



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

34
am

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE
NAPROXEN EN TABLETAS POR ESPECTROSCOPIA
EN EL INFRARROJO,

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A,
JORGE LOPEZ TRUJILLO

U N A M
F E B
Z A R A G O Z A



LO QUE NO SE
DE NUESTRA DEFENSION

DIRECTOR; M. EN C. A. LOURDES CASTILLO GRANADA

MEXICO. D F,

FEBRERO 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
ESPECTROSCOPÍA L - 328, Y LABORATORIO L - 314

CAMPUS II

F. E. S. ZARAGOZA

U. N. A. M.

Parte de éste trabajo fue presentado en el:
XXVIII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Del 22 al 26 de Octubre de 1995
Mérida, Yucatán.

AGRADECIMIENTOS

A mi Director:

M. en C. A. LOURDES CASTILLO GRANADA

Un gran ser humano a quien gracias a su comprensión, apoyo, dedicación y profesionalismo debo la realización de éste trabajo.

A los profesores:

BIOL. MARICELA ARTEAGA MEJIA
M. en C. J.L. MIGUEL CASTILLO GONZÁLEZ

Por la confianza y el apoyo brindados.

A mis Sinodales:

Por las observaciones y sugerencias para la elaboración de éste trabajo.

A mis Maestros:

Por que cada uno dió lo mejor de sí para que yo alcanzara esta meta.

DEDICATORIAS

A mis Padres:

TERESA Y FORTUNATO

Por todo el cariño, apoyo, comprensión y aliento que me han dado siempre; y por que gracias a ustedes comprendi los verdaderos valores de la vida.

A la compañera de mi vida:

ROSALBA

Por la comprensión, y el apoyo recibidos durante la elaboración de éste trabajo; y por todo ese AMOR que me brinda y que me hace sentir completo.

A mis hermanos:

BETTY Y JOSÉ LUIS

Que siempre han estado presentes conmigo y que me han ayudado a mantener lo más sagrado de la vida: mi familia.

A mis sobrinos:

**ERICK SEBASTIAN
ALEXIS IVAN
JAFETH**

Quienes con su inocencia y su alegría me han dado ánimos para seguir adelante.

DEDICATORIAS

A mis Abuelitas:

‡ ZENAIDA
VIRGINIA

Que aunque lejos, están siempre en mi mente como un ejemplo de lucha incansable por la vida.

A: Sra. GUADALUPE DÍAZ
Sr. JORGE ORTÍZ

Por la confianza y las atenciones que me han brindado.

A mis cuñados:

LAURA
ELIZABETH
SEBASTIAN

A mis amigos:

Paty, Gaby, Alma D., Alicia, Lucy, Irene, Lalo, Eva, Cuauhtémoc, Ludivina, Jorge L., Martha, Maribel, Lety, Raúl, Fernando, Alfredo, Agustín, Ossiel. Y a mis compañeros de la generación 89 - 93

A quienes debo una gran parte de mi formación como ser humano.

A mis alumnos de la Escuela Secundaria Ofic. # 587, especialmente al grupo 3ºB (generación 92-95), 3ºA y 3ºC (generación 93-96). Por que con su alegría y sus ganas de vivir me dieron ánimos para seguir adelante.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
I INTRODUCCIÓN	2
II FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA	4
I. FARMACOLOGÍA DEL NAPROXÉN	4
2. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	7
3. MÉTODOS DE ANÁLISIS	8
3.1. Métodos Oficiales	8
3.2. Métodos No Oficiales	8
4. ESPECTROFOTOMETRÍA EN EL IR	10
4.1. Antecedentes Históricos	10
4.2. Principios Teóricos	12
4.3. Aplicaciones	16
4.4. Instrumentación	20
5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	28
5.1. Definiciones, Determinaciones y Criterios	29
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38

	Página
IV OBJETIVOS	40
V HIPÓTESIS	41
VI MÉTODO	42
1. MATERIAL	42
2. EQUIPO E INSTRUMENTOS	42
3. REACTIVOS	42
4. PROCEDIMIENTO	43
VII RESULTADOS	45
VIII ANÁLISIS DE RESULTADOS	60
IX CONCLUSIONES	64
X ANEXO	66
1. ABREVIATURAS	66
2. FORMULARIO ESTADÍSTICO	67
XI BIBLIOGRAFÍA	82

RESUMEN

En su aplicación como antiinflamatorio, analgésico y antipirético, el Naproxén se ofrece al público en su forma libre o como sal de sodio en diferentes concentraciones y formas farmacéuticas, entre ellas las tabletas. Para su análisis cuantitativo como producto terminado, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos describe un método basado en la absorción de radiación ultravioleta.

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico alternativo para la cuantificación de Naproxén libre en tabletas por Espectroscopía en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR).

El método consistió en realizar una extracción del principio activo con cloroformo, para después efectuar las lecturas de absorbancia del extracto y comparar contra una curva de calibración.

Para asegurar la confiabilidad del método, se realizó su validación.

Con base en los resultados obtenidos, puede afirmarse que el método es lineal, exacto, preciso y específico. La estabilidad máxima de la muestra analítica es de 24 hrs. por lo que debe procesarse después de la extracción.

Se concluyó que el método propuesto cumple con las características necesarias y puede ser utilizado de manera confiable en el trabajo rutinario para cuantificar Naproxén libre en tabletas. De esta manera, se hizo evidente la utilidad de la espectroscopía FTIR en el análisis cuantitativo, ya que ofrece, entre otras ventajas, el tener una mayor variedad de bandas de absorción de las que se puede seleccionar la más adecuada para la cuantificación del compuesto; además, permite tener un control sobre productos de degradación y otras sustancias que puedan presentarse durante la determinación. Esto permite que dicha técnica pueda adaptarse a una gran variedad de principios activos en diversas formulaciones.

I. INTRODUCCIÓN.

Es de suma importancia garantizar que los productos farmacéuticos que llegan al público sean seguros y efectivos. Y es precisamente el Químico Farmacéutico Biólogo el responsable de la producción de bienes e insumos para la salud, así como de comprobar constantemente la seguridad y eficacia de estos (1).

Cuando un medicamento es suministrado a un paciente se da por hecho que cumple con ciertas características las cuales permitirán obtener una respuesta fisiológica deseada. Esto presupone que el principio activo estará en la cantidad adecuada, que sea estable dentro de la formulación, y biológicamente disponible; asimismo, debe asegurarse que haya sido producido en un medio libre de cuerpos extraños y puesto en un contenedor que lo proteja de algún cambio potencial (2).

Todos los medicamentos tienen que cumplir con las normas especificadas en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, las cuales establecen las características de calidad (identidad, pureza, concentración, potencia e inocuidad), así como los métodos de prueba y análisis que se tienen que aplicar para determinar si el medicamento cumple o no con los requerimientos legales. Las características de calidad se agrupan en físicas, biológicas y químicas; para estas últimas se aplican métodos analíticos que permitan determinar la concentración del fármaco o sustancias relacionadas (1).

Hoy en día, se invierte una gran cantidad de tiempo y dinero en investigaciones durante el desarrollo de un nuevo fármaco, así como en establecer nuevos sistemas para asegurar que los productos que ya están en el mercado cumplan con todas las especificaciones (1, 2).

La necesidad de realizar determinaciones analíticas cada vez más precisas y exactas ha dejado de lado el uso de los métodos gravimétricos y

volumétricos, y se ha permitido el desarrollo de otros más específicos conocidos como: Métodos de Análisis Instrumental. Estos se basan en la propiedad de una sustancia de absorber radiación desde alguna región del espectro electromagnético como puede ser la ultravioleta (UV), visible, e infrarroja (IR), entre otras, y a través de un sistema electrónico obtener el valor de una propiedad determinada (3).

Es importante establecer la confiabilidad de estos métodos de análisis, ya que son un elemento importante para determinar la calidad de un medicamento.

En México la Ley General de Salud, que regula las actividades de los establecimientos que se dedican a la producción de medicamentos, asigna un estatuto legal a esta actividad al establecer que los controles analíticos de materias primas, productos en proceso y productos terminados, deben demostrar ser confiables mediante el proceso de *validación* (1).

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico para la cuantificación de Naproxén libre en tabletas por Espectroscopía en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier.

El método consiste en realizar una extracción del principio activo en cloroformo y efectuar la lectura directa del extracto en comparación con un estándar.

La validación del método analítico mostró que éste es lineal, exacto, preciso y específico, además de ser muy rápido. La muestra analítica debe ser examinada en las 24 horas posteriores a su preparación. Por todo ello, el método analítico puede ser utilizado de manera confiable como prueba de control de calidad.

II. FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.

1. FARMACOLOGÍA DEL NAPROXÉN.

La inflamación es un mecanismo importante para proteger al organismo contra el ataque de agentes invasores; sin embargo, también es la causa de la incapacidad que aparece junto con una diversidad de trastornos. En la artritis, la prolongación de la reacción inflamatoria puede ocasionar limitación de la función de las articulaciones y destrucción de hueso y cartilago, así como de otras estructuras articulares.

Esta reacción suele iniciarse por antígenos virales, bacterianos, protozoarios o micóticos, o bien por un traumatismo.

Los salicilatos y otros agentes empleados para tratar las enfermedades reumáticas suprimen los signos y síntomas de la inflamación, y algunos también ejercen acciones analgésicas y antipiréticas (4).

Los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos constituyen un grupo heterogéneo de compuestos con ciertas relaciones químicas, muchos de ellos son ácidos orgánicos débiles que comparten acciones terapéuticas así como efectos colaterales. El prototipo es la Aspirina, por ello, estos compuestos a menudo se mencionan como fármacos tipo aspirina ó como fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE) para distinguirlos de los glucocorticoides, también se les conoce como analgésicos no narcóticos para diferenciarlos de los opioides y como analgésicos antipiréticos.

La prolongada historia del uso y disponibilidad sin prescripción de la aspirina, además de los efectos colaterales (tales como la irritación gástrica) han conducido a la búsqueda de compuestos alternativos (4, 5, 6).

El Naproxén es un fármaco sintético antiinflamatorio no esteroide y no narcótico derivado del ácido fenilpropiónico. Este fármaco, junto con algunos

otros (Ibuprofeno, Ketoprofeno, Fenoprofeno, etc.), fueron introducidos en terapéutica desde 1975 y han sido aprobados para el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos como la artritis reumatoide, osteoartritis, dolor postparto, etc. Además de su uso en enfermedades articulares, esta autorizado para emplearse en la dismenorrea primaria (4, 6, 7).

Se considera que la faceta fundamental de su mecanismo de acción la constituye la inhibición de la prostaglandinsintetasa (ciclooxigenasa) que es la enzima responsable de la biosíntesis de prostaglandinas y de otros autacoides (tromboxano y prostacilinas) los cuales han demostrado ser participantes fundamentales en la patogénesis de la inflamación. Asimismo, hay buenas evidencias que indican que las dosis terapéuticas de estos fármacos inhiben la agregación plaquetaria y prolongan el tiempo de protrombina, reduciendo así la formación de las prostaglandinas por las plaquetas (4, 5, 7).

El Naproxén se metaboliza por desmetilación y se elimina principalmente a través de la orina como glucurónido. Se fija en un 99% a las proteínas plasmáticas; atraviesa la placenta y aparece en la leche hasta en 1% de la concentración plasmática materna. El Naproxén se absorbe bien a través del tracto gastrointestinal, alcanzando una concentración plasmática máxima entre 1-2 horas después de su administración oral; por administración rectal esta concentración se logra más lentamente. La presencia de alimento en estómago modifica la rapidez pero no el grado de absorción.

La potencia analgésica y antiinflamatoria del Naproxén es menor que la observada con la Indometacina y mayor que la Aspirina (7).

Suele ser efectivo sólo contra el dolor de intensidad baja a moderada. Carece de las acciones indeseadas de los opiáceos sobre el sistema nervioso central, incluyendo depresión respiratoria y desarrollo de la dependencia física; además, no cambia la percepción de las modalidades sensitivas, excepto la del dolor. Se controla bien el dolor pos quirúrgico crónico o el que surge a causa

de la inflamación, pero no alivia el que se origina en una víscera hueca.

Como antipirético, este fármaco reduce la temperatura en los estados febriles, pero no influye sobre la temperatura cuando es aumentada por factores como el ejercicio o el incremento de la temperatura ambiente (5).

Este fármaco encuentra su aplicación clínica principal como agente antiinflamatorio, pero no detiene el progreso de la agresión patológica a los tejidos durante los episodios graves (5, 8).

En general, las molestias gastrointestinales por uso de estos medicamentos no suelen ser problema. La intoxicación aguda es menos peligrosa que con la aspirina o el paracetamol. La vida media prolongada del Naproxén (13 horas), a diferencia de la aspirina (3-6 horas), hace posible su administración tan sólo en dos tomas diarias (4, 5).

2. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.

NAPROXÉN: *Ácido (S)-6-metoxi- α -metil-2-naftalenoacético*

$C_{14}H_{14}O_3$

P.M. = 230.26 g/mol

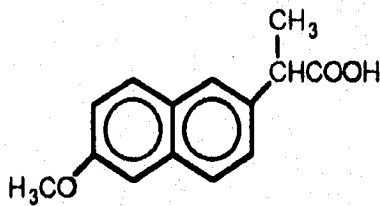


FIG. 1. Estructura química del Naproxén (8).

El Naproxén libre (fig. 1) también es llamado ácido (+)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanoico. Comercialmente recibe varios nombres entre los cuales están: Naprosyn, Naxén, Prexan (8).

Es polvo cristalino blanco de sabor amargo. Punto de fusión: 152-154 °C (8, 9).

Solubilidad: Muy poco soluble en agua a pH 2, ligeramente soluble en agua a pH 8 o más. Soluble en 25 partes de etanol (96%), en 20 partes de metanol, en 15 partes de cloroformo y en 40 partes de éter (9, 10).

Uso terapéutico: Antiinflamatorio, analgésico y antipirético (8).

3. MÉTODOS DE ANÁLISIS.

3.1. MÉTODOS OFICIALES.

3.1.1. British Pharmacopoeia (1988). La Farmacopea Británica presenta un método en el cual se realiza la extracción del principio activo de las tabletas con metanol, para después medir la absorbancia de la muestra analítica en la región UV a 331 nm. El contenido de Naproxén se calcula tomando como referencia el valor de absorbancia de 81 (1%, 1cm) al máximo de 331 nm (10).

3.1.2. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (1994). Aquí se describe un método similar al anterior, la diferencia radica en que en éste se utilizan dos soluciones: una de referencia y otra de la muestra. La primera se prepara a partir de Naproxén estándar en metanol, y la segunda se obtiene al extraer el principio activo de las tabletas con el mismo disolvente. Finalmente, se compara la absorbancia de ambas soluciones en la región UV a 332 nm (11).

3.2. MÉTODOS NO OFICIALES.

3.2.1. Hogue y Landgraf (1981). Describen el uso de un detector específico para la determinación cuantitativa de Naproxén en tabletas y cápsulas. Se trata de un sensor electroquímico denominado "*Electrodo Específico para el Ión Naproxinato*", el cual es capaz de detectar el ión 2-(6-metoxi-2-naftil)naproxinato con buena selectividad y sensibilidad, además de algunos parámetros adicionales tales como linealidad del método y especificidad.

Antes de usarlo, se deja de 12 a 24 horas en una solución 10^{-2} M del ión naproxinato, para su pre-acondicionamiento lo cual ayudará a reducir el tiempo

de respuesta.

La cuantificación del Naproxén se hace a partir de mediciones hechas sobre una solución 0.1 M de tetraheptilamonio naproxinato en decanol. Esta solución se obtiene a partir de una reacción de transferencia de fase que involucra soluciones acuosas 0.1 M de los iones naproxinato y tetraheptilamonio. El cloruro de metileno es usado como disolvente de transferencia. La reacción dura 18 horas a temperatura ambiente. El producto se remueve de la fase acuosa y se agrega decanol para obtener una solución 1 M. La respuesta del electrodo se calibra usando soluciones de naproxinato sódico de 10^{-2} a 10^{-5} M (12).

Las características de operación son las siguientes (op. cit.):

- Concentración del naproxinato como sal de amonio en decanol = 0.1M
- Rango de respuesta lineal (conc. del ión) = 10^{-1} a 10^{-5} M
- Efecto del pH = el uso del electrodo debe ser a pH > 7
- Tiempo de respuesta = 30 s (para el estándar)
2 min (para tabletas y cápsulas).

3.2.2. Kwayke (1985). Muestra el uso de la Resonancia Magnética Nuclear como método analítico para cuantificar algunos fármacos, entre ellos Naproxén.

El método consiste en realizar una extracción con CDCl_3 de una muestra que contiene Naproxén y un estándar interno (3-acetobenzotiofeno). Con el extracto se obtiene el espectro de NMR, se eligen las señales apropiadas, tanto para la referencia como para la muestra, y el área bajo la curva es obtenida por medio de una integración. Con esos datos del estándar interno y la muestra, y el peso del estándar tomado, se calcula la cantidad de un componente en la muestra (13).

4. ESPECTROFOTOMETRIA EN EL INFRARROJO.

4.1. *ANTECEDENTES HISTÓRICOS.* Las investigaciones sobre la utilidad de la región infrarroja del espectro electromagnético, tienen una larga historia. El descubrimiento de energía radiante más allá del final del rojo de la región visible fué hecha por el astrónomo Sir William Herschel, en 1800. Él midió la energía térmica de la luz del sol al colocar un termómetro en esta radiación después de ser dispersada por un prisma, observando el efecto calorífico de diferentes partes del espectro y descubriendo las altas temperaturas que se dan después de la región roja del espectro.

Investigaciones en esta región se realizaron lentamente. El progreso fué limitado primero por la necesidad de usar "placas fotográficas" para la detección de bandas de absorción. En 1882 Abney y Festing reportaron interesantes resultados que daban la relación existente entre grupos atómicos y líneas de absorción de una serie de 52 compuestos de 0.7 a 1.2 μm que fué el límite de sensibilidad de esas "placas fotográficas". También demostraron que algunas de esas absorciones eran características de compuestos con grupos etilo o de compuestos con anillos de benceno.

Por 1890, Angstrom extiende las investigaciones de algunos compuestos a 8 μm , usando un bolómetro y un prisma de cloruro de sodio. Él reportó bandas de absorción del CO, CO₂, disulfuro de carbono y otros hidrocarburos simples (14, 15).

Un trabajo más extenso involucró espectros de absorción de 20 compuestos orgánicos en la región de los 10 μm , reportado por Julius en 1892. Él descubrió que todos esos compuestos contenían un grupo -CH₃ al mostrar una banda de absorción a 3.45 μm , y llegó a la importante conclusión de que la absorción de ondas de calor es debida a movimientos intramoleculares.

Por 1898, se observó que las bandas de absorción del vapor de agua se

encontraban en una región más lejana dentro del infrarrojo (20 μm). La cristalización del agua, similitudes y diferencias entre los isómeros del xileno, y el movimiento de las bandas de absorción debido a la presencia de solventes, se dieron a conocer por el año de 1900 (15).

Uno de los trabajos más amplios fué el de un físico del Instituto Carnegie de Washington, William W. Coblentz, quien trabajó ignorado por los químicos de su época. Sus estudios los inició en 1903 mientras era estudiante graduado de la Cornell University. Para 1905, Coblentz había reconocido claramente el potencial de la espectroscopía en el infrarrojo como una herramienta para el análisis químico. Por 1910, obtuvo el espectro de absorción de un gran número de sustancias y dió las bases para algunas correlaciones usadas hoy en día (14, 15, 16, 17).

A mediados de los años 30's y principios de los 40's, investigaciones en el área de la química tales como las de H. W. Thompson y G. B. B. M. Sutherland en Inglaterra, y de J. Lecomte en Francia, extendieron rápidamente los fundamentos para la aplicación de esta técnica en la elucidación de la estructura molecular. De esta manera, en 1935, comenzaron a utilizarse los primeros espectrofotómetros en el infrarrojo para trabajos teóricos en moléculas pequeñas (15, 16, 17).

Bajo la presión de la Segunda Guerra Mundial (1939-1945), se empezaron a utilizar las nuevas técnicas para el estudio de largas y complejas moléculas. Estos esfuerzos fueron altamente fructíferos, particularmente en el campo del hule sintético y en la química del petróleo.

Los espectrofotómetros de infrarrojo de un sólo haz fueron comercialmente disponibles en 1944. En estos instrumentos la difracción de la luz se hacía por medio de un prisma (14, 16, 17).

En 1947 se dió un cambio radical cuando Baird Associates introdujeron al mercado los primeros espectrofotómetros de DOBLE HAZ, que

automáticamente registraban la transmitancia contra la longitud de onda. Instrumentos similares fueron producidos por Perkin-Elmer y Beckman Instruments en los Estados Unidos y por Hilger & Wats en Inglaterra (16, 17).

Todos estos instrumentos sufrieron una serie de innovaciones, hasta llegar a los modernos espectrofotómetros manejados por microprocesador. El primero de estos instrumentos apareció en 1988 y fué denominado: Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformadas de Fourier; el cual, en lugar de dispersar la luz, utiliza un interferómetro del que se obtiene una señal llamada interferograma, a este patrón de interferencia se le aplican las ecuaciones de Transformadas de Fourier por medio de una computadora que lo convierte al final en un espectro típico en el infrarrojo. Entre las ventajas que ofrecen estos instrumentos, con respecto a los dispersivos, se encuentran su mayor sensibilidad y resolución, además de que permiten llevar a cabo análisis más rápidos (15).

La introducción de esos instrumentos marcó el principio de un periodo revolucionario de crecimiento para las aplicaciones químicas del infrarrojo (16).

4.2. PRINCIPIOS TEÓRICOS. Los métodos espectrofotométricos basados en la absorción de radiación electromagnética, como resultado de su interacción con la materia son llamados *Métodos de Análisis Instrumental* e incluyen los rayos X, las técnicas de ultravioleta (UV), visible (V), infrarroja (IR), resonancia magnética nuclear (RMN), absorción atómica (AA), y fluorescencia atómica (9).

La interacción entre una molécula y la radiación electromagnética origina un cambio en la energía electrónica o en la energía cinética de la molécula o en ambas. En la mayoría de los casos, la energía absorbida se convierte rápidamente en energía de tipo vibracional, rotacional y traslacional (9, 18).

La región infrarroja, localizada entre las regiones del visible y las microondas, corresponde al intervalo de longitud de onda entre 0.75 y 500 μm o, en número de onda, de 14,286 a 20 cm^{-1} (15).

Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los instrumentos es conveniente que la región infrarroja del espectro se divida en tres partes: infrarrojo cercano, medio y lejano. En la tabla I se indican los límites de cada una (3, 15, 19).

DIVISIÓN	INTERVALOS EN LONGITUD DE ONDA (λ) μm	INTERVALOS EN NÚMERO DE ONDA ($\bar{\nu}$) cm^{-1}
IR Cercano	0.75 a 2.5	14,286 a 4 000
IR Medio	2.5 a 25	4 000 a 400
IR Lejano	25 a 500	400 a 20

TABLA I. División de la región infrarroja (3).

El intervalo más común para el análisis cualitativo y cuantitativo de moléculas orgánicas es el existente entre los 2.5 a 16 μm (4 000 a 625 cm^{-1}), localizado en el infrarrojo medio (9, 20).

Para entender las causas por las cuales una molécula orgánica absorbe la radiación infrarroja, es necesario tomar en cuenta algunas consideraciones importantes.

Una molécula no es un conjunto rígido de átomos como lo suponen varias representaciones, más bien se puede comparar con un sistema dinámico formado por esferas de diferente tamaño las cuales representan a los átomos de las moléculas y resortes de longitudes variables que corresponden a los enlaces químicos de la misma (15).

De esta forma, las posiciones relativas de los átomos de una molécula con uniones covalentes no están exactamente fijas, sino que cambian continuamente como consecuencia de diferentes vibraciones. La energía necesaria para que las moléculas efectúen estos movimientos vibracionales es del orden del contenido energético de la radiación infrarroja (15, 18, 19, 21).

Al interactuar las moléculas con la radiación IR, algunas de las porciones de la radiación incidente se absorben a determinadas longitudes de onda. Las múltiples vibraciones que ocurren en forma simultánea producen un espectro de absorción altamente complejo que depende de las características de los grupos funcionales en la molécula (18, 21).

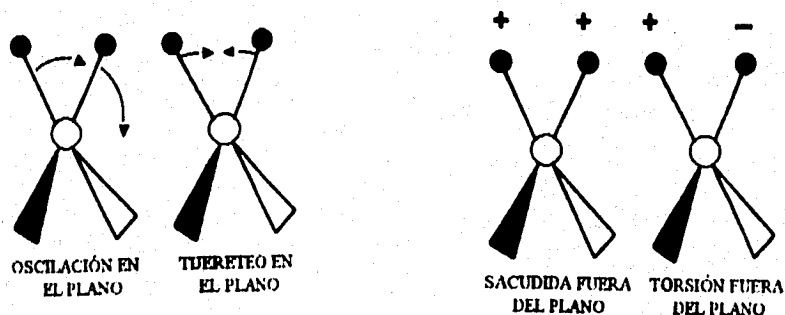
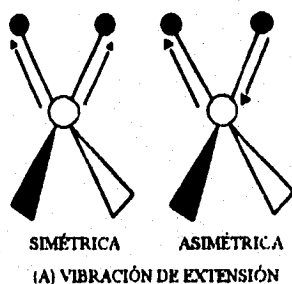
Los mismos grupos funcionales presentes en las diferentes clases de compuestos químicos absorben radiación infrarroja a frecuencias esencialmente idénticas y las bandas tienen la misma intensidad dentro de dicho compuesto, esas bandas son predecibles y sirven al analista para elucidar, comprobar y cuantificar una sustancia en particular en una muestra.

La frecuencia e intensidad de las bandas de absorción infrarroja exhibidas por un compuesto químico caracterizan únicamente a ese material (18).

Para que la radiación IR sea absorbida por una molécula, se deben cumplir dos condiciones. Primero, la molécula debe poseer una frecuencia vibracional idéntica a la de la radiación incidente. La molécula absorberá entonces la energía radiante aumentando su vibración natural. En segundo lugar, la vibración debe ir acompañada de un cambio neto en la magnitud o dirección del momento dipolo (9, 15, 21).

La espectroscopía IR implica movimientos vibracionales de las moléculas que corresponden a dos categorías básicas: "Stretching" o de extensión (estiramiento, alargamiento, tensión); y "Bending" o flexión (deformación) (15, 18, 19, 21).

a) **Stretching o extensión** (fig. 2-A). Este tipo de vibración supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos sin que exista variación en el ángulo de enlace, y puede ser simétrica o asimétrica. En el estiramiento simétrico los dos átomos se mueven a distancias iguales en direcciones opuestas, con respecto al átomo central. En el estiramiento asimétrico, los centros donde se encuentran las cargas positivas y la negativa se mueven de tal manera que el centro eléctrico del grupo se desplaza alejándose del átomo central (15, 18, 19).



(B) VIBRACIONES DE FLEXIÓN

FIG. 2. Tipos de vibraciones moleculares. (+) indica movimiento del plano de la página hacia el lector, (-) significa movimiento del plano de la página alejándose del lector (19, 21).

b) Bending o flexión (fig. 2-B). Se caracterizan por un cambio en el ángulo de dos enlaces (la posición de los átomos varía en relación al eje de enlace original). Se consideran 4 tipos: de oscilación, de tijeras, de sacudida y de torsión (15, 18, 19, 21).

Para expresar la posición de las bandas de absorción, se emplea la longitud de onda o el número de onda en cm^{-1} , éste último es el inverso de la longitud de onda expresada en cm, $\bar{\nu} = 1/\lambda$

donde,

$\bar{\nu}$ = no. de onda

λ = longitud de onda en cm

De esta manera, el número de onda representa el número de ondas de la radiación contenidas en un centímetro (19, 22).

El espectro de infrarrojo puede ser obtenido rápidamente de materiales en forma sólida, líquida, y gas (18).

4.3. APLICACIONES. La espectroscopía en el infrarrojo tiene fundamentalmente dos aplicaciones: el análisis CUALITATIVO y el CUANTITATIVO.

4.3.1. Análisis Cualitativo. La principal utilidad de la espectroscopía en el infrarrojo ha sido la identificación de grupos funcionales en compuestos orgánicos, ya que los espectros correspondientes suelen tener numerosas bandas de absorción que pueden servir para realizar comparaciones e interpretaciones. Con excepción de los isómeros ópticos, no existen teóricamente dos compuestos que absorban exactamente igual y como consecuencia presenten el mismo espectro (19).

El espectro de absorción en el infrarrojo contiene información básica acerca de la composición y estructura de un compuesto. Los grupos funcionales de los compuestos químicos tienen frecuencias de absorción características, las

cuales pueden o no ser afectadas por el resto de la molécula. Un compuesto desconocido, puede a menudo ser identificado al señalar la posición de las diferentes frecuencias de absorción y asociarlas con las cartas de correlación estructura-espectro, las cuales son un compendio de datos sobre los grupos funcionales más comunes y las bandas de absorción características de cada uno de ellos que se presentan siempre, independientemente del compuesto químico en el que se encuentren. Con ellas, el investigador puede determinar la característica estructural de un compuesto desconocido y reducir así el número de posibilidades (20).

De esta manera, para el análisis cualitativo se deben de observar tres características importantes de las bandas de un espectro: posición, forma e intensidad (23).

4.3.2. Análisis Cuantitativo. Hoy en día, con la introducción de los instrumentos con Transformadas de Fourier, la espectrofotometría infrarroja se emplea cada vez más en el análisis cuantitativo. En este caso, su enorme ventaja reside en la selectividad que tiene, lo que posibilita la cuantificación de un componente en una mezcla compleja sin la separación de otras sustancias o productos de degradación del mismo compuesto presentes en la muestra (19).

En una serie de estándares de concentración conocida la intensidad de una banda de absorción a una misma longitud de onda es proporcional a la concentración del componente que la causa. Por ello, la cuantificación de un compuesto puede efectuarse por comparación de la intensidad de una banda característica de este, con las intensidades de la banda a esa misma frecuencia medidas a diferentes concentraciones del componente puro, para el análisis de mezclas lo único que se requiere es una banda de absorción para cada uno de los componentes, de intensidad apreciable y que no se sobreponga con la de otros en la muestra total (15, 20).

El análisis cuantitativo infrarrojo se fundamenta en la ley de Lambert-Beer que se basa en la intensidad relativa de radiación que llega al detector o el porcentaje de transmisión de la radiación incidente al pasar por la muestra (15, 19, 20, 21, 23).

La Ley de Beer expresa, precisamente, la relación entre la cantidad de energía absorbida y su relación directa con la concentración del elemento a cuantificar: la absorbancia es directamente proporcional a la trayectoria de la radiación a través de la solución y a la concentración de la especie que produce la absorción. Dependiendo de las unidades de medida, esta ley puede ser escrita en una variedad de formas (9, 19, 20):

$$A = ecl/P.M. = abc = \log I_0/I = -\log T = \log 1/T = \log 100/\%T$$

$$T = I/I_0$$

donde:

A = absorbancia.

c = concentración en gramos por litro.

l = b = grosor de la celda en cm.

a = e/P.M. = absorptividad molar, es una constante de proporcionalidad y es característica del compuesto para esa absorción particular.

e = absorptividad molar o coeficiente de extinción molar. Esta es una característica de la muestra en una frecuencia particular. Esta es casi la misma para un grupo de compuestos si la banda de absorción es característica de ese grupo.

I_0 = intensidad de la radiación incidente.

I = intensidad de radiación transmitida.

T = Transmitancia, es la razón de la energía transmitida y la energía incidente sobre la muestra.

El procedimiento para la cuantificación de un componente, es la medida de la absorbancia a diferentes concentraciones del compuesto puro (15, 19, 21).

Existe un método práctico para medir la absorbancia empleando la altura de las bandas de absorción: el método de la *línea base* (15).

Este método implica la selección de una banda de absorción de la sustancia analizada, que no quede muy cercana a las bandas de otros componentes de la matriz (19, 21).

Una vez elegida la banda, se dibuja una línea recta tangente a la curva de absorción espectral que representa la línea base de absorción de la muestra, para lo que se toman las siguientes consideraciones (fig. 3):

-Si no existen sustancias que interfieran, se dibuja la *línea 1*.

-Si está presente una sustancia extraña, cuya interferencia se encuentra del lado de mayor longitud de onda, se dibuja la *línea 2*. Si la interferencia se encuentra del lado de menor longitud de onda, se dibuja la *línea 3*.

-Si la banda perturbadora está cerca de la banda analítica, pero su efecto es esencialmente constante sobre el intervalo de análisis, se podría aplicar la *línea 4*.

-Cuando la transmitancia del disolvente es constante o al menos cambia linealmente entre los hombros de la banda analítica, se puede aplicar la *línea 5* o la *línea 6*. Las desviaciones provienen de efectos instrumentales o químicos (15, 19, 21, 23).

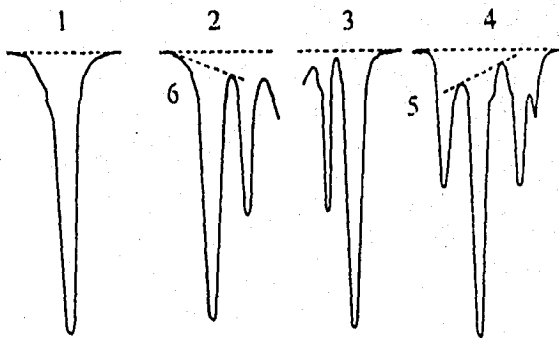


FIG. 3. Formas de dibujar la línea base en una banda de absorción (15).

En un espectrofotómetro de Infrarrojo, se puede leer directamente transmitancia o absorbancia (fig. 4) (9, 19).

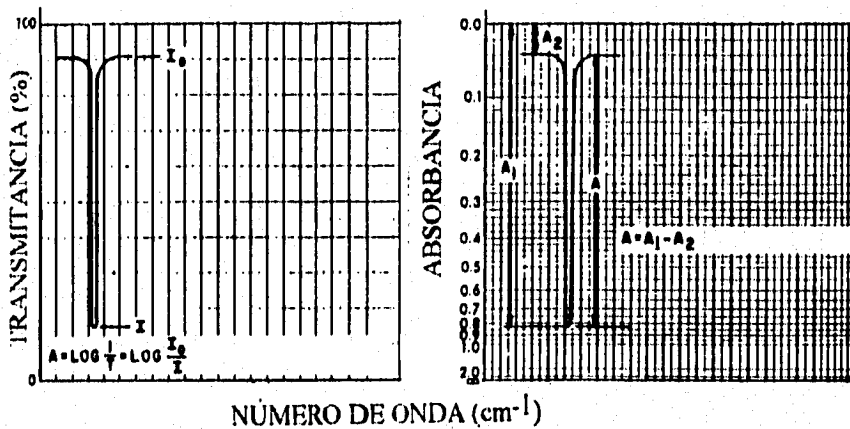


FIG. 4. Manera de medir la absorbancia en un espectro en el infrarrojo (20).

Una vez obtenidos los datos de absorbancia, estos se grafican como función de la concentración en un intervalo determinado de la misma para construir una *curva de calibración*. La absorbancia del compuesto problema se interpola en la curva de calibración para obtener la concentración desconocida (9, 19).

Para el análisis cuantitativo en el infrarrojo, se utiliza la misma celda en todas las determinaciones.

4.4. INSTRUMENTACIÓN. Los instrumentos utilizados en el infrarrojo pueden agruparse en dos categorías: dispersivos y no dispersivos (21).

4.4.1. Instrumentos Dispersivos. Los principales componentes de un espectrofotómetro de infrarrojo dispersivo son (10, 17, 19, 21):

- a) la fuente de radiación
- b) el sistema dispersivo
- c) el detector

En un instrumento dispersivo de doble haz, la luz policromática de una fuente infrarroja se divide en dos haces iguales, uno es el haz de referencia y el otro el haz de la muestra; para unirse, antes de pasar a través de un espejo sectorial o "choper" (divisor de haz) cuya función es dejar pasar intermitentemente la luz proveniente de la muestra y de la referencia, estas dos señales pasan al monocromador a través de una rendija; el monocromador tiene como elemento dispersante una rejilla de difracción. La luz monocromada que pasa a través de la rendija de salida del monocromador llega al detector y posteriormente esta señal se amplifica y se registra, dando como resultado un espectro (fig. 5) (17, 21).

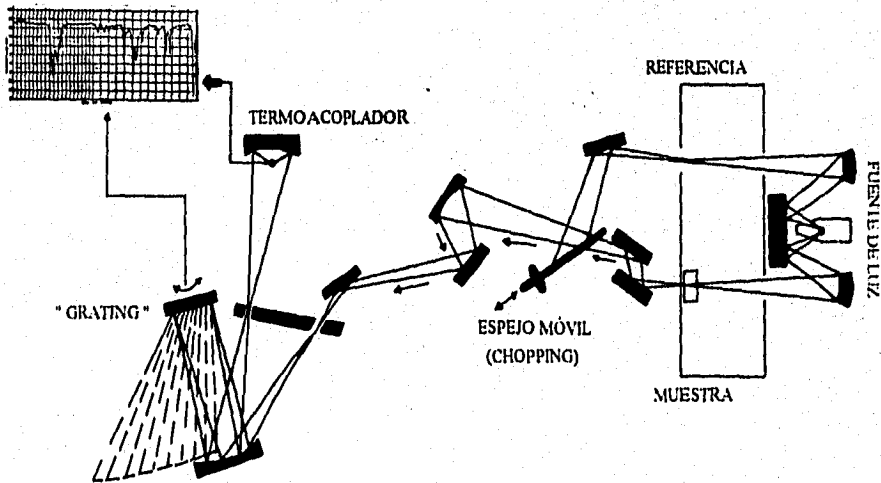


FIG. 5. Diagrama óptico de un espectrofotómetro infrarrojo dispersivo (15).

Los componentes de un instrumento dispersivo se enlistan en la tabla II (10, 17, 19, 21).

SISTEMA	COMPONENTES (Infrarrojo medio)
Fuente de radiación	Filamento de Nernst, Fuente Global, Tira de Nicromo (níquel-cromo)
Sistema dispersivo	Rejilla de difracción con un monocromador de prisma o filtros infrarrojos
Detector	Termopar, Bolómetro, Detector Neumático de Golay

TABLA II. Componentes de un Espectrofotómetro Infrarrojo Dispersivo.

En los instrumentos no dispersivos no se usan prismas o rejillas. La radiación total de una fuente infrarroja se hace pasar a través de la muestra produciendo una mayor potencia de señal (21).

4.4.2. Instrumentos No Dispersivos (FTIR). La Espectroscopía en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR) es hoy la técnica no dispersiva de preferencia sobre la espectroscopía IR dispersiva para manejar muestras cada vez más pequeñas y complejas. Su sensibilidad y resolución superan a los instrumentos dispersivos, su exactitud de longitud de onda absoluta, y la mayor precisión de las mediciones son algunas de las razones que están avalando su amplio uso (9, 19).

Los componentes principales de un espectrofotómetro en el infrarrojo con transformadas de fourier se encuentran en la tabla III (15, 17).

SISTEMA	COMPONENTES
Fuente de radiación	Filamento de Nernst, Fuente Global, Tira de Nichromo
Interferómetro	De Michelson, de Péndulo
Detector	De sulfato de triglicina deuterado, de mercurio-cadmio-telurio, de tantalato de litio
Procesamiento de datos	Computadora

TABLA III. Componentes de un Espectrofotómetro Infrarrojo con Transformadas de Fourier.

a)Fuente de radiación. Este instrumento utiliza la misma fuente de radiación que un dispersivo.

b)Interferómetro. Existen de dos tipos:

-Interferómetro de Michelson. Es un sistema para dividir un haz de radiación en dos y luego volver a combinar los haces introduciendo una diferencia en su trayectoria. Este haz combinado pasa a través de la muestra y va hacia el detector. La división del haz se logra con un separador que transmite aproximadamente el 50% y refleja el otro 50%. Una parte del haz va hacia un espejo fijo y el otro a un espejo que puede moverse para introducir una diferencia de variación en la trayectoria obteniéndose un patrón de interferencia (15, 17).

-Interferómetro de péndulo. El principio de funcionamiento es similar al anterior. La diferencia es que en lugar de que haya un desplazamiento lineal del espejo móvil (lo cual ocasiona incremento del ruido, error en los valores de transmitancia y pérdida de resolución) hay una rotación de cierto número de grados (17).

c) Detector. Normalmente se utilizan tres tipos de detectores:

-De Sulfato de Triglicina Deuterado (DTGS). Este detector es el más común. Consta de un dispositivo piroeléctrico operado a temperatura ambiente y tiene una respuesta más rápida que el termopar.

-De Mercurio-Cadmio-Telurio (MCT). Es un dispositivo fotoconductor que opera a la temperatura del nitrógeno líquido. Tiene mejor respuesta a frecuencias de modulación altas que el DTGS. Es recomendable para muestras algo opacas.

-De Tantalato de Litio (LiTaO). Es de bajo costo, opera a temperatura ambiente como el DTGS, pero es menos sensible que este.

d) Sistema de procesamiento de datos. Consiste de una computadora capaz de realizar las operaciones matemáticas de Transformadas de Fourier (15, 17).

Básicamente, la técnica es un acoplamiento del interferómetro de Michelson con un detector infrarrojo sensible. En el interferómetro de Michelson no hay monocromador y la radiación de muchas frecuencias pasa a través de la muestra. En lugar de dispersar la radiación policromática como lo haría un espectrofotómetro dispersivo convencional, el espectrofotómetro de Transformadas de Fourier efectúa una transformación de frecuencia. No se requiere dispersión o filtros que desperdician energía, y esto representa una gran ventaja (9, 21).

El Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformadas de Fourier tiene una fuente luminosa que emite luz infrarroja policromática, la cual llega a un divisor de haz hecho normalmente de bromuro de potasio (KBr) o Yoduro de Cesio (CsI) colocado en una posición de 45° y con un pequeño recubrimiento de germanio en la parte posterior. La función de éste, es dividir el haz procedente de la fuente en dos partes iguales: la primera de ellas que refleja hacia un espejo fijo, colocado en la parte superior y cuya función es la de volver

a reflejar este haz luminoso hacia el divisor de haz. El segundo haz no se refleja, sino que pasa a través del divisor de haz hacia un espejo que tiene un movimiento lineal el cual servirá para introducir una variable llamada *diferencia de paso óptico*. Los dos haces se combinan de nuevo en el divisor de haz interfiriéndose constructiva y destructivamente, dependiendo de la diferencia de paso óptico entre el divisor de haz y los espejos. La radiación recombinada pasa a través de la muestra hacia el detector.

En el trayecto del haz infrarrojo corre paralelamente un rayo láser de helio-neón que proporciona la exactitud en la frecuencia. La señal que se obtiene al final de este proceso es un *interferograma*, que por uso de las ecuaciones de transformadas de Fourier y por medio de una computadora se convierte al final en un espectrograma (fig. 6) (15, 17).

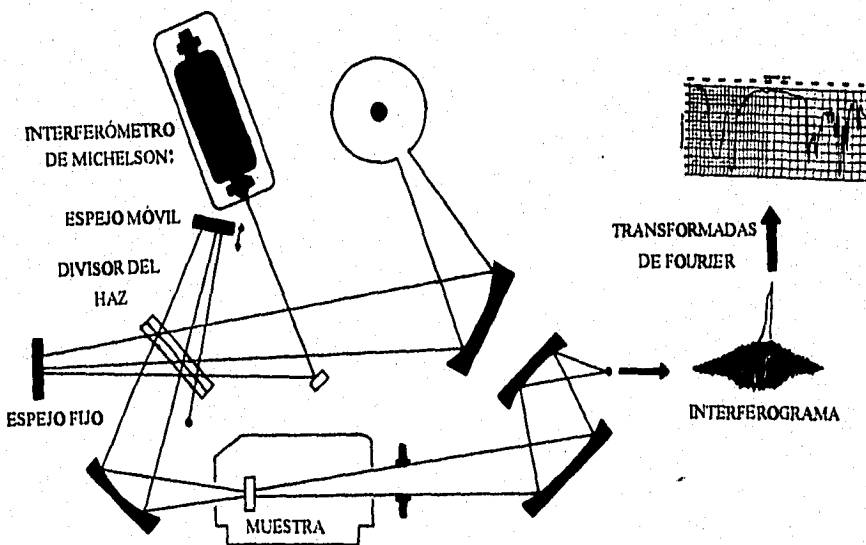


FIG. 6. Diagrama óptico de un espectrofotómetro en el infrarrojo con transformadas de Fourier (15).

La rapidez y alta sensibilidad de la espectroscopia FTIR, que la hacen

ideal para el microanálisis, se originan en varios factores. Primero, la calidad de un espectro de IR depende no sólo del número de elementos de resolución sino también de la relación entre señal y ruido; pero, desgraciadamente el aumento en el número de elementos de resolución se acompaña por lo general de una disminución en la relación entre señal y ruido, en consecuencia, la señal que llega al transductor es más débil, pero el ruido permanece constante (9, 19).

Un espectrofotómetro de infrarrojo con Transformadas de Fourier tiene varias ventajas sobre un instrumento dispersivo clásico.

1. Ventaja multiplex o de Fellget. En el espectrofotómetro dispersivo se miden sucesivamente todas las frecuencias, mientras que un espectrofotómetro de FTIR las mide en forma simultánea y en consecuencia se obtienen aumentos significativos en la relación señal-ruido. Esta propiedad es conocida como ventaja multiplex o de Fellget, donde la alta relación señal-ruido se debe al hecho de que la muestra, y por lo tanto el detector, son afectados por todas las frecuencias a la misma vez. Más aún, si se desea mejorar dicha relación, el interferómetro permite efectuar exploraciones repetitivas (barridos) con señales promediadas en tiempos más cortos que los empleados por un espectrofotómetro de dispersión para efectuar un barrido sencillo (9, 15, 17, 19, 21).

2. Ventaja de Jacquinet. Otro factor importante es el hecho de que, para la misma resolución, el poder de la radiación que pasa a través de un interferómetro es significativamente más grande (alrededor de 40 veces) que en un instrumento dispersivo donde está restringida por las rendijas. Por eso mismo, sólo el 10 % de la energía de la lámpara se aprovecha, mientras que en el FTIR el 95% es aprovechado. En combinación con la ventaja de Fellget, se llega a una de las características más importantes del espectrofotómetro FTIR: la habilidad de lograr la misma relación señal-ruido de un instrumento dispersivo, en un tiempo más corto (9, 15, 17).

3. Ventaja de Connes. La escala de frecuencias de un interferómetro se deriva de un rayo láser de helio-neón, que actúa como una frecuencia interna para cada barrido. La frecuencia de este láser se conoce con exactitud y es estable. Como resultado de esto, la calibración de frecuencia de los interferómetros es mucho más exacta (0.01 cm^{-1}) y tiene una mayor estabilidad que la de los instrumentos dispersivos.

4. Ventajas de Resolución. La resolución es constante en todas las longitudes de onda. En un instrumento dispersivo el poder de resolución es menor y además varía a causa del programa de rendijas. Otra característica importante es que en el FTIR, como no hay rejilla de difracción o cambios de filtros, no hay discontinuidad en el espectro como la que se presenta con un sistema dispersivo donde si existen.

5. Velocidad. Otra ventaja importante es que debido a la alta velocidad de respuesta (segundos), éste se puede conectar a un cromatógrafo de gases o de líquidos para dar simultáneamente el cromatograma y el espectro infrarrojo de cada uno de los componentes (15, 17).

6. Ventajas de operación. La capacidad de memoria se puede ampliar para guardar desde 3 hasta miles de espectros. Puede hacer uno o más barridos de fondo (background). Puede hacer la diferencia de espectros que es de gran ayuda para el análisis cualitativo y cuantitativo (15).

Hoy en día, la instrumentación infrarroja moderna permite obtener espectros de muestras disponibles sólo en pequeñas cantidades. Ninguna otra técnica concede el análisis de materiales bajo esta variedad de condiciones físicas (estado físico, cantidad de materia, etc.), y es esta versatilidad la que le confiere su desarrollo dentro del trabajo de la química analítica (18).

5. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde el analista se da cuenta si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fué diseñado (24).

Todo método analítico tiene como propósito el determinar al analito en una muestra y es un procedimiento que involucra un proceso de medición que da como resultado una respuesta analítica. El atributo esencial que debe cumplir la respuesta es la "confiabilidad".

Toda respuesta analítica es influenciada por una serie de factores intrínsecos (variables operativas, eficiencia de técnicas extractivas, separativas, instrumentos, etc.), así como de factores extrínsecos del método (analistas, reactivos, materiales, etc.); lo que da lugar a que siempre este presente la variación.

Los factores intrínsecos, fijan la medida de posición de la respuesta y su análisis estadístico permite inferir respecto de la exactitud. Los factores extrínsecos, fijan la medida de dispersión de la respuesta analítica y el análisis estadístico proporciona inferencia respecto de la precisión. La medida de posición de la respuesta analítica se evalúa a través de la validación (25).

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos y debe estar debidamente documentada (1, 24).

Esta actividad debe desarrollarse a través de estudios, ya sea por revisión de casos (validación retrospectiva) o por experimentación (validación prospectiva). Dichos estudios permiten establecer, con la ayuda de modelos

estadísticos, si el atributo de la confiabilidad está ausente o presente, y están enfocados a la evaluación de ciertos parámetros analíticos reconocidos tanto a nivel nacional como internacional (especificidad, linealidad, exactitud, precisión, etc.). El propósito del método analítico debe ser establecido con claridad, ya que en función de éste se establecen los parámetros a evaluar (1, 25).

5.1. DEFINICIONES, DETERMINACIONES Y CRITERIOS.

5.1.1. Especificidad. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra (excipientes, productos de degradación, impurezas, etc.) (24, 26, 27).

Determinación: Con el método propuesto se analizan placebos del producto, identificando la respuesta del principio activo y, si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

Criterio: Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes (24).

5.1.2. Linealidad. La linealidad de un sistema o método analítico representa su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Con esta determinación se espera que dichos resultados se ajusten a una línea de respuesta expresada por la ecuación de la recta (24, 26, 27).

El modelo estadístico para la linealidad debe sugerir que se cumplan los

siguientes requisitos (25):

* La relación entre **X** y **Y** en el intervalo de concentración estudiado, sea descrita mediante un modelo lineal:

$$Y = MX + B + E_a$$

donde:

Y = respuesta analítica

X = concentración del analito

M = coeficiente que representa la magnitud de cambio de **Y** respecto de un cambio en **X**

B = respuesta de **Y** cuando se tiene ausencia en **X**

E_a = error aleatorio del sistema

Que además inicie en los valores $Y = 0$, $X = 0$; esto es, que pase por el origen en una gráfica de ejes cartesianos (**X**, **Y**) (26).

Para aquellos métodos en los que se emplea un estándar, una sola concentración o una curva de calibración, si el requisito no se cumple, la exactitud del método es afectada.

* La variación de **Y**, es explicada por una variación en **X**, en el intervalo de concentración del analito estudiado.

* Para ciertos sistemas de proporcionalidad directa entre **X** y **Y**, $B = 0$. Cuando **B** es diferente de cero, se presenta un error debido al blanco, el cual puede afectar la exactitud del método (25).

La linealidad se debe evaluar tanto en el sistema como en el método (24, 27).

5.1.2.1. Linealidad del Sistema. La determinación del analito en una muestra involucra en casi todos los métodos, el empleo de un sistema de medición. El sistema generalmente se basa en determinar la respuesta analítica ya sea física, química o biológica del analito; por ejemplo, en los sistemas

espectrofotométricos se determina la radiación absorbida o transmitida por el analito.

Este parámetro se caracteriza por estudiar la relación concentración-respuesta en un intervalo apropiado de concentración únicamente del analito, sin incluir los otros componentes de la muestra. La exactitud de la respuesta analítica dependerá de que el sistema sea lineal, ya que el error aleatorio del sistema únicamente debe ser transmitido a la respuesta (25).

Determinación: Se realiza construyendo una curva de calibración (absorbancia contra concentración) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad y seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100% (se considera el 100% como la concentración de la muestra en la solución final a analizar), que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación (24).

Criterio: $CV \leq 1.5\%$

$r \geq 0.99$

$r^2 \geq 0.98$

La linealidad del sistema, al igual que la precisión del sistema, deben realizarse antes que la linealidad del método, pues generalmente limitan a este último (27).

5.1.2.2. Linealidad del Método. Por su parte, el método también debe ser lineal pues así medirá sin error la cantidad de analito presente en una muestra no sólo a una cantidad constante, sino también a una cantidad variable; es decir, si la muestra contiene **X** cantidad de analito, el método debe medir **Y** cantidad

de analito, donde $X = Y$ (28).

Determinación: Se hace a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de los placebos adicionados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%. La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

Criterio: Cantidad adicionada vs cantidad recuperada

$$m \approx 1$$

$$b \approx 0$$

$$r^2 \geq 0.98$$

Los porcentos recuperados y los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar en el siguiente intervalo (24):

$$\text{Recobro } 97 - 103 \%$$

$$\text{CV} \leq 3 \%$$

5.1.3. Precisión. Un requisito esencial de un método que tenga aplicaciones cuantitativas es la precisión, es decir su capacidad para repetir y reproducir la medición (29).

La precisión se define como el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una parte homogénea del producto. Este parámetro debe determinarse tanto al sistema como al método y usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación (24, 26, 29).

La precisión se establece en términos de 2 componentes independientes: la *repetibilidad* y la *reproducibilidad* (29).

La *repetibilidad* es la medida de la concordancia relativa entre determinaciones independientes del analito, bajo las mismas condiciones de análisis (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.), provenientes del muestreo de un material, en el cual el analito está distribuido de manera homogénea.

La *reproducibilidad* es la medida de la concordancia relativa, entre determinaciones independientes del analito, bajo distintas condiciones (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, etc.), provenientes del muestreo de un material, en el cual el analito está distribuido de manera homogénea (24, 29).

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación (24, 27).

Debe distinguirse claramente entre precisión del método y precisión del sistema, entendiéndose la primera como aquella que se refiere a todo el procedimiento y la segunda como aquella que considera solamente la contribución del error atribuible al sistema operativo en sí y no al error debido a la manipulación de la muestra (26).

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

Criterio: $CV \leq 1.5\%$

5.1.3.2. Precisión del Método (Reproducibilidad). Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por

triplicado (haciendo uso del método propuesto) (24).

Criterio: $CV \leq 3 \%$

5.1.4. Exactitud. La exactitud es un atributo, el cual mide la concordancia absoluta entre el contenido del analito obtenido al aplicar el método a la muestra, y el valor verdadero del contenido del analito en la muestra. Obviamente, esta concordancia dependerá del error "in situ" del método analítico utilizado. Este parámetro se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia (placebos adicionados), además de la desviación estándar porcentual (CV) de la medición (24, 26, 30).

La respuesta analítica de un método es influenciada por una serie de factores intrínsecos del método, por lo que se espera que estos factores gobiernen su exactitud.

Entre aquellos factores intrínsecos que pueden causar inexactitud del método se tienen: factores instrumentales (instrumentos mal calibrados, por ejemplo), factores del método (asociados principalmente a aspectos de diseño del método, como extracciones no cuantitativas, el uso de un indicador no adecuado, temperaturas inadecuadas, etc.) y, factores operativos (asociados principalmente a la experiencia del analista) (30).

Determinación: Este parámetro se evalúa como Exactitud y Repetibilidad al 100%. Se analizan, cuando menos, 6 placebos adicionados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Dicho análisis se realiza en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista (24).

Criterio: Promedio de Recobro 97 - 103 %

$CV \leq 3 \%$

5.1.5. Estabilidad de la muestra. Este parámetro determina el período de tiempo en el cual se debe analizar una muestra, así como las condiciones específicas de almacenamiento que le permitan conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés durante ese tiempo. El período puede ser corto o prolongado dependiendo de los cambios observados en la muestra a lo largo del estudio (24, 27).

Determinación: Se efectúa mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras, con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

Las muestras analizadas se almacenan bajo distintas condiciones (por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración protegidas de la luz, etc.), durante un tiempo preestablecido por el analista dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Después se vuelven a analizar bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

Criterio. La muestra es estable si el intervalo de confianza (IC) para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda de $\pm 3\%$. Además, el coeficiente de variación para cada condición/tiempo/muestra (factor I promedio) debe estar entre 97 - 103 %.

5.1.6. Límite de detección. Se define como la concentración mínima de un analito que puede ser detectada analíticamente pero no necesariamente cuantificada (24).

Esta definición incorpora consideraciones tanto del tamaño de la señal como del ruido de la línea base. También se define como la concentración que haga el cociente señal-ruido igual a tres.

El límite de detección describe la señal-ruido para el instrumento. Este término es de gran importancia analítica ya que describe la capacidad del instrumento y suministra una forma de estimar el valor mínimo de detección (31).

Siendo S_t el valor total medido para la muestra, S_b el valor del blanco y σ la desviación estándar medida. Puede ser demostrado que distribuciones normales $S_t - S_b > 0$ tienen un alto nivel de confiabilidad cercano al 99% cuando la diferencia $S_t - S_b > 3\sigma$. El valor recomendable del límite de detección es 3σ y el valor para S_b debe aproximarse a cero.

Determinación: Se preparan cuatro soluciones, dos con una concentración del triple de lo señalado como límite de detección en el manual del equipo, y otras dos del quintuple. Se toman 20 lecturas de cada una de las cuatro disoluciones (32, 33).

5.1.7. Límite de cuantificación. Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas (24).

La certeza en la cuantificación del analito se incrementa en tanto que la señal del analito rebasa la señal del límite de detección.

El valor recomendable para el límite de cuantificación es de 10σ , con una incertidumbre del 30% en el valor medido ($10\sigma \pm 3\sigma$) con una certeza del 99%

El límite de cuantificación sirve para definir el límite más bajo del rango útil para el método seleccionado. Este valor proporciona el límite de la linealidad, es decir, en donde la concentración del analito deja de ser proporcional a la respuesta medida.

Debe enfatizarse que el límite de cuantificación y de detección no son constantes intrínsecas en la metodología. Cada laboratorio debe evaluar su

propia precisión y estimar sus propios valores de límite de cuantificación y detección.

Determinación: Se toma como 10 veces la desviación estándar y es la cantidad mínima que se puede informar, cuando se efectúa una determinación, para tener la certeza de que la señal es debida al elemento medido (33, 34, 35).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En su aplicación como antiinflamatorio, analgésico y antipirético, el Naproxén es vendido al público en su forma libre o como sal sódica en distintas concentraciones y en distintas formas farmacéuticas tales como tabletas, cápsulas, suspensión, inyectables, gel y supositorio infantil (10, 11).

Dentro de los métodos oficiales para el análisis cuantitativo de Naproxén en tabletas, la Farmacopea Británica (*British Pharmacopoeia*), reporta el uso de la absorción de energía del fármaco en el intervalo de radiación ultravioleta (UV) a 331 nm (10).

Por su parte, la *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (FEUM) indica un método similar utilizando dos soluciones, una de referencia con 50 µg/ml de Naproxén y la de la muestra de concentración desconocida, midiendo la absorbancia de ambas en el rango UV a 332 nm (11).

Entre los métodos no oficiales se encuentran el de *Hogue y Landgraf*, quienes emplean un electrodo específico que detecta el ión naproxinato después de formar un complejo (el tetraalquilamonio naproxinato) en decanol (12).

Otro método no oficial es el de *Kwakye*, quien hace uso de la Resonancia Magnética Nuclear, obteniendo un espectro del fármaco, al cual se añadió un estándar interno, y midiendo el área bajo la curva de picos seleccionados. Mediante una ecuación matemática obtiene la concentración de la sustancia de interés (13).

Como se ha observado, los métodos que se describen en las Farmacopeas para cuantificar Naproxén son similares. Ambos utilizan el espectro electromagnético en la región del ultravioleta (UV), y, aunque el método en general es sencillo, requiere de tiempos relativamente largos en la preparación de las muestras de análisis; además de que se requiere una cantidad excesiva del producto. Asimismo, el uso de una sola longitud de onda limita la extensión

del estudio de la misma muestra a otras longitudes de onda en una misma determinación; así como el empleo de tiempo extra para el cálculo del peso promedio de las tabletas, necesario para obtener el resultado final, según la FEUM. Por otra parte, aunque éste método es específico para esta formulación, podrían existir otros compuestos químicos que absorban a longitudes de onda cercanas a la utilizada y que pueden, en un momento dado, provocar errores.

Con respecto a los métodos no oficiales, el de *Hogue y Landgraf*, siendo un electrodo fácil de usar, altamente sensible, selectivo entre algunos otros iones, así como en productos de degradación, es también un instrumento poco desarrollado a nivel comercial y por lo tanto difícil de conseguir. De la misma manera, la obtención del derivado (tetraalquilamonio naproxinato) es complicada y lleva tiempo.

En el caso de *Kwakye*, el método que propone es rápido y revela la presencia de impurezas o de productos de degradación (por aparición de picos extras), pero presenta algunas desventajas importantes. Aunque el instrumento requiere sólo de pequeñas cantidades de muestra, se utiliza demasiado producto para la preparación de la misma; más aún, el mismo autor, al comparar el método con otras técnicas oficiales y no oficiales se percata que el suyo es poco preciso, y además se obtienen coeficientes de variación muy altos que pueden ser debidos a factores no instrumentales, entre los cuales puede existir la posible interferencia por excipientes.

Con base en lo anterior, el presente trabajo propone un método analítico alternativo, por espectroscopía en el infrarrojo con transformadas de Fourier, para la cuantificación del Naproxén en tabletas que optimice dicha determinación. Para garantizar que el método cumpla con las características para las cuales fué diseñado, y como parte fundamental del desarrollo de un nuevo método analítico, se efectuó la validación del mismo.

IV. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL: Desarrollar un método analítico para la cuantificación de Naproxén libre en tabletas por Espectroscopía en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR), así como la validación del mismo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Obtener el espectro en el Infrarrojo del Naproxén.
- b) Elegir la banda de absorción más adecuada y aplicar el método de la línea base.
- c) Desarrollar y validar el método analítico propuesto evaluando los siguientes parámetros: especificidad, linealidad del sistema, precisión del sistema, linealidad del método, exactitud y repetibilidad al 100%, precisión (reproducibilidad), y estabilidad de la muestra.

V. HIPÓTESIS.

Dado que la frecuencia e intensidad de las bandas de absorción infrarroja, debidas a los grupos funcionales de un compuesto orgánico, lo caracterizan únicamente a él; y considerando que la Espectroscopía en el Infrarrojo con Transformadas de Fourier es más sensible, con mejor resolución y mayor precisión en sus medidas, entonces, al obtener el espectro en el infrarrojo, eligiendo una banda adecuada y aplicando la ley de Lambert-Beer, se podrá cuantificar Naproxén en tabletas, además, mediante los parámetros de validación podrá conocerse si el método satisface los requisitos para su aplicación.

VI. MÉTODO.

1. MATERIAL

- * Matraces volumétricos Pyrex de 10, 25, 50 y 100 ml.
- * Vasos de precipitados Pyrex de 50, 100 y 150 ml.
- * Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 5 y 10 ml.
- * Pipetas Pasteur.
- * Jeringas de vidrio.
- * Mortero de ágata con pistilo.
- * Embudo de vidrio de tallo corto Pyrex.
- * Papel filtro de poro mediano.
- * Pizeta de plástico.
- * Frascos de vidrio color ámbar y transparentes con tapa.

2. EQUIPO E INSTRUMENTOS

- * Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformadas de Fourier (FTIR), Perkin Elmer 1600.
- * Celdas para líquido con ventanas de Bromuro de Potasio.
- * Balanza analítica, Bosch S-2000
- * Parrilla de calentamiento, Barnstead/Thermolyne.
- * Refrigerador, General Electric.

3. REACTIVOS

- * Cloroformo grado espectroscópico, Spectrum Chem. Mfg. Corp.
- * Naproxén estándar.
- * Tabletas con 500 mg de Naproxén (NAXÉN).

4. PROCEDIMIENTO

4.1. Se obtuvo el espectro en el infrarrojo del Naproxén a partir de una solución al 1.5% del principio activo en cloroformo.

4.2. Se eligió la banda de absorción adecuada tomando en cuenta las consideraciones propuestas por el método de la línea base, además de la reproducibilidad relativa entre las bandas que se compararon.

4.3. El desarrollo del método y las determinaciones referentes a la validación se efectuaron de la siguiente manera:

4.3.1. Solución de la muestra. Se trituró una tableta de Naproxén, se transfirió el polvo a un vaso de precipitados, se adicionaron ± 25 ml de cloroformo y se calentó ligeramente, se dejó enfriar y se decantó en un matraz volumétrico de 100 ml. Finalmente se aforó con cloroformo y se filtró.

4.3.2. Solución estándar de referencia. Se preparó disolviendo 0.7500 g de Naproxén estándar en 50 ml de cloroformo.

4.3.3. Placebo adicionado. Se pesaron 0.7500 g de Naproxén estándar, se disolvieron con un pequeño volumen de la solución de la muestra y se aforó con la misma solución a 50 ml. A partir de esta se obtuvieron las concentraciones necesarias para la determinación de cada parámetro.

4.3.4. Especificidad. Con el método propuesto:

- a) Se analizó la respuesta de los excipientes.
- b) Se identificó la respuesta del principio activo sólo y en la tableta.

4.3.5. Linealidad del Sistema. Se determinó construyendo una curva de calibración con 5 niveles de concentración de la solución estándar de referencia por duplicado: 1.5, 3.0, 4.5, 7.5 y 15.0 mg/ml.

4.3.6. Precisión del Sistema. Se realizó con el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% (4.5 mg/ml) establecido en la linealidad del sistema.

4.3.7. Linealidad del Método. Se designó a partir de placebos adicionados de 3 diferentes cantidades de Naproxén estándar (3.0, 4.5, 7.5 mg/ml), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

4.3.8. Exactitud y Repetibilidad al 100%. Se determinó a partir de 6 placebos cargados de manera independiente con la concentración correspondiente al 100% de Naproxén.

4.3.9. Precisión (Reproducibilidad). Se llevó a cabo con una muestra homogénea del producto cuya concentración era del 100%, analizada por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

4.3.10. Estabilidad de la muestra analítica. Se determinó mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer 24 y 48 horas en diferentes condiciones de temperatura (ambiente y refrigeración) y en distintos envases (vidrio ámbar y transparente).

Se analizaron bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada para cada tiempo. La determinación se efectuó por un mismo analista.

VII. RESULTADOS.

1. Espectro en el infrarrojo del Naproxén estándar.

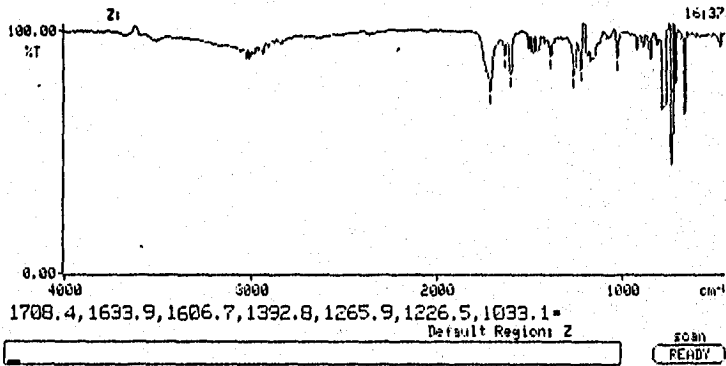


FIG. 7. Espectro en el infrarrojo del Naproxén estándar.

2. La banda de absorción elegida para realizar las medidas de absorbancia fué la encontrada en 1634.6 cm^{-1} .

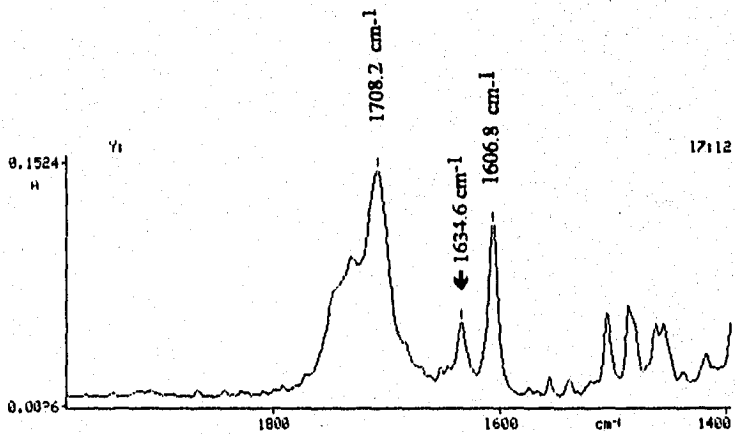


FIG. 8. Banda de absorción utilizada para realizar las medidas de absorbancia en la cuantificación de Naproxén (1634.6 cm^{-1}).

3. Especificidad del método.

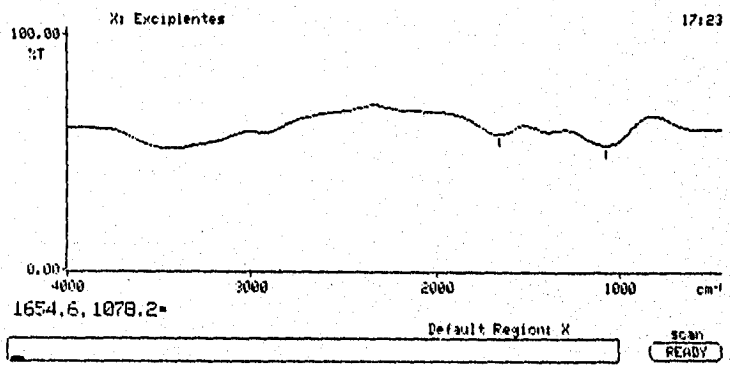


FIG. 9. Espectro de absorción en el infrarrojo obtenido con los excipientes que demuestra la especificidad del método.

4. Linealidad del sistema.

Concentración en mg/ml	Absorbancia de la muestra	
	Y ₁	Y ₂
1.5	0.0048	0.0046
3.0	0.0095	0.0095
4.5	0.0145	0.0145
7.5	0.0240	0.0243
15.0	0.0479	0.0481

TABLA IV. Resultados de absorbancia/concentración obtenidos en la evaluación de la Linealidad del Sistema.

Parámetro	Resultado	Criterio
CV	0.0 %	≤ 1.5 %
r	1.0002	≥ 0.99
r ²	1.0004	≥ 0.98

TABLA V. Resultados de los parámetros estadísticos evaluados en la determinación de la Linealidad del Sistema.

* Análisis de Varianza para la regresión lineal.

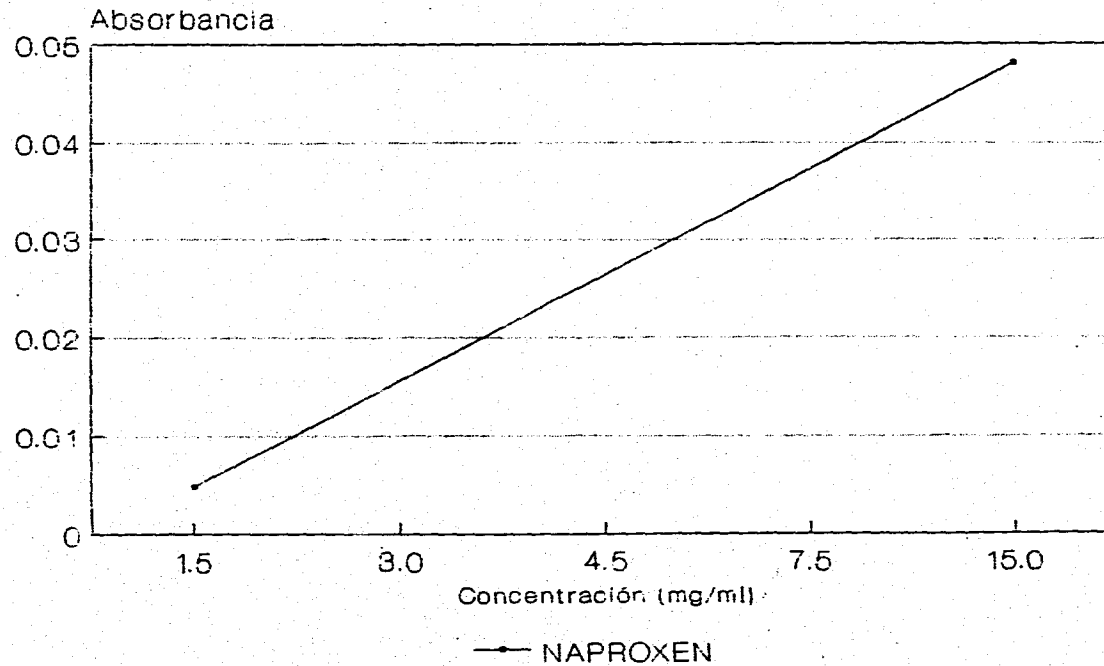
H_0 : Y no depende linealmente de X

H_a : Y depende linealmente de X

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Varianzas	F _{calc}	F _{teor}
Regresión	1	2.35×10^{-3}	2.35×10^{-3}	119051.2911	7.57
Error	8	1.58×10^{-7}	1.98×10^{-8}		
Total	9	2.35×10^{-3}			

TABLA VI. Análisis de varianza para la regresión lineal.

LINEALIDAD DEL SISTEMA



GRAFICA No. 1

5. Precisión del sistema.

Absorbancia de la muestra
0.0252
0.0253
0.0252
0.0252
0.0252
0.0253

TABLA VII. Resultados analíticos obtenidos al evaluar la Precisión del Sistema.

Parámetro	Resultado	Criterio
CV	0.0031 %	$\leq 1.5 \%$

TABLA VIII. Resultado del parámetro estadístico evaluado en la Precisión del Sistema.

6. Linealidad del método.

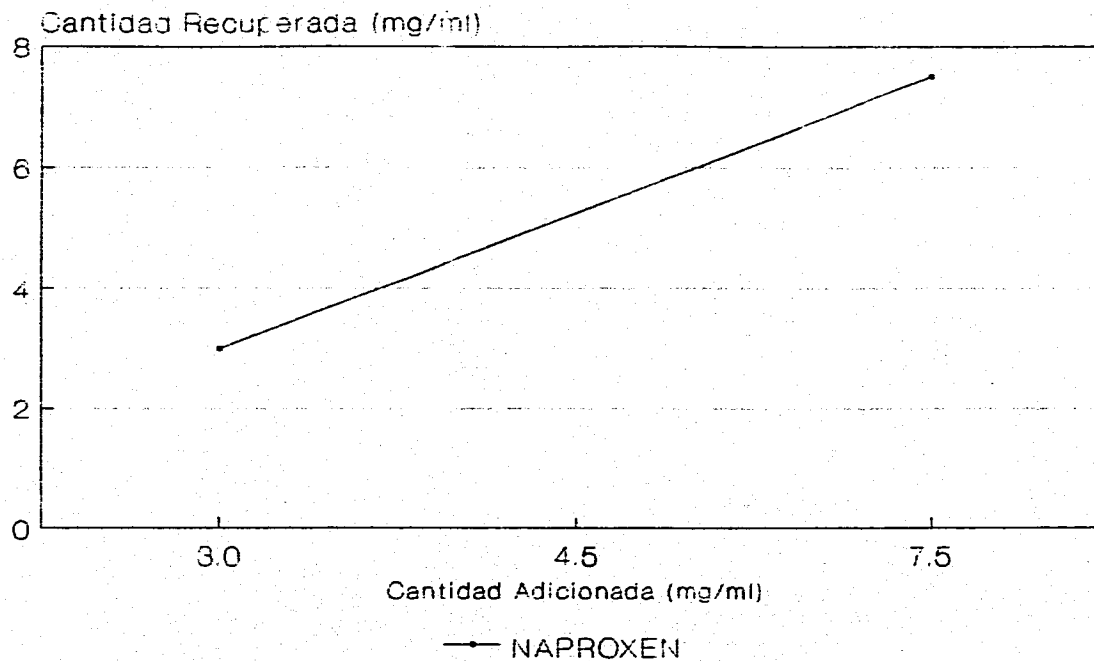
Cantidad adicionada (mg/ml)	Cantidad recuperada (mg/ml)		
	Y ₁	Y ₂	Y ₃
3.0	3.0000	3.0000	2.9869
4.5	4.4671	4.5000	4.4833
7.5	7.5000	7.4590	7.4792

TABLA IX. Resultados analíticos obtenidos en la determinación de la Linealidad del Método.

Parámetro	Resultado	Criterio
m	0.9967	≈ 1
b	0.0026	≈ 0
r ²	0.9999	≥ 0.98
% R	99.74 % (prom.)	97 - 103 %
CV	0.2791 %	≤ 3 %

TABLA X. Resultados de los parámetros estadísticos evaluados en la determinación de la Linealidad del Método.

LINEALIDAD DEL METODO



GRAFICA No. 2

*** Estimación y prueba de hipótesis para la pendiente (m):**

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

$$* t_{\text{calc.}} = -1.2239$$

$$* t_{0.975, 7} = 2.3646$$

* Ha es rechazada

$$* \text{Intervalo de confianza: } 0.9904 < m < 1.0031$$

*** Estimación y prueba de hipótesis para la ordenada al origen (b):**

$$H_0: b = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

$$* t_{\text{calc.}} = 0.1813$$

$$* t_{0.975, 7} = 2.3646$$

* Ha es rechazada

$$* \text{Intervalo de confianza: } -0.0312 < b < 0.0364$$

7. Exactitud y repetibilidad al 100 %.

% R
97.81
100.00
98.75
100.31
100.31
97.81

TABLA XI. Resultados obtenidos en la determinación de la Exactitud y Repetibilidad al 100%.

Parámetro	Resultado	Criterio
% R	99.16 % (prom.)	97 - 103 %
CV	1.2070 %	≤ 3 %

TABLA XII. Resultados de los parámetros estadísticos evaluados en la determinación de la Exactitud y Repetibilidad al 100 %.

* Prueba de hipótesis para μ con σ desconocida:

$$H_0: \mu = 100$$

$$H_a: \mu \neq 100$$

* $t_{\text{calc.}} = -1.7088$

* $t_{0.975, 5} = 2.5706$

* Ha es rechazada

* Intervalo de confianza: $97.9089 < \mu < 100.4211$

* Prueba de hipótesis para la σ .

$$H_0: \sigma \leq 3\%$$

$$H_a: \sigma > 3\%$$

* $\chi^2_{\text{calc.}} = 1.9949$

* $\chi^2_{0.95, 0.05} = 11.070$

* Ha es rechazada

* Intervalo de confianza: $0.7472 < \sigma < 2.9361$

8. Precisión (reproducibilidad).

	ANALISTA	
	1	2
D 1	99.70 %	99.70 %
	100.00 %	98.80 %
I	99.10 %	100.00 %
	99.03 %	100.32 %
A	100.00 %	100.00 %
	100.00 %	100.00 %

TABLA XIII. Resultados de % R obtenidos en la determinación de la Precisión (Reproducibilidad).

Parámetro	Resultado	Criterio
CV	0.4814 %	≤ 3 %

TABLA XIV. Resultado del parámetro estadístico determinado para evaluar la Precisión (Reproducibilidad).

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F _{calc.}	F _{0.05}
Analista	1	0.0817	0.0817	0.2918	38.51
Día	2	0.5600	0.2800	1.1829	6.06
Error	8	1.8933	0.2367		

TABLA XV. Análisis de Varianza para evaluar la Precisión (Reproducibilidad).

$F_a < F_{0.05}$	El método analítico es reproducible por los analistas.
$F_d < F_{0.05}$	El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

TABLA XVI. Interpretación de resultados para la Precisión (Reproducibilidad).

9. Estabilidad de la muestra analítica.

A) Estabilidad en envase de vidrio transparente.

Muestra	Inicial	TA/24 h	TA/48 h	4°C/24 h	4°C/48 h
1	100.00	109.83	111.85	111.80	112.59
2	99.52	108.71	130.12	113.76	129.38
3	100.96	119.10	147.16	115.45	128.15

TABLA XVII. Porcentaje recuperado en muestras analíticas almacenadas a distintas temperaturas e intervalos de tiempo.

Condición de almacenamiento	Intervalo de Confianza	Resultado
TA/24 h	4.6380 - 20.1420	No es estable
TA/48 h	5.7219 - 53.3781	No es estable
4°C/24 h	10.8563 - 16.1637	No es estable
4°C/48 h	10.5536 - 35.8664	No es estable

TABLA XVIII. Resultados finales obtenidos en la evaluación de la estabilidad de la muestra analítica.

Condición de almacenamiento	Factor I (%)	Criterio (%)	Resultado
TA/24 h	112.34	97 - 103	No es estable
TA/48 h	129.45	97 - 103	No es estable
4°C/24 h	113.49	97 - 103	No es estable
4°C/48 h	123.17	97 - 103	No es estable

TABLA XIX. Factor I promedio para cada condición/tiempo.

B) Estabilidad en envase de vidrio ámbar.

Muestra	Inicial	TA/24 h	TA/48 h	4°C/24 h	4°C/48 h
1	100.00	118.26	118.27	111.52	118.02
2	99.52	113.76	123.21	118.54	118.02
3	100.96	118.26	137.28	126.40	140.99

TABLA XX. Porcentaje recuperado en muestras analíticas almacenadas a distintas temperaturas e intervalos de tiempo.

Condición de almacenamiento	Intervalo de Confianza	Resultado
TA/24 h	12.9604 - 20.2396	No es estable
TA/48 h	12.7550 - 39.4250	No es estable
4°C/24 h	8.5754 - 28.7446	No es estable
4°C/48 h	7.6130 - 43.4270	No es estable

TABLA XXI. Resultados finales obtenidos en la evaluación de la estabilidad de la muestra analítica.

Condición de almacenamiento	Factor I (%)	Criterio (%)	Resultado
TA/24 h	116.57	97 - 103	No es estable
TA/48 h	126.02	97 - 103	No es estable
4°C/24 h	118.61	97 - 103	No es estable
4°C/48 h	125.42	97 - 103	No es estable

TABLA XXII. Factor I promedio para cada condición/tiempo.

10. Límite de detección y límite de cuantificación.

Parámetro	Resultado
Límite de Detección	0.0376 mg/ml
Límite de Cuantificación	0.1254 mg/ml

TABLA XXIII. Resultados obtenidos en la determinación de los límites de detección y de cuantificación.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Al iniciar el desarrollo del método analítico, se obtuvo el espectro en el infrarrojo del Naproxén estándar para seleccionar la banda de absorción adecuada con la que se efectuarían las medidas de absorbancia.

Inicialmente se tomaron 3 señales: 1708.2, 1634.6 y 1606.8 cm^{-1} . A continuación se observó la reproducibilidad de los puntos medidos en las tres bandas, variando la concentración, la señal que mejores resultados mostró en cuanto a las consideraciones establecidas por el método de la línea base, es la que se encuentra en 1634.6 cm^{-1} . En ella se considera que las variaciones de absorbancia en la línea base son casi constantes o al menos cambian linealmente.

Una vez seleccionada la banda, se procedió a evaluar la linealidad y precisión del sistema mediante los parámetros estadísticos establecidos. Para la Linealidad del Sistema se determinó un coeficiente de variación (CV) de 0.0%, que es menor a 1.5%, un coeficiente de correlación (r^2) de 1.0002 y un coeficiente de determinación (r) de 1.0004, que son mayores a 0.99 y 0.98, respectivamente. Esto indica que el sistema es lineal. Además se realizó un análisis de varianza para éste parámetro el cual, aunque no es requerido por las normas oficiales, permitió asegurar que la respuesta analítica proporcionada por el sistema depende significativamente de la concentración de la muestra en forma lineal (la hipótesis nula, H_0 , se rechazó por que la F de fisher calculada es mayor a la F de fisher teórica).

En la Precisión del Sistema se obtuvo un coeficiente de variación de 0.0031% que, al ser menor de 1.5%, mostró que el sistema cumple con esa característica.

En lo que se refiere al método analítico, se determinó inicialmente su especificidad. Al no contar con un placebo como tal, se realizó comparando el

espectro del estándar contra el espectro del residuo que quedó después de extraer el principio activo de las tabletas. En el primero se identificaron las bandas características del Naproxén, pero en el segundo no se observaron por lo que se deduce que los excipientes no absorben en esta región del espectro electromagnético. Luego, entonces, el método es específico y permitira conocer, en un momento dado, si el fármaco se contamina o sufre degradación.

Una vez evaluada la especificidad del método, se determinó su linealidad, obteniendo la pendiente (m) aproximadamente igual a 1 (0.9967), la ordenada al origen (b) aproximadamente igual a cero (0.0026), el coeficiente de determinación mayor a 0.98 (0.9999), el porcentaje de recobro promedio (\bar{R}) entre 97 y 103% (99.74%) y el CV menor al 3% (0.2791) se cumple con los criterios establecidos para la linealidad del método; sin embargo, para asegurar lo anterior, se efectuó la prueba de hipótesis tanto para la pendiente como para la ordenada al origen, además de que se determinaron los intervalos de confianza para cada parámetro. Al ser rechazada la hipótesis alterna (H_a), que establecía que la $m \neq 1$ y la $b \neq 0$, se deduce que la respuesta analítica obtenida es directamente proporcional a la concentración de la muestra, en el rango de concentraciones utilizado.

Para la determinación de la exactitud y repetibilidad al 100% se encontró que el coeficiente de variación (1.2070%) fué menor al 3%, y que los porcentos de recuperación individuales así como el global (99.16%) se incluyen en el rango del 97 al 103%. Como prueba estadística adicional la prueba de hipótesis para el promedio del porcentaje recuperado, mostró que éste no es significativamente diferente del 100%, por lo tanto, el método es exacto. Es decir, existe concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y la cantidad adicionada de Naproxén.

Asimismo, al ser rechazada la H_a , en la prueba de hipótesis para la desviación estándar muestral, se infiere la concordancia que existe entre los

datos obtenidos, por lo tanto, el método es repetible.

La reproducibilidad del método analítico, como parte importante en la evaluación de la precisión, fué también aceptable tal como lo muestra el CV determinado (0.4814%) el cual es menor al establecido (3%). Sumado a esto, se observa que la prueba estadística adicional (F de Fischer), tanto para el analista (0.2918) como para el día de análisis (1.1829), son menores a los teóricos (38.51 y 6.06, respectivamente). Estos datos nos permiten asegurar que el método analítico es reproducible por diferentes analistas, así como también lo es en distintos días por un mismo analista.

Por otra parte, al evaluar la estabilidad de la muestra analítica se observa que los datos de porcentaje recuperado obtenidos después de 24 horas de almacenamiento, bajo cualquiera de las condiciones marcadas, muestran valores altos. Esto indica variaciones importantes en la concentración de la muestra. Al calcular el Intervalo de Confianza, en ninguno de los casos se encontró que el valor de cero fuera incluido, por lo tanto la muestra analítica no es estable bajo esas condiciones de almacenamiento; y al no entrar ninguno de los factores I (prom.) dentro del criterio establecido, se corrobora lo anterior. Por ello, la muestra deberá analizarse dentro de las 24 hrs. posteriores a su preparación. Estas variaciones en la concentración pueden explicarse por el hecho de que la muestra analítica es preparada con un disolvente muy volátil, y considerando que los recipientes convencionales en que es almacenada no logran un cierre hermético, entonces, la muestra se concentra obteniendo así el porcentaje de recuperación alto.

Finalmente se determinaron los límites de detección y de cuantificación. Con este valor (0.0376 mg/ml), el límite de detección muestra la gran capacidad del instrumento para detectar cantidades muy pequeñas; además, la relación señal-ruido del mismo es tan pequeña que no dará una interferencia significativa en las determinaciones analíticas. Por su parte, el límite de

cuantificación obtenido (0.1254 mg/ml), muestra su cualidad para cuantificar bajas concentraciones con precisión y exactitud, bajo las condiciones de operación establecidas.

IX. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos, puede concluirse que el método analítico es lineal, preciso, exacto y específico; por lo cual se asegura que su aplicación a la cuantificación de Naproxén libre en tabletas deberá realizarse con la certeza de que los resultados que se obtengan serán confiables bajo las siguientes condiciones:

1. Las medidas cuantitativas deben realizarse cuando la muestra analítica se encuentre en un rango de concentración de 1.5 a 15 mg/ml.

2. La señal adecuada para realizar las lecturas de absorbancia es la que se encuentra en 1634.6 cm^{-1} .

3. La muestra analítica debe ser analizada dentro de las 24 horas posteriores a su preparación.

En general el método analítico, en comparación con los métodos existentes, presenta las siguientes ventajas:

- a) Es rápido.
- b) Es un método accesible.
- c) No requiere de cálculos adicionales complejos.
- d) Es específico.
- e) La muestra de análisis puede ser recuperada, ya que el método no es destructivo.

Limitaciones:

- Sólo es aplicable directamente al análisis de tabletas de Naproxén libre.
- La muestra analítica debe analizarse dentro de las 24 horas posteriores a su preparación.

Sugerencia:

En caso que se desee cuantificar Naproxén como sal de sodio, deberán realizarse pruebas preliminares liberando primero el principio activo para después aplicar éste método.



X. ANEXO.**I. ABREVIATURAS.**

b = ordenada al origen

r = coeficiente de correlación

r² = coeficiente de determinación

CV = coeficiente de variación

IC = intervalo de confianza

m = pendiente

n = número de replicaciones

t = número de diluciones o número de cantidades adicionadas

y = media aritmética

N = número total de determinaciones

s² = varianza

DE = desviación estándar

x = concentración de la solución o cantidad adicionada

y = propiedad medida o cantidad recuperada

%R = porcentaje recuperado

t = valor de la distribución t de Student con una probabilidad acumulada de 0.975

t* = valor de la distribución t de Dunnet con una probabilidad acumulada de 0.975

S_p² = varianza ponderada.

F = valor de la distribución F de Fischer con una probabilidad acumulada de 0.975

g.l. = grados de libertad

F = factor para cálculos en la linealidad del sistema

I = factor para cálculos en la estabilidad de la muestra

c = número de comparaciones en la prueba de t de Dunnet

2. FORMULARIO ESTADÍSTICO (24, 36).

2.1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

2.1.1. Determinación del CV, r y r^2 . Para proceder a realizar estos cálculos, es necesario que el número de replicaciones por dilución, sean equivalentes.

a) Cálculos preliminares:

$$\Sigma x = n (x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$\Sigma y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\Sigma x^2 = n (x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_t^2)$$

$$\Sigma y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$\Sigma xy = x_1 (y_{11} + y_{12} + y_{1n}) + x_2 (y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n}) + \dots + x_t (y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn})$$

b) Coeficiente de correlación y de determinación:

$$r = [n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2 / [n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]^{1/2}$$

$$r^2 = [n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2 / [n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]$$

c) Factor F:

F = propiedad medida (y) / conc. de la dilución (x)

$$F_{11} = y_{11} / x_1, \quad F_{12} = y_{12} / x_1, \quad F_{1n} = y_{1n} / x_1 \dots$$

$$F_{t1} = y_{t1} / x_t, \quad F_{t2} = y_{t2} / x_t, \quad F_{tn} = y_{tn} / x_t$$

$$\Sigma F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{t1} + F_{t2} + F_{tn}$$

$$\Sigma F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{t1}^2 + F_{t2}^2 + F_{tn}^2$$

$$F = \Sigma F / N$$

donde: N = no. de puntos de la linealidad del sistema

d) Coeficiente de variación:

$$DE = [N (\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2 / N (N-1)]^{1/2}$$

$$CV = (DE/F)100$$

2.1.2. Análisis de Varianza para Regresión Lineal Simple.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fcalc.
Regresión	2-1 = 1	SC _{expl}	$S^2_{expl} = \frac{SC_{expl}}{1}$	$F = \frac{S^2_{expl}}{S^2_{inexpl}}$
Error	n - 2	SC _{inexpl}	$S^2_{inexpl} = \frac{SC_{inexpl}}{n - 2}$	
Total	n - 1	SC _{total}		

- * Ecuación de la recta: $Y = m x + b$
- * Suma de cuadrados total: $SC_{total} = \sum (Y_i - \bar{Y})^2$
- * Suma de cuadrados explicada: $SC_{expl} = \sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2$
- * Suma de cuadrados inexplicada: $SC_{inexpl} = SC_{total} - SC_{expl}$
- * F (teórica) = $F_{1-\alpha/2, n-2}$ $\alpha = 0.05$

2.2. PRECISIÓN DEL SISTEMA. Se evalúa a través del CV.

a) Cálculos preliminares:

$$\sum y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n$$

$$\sum y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_n^2$$

$$\bar{y} = \sum y / N$$

$$DE = [N (\sum y^2) - (\sum y)^2 / N (N-1)]^{1/2}$$

b) Coeficiente de variación:

$$CV = (DE/y)100$$

2.3. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

2.3.1. Se determinan la m , b , r^2 , %R y CV. Para proceder a realizar los cálculos, es necesario que el número de cantidades recuperadas (replicas) de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.

a) Cálculos preliminares:

$$\Sigma x = x_{11} + x_{12} + \dots + x_{1n} + x_{21} + x_{22} + \dots + x_{2n} + \dots + x_{t1} + x_{t2} + \dots + x_{tn}$$

$$\Sigma y = y_{11} + y_{12} + \dots + y_{1n} + y_{21} + y_{22} + \dots + y_{2n} + \dots + y_{t1} + y_{t2} + \dots + y_{tn}$$

$$\Sigma x^2 = x_{11}^2 + x_{12}^2 + \dots + x_{1n}^2 + x_{21}^2 + x_{22}^2 + \dots + x_{2n}^2 + \dots + x_{t1}^2 + x_{t2}^2 + \dots + x_{tn}^2$$

$$\Sigma y^2 = y_{11}^2 + y_{12}^2 + \dots + y_{1n}^2 + y_{21}^2 + y_{22}^2 + \dots + y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2 + y_{t2}^2 + \dots + y_{tn}^2$$

$$\Sigma xy = x_{11} y_{11} + x_{12} y_{12} + \dots + x_{1n} y_{1n} + x_{21} y_{21} + x_{22} y_{22} + \dots + x_{2n} y_{2n} + \dots + x_{t1} y_{t1} + x_{t2} y_{t2} + \dots + x_{tn} y_{tn}$$

b) Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación:

$$m = \frac{nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

$$b = \frac{\Sigma y - m(\Sigma x)}{nt}$$

$$r^2 = \frac{[nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][nt(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

c) Porcentaje recuperado:

$$R = (y/x)100$$

$$\Sigma R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$R = \Sigma R/N$$

d) Coeficiente de variación:

$$DE = [N(\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2 / N(N-1)]^{1/2}$$

$$CV = (DE/R)100$$

2.3.2. Estimación y prueba de hipótesis para la pendiente:

$H_0: m = M_0$

$H_a: m \neq M_0$

* $S_{y/x} = [n-1/n-2 (S_y^2 - m^2 S_x^2)]^{1/2}$

* Estadígrafo de contraste: $t = \frac{(m - M_0)(n-1)^{1/2} S_x}{S_{y/x}}$

g.l. = n - 2, $\alpha = 0.05$

* Intervalo de confianza:

$P(m - t_{1-\alpha/2, n-2} \frac{S_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}} < M < m + t_{1-\alpha/2, n-2} \frac{S_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}) = 1-\alpha$

2.3.3. Estimación y prueba de hipótesis para la ordenada al origen:

$H_0: b = B_0$

$H_a: b \neq B_0$

* Estadígrafo de contraste: $t = \frac{b - B_0}{S_{y/x} [1/n + X^2/(n-1)S_x^2]^{1/2}}$

g.l. = n - 2, $\alpha = 0.05$

* Intervalo de confianza:

$P(b - t_{1-\alpha/2, n-2} S_{y/x} [1/n + X^2/(n-1)S_x^2]^{1/2} < B < b + t_{1-\alpha/2, n-2} S_{y/x} [1/n + X^2/(n-1)S_x^2]^{1/2})$

2.4. EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%.

2.4.1. Se determina con el %R y el CV.

a) Porcentaje recuperado:

$$\Sigma R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\Sigma R^2 = R_{12} + R_{22} + R_{32} + \dots + R_{n2}$$

$$\bar{R} = \Sigma R / N$$

b) Coeficiente de variación:

$$DE = [N (\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2 / N (N-1)]^{1/2}$$

$$CV = (DE/R) 100$$

2.4.2. Prueba de hipótesis para μ con σ desconocida:

$$H_0: \mu = 100$$

$$H_a: \mu \neq 100$$

* Estadígrafo de contraste: $t_{calc} = \frac{R - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$

$$g.l. = n - 2, \alpha = 0.05$$

* Intervalo de confianza:

$$P(R - t_{1-\alpha/2} s/\sqrt{n} < \mu < R + t_{1-\alpha/2} s/\sqrt{n}) = 1 - \alpha$$

2.4.3. Prueba de hipótesis para la desviación estándar de una distribución normal:

$$H_0: \sigma = \sigma_0$$

$$H_a: \sigma \neq \sigma_0$$

* Estadígrafo de contraste:
$$\chi^2 = \frac{(n-1)s}{\sigma_0}$$

* Intervalo de confianza:

$$P\left(\left[\frac{(n-1)s}{\chi^2_{1-\alpha/2}}\right]^{1/2} < \sigma < \left[\frac{(n-1)s}{\chi^2_{\alpha/2}}\right]^{1/2}\right) = 1-\alpha$$

2.5. PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD). Se determina a través del CV y en caso de que se requieran establecer las fuentes de variación del método, se realiza una prueba estadística adicional. Estos procedimientos sólo son aplicables cuando se utilicen 2 días, 2 analistas y 3 determinaciones.

2.5.1. Coeficiente de variación.

a) Cálculos preliminares:

$$y_{\dots} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

$$\Sigma y^2 = y_{111}^2 + y_{112}^2 + y_{113}^2 + y_{121}^2 + y_{122}^2 + y_{123}^2 + y_{211}^2 + y_{212}^2 + y_{213}^2 + y_{221}^2 + y_{222}^2 + y_{223}^2$$

$$y = y.../N$$

$$DE = [N (\Sigma y^2) - (y...)^2 / N (N-1)]^{1/2}$$

b) Coeficiente de variación:

$$CV = (DE/y)100$$

2.5.2. Prueba estadística adicional. En esta prueba se evalúa el método con el estudio de las siguientes variables: analista, día. El modelo hipotético que representa el caso particular de 2 analistas en dos diferentes días y con tres replicaciones, cada uno es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_j(i) + \epsilon_k(ij)$$

donde:

Y_{ijk} = el ensayo de la sustancia de interés de la k ésima muestra analizada por el i ésimo analista en el j ésimo día.

μ = media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra.

α_i = efecto del analista en el ensayo (donde $i = 1...a$).

$\delta_j(i)$ = efecto del día anidado en el analista (donde $j = 1...d$).

$\epsilon_k(ij)$ = error del método analítico (donde $k = 1...r$).

a = número de analistas ($a = 2$)

d = número de días ($d = 2$)

r = número de replicaciones ($r = 3$)

Para la evaluación se realiza el análisis de varianza que se describe a continuación.

a) Calcular la suma de las combinaciones analista-día (y_{ij}):

$$y_{11.} = y_{111} + y_{112} + y_{113} \quad y_{12.} = y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{21.} = y_{211} + y_{212} + y_{213} \quad y_{22.} = y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

b) Calcular la suma para cada analista ($y_{i..}$):

$$y_{1..} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{2..} = y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

c) Calcular la suma total ($y_{...}$):

$$y_{...} = y_{1..} + y_{2..}$$

d) Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\Sigma \Sigma y_{ij.}^2 = (y_{11.})^2 + (y_{12.})^2 + (y_{21.})^2 + (y_{22.})^2$$

e) Calcular las sumas del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$\Sigma y_{i..}^2 = (y_{1..})^2 + (y_{2..})^2$$

f) Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\Sigma \Sigma \Sigma y_{ijk}^2 = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + (y_{113})^2 + \dots + (y_{221})^2 + (y_{222})^2 + (y_{223})^2$$

g) Calcular la suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista, con la siguiente fórmula:

$$SCa = \frac{\sum y_{i..}^2}{dr} - \frac{y_{...}^2}{adr}$$

h) Calcular la suma de cuadrados del día que trabajó el analista (SCd), con la siguiente fórmula:

$$SCd = \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum y_{i..}^2}{dr}$$

i) Calcular la suma de cuadrados del error (SCe):

$$SCe = \sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{r}$$

j) Con los datos anteriores construir la Tabla de Análisis de Varianza (ANADEVA):

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{calc.}	F _{0.05} ^{1*}
Analista (α)	gla = a-1	SCa	$MCa = \frac{SCa}{gla}$	$F_a = \frac{MCa}{MCd}$	Fgla/gld
Día (δ)	gld = (d-1)a	SCd	$Mcd = \frac{SCd}{gld}$	$F_d = \frac{Mcd}{Mce}$	Fgld/gle
Error (ε)	gle = (r-1)ad	SCe	$Mce = \frac{SCe}{gle}$		

k) Realizar la interpretación de los resultados:

Si $F_a < F_{gla/gld}$, el método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_a \geq F_{gla/gld}$, el método analítico no es reproducible por los analistas.

Si $F_d < F_{gld/gle}$, el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si $F_d \geq F_{gld/gle}$, el método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

^{1*} Estos valores se obtienen de tablas, para un $\alpha = 0.05$

2.6. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA. Se evalúa mediante los intervalos de confianza para cada condición/tiempo.

a) Tabular los resultados:

Condición / Tiempo			
Inicial	1	2	m
Y ₁	Y ₄	Y ₇	Y _{n-2}
Y ₂	Y ₅	Y ₈	Y _{n-1}
Y ₃	Y ₆	Y ₉	Y _n

b) Cálculos preliminares:

Media	Y ₀	Y ₁	Y ₂	Y _M
Varianza	S ₀ ²	S ₁ ²	S ₂ ²	S _m ²

$$S_{p1}^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_1^2}{2(c+1)}$$

$$S_{p2}^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_2^2}{2(c+1)}$$

$$S_{pm}^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_m^2}{2(c+1)}$$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

c) Intervalo de confianza para cada condición/tiempo:

$$IC = (Y_i - Y_0) \pm t^{2*} [S_{pi}^2 (2/3)]^{1/2}$$

d) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación: Para cada condición/tiempo/muestra, calcular el factor I:

$$I = \frac{(\text{análisis muestra/condición/tiempo})_i}{(\text{análisis inicial})_i} \times 100$$

$$I_1 = \frac{Y_4}{Y_1} \times 100$$

$$I_5 = \frac{Y_8}{Y_2} \times 100$$

$$I_9 = \frac{Y_n}{Y_3} \times 100$$

$$I_2 = \frac{Y_5}{Y_2} \times 100$$

$$I_6 = \frac{Y_9}{Y_3} \times 100$$

$$I_3 = \frac{Y_6}{Y_3} \times 100$$

$$I_7 = \frac{Y_{n-2}}{Y_1} \times 100$$

$$I_4 = \frac{Y_7}{Y_1} \times 100$$

$$I_8 = \frac{Y_{n-1}}{Y_2} \times 100$$

^{2*} t = valor de la t de Dunnett con c comparaciones y 2(c + 1) grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

Para cada condición/tiempo calcular la media del factor I:

$$I = \frac{\Sigma I (\text{condición/tiempo})}{N} \quad N = \text{no. de muestras para cada condición/tiempo}$$

$$I_1 = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3}$$

$$I_2 = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3}$$

$$I_3 = \frac{I_7 + I_8 + I_9}{3}$$

XI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Lual; COMPONENTES PARA UN PROGRAMA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS, *Pharma News*, 4 (5): 39, 40, (1993).
2. Cooper M. S.; QUALITY CONTROL IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY, U.S.A., Academic Press, 1972. pp. 155, 156, 179, 181.
3. Koenig J. L.; INDUSTRIAL PROBLEM SOLVING WITH MOLECULAR SPECTROSCOPY, *Anal. Chem.*, 66 (9): 515A-521A, (1994).
4. Katzung B. G.; FARMACOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA, 2a edición, México, Editorial El Manual Moderno, 1986. pp. 413, 414, 418.
5. Goodman L. S., Gilman A.; LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPÉUTICA, 8a. edición, México, Editorial Médica Panamericana, 1991. pp. 624-627, 648.
6. Goth A.; FARMACOLOGÍA MÉDICA, España, Editorial Mosby, 1993. pp. 356, 357, 366, 368.
7. Rodríguez C. R.; VADEMÉCUM ACADÉMICO DE MEDICAMENTOS, Tomo II, México, U.N.A.M., 1984. pp. 595, 596.
8. THE MERCK INDEX, 11a. edición, U.S.A., Editorial Merck & Co., 1989. pp. 1014.

9. Remington's; FARMACIA, Tomos I y II, 17a. edición, Argentina, Editorial Médica Panamericana, 1990. pp. 846-848, 851-859, 1521.
10. BRITISH PHARMACOPOEIA, Tomos I y II, United Kingdom, Her Majesty's Stationery Office, 1988. pp. 384, 385, 972, S85.
11. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 5a. edición, México, 1988. pp. 781, 782, 1339, 1340, 1341.
12. Hogue E. R., Landgraf W. C.; NAPROXINATE ION SPECIFIC ELECTRODE DEVELOPMENT AND USE, *Anal. Lett.*, 14 (B20): 1757-1766 (1981).
13. Kwakye J. K.; USE OF NMR FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHARMACEUTICALS, *Talanta*, 32 (11): 1069-1071 (1985).
14. Price W. J.; A COURSE IN THE PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFRARED SPECTROSCOPY, 3a. ed., England, Pye Unicam Ltd., 1973. pp. 1, 2, 41-47, 56.
15. NOTAS PARA EL CURSO BÁSICO DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA, México, Perkin Elmer de México, 1995.
16. Whetsel K.; INFRARED SPECTROSCOPY, *Chemical Engineering News*, 46:82-96, (1968).
17. Cano J., Zavalza D.; INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO, México, Perkin Elmer de México, 1985.

18. Putzig C. L., Leugers M. A., McKelvy M. L.; INFRARED SPECTROSCOPY, *Anal. Chem.*, 66 (12): 26R-66R (1994).

19. Skoog A. D., West D. M.; ANÁLISIS INSTRUMENTAL, 2a edición, México, Nueva Editorial Interamericana, 1987. pp. 158-163, 221-223, 231, 232-237, 250-254, 257, 264-266.

20. Hannah R. W.; EXPERIMENTS IN TECHNIQUES OF INFRARED SPECTROSCOPY, U.S.A., Perkin Elmer Corporation, 1969.

21. Willard H. H., Merritt L. L.; MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS, México, Compañía Editorial Continental, 1978. pp. 175, 177-179, 183-188, 196, 197.

22. Aragón M. G.; CERTIFICACIÓN Y CALIBRACIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO IR Y DETERMINADOR DE HUMEDAD KARL FISCHER DE ACUERDO A NORMAS INTERNACIONALES, TESIS, ENEP Zaragoza, UNAM, 1992. pp. 2-5, 9, 10.

23. Cruz M. M. T.; ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO POR ESPECTROSCOPÍA DE IR DE LOS COMPONENTES DE LAS LACAS ACRÍLICAS USADAS COMO RECUBRIMIENTO, TESIS, ENEP Zaragoza, UNAM, 1986. pp. 12-14.

24. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México.

25. Lual, MODELOS ESTADÍSTICOS Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (Primera parte), *Pharma News*, 4 (7):32 - 44 (1993).
26. Fontani F., Prelini R., Ronchi M. C.; CRITERI DI CONVALIDA DEI METODI D' ANALISI, *Boll. Chim. Farm.*, 126 (2), (1986).
27. Inman E. L., Frischmann P. J., Winkel G. D.; GENERAL METHOD VALIDATION GUIDELINES FOR PHARMACEUTICAL SAMPLES, *J. Chrom. Sci.*, 25: 252-256 (1987).
28. Lual; MODELOS ESTADÍSTICOS Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (Tercera parte), *Pharma News*, 4 (10):16-19 (1993).
29. Lual; MODELOS ESTADÍSTICOS Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (Cuarta parte), *Pharma News*, 4 (11):26-28 (1993).
30. Lual; MODELOS ESTADÍSTICOS Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS (Segunda parte), *Pharma News*, 4 (7):24, 25 (1993).
31. Beaty R. B.; CONCEPTOS, INSTRUMENTACIÓN Y TÉCNICAS DE ESPECTROFOTOMETRÍA POR ABSORCIÓN ATÓMICA, México, Perkin Elmer Co., 1979.

32. Long G. L.; THE LIMIT OF DETECTION IS THE LOWEST CONCENTRATION LEVEL THAT CAN BE DETERMINED TO BE STATISTICALLY DIFFERENT FROM AN ANALYTICAL BLANK. SIGNIFICANT PROBLEMS HAVE BEEN ENCOUNTERED IN EXPRESSING THESE VALUES BECAUSE OF THE VARIOUS APPROACHES TO THE TERM "STATISTICALLY DIFFERENT", *Anal. Chem.*, 52: 152- 160 (1980).

33. McDougall D. Ch., Amore F. J., Cox G. V.; GUIDELINES FOR DATA ACQUISITION AND DATA QUALITY EVALUATION IN ENVIRONMENTAL CHEMISTRY, *Anal. Chem.*, 52: 2242-2248 (1980).

34. Keith L. H.; PRINCIPLES OF ENVIRONMENTAL ANALYSIS, *Anal. Chem.*, 55: 2210-2218 (1983).

35. Taylor J. K.; QUALITY ASSURANCE OF CHEMICAL MEASUREMENTS, *Anal. Chem.*, 53: 1589-1592 (1981).

36. Márques de Cantú M. J.; PROBABILIDAD Y ESTADÍSTICA PARA CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS, México, UNAM, 1988. pp. 431-454