

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
INDIGOTINA EN *Indigofera dossua* (AÑIL)

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ MENDOZA
XIOMARA ROCÍO MOLINA CORNEJO

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE DE 2008
SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DÍAZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo.

ASESORA DE ÁREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS, COSMÉTICOS Y VETERINARIOS:

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

ASESORA DE ÁREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES:

Licda. Arelí Cáceres Magaña

DOCENTE DIRECTOR

MSc. Oscar David Guzmán Julián

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera especial al personal técnico de Laboratorio Especializado en Control de Calidad (L.E.C.C.), por su apoyo y disposición para la realización de este trabajo de investigación.

Agradecemos de manera especial a nuestro asesor y docente director Lic. Oscar David Guzmán Julián por asumir este reto y darle seguimiento hasta la finalización, por compartir su conocimiento, experiencia y por el tiempo dedicado, sin el cual no hubiese sido posible la culminación de este proyecto.

Xiomara Molina y José Martínez

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan importante en mi vida.

A mis padres Toni y Mila, Por su cariño comprensión y apoyo sin condiciones. Gracias por guiarme por el camino de la educación y confiar en la culminación de este sueño. Este es un pequeño homenaje a su esfuerzo y dedicación.

A mi amor Osi, Por su apoyo, comprensión lo que me hace sentir poder lograr lo que me proponga. Gracias por ser una parte muy especial en mi vida, te amo.

A mi hermano Roberto, Por sus consejos y sugerencias que me guían en el transcurso de mi vida. Gracias por ser un buen amigo.

A mis suegros Rubén y Antonieta, por su ayuda y orientación, Gracias por permitirme ser parte en sus vidas.

A mis cuñados Fabio y Roxi, gracias por ser como hermanos para mí.

A mis tios (as) Isa, Rosi, Alex, David y en especial a toda mi familia, que ocupan un lugar especial en mi vida. Gracias por estar siempre unidos.

José A. Martínez

DEDICATORIA

Agradezco a Dios, por permitirme llegar a la culminación de esta etapa tan importante en mi vida.

A mis padres Gabriel y Mirta, por todo su apoyo incondicional, por sus consejos y su firmeza a lo largo de todos estos años, sin ellos no hubiese podido realizar mi sueño.

A mi esposo, Miguel Ángel, por estar a mi lado, por su inmenso amor, respeto y confianza, gracias por ser mi mejor amigo.

A mis hermanos, More, Celio y Danilo, por creer mi.

Xiomara R. Molina

“Si se siembra la semilla con fe y se cuida con perseverancia, sólo será cuestión de tiempo recoger sus frutos”

Thomas Carlyle

RESUMEN

En el presente trabajo se ha validado el método analítico para la cuantificación de indigotina en *Indigofera dossua* (añil), El método utilizado es un método de referencia utilizados por los laboratorios de Control de Calidad el cual no había sido validado. Este método es útil principalmente para el análisis de muestras de añil que son exportadas por productores nacionales de añil principalmente a Europa donde este pigmento es muy apreciado por lo que las exigencias de pureza son muy estrictas, por lo tanto la validación de este método es de mucha importancia para los laboratorios que analizan este pigmento. Para la presente validación se evaluaron 8 parámetros de desempeño los cuales son especificados por la USP para validación de materias primas, dichos parámetros fueron los siguientes: Límite de detección, Limite de cuantificación, Rango de trabajo, Selectividad, Linealidad, Precisión, exactitud y robustez. Con lo cual se demostró estadísticamente que el método es adecuado para obtener resultados reproducibles y confiables para el análisis de indigotina.

La evaluación estadística de los parámetros se hizo por herramientas de Microsoft Excel haciendo los cálculos de manera práctica y sencilla, obteniendo gráficas y tablas, las cuales son acompañadas con su respectivo análisis e interpretación de resultados. En los anexos se presenta un pequeño manual de uso de estas herramientas, que puede servir de referencia para futuras validaciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método analítico utilizado satisface las exigencias propuestas al inicio de la validación, por lo tanto cumple con el propósito para el cual es requerido, teniendo la confianza que los resultados obtenidos son satisfactorios y reproducibles en el país o en cualquier parte del mundo donde se analice.

ÍNDICE

Resumen

CAPITULO I

1.0 Introducción xviii

CAPITULO II

2.0 Objetivos 21

CAPITULO III

3.0 Marco teórico 23

3.1 Generalidades de los colorantes 23

3.2 Generalidades del añil 24

3.3 Generalidades de espectrofotometría ultravioleta/visible 31

3.4 Generalidades de validación de métodos de análisis 35

CAPITULO IV

4.0 Diseño metodológico 41

4.1 Tipo de estudio 41

4.2 Investigación bibliográfica 41

4.3 Investigación de campo 41

4.4 Método 41

4.5 Técnica de análisis de muestra 42

4.6 Método de preparación de la muestra 42

4.7 Método de preparación del estándar 43

4.8 Metodología de validación 45

CAPITULO V

5.0 Resultados e interpretación de resultados 47

5.1 Evaluación del límite de detección 47

5.2 Evaluación del límite de cuantificación 47

5.3 Evaluación del rango de trabajo 48

5.4	Evaluación de la selectividad del método	49
5.5	Evaluación de la linealidad	51
5.6	Evaluación de la precisión	58
5.7	Evaluación de la exactitud	60
5.8	Evaluación de la robustez	63
5.9	Resumen de evaluación de parámetros y resultados	66

CAPITULO VI

6.0	Conclusiones	70
-----	--------------	----

CAPITULO VII

7.0	Recomendaciones	73
-----	-----------------	----

Bibliografía

Glosario

Anexos

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN.
2. CALCULO ESTADISTICO DE PARAMETROS.
3. TABLA DE VALORES CRÍTICOS PRUEBA t-Student.
4. TABLA DE VALORES CRÍTICOS PARA PRUEBA DE COCHRAN.
5. GRAFICO DE CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR
CONCENTRACION DE INDIGOTINA.
6. PREPARACION DE SOLUCION MADRE (100 mcg/mL) PARA
ANALISIS DE MUESTRA.
7. TABLA Kg. DE AÑIL PROCESADO/EXPORTADO ENTRE 1997 Y
2005.
8. GRAFICA Kg. DE AÑIL PROCESADO/ EXPORTADOS ENTRE
1997 Y 2005.

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°

1. Análisis de Límite de detección.
2. Análisis de Límite de cuantificación.
3. Análisis de Selectividad del método por degradación de la muestra.
4. Análisis de Linealidad Día 1.
5. Análisis de Linealidad Día 2
6. Ecuación de la recta para cada día de análisis.
7. Estadística de Regresión.
8. Análisis de Varianza Día 1.
9. Análisis de Varianza Día 2.
10. Probabilidad de dependencia de variable Y por X.
11. Probabilidad de que la pendiente sea igual a cero (Linealidad).
12. Repetibilidad del Método.
13. Precisión Intermedia.
14. Ensayo de exactitud día 1 de análisis
15. Ensayo de exactitud día 2 de análisis.
16. Prueba de Cochran día 1 y día 2 de análisis.
17. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales.
18. Robustez Condiciones normales.
19. Robustez variando Temperatura, agitación y tiempo.

CUADRO N°

20. Robustez variando Agitación.
21. Robustez variando Temperatura.
22. Resumen de Parámetros alterados y Concentraciones obtenidas (Robustez).

23. Kg. De añil procesado/exportado entre 1997 y 2005.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°

1. Figura análisis de selectividad.
2. Figura recta de regresión ajustada día 1.
3. Figura recta de regresión ajustada día 2.
4. Figura de residuales día 1
5. Figura de residuales día 2
6. Figura de concentraciones variando parámetros para robustez.
7. Figura curva de calibración de indigotina
8. Figura Kg. de añil procesado/exportados entre 1997 y 2005

ABREVIATURAS

A:	Absorbancia.
ABS:	Valor absoluto.
% CV:	Coefficiente de variación porcentual.
FR:	Factores de respuesta
E:	Exponencial.
F:	Probabilidad.
Mcg/mL o µg/ml:	Microgramos/mL.
nm:	Nanometros.
P:	Probabilidad.
R:	Coefficiente de correlación.
R ² :	Coefficiente de correlación.
S:	Desviación estandar.
<:	Menor que.
[]:	Concentración.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN

El cultivo del Añil fue conocido hace mucho tiempo como parte fundamental de la economía del país, especialmente desde que los españoles comenzaron a importarlo, de toda Centro América y principalmente de El Salvador. A principios del siglo pasado la disminución del cultivo del Añil fue muy evidente debido al descubrimiento de colorantes artificiales que resultaban ser más fáciles de obtener económicamente. Actualmente este tinte está cobrando un gran interés en Europa, esto implica un mercado muy exigente en cuanto al cumplimiento a los requisitos de calidad, por eso es importante contar con un método de cuantificación confiable que brinde resultados satisfactorios. La Comunidad Europea tiene normas muy estrictas en cuanto a la lista de colorantes permitidos, su pureza y su dosis absorbida diariamente. Se observa a nivel internacional una tendencia cada vez mayor a utilizar colorantes naturales. Por lo tanto, podemos asegurar que la importancia de los colorantes naturales irá aumentando a futuro, es por eso que el cultivo del Añil está resurgiendo como una alternativa ecológica.

Es importante contar con un método de análisis validado para obtener resultados confiables y reproducibles, el cual es el objeto de la investigación. La metodología de este proceso se realizará por medio de Espectrofotometría Ultravioleta, usando un estándar de indigotina calidad USP para hacer una curva de calibración con las siguientes concentraciones: 2, 4, 6, 8, 10 mcg/mL

con la que se obtuvo datos que luego serán comprobados estadísticamente y así determinar si el método que se está utilizando es adecuado para su uso, las muestra que se analizaron son solicitudes de análisis que ingresan a un laboratorio privado nacional acreditado bajo la norma ISO/IEC 17025, y que en algunos casos han sido previamente analizadas, el tiempo estimado para realizar la investigación fue de 9 meses : Enero de 2005 – Septiembre de 2005. Además presentamos un protocolo de validación el cual incluye la forma en que evaluaron los parámetros a estudiar, el desarrollo de los mismos, los resultados los cuales incluyen tablas, gráficos y la interpretación de resultados.

En los anexos presentamos un pequeño manual para uso de hojas de Excel para hacer la evaluación estadística de los parámetros de forma práctica y sencilla.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Validar un método analítico para la cuantificación de Indigotina en Añil (*Indigofera dossua*).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Diseñar un protocolo de validación de un método analítico para la cuantificación de Indigotina en Añil.

2.2.2 Comprobar por medio de un estudio de selectividad que el método analítico propuesto es el más conveniente para cuantificar Indigotina en añil.

2.2.3 Establecer el rango de trabajo más adecuado por medio de un Método analítico para la cuantificación de Indigotina en añil que proporcione resultados lineales, precisos y exactos.

2.2.4 Determinar los límites de detección y cuantificación de un método de análisis para la cuantificación de Indigotina en Añil.

2.2.5 Puesta a punto por medio de un estudio de Robustez los parámetros que pueden ser modificados para obtener un método analítico más conveniente para la cuantificación de Indigotina en añil.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES DE COLORANTES ⁽⁹⁾

Los colorantes se dividen en dos grandes grupos: colorantes naturales y colorantes artificiales. Existen aromas que por su proceso de extracción (provenientes de productos naturales) contienen sustancias colorantes que pueden conferir color. Estos aromas se denominan extractos vegetales naturales. Los colorantes de síntesis deben reunir una serie de características, para asegurar su buen uso.

Los requisitos exigidos son:

- a) Ser inocuo.
- b) Constituir una especie química definida y pura.
- c) Tener gran poder tintorial, con objeto de utilizar la mínima cantidad posible y ser fácilmente incorporables al producto.
- d) Ser lo más estable posible a la luz y al calor.
- e) Poseer compatibilidad con los productos que deben teñir.
- f) No poseer olor ni sabor desagradables.
- g) Ser estable a diferentes pH, presencia de agentes oxidantes y reductores.
- h) Ser lo más económico posible.

Los factores que contribuyen a la inestabilidad son ⁽⁹⁾:

- a) Trazas de metales.
- b) Altas temperaturas.

c) Agentes óxido-reductores.

d) Luz.

e) pH.

En cuanto a la toxicidad de los colorantes, desde hace años se han visto como agentes potencialmente tóxico y contaminante del medio ambiente. Normalmente la toxicidad de un colorante, está relacionado con su absorción. “El grado de seguridad requerido, depende de los campos de aplicación y frecuencia del uso. No es lo mismo, la toxicidad de un colorante, utilizado en jabones, cremas y otros productos aplicados en la superficie corporal, que aquella que se pueda producir cuando el colorante es ingerido en medicamentos o alimentos”⁽⁹⁾

3.2 GENERALIDADES DEL AÑIL⁽¹²⁾



Nombre Científico: *Indigofera dossua*.

Familia: Leguminosas. El nombre genérico deriva de vocablos griegos que juntos significan producir añil.

Lugar de Origen: Himalaya; planta introducida en Europa hacia la mitad del Siglo pasado.

Descripción: Arbusto que llega a alcanzar hasta un metro de altura, con tronco indiviso en su porción inferior y muy ramificado en la extremidad; hojas compuestas, formadas de pequeños folíolos, rojizos o parduscos; flores de color rojo vivo o rosa violáceo reunidas en racimos.

Floración: De julio a septiembre.

Plantación: Durante la primavera.

Humedad: Se necesita riego diariamente.

Terreno: Ligero, rico en humus, o bien tierra mezclada con arena. Conviene abonarlo orgánicamente en otoño.

Añil de El Salvador⁽¹¹⁾

El estudio del añil o xiquilite tiene mucha importancia en la historia económica de Centroamérica, que junto con el maíz sagrado y legendario de los mayas, y con el cacao, constituyen uno de los legados de las altas culturas indígenas a la civilización mundial. Pero a diferencia del maíz y otros productos vegetales, el añil dejó de ser, por distintas razones, un objeto de interés, sin embargo actualmente resurge como una alternativa agrícola y económica El Salvador.

Origen.

El índigo, material colorante que fue usado para teñir textiles en todos los países civilizados, es de origen remoto. Según la enciclopedia “España Calpe”.

Los antiguos lo llamaron indicus (esto es indio), de donde se formó la moderna palabra índigo. Los escritores árabes lo designaron con el vocablo “NIL” (azul) del cual deriva la palabra “añil” que se le da en castellano. En Europa el concepto del origen y naturaleza del verdadero índigo era confusa.

Se le tenía como mineral, a causa de su brillo cobrizo. El primero en dar datos exactos del origen de este tinte fue Marco Polo en el siglo XIII. Al regreso de sus viajes en Asia, se refirió tanto a la planta de donde se extrae, como a los métodos de elaboración o procedimientos de extracción de la tinta.

La información relativa a esta época indica que antes de utilizarse el añil en escala comercial en Europa, el colorante usado era llamado “pastel”, que se extraía de varias plantas del género “isatis” y al tener conocimiento sobre el añil, el comercio europeo puso resistencia violenta a su introducción. Sin embargo, la calidad superior del añil fue venciendo los obstáculos y se abrió paso hasta que se vendió libremente por el año 1737.

Los antiguos pobladores de esta región mesoamericana, conocían la planta denominada “Xihquilit” que en idioma náhuatl significa “hierba azul”, palabra que degeneró después en “xiquilite” y “jiquilite”. Conocieron también la utilidad de dicha planta de la que extraían tinta azul o “mohuitl”, la cual era muy apreciada para colorear tejidos y adornos o para otros usos. La utilidad de la

planta se extendía hasta la medicina y el polvo del tronco o raíces aplicadas en forma de cataplasma a la cabeza de los niños les aplacaba el calor y los dolores.

En realidad es difícil establecer si el añil se utilizaba antes de la llegada de los españoles, pero lo que sí es cierto, es que los mayas ya lo conocían en 1558. Ese mismo año el Rey de España pidió unas muestras de añil con una recopilación de los métodos de cultivo y extracción empleados por los cultivos. El cultivo y procesamiento del añil a nivel industrial y en grandes proporciones comenzó en el siglo XVI, ya con nuevos métodos y una mano de obra mayor.

Localización del añil en El Salvador

El xiquilite crece mejor en los terrenos bajos y cálidos, en tierras arenosas no muy húmedas, niveladas o con ligeras pendientes y con buen drenaje. Las zonas donde se concentró la producción añilera fueron: Santa Ana, Metapán, Sonsonate, Sensuntepeque, San Vicente, Olocuilta, Chalatenango, Tejutla, Opico, Ateos, San Salvador, Suchitoto, Cojutepeque, Gotera, Usulután, San Miguel, Zacatecoluca y San Alejo.

Se establecieron núcleos urbanos llamados “Ferias del añil” siendo las principales las de Apastepeque, San Vicente, Chalatenango, San Miguel, Sensuntepeque y Zacatecoluca a las cuales concurrían comerciantes del país, de Centro América, Sur América y hasta Europa con fines de exportar el producto. Del total de la producción del añil en Centro América, entre los años 1783 y 1792, un 91% aproximadamente, era producido en El Salvador.

Extracción del añil ⁽¹¹⁾

El método que usaban los antiguos pobladores de la región, consistían en poner las hojas de la planta en un recipiente de agua tibia, y después de unas horas de reposo, sacaban las hojas, dejando el agua para batirla fuertemente hasta precipitar la tinta. Luego separaban el agua de la superficie por decantación, colaban el sedimento espeso en una tela de algodón o de fibras vegetales y el residuo pastoso lo moldeaba en forma de bolas que luego secaban a sol o calentaban para endurecerlo.

La mayor producción de tinta se daba entre el segundo y tercer año de desarrollo de la planta, y a finales del siglo XVI, el procedimiento consistía en cortar las plantas y trasladarlas a los obrajes, así se llamaban las instalaciones donde se procesaba el añil, siempre inmediato a una fuente de agua ya que ésta se usaba en abundancia para el procesamiento

El obraje ⁽¹¹⁾

Se compone de tres pilas, dos grandes y una pequeña orientadas de norte a sur. La primera pila conocida como del “remojo” está situada en el plano superior del terreno, hacia donde puede llegarle el agua directamente por gravedad, y sirve para el “empilo”, es decir, para recibir las ramas de jiquilite. Generalmente tienen un tamaño de 5 x 3.5 varas y 1 vara de profundidad, teniendo el piso una ligera inclinación hacia el sur con una media vara de desnivel, y en el centro de ese extremo, empezando desde la base, le abren una ranura alargada y vertical, que puede medir 20 cm. Llamada “bitoquera”. El

repello interior está hecho con una mezcla de cal, arena y agua, una especie de argamasa consistente; no utilizan cemento por considerarlo muy “helado”, ya que en esta pila tiene lugar el “cocimiento” (fermentación) por lo que el agua necesitaba permanecer caliente, razón por la cual, las paredes eran muy gruesas.

La segunda pila es la de “batido”, situada a continuación del extremo sur de la primera y a un nivel más bajo, de tal forma que la “bitoquera” comunicaba directamente con la pila. Tiene las mismas dimensiones pero con una profundidad de 2 varas y también con el piso inclinado, lleva la “bitoquera” partiendo a 20 cm. De la base, en la pared del lado sur, pero ésta no se comunica con la tercera pila.

La tercera pila, llamada “piletilla” es más pequeña de unas dos varas cuadradas por una vara de hondo y paredes un poco más delgadas. Se encuentra al lado derecho del extremo anterior de la pila del “batido” y a un nivel inferior. El piso es plano, solo tiene en el centro una concavidad donde colocan una olla de barro que sirve para recoger toda la tinta que puede estar pegada en el fondo. Tiene una “bitoquera” muy pequeña y redonda, también en la pared del lado sur.

Procedimiento Artesanal ⁽¹¹⁾

En la primera pila, la del remojo, se descargaba el jiquilite y se llena con suficiente agua para que cubra completamente toda la planta. Ahí se produce la fermentación que hace desprender el color azul. Esta tarea dura de 15 a 17

horas y es determinado por el puntero, que es la persona que dirige toda la operación.

Terminado el tiempo, el puntero ordena el traspaso del agua azul hacia la segunda pila, para realizar esa operación se destapa con una vara de madera puntuda, la bitoquera que había sido tapada previamente con un tapón de barro. En esta segunda pila, una vez llenada con agua azul, se produce el batido por medio de “remos” que son varas largas y delgadas que llevan en un extremo unas tablillas de madera liviana, casi cuadradas que hacen la función de paletas. Con el batido se logra la oxidación de la materia, lo que produce el desprendimiento del gas carbónico y finalmente el grano color azul o tinta añil que precipita en el fondo de la pila.

El batido dura hasta que lo indica el puntero, pues si se pasa de este tiempo, el tinte se disuelve y se pierde el trabajo. Después de botar las “lejías” (excedente de aguas) de la segunda pila, se procede a pasar la tinta a la piletilla con el fin de colocarla y dejar que se asiente. Como la tercera pila no se comunica con la segunda, la tinta se traslada manualmente por medio de huacales. El “canastero” es el artefacto que cumple la función de colador. Se encuentra encima de las vigas colocadas sobre la piletilla, para recibir directamente la tinta, que luego, ya colocada va cayendo en la pila.

El monte o bejuco llamado “capitán” colocado en el canastero tiene hojas velludas que detienen las partículas de basura, tierra, arena, etc. Que pueden arrastrar la tinta. Cuando la tinta está bien sedimentada en la piletilla, se pasa a

los coladores de los “tendales” que son lienzos sostenidos por viguetas. Ahí permanece el añil por un día para que filtre más la lejía.

Luego se procede a cocer la tinta por un tiempo de unas seis horas. Al día siguiente del cocimiento, elaboran los llamados “panes” colocando la masa de añil en una tabla, y con pequeños huacales de morro, van tomando porciones, apelmazándolas hasta formar los “panes” que dejan secar al sol por unos seis u ocho días.

3.3 GENERALIDADES DE ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA / VISIBLE ⁽⁶⁾

La espectroscopia consiste en la medida de absorción, por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática.

La banda espectral empleada en las mediciones descritas a continuación se extiende desde las cortas longitudes de onda de la zona ultravioleta hasta la zona visible del espectro.

Este intervalo espectral puede considerarse como si estuviera constituido por dos zonas, la ultravioleta (190 nm – 380 nm). Y la visible (380 nm – 780 nm).

La espectroscopia en la zona visible es la medida de absorción de la luz visible.

Los espectros ultravioleta y visible de una sustancia no tienen, en general, un alto grado de especificidad. Sin embargo, son muy adecuados para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias, constituyen un medio útil adicional de identificación.

Los términos relacionados con pruebas espectrofotométricas son los siguientes:

Absorbancia (A): logaritmo decimal del inverso de la transmitancia (T). El término “densidad de transmisión interna” puede emplearse como sinónimo de absorbancia.

Transmitancia (T): relación entre el flujo de radiación transmitido por la sustancia por la sustancia problema y el flujo de radiación incidente.

Absortividad (a): cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración de la sustancia (c), expresada en gramos por litro y el espesor atravesado por la energía luminosa (b) expresado en centímetros.

$$a = \frac{A}{bc \text{ (g/L)}}$$

Absortividad molar (E): cociente de dividir la absorbancia (A) entre el producto de la concentración de la sustancia (c), expresada en moles por litro y el espesor atravesado por la energía luminosa (b) expresado en centímetros. Es también el producto de la Absortividad (a) por el peso molecular de la sustancia

$$E = \frac{A}{bc \text{ (moles/L)}}$$

Espectro de absorción: relación de absorbancia y la longitud de onda o cualquier función de estas, representada en forma grafica.

Aparatos: ⁽⁶⁾

Los tipos de espectrofotómetros están diseñados de modo que permitan el paso de una radiación esencialmente monocromática a través de la sustancia problema, convenientemente preparada y hagan posible la fracción de radiación transmitida. El espectrofotómetro consta de una fuente de energía, de un sistema dispersivo con rendijas para seleccionar la banda de longitudes de onda, una celda o recipiente para la sustancia problema, un detector de la energía radiante y dispositivos acoplados de amplificación, medición y registro.

En la actualidad se han desarrollado procesos bastante significativos en la detección y cuantificación de compuestos. Las medidas de absorción de la radiación ultravioleta y visible encuentran una enorme aplicación en la determinación cuantitativa de una gran variedad de especies tanto inorgánicas como orgánicas.

La espectroscopia de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia T o de la absorbancia A de disoluciones que se encuentran en cubetas transparentes que tienen un camino óptico de b cm. Normalmente, la concentración c de un analito absorbente está relacionados linealmente con la absorbancia como representa la ecuación:

$$A = -\log t = \log P_0/P = Ebc$$

Donde:**A:** Es la absorbancia**T:** Transmitancia**P_o:** Potencia de radiación en el disolvente**E:** Absortividad molar**P:** Potencia de radiación en el analito**b:** Longitud del material**C:** Concentración

Uno de los métodos espectrofotométricos de gran utilidad es el ultravioleta-visible, el cual se fundamenta en que la luz ultravioleta es absorbida en la región de 200 a 780 nm. En el caso de moléculas orgánicas, las transiciones electrónicas involucran paso de electrones de orbitales en su estado basal hacia un estado excitado. El intervalo de absorción electrónica va de 400 – 800 nm en el visible, todos los compuestos coloreados absorben en este intervalo. Por lo general son compuestos con enlaces múltiples.

Ley de Beer ⁽⁶⁾

Si la luz incidente con la longitud de onda (λ) e intensidad (I_0) llega a una solución con concentración (C), y con un trayecto, L de 1cm, la energía radiante de la luz se disminuye en forma exponencial. De este modo si una concentración dada de una sustancia absorbe el 50% de la radiación incidente, al duplicar la concentración no absorberá el 100% sino el 75% de la luz. El espesor de la muestra o el trayecto posee un efecto similar en la absorción.

Limitaciones de la ley de Beer.

“Este hecho se basa en que la ley de Beer no toma en cuenta los efectos de pH, Temperatura, las interacciones soluto – solvente y soluto – soluto. Por

ejemplo asociación (enlaces hidrógenos intermoleculares). Disociación, reacciones químicas, etc. Debido a estas limitaciones, la ley se aplica usualmente solo para soluciones diluidas, donde estas interacciones son insignificantes. Otra limitación se debe a la incapacidad de la mayoría de los instrumentos para proveer radiaciones monocromáticas”⁽⁶⁾

Comúnmente los espectrofotómetros que tienen mayor uso son aquellos que miden la absorción de la luz en el rango de los 185 nm a los 300 nm que cubren toda la gama del espectro.

Determinaciones cuantitativas en la región ultravioleta visible:

"Las valoraciones espectrofotométricas requieren normalmente una comparación de la absorbancia producida por la solución de la sustancia problema con la absorbancia de una solución estándar de referencia. En este caso, las mediciones espectrofotométricas se hacen primero con la solución preparada con el estándar de referencia y después con la solución preparada del problema. La segunda medición se hace lo más rápido posible después de la primera usando las mismas condiciones experimentales.

Determinaciones cuantitativas en la región visible.

Las valoraciones espectrofotométricas en la región visible, lo mismo que en la región ultravioleta, suelen requerir la comparación simultánea de la absorbancia hecha por la preparación de la solución problema con la hecha por una solución patrón que aproximadamente contenga la misma cantidad de una estándar de referencia”⁽⁶⁾

3.4 GENERALIDADES DE VALIDACIÓN ⁽⁴⁾

Concepto: Evidencia documental de que un procedimiento. Analítico presenta un alto grado de seguridad en los resultados. Siendo estos resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

Según la USP 25, los métodos analíticos se clasifican en varias categorías para su validación:

Ensayos tipo I:

Ensayo para cuantificación de componente mayoritario en productos farmacéuticos terminado, materia prima.

Ensayos tipo II:

Ensayo para determinación de impurezas y compuestos de degradación en producto farmacéutico terminado.

Ensayo Tipo III:

Ensayos para la determinación de características de un producto farmacéutico.

Ensayos Tipo IV:

Ensayos de identificación de producto farmacéutico.

El método que es objeto de estudio en el presente trabajo pertenece a la categoría I y se clasifican como “métodos cuantitativos para determinación del principio activo como materia prima o en formulaciones farmacéuticas”. Los parámetros de validación que se deben considerar varían según los requisitos

legales exigidos por distintas organizaciones, según la literatura consultada, para este tipo de métodos deben evaluarse:

1. Limite de detección.
2. Limite de cuantificación.
3. Rango.
4. Linealidad.
5. Precisión.
 - 5.1 Repetibilidad.
 - 5.2 Precisión intermedia.
6. Exactitud.
7. Selectividad.
8. Robustez.

Además de otras pruebas no especificadas por la USP y que son importantes para determinar que el método propuesto es ideal para ser usado como método oficial por cualquier laboratorio de control de calidad. Por ejemplo la Robustez

Definición de parámetros a evaluar ⁽¹⁾

1. Limite de detección: Mínima cantidad de analito que puede ser detectado aunque no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas.

2. Limite de cuantificación: Mínima cantidad de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión.

Teóricamente el límite de cuantificación es 10 veces el límite de detección.

3. Rango: Diferencia en magnitud entre la mayor y menor concentración de analito que puede determinarse satisfactoriamente con adecuada linealidad, exactitud y precisión.

4. Linealidad: Es la capacidad del método analítico para proporcionar resultados directamente (o por transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido.

5. Precisión: Refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí.

La precisión se puede estudiar a dos niveles ⁽²⁾:

5.1 Repetibilidad: evalúa la precisión del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (aparatos, reactivos, analistas) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

5.2 Precisión intermedia: Evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (analista, día, instrumento, etc.). Es la precisión intralaboratorio.

6. Exactitud: Indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximo posible del valor considerado como verdadero. Matemáticamente se expresa como el valor numérico del error sistemático (diferencia entre el valor medio hallado y el verdadero) o bien como error relativo porcentual.

7. Selectividad: Se define como la capacidad del método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra. Se expresa como el grado de inexactitud del método. La evaluación de este parámetro es especialmente importante en el caso de los métodos analíticos diseñados para la cuantificación del analito en formulaciones y en estudios de estabilidad.

Aunque la especificidad y la selectividad se consideran términos equivalentes, algunos autores los diferencian, considerando:

-La selectividad: como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y

-La especificidad: como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto.

8. Robustez: Mide la capacidad del método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo de rutina.

No debe confundirse con el término de robustez que aparece en la USP el cual es asimilable al término reproducibilidad.

Factores a evaluar:

Cuantitativos: pH, temperatura, agitación etc.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio experimental. El propósito de esta investigación es validar un método que sea confiable para ser utilizado en el análisis de la Indigotina en añil.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

La investigación bibliográfica se desarrolla con la revisión de literatura en La Biblioteca de la Universidad de El Salvador (UES), Biblioteca de la Universidad Salvadoreña Alberto Mansferrer (USAM) y Biblioteca de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Además de textos proporcionados por especialistas en el tema, así como información disponible en la Red Internacional de Comunicación (INTERNET) Relacionados con la validación.

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO

Se analizarán tres muestras al azar que ingresan a un laboratorio privado nacional como solicitudes de análisis y se comparan con los análisis obtenidos en dicho laboratorio; los datos que se obtendrán serán a partir de los resultados obtenidos experimentalmente por observación directa y serán analizados por cálculos estadísticos.

4.4 MÉTODO

Con el propósito de asegurar que una metodología de análisis sea ideal y específica para un producto se hace necesario contar con procedimientos escritos en forma clara evitando en la medida de lo posible el uso de lenguaje

muy técnico que generen confusión a cualquiera de las personas encargadas del análisis. La recolección de datos se hará por plantillas Excel.

4.5 TÉCNICA DE ANÁLISIS DE MUESTRA.

1. Pesar 500 mg de muestra a analizar.
2. Colocar en balón de fondo plano de 250 mL.
3. Agregar 120 mL de ácido sulfúrico concentrado.
4. Agitar con agitador magnético por 1 ½ hora en baño María a ± 80 °C.
5. Pasar a un balón volumétrico de 1000 mL y aforar con agua destilada.
6. Llevar a volumen de 1000 mL con agua desmineralizada.
7. Tomar 20 mL de la solución anterior y pasar a un balón volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con ácido sulfúrico al 5% Solución madre:
Concentración: 100 mcg/mL.

4.6 MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Preparación de la muestra de 2.0 mcg/mL:

De la solución madre tomar 2.0 mL, poner en un balón volumétrico de 100 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.

Preparación de la muestra 4.0 mcg/mL:

De la solución madre tomar 4.0 mL, poner en un balón volumétrico de 100 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.

Preparación de la muestra 6.0 mcg/mL:

De la solución madre tomar 6.0 mL, poner en un balón volumétrico de 100 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.

Preparación de la muestra 8.0 mcg/mL:

De la solución madre tomar 8.0 mL, poner en un balón volumétrico de 100 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.

Preparación de la muestra 10.0 mcg/mL:

De la solución madre tomar 10.0 mL, poner en un balón volumétrico de 100 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.

Leer todas las alícuotas preparadas Leer a $\lambda = 610$ nm usando H₂SO₄ 5% como blanco.

Con las lecturas obtenidas anteriormente en el equipo U.V. determinar la concentración real de la muestra por medio de la curva de calibración obtenida con el estándar de trabajo.

4.7 MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR.

Pesar exactamente 10.0 mg de estándar de indigotina calidad USP (estándar al 100% de concentración), poner en un balón de 100 mL y aforar con H₂SO₄ 5% (Solución madre concentración: 100 mcg/mL), de la solución madre preparar las siguientes diluciones.

Preparación del estándar 2.0 mcg/mL:

De la solución madre tomar 2.0 mL, poner en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.

Preparación del estándar 4.0 mcg/mL:

De la solución madre tomar 4.0 mL, poner en un balón volumétrico de 100 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.

Preparación del estándar 6.0 mcg/mL:

De la solución madre tomar 6.0 mL, poner en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.

Preparación del estándar 8.0 mcg/mL:

De la solución madre tomar 8 mL, poner en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.

Preparación del estándar 10.0 mcg/mL:

De la solución madre tomar 10.0 mL, poner en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.

Leer todas las alícuotas preparadas a $\lambda = 610$ nm usando H₂SO₄ 5% como blanco.

Con las lecturas obtenidas anteriormente obtener una curva de calibración, la cual nos servirá como referencia para obtener la concentración de la muestra analizada.

4.8 METODOLOGIA DE VALIDACIÓN ⁽¹³⁾

Elaboración de protocolo de validación y Metodología analítica para la evaluación de parámetros. (Anexo N° 1)

5.0 Resultados e interpretación de parámetros.

5.1 Desarrollo del límite de detección.

5.2 Desarrollo del límite de cuantificación.

5.3 Desarrollo del rango de trabajo.

5.4 Desarrollo de la selectividad.

5.5 Desarrollo de la linealidad.

5.6 Desarrollo de la precisión.

5.7 Desarrollo de la exactitud.

5.8 Desarrollo de la robustez.

5.9 Resumen de evaluación de parámetros y resultados.

INFORME FINAL

Incluirá las referencias de la calibración y verificación de los equipos utilizados, los resultados primarios y estadísticos de cada parámetro, la discusión de los resultados y las conclusiones de la validación.

CAPITULO V

RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

5.1. EVALUACION DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.

Ruido del equipo U.V. según manual de especificaciones: 0.0002.

Límite de detección teórico: RUIDO x 3.

Límite de detección teórico: $0.0002 \times 3 = 0.0006$.

Ecuación de la curva de calibración: $y = 0.0697x + 0.0026$.

Concentración a preparar muestra: $x = (0.0006 - 0.0026)/0.0697 = -0.0287$ mcg/mL.

Tabla No 1 Análisis de Límite de detección.

Absorbancias teóricas	Concentración a preparar muestra ($\mu\text{g/ml}$)	Resultado
0.0025	-0.0014	
0.0030	0.0060	Detección de ruido
0.0050	0.0350	
0.0070	0.0650	

En el **Límite de detección** se determina que la concentración a la cual el equipo U.V. detecta la menor concentración de muestra es a 0.0060 mcg/mL.

5.2 EVALUACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Ruido del equipo U.V. según manual de especificaciones: 0.0002.

Límite de detección teórico: RUIDO x 10.

Límite de detección teórico: $0.0002 \times 10 = 0.002$.

Ecuación de la curva de calibración: $y = 0.0697x + 0.0026$.

Concentración a preparar muestra: $x = (0.002 - 0.0026)/0.0697 =$
 -0.0086 mcg/mL .

Tabla No. 2 Análisis de Límite de cuantificación (ver anexo N° 1)

CONCENTRACIÓN DE MUESTRA (mcg/mL)				
	0.0600	0.1000	0.6000	2.0000
	0.006	0.069	0.011	0.013
	0.009	0.056	0.010	0.016
	0.008	0.064	0.010	0.013
	0.007	0.085	0.012	0.015
	0.006	0.051	0.008	0.013
	0.010	0.069	0.012	0.014
% CV	20.52%	18.11%	14.44%	9.04%

En el **Límite de cuantificación** se determina que la concentración a la cual el equipo U.V. detecta la concentración de muestra con linealidad, precisión y exactitud es: 2.00 mcg/mL.

5.3 EVALUACIÓN DEL RANGO DE TRABAJO.

En el **rango de trabajo**, se comprobó experimentalmente que el rango propuesto (2 mcg/mL – 10 mcg/mL) es el adecuado para obtener resultados lineales, precisos y exactos.

5.4 EVALUACIÓN DE LA SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.

Tabla No 3 Análisis de Selectividad del método por degradación de la muestra.

Condiciones normales de operación			Muestra + 5% NaOH 3N		Muestra + 2.5% HCL Concentrado	
[] teórica de muestra (µg/ml)	[] real de muestra (µg/ml)	Absorbancia	[] real de muestra (µg/ml)	Absorbancia	[] real de muestra (µg/ml)	Absorbancia
2	0.88	0.063	1.32	0.14	1.83	0.130
4	1.76	0.128	2.64	0.28	3.61	0.260
6	2.64	0.198	3.93	0.41	5.60	0.381
8	3.52	0.261	5.28	0.53	7.14	0.501
10	4.40	0.317	6.61	0.67	9.04	0.622

En el análisis de **selectividad**, se observa como hay un aumento de concentración al degradar la muestra debido probablemente a la formación de productos de degradación que son sumados al principio activo durante la lectura de la muestra en el equipo U.V.

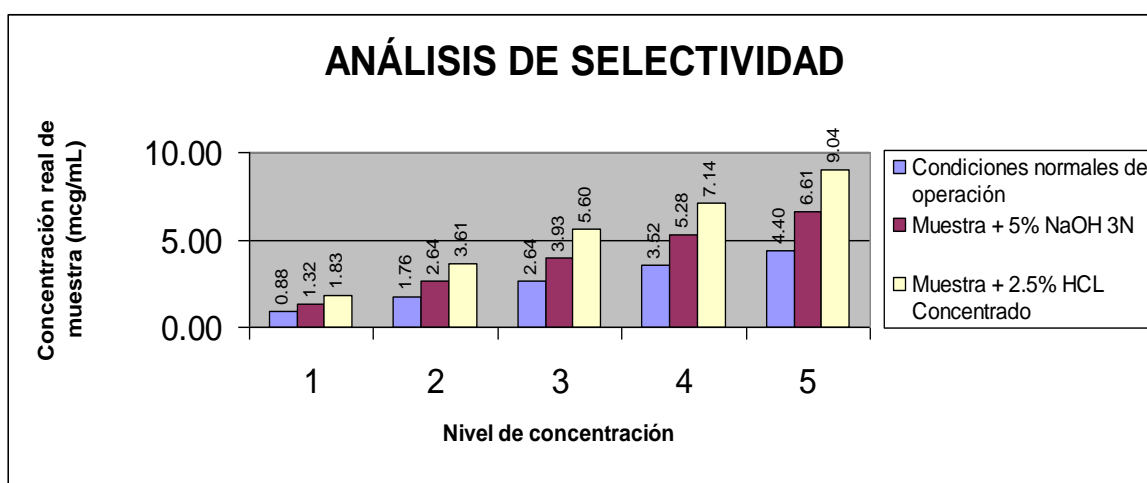


Figura N° 1 Concentraciones obtenidas al agregar contaminantes a la muestra

En el gráfico de **selectividad** se observa de manera más evidente como aumenta la concentración al agregar NaOH y HCL, la formación de productos de degradación debido a una segunda digestión con HCL produce subproductos los cuales son sumados a la concentración de la muestra a la hora de hacer la lectura en el equipo U.V.

5.5 EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD.

Tabla No. 4 Análisis de Linealidad Día 1. (ver anexo N° 2)

No.	[] real de la mx µg/ml)	A	[] real a través de interpolación	Error %	Promedio Error %	%CV	Factores de Respuesta	%CV FR
1	0.8840	0.065	0.8819	0.24%	0.24%	1.88%	0.0735	1.84%
2	0.8700	0.064	0.8674	0.30%			0.0736	
3	0.8700	0.064	0.8674	0.30%			0.0736	
4	0.8700	0.064	0.8674	0.30%			0.0736	
5	0.8700	0.064	0.8674	0.30%			0.0736	
6	0.9110	0.067	0.9111	0.01%			0.0735	
7	1.7680	0.125	1.7566	0.64%	0.63%	0.41%	0.0707	
8	1.7680	0.125	1.7566	0.64%			0.0707	
9	1.7680	0.125	1.7566	0.64%			0.0707	
10	1.7820	0.126	1.7711	0.61%			0.0707	
11	1.7820	0.126	1.7711	0.61%			0.0707	
12	1.7680	0.125	1.7566	0.64%			0.0707	
13	2.6520	0.187	2.6604	0.32%	0.30%	0.55%	0.0705	
14	2.6380	0.186	2.6458	0.30%			0.0705	
15	2.6380	0.186	2.6458	0.30%			0.0705	
16	2.6240	0.185	2.6312	0.27%			0.0705	
17	2.6660	0.188	2.6749	0.33%			0.0705	
18	2.6380	0.186	2.6458	0.30%			0.0705	
19	3.5350	0.247	3.5350	0.00%	0.02%	0.49%	0.0699	
20	3.5350	0.247	3.5350	0.00%			0.0699	
21	3.5490	0.248	3.5496	0.02%			0.0699	
22	3.5630	0.249	3.5642	0.03%			0.0699	
23	3.5200	0.246	3.5204	0.01%			0.0699	
24	3.5630	0.249	3.5642	0.03%			0.0699	
25	4.4190	0.312	4.4825	1.44%	1.37%	0.73%	0.0706	
26	4.3480	0.307	4.4096	1.42%			0.0706	
27	4.3380	0.306	4.3951	1.32%			0.0705	
28	4.3480	0.307	4.4096	1.42%			0.0706	
29	4.3380	0.306	4.3951	1.32%			0.0705	
30	4.3380	0.306	4.3951	1.32%			0.0705	

Tabla No. 5 Análisis de Linealidad Día 2. (Ver anexo N° 2)

No.	[] real de la mx µg/ml)	A	[] real a través de interpolación	Error %	Promedio Error %	%CV	Factores de Respuesta	%CV FR
1	0.8379	0.061	0.8422	0.51%	1.45%	1.20%	0.0728	1.64%
2	0.8560	0.063	0.8704	1.68%			0.0736	
3	0.8700	0.064	0.8845	1.67%			0.0736	
4	0.8560	0.063	0.8704	1.68%			0.0736	
5	0.8570	0.063	0.8704	1.56%			0.0735	
6	0.8570	0.063	0.8704	1.56%			0.0735	
7	1.7960	0.127	1.7721	1.33%	1.24%	0.62%	0.0707	
8	1.7960	0.127	1.7721	1.33%			0.0707	
9	1.7960	0.127	1.7721	1.33%			0.0707	
10	1.7960	0.127	1.7721	1.33%			0.0707	
11	1.8240	0.129	1.8003	1.30%			0.0707	
12	1.8010	0.128	1.7862	0.82%			0.0711	
13	2.7461	0.194	2.7161	1.09%	1.10%	1.25%	0.0706	
14	2.7604	0.195	2.7302	1.09%			0.0706	
15	2.7461	0.194	2.7161	1.09%			0.0706	
16	2.8178	0.199	2.7866	1.11%			0.0706	
17	2.8178	0.199	2.7866	1.11%			0.0706	
18	2.8034	0.198	2.7725	1.10%			0.0706	
19	3.6786	0.259	3.6319	1.27%	1.28%	0.73%	0.0704	
20	3.7504	0.264	3.7024	1.28%			0.0704	
21	3.7217	0.262	3.6742	1.28%			0.0704	
22	3.7504	0.264	3.7024	1.28%			0.0704	
23	3.7217	0.262	3.6742	1.28%			0.0704	
24	3.7073	0.261	3.6601	1.27%			0.0704	
25	4.4910	0.317	4.4491	0.93%	0.92%	0.35%	0.0706	
26	4.4610	0.315	4.4209	0.90%			0.0706	
27	4.4910	0.317	4.4491	0.93%			0.0706	
28	4.4910	0.317	4.4491	0.93%			0.0706	
29	4.4610	0.315	4.4209	0.90%			0.0706	
30	4.4910	0.317	4.4491	0.93%			0.0706	

En el **error** del método observamos valores menores del 2% para ambos días de análisis lo que nos indica que la exactitud del método es adecuado.

Para el **Coefficiente de variación** se observan valores menores de 2% indicándonos buena variabilidad del método, es decir que la dispersión de los resultados es la adecuada para los niveles de concentración de prueba.

El **coeficiente de variación de los factores de respuesta** es menor del 2% por lo que la dispersión de los resultados es baja indicándonos una buena sensibilidad entre la respuesta y la cantidad de muestra, concluyéndose que el sistema es preciso.

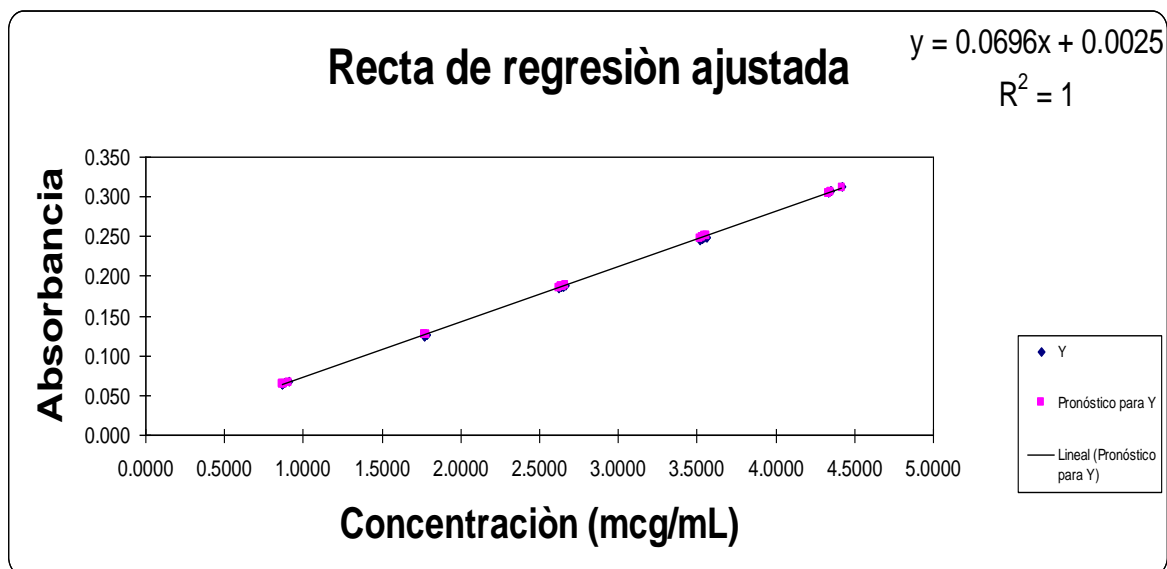


Figura N° 2 Recta de regresión ajustada día 1.

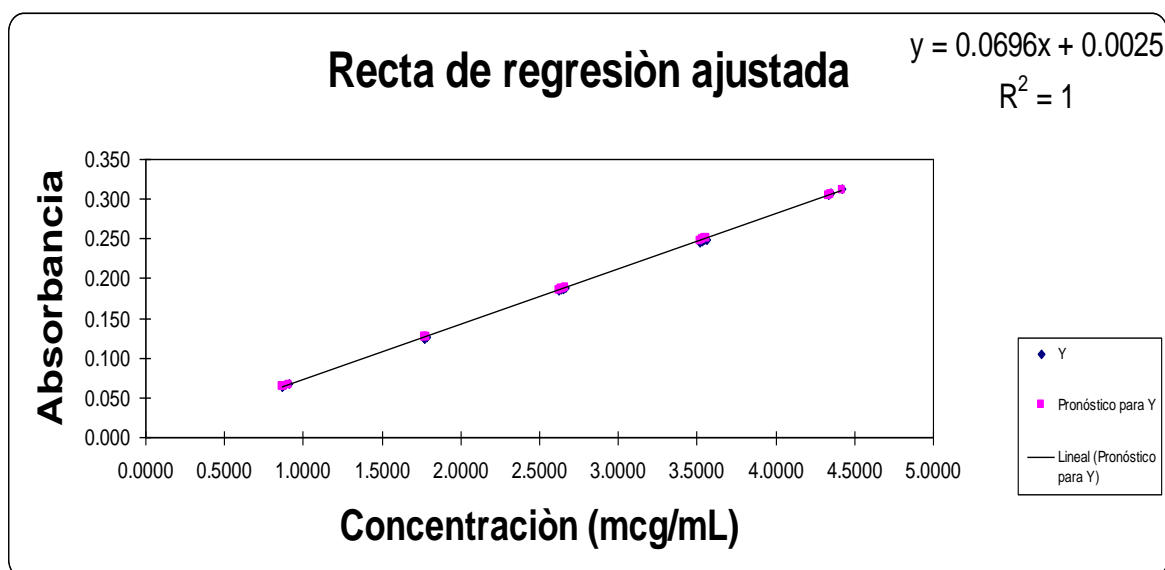


Figura N° 3 Recta de regresión ajustada día 2

Se observa que la **Recta de Regresión** del gráfico, se ajusta a una línea recta cuya ecuación es:

Tabla No. 6 Ecuación de la recta para cada día de análisis.

Día 1	Día 2
$y = 0.0696x + 0.0025$	$y = 0.0699x + 0.0022$

Tabla No. 7 Estadísticas de Regresión (ver anexo 2)

	Día 1	Día 2
Coefficiente de correlación múltiple (R)	0.999912	0.999974
Coefficiente de determinación R^2	0.999824	0.999949
R^2 ajustado	0.999817	0.999947
Error típico	0.001179	0.000669
Observaciones	30	30

El **coeficiente de correlación R**, es igual a 0.999, para ambos días esto se interpreta diciendo que existe buena correlación entre las variables, es decir un

adecuado grado de relación entre la concentración de indigotina en la muestra y la absorbancia obtenida en el equipo U.V.

El **coeficiente de determinación R^2** , es igual a 0.999, para ambos días lo que significa que el 99,9 % de la variación de la variable dependiente (Absorbancia) se explica por la variable independiente (Concentración de Indigotina).

Tabla No. 8 Análisis de Varianza Día 1 (ver anexo 2).

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	0.221568887	0.22156888	159156.31825	4.0562E-54	
Residuos	28	3.89801E-05	1.3921E-06			
Total	29	0.221607867				
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	0.002483853	0.000508	4.88417075	3.8E-05	0.00144213	0.00353
Pendiente	0.069648999	0.000174	398.944003	4.1E-54	0.06929138	0.07001

Tabla No. 9 Análisis de Varianza Día 2 (ver anexo 2).

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	0.24735642	0.24735642	552015.581	1.1145E-61	
Residuos	28	1.25467E-05	4.4809E-07			
Total	29	0.247368967				
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	0.002229471	0.000284	7.83899289	1.54076E-08	0.00164688	0.002812
Pendiente	0.069933707	9.412E-05	742.977510	1.1145E-61	0.06974089	0.070126

Tabla No. 10 Probabilidad de dependencia de variable Y por X.

	Día 1	Día 2
F	159,156.31825	552,015.581

Se muestra una $p < 0.001$, siendo altamente significativa por lo que se acepta la hipótesis alternativa que expresa que existe una relación lineal de dependencia de la variable Y por la X.

En la **significación estadística de la desviación estándar de la pendiente b** se acepta la hipótesis alternativa que dice que la pendiente es distinta de cero debido a la muy baja probabilidad de que sea igual a cero.

Tabla No. 11 Probabilidad de que la pendiente sea igual a cero.

	Día 1	Día 2
Probabilidad	4.1000E-54	1.1145E-61

(día 1 $p = 4.1000E-54$) y (día 2 $p = 1.1145E-61$), se confirma ya que los límites inferior y superior no incluyen el cero con un nivel de confianza del 95%: Día1]0.06929138, 0.07001 [y]0.06974089, 0.07012651[Día 2.

En el **Test de Proporcionalidad** se rechaza la hipótesis nula que dice que el intercepto es igual a cero debido a la baja probabilidad de que esto ocurra día 1 ($p = 3.800E-05$) y ($p = 1.54076E-08$) día 2, Esto se confirma ya que los límites inferior y superior no incluyen el cero con un nivel de confianza del 95%; Esto

debido a un error tipo alfa el cual es corregido por el uso de un blanco en la lectura de la muestra, además el rango de análisis del método propuesto inicia en 2 mcg/mL.

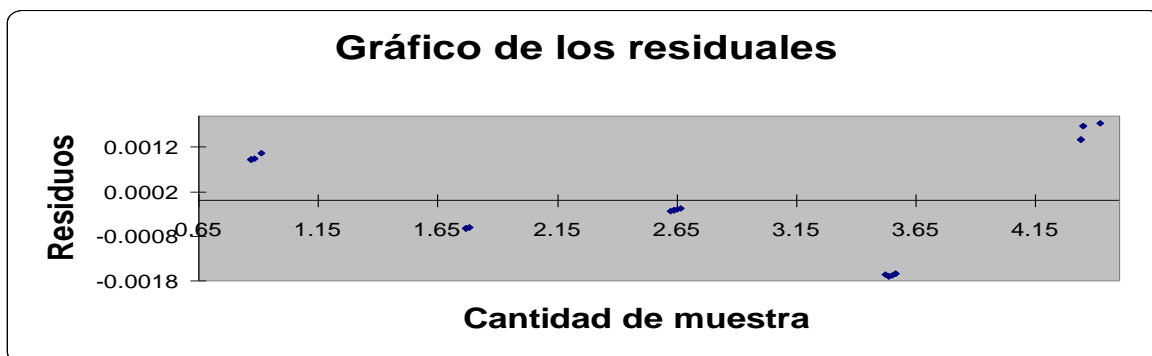


Figura N° 4 Residuales día 1

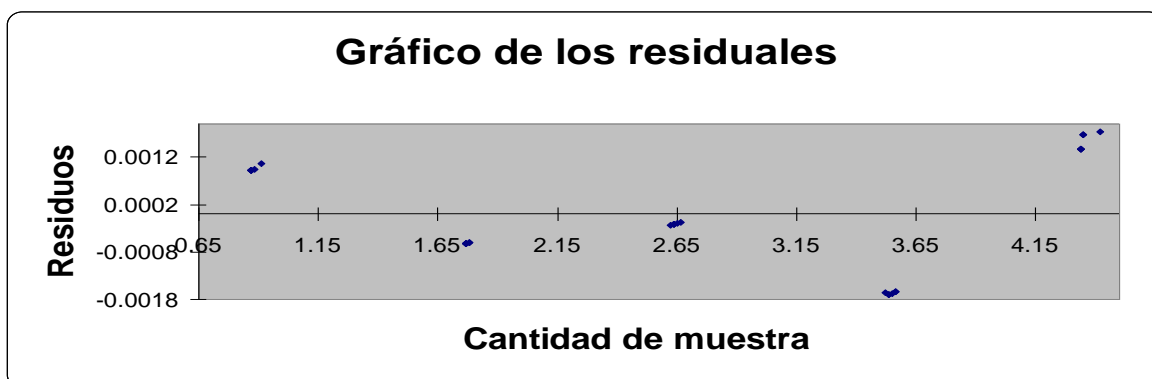


Figura N° 5 Residuales día 2

En el **Gráfico de residuales**, en ambas graficas se observa que la distribución de puntos es aleatoria sin ninguna tendencia por lo que se aceptan la hipótesis nula que dice:

No existe diferencia entre la distribución normal y la distribución de los residuales.

5.6 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN.

5.6.1 REPETIBILIDAD.

Tabla No. 12 Repetibilidad del Método. (ver anexo N° 2)

Concentración de muestra en base a peso ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	S	% CV
2.00	0.064	0.001	0.90
2.00	0.064		
2.00	0.065		
4.00	0.125	0.000	0.00
4.00	0.125		
4.00	0.125		
6.00	0.187	0.001	0.31
6.00	0.186		
6.00	0.186		

En la **Repetibilidad de Método** se observa que todos los coeficientes de variación, son menores al 2 %, por lo que se demuestra la baja variabilidad del método analítico.

5.6.2 PRECISIÓN INTERMEDIA

Tabla No. 13 Precisión Intermedia. (Ver anexo N° 2)

Concentración de muestra en base a peso ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia día 1	% CV	% CV PROMEDIO	Absorbancia día 2	% CV	% CV PROMEDIO	% CV GLOBAL
2.00	0.064	0.91	0.40	0.064	0.00	0.25	0.33
2.00	0.063						
2.00	0.063						
4.00	0.127	0.00					
4.00	0.127						
4.00	0.127						
6.00	0.194	0.30					
6.00	0.195						
6.00	0.194						

En la **Precisión intermedia** se observa que el coeficiente de variación promedio de los dos días de análisis es de 0.33 %, siendo un valor adecuado que demuestra la poca variabilidad que presenta el método en días distintos.

5.7 DESARROLLO DE LA EXACTITUD:

Tabla No. 14 Ensayo de exactitud día 1 de análisis

DIA 1				
Concentración de muestra (µg/ml)	Concentración de indigotina encontrada (µg/ml)	% de recuperación	S ²	CV
0,8819	0,8840	99,76	0,0002	0,3945
0,8674	0,8700	99,70		
0,8674	0,8700	99,70		
0,8674	0,8700	99,70		
0,8674	0,8700	99,70		
0,9111	0,9110	100,01		
0,8674	0,8700	99,70		
0,8819	0,8840	99,76		
0,8674	0,8700	99,70		
1,7566	1,7680	99,36	0,00005	
1,7566	1,7680	99,36		
1,7566	1,7680	99,36		
1,7711	1,7820	99,39		
1,7711	1,7820	99,39		
1,7566	1,7680	99,36		
1,7566	1,7680	99,36		
1,7566	1,7680	99,36		
1,7711	1,7820	99,39		
2,6604	2,6520	100,32	0,00017	
2,6458	2,6380	100,30		
2,6458	2,6380	100,30		
2,6312	2,6240	100,27		
2,6749	2,6660	100,33		
2,6458	2,6380	100,30		
2,6458	2,6380	100,30		
2,6312	2,6240	100,27		
2,6458	2,6380	100,30		
PROMEDIO	1,7614	1,7633	99,80	

Tabla No. 15 Ensayo de exactitud día 2 de análisis.

DIA 2				
Concentración de muestra (µg/ml)	Concentración de indigotina encontrada (µg/ml)	% de recuperación	S ²	CV
0,8422	0,8350	100,86	0,00025	0,7490
0,8704	0,8709	99,94		
0,8845	0,8700	101,67		
0,8704	0,8711	99,92		
0,8704	0,8711	99,92		
0,8704	0,8711	99,92		
0,8704	0,8711	99,92		
0,8422	0,8350	100,86		
0,8704	0,8710	99,93		
1,7921	1,7999	99,57	0,00011	
1,7921	1,7999	99,57		
1,7921	1,7999	99,57		
1,7921	1,7999	99,57		
1,8203	1,8210	99,96		
1,8203	1,8210	99,96		
1,7921	1,7999	99,57		
1,8203	1,8210	99,96		
1,7921	1,7999	99,57		
2,7565	2,7891	98,83	0,00012	
2,7275	2,7704	98,45		
2,7565	2,7891	98,83		
2,8066	2,8010	100,20		
2,8066	2,8010	100,20		
2,8125	2,8034	100,32		
2,7275	2,7804	98,10		
2,7565	2,7891	98,83		
2,8066	2,8010	100,20		
PROMEDIO	1,8134	1,8205	99,78	

Tabla No. 16 Prueba de Cochran día 1 y día 2 de análisis.

Prueba de G de Cochran		
	día 1	día 2
G experimental:	0,4698	0,5151
G de tablas (alfa=0.05; k=3; n=3)	0,7977	0,7977

En la prueba **G de Cochran** se cumple $G_{exp} < G_{tab}$, por lo que se acepta la hipótesis nula que dice que las varianzas de los datos son semejantes y poseen una variación adecuada observadas en K muestras del mismo tamaño.

Tabla No. 17 Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

	DÍA 1		DÍA 2	
	Variable 1	Variable 2	Variable 1	Variable 2
Media	1,761440741	1,763296296	1,813392593	1,820488889
Varianza	0,543557353	0,537446447	0,630180117	0,644063791
Observaciones	27	27	27	27
Varianza agrupada	0,5405019		0,637121954	
Diferencia hipotética de las medias	0		0	
Grados de libertad	52		52	
Estadístico t	-0,009273469		-0,032665352	
P(T<=t) dos colas	0,992636435		0,974066516	
Valor crítico de t (dos colas)	2,006646761		2,006646761	

En la prueba t Student Se observa con un 95% de confianza que el t experimental es menor que el t de tablas día 1 ($0.99 < 2,00$) y día 2 ($0.97 < 2,00$), por lo tanto se puede decir que no hay diferencia significativa entre el valor hallado y el valor verdadero.

5.8 DESARROLLO DE ROBUSTEZ:

Tabla No.18 Robustez Condiciones normales.

Nivel de concentración	Concentración teórica peso de muestra ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	Concentración real de muestra (mcg/mL)
1	2.003	0.064	0.88
2	4.006	0.124	1.74
3	6.010	0.188	2.66
4	8.013	0.248	3.52
5	10.016	0.306	4.35
PARAMETROS: Temperatura: 75°C - 85°C Agitación: 300 rpm Tiempo: 1 hora 30 minutos			

Tabla No. 19 Robustez variando temperatura, agitación y tiempo.

Nivel de concentración	Concentración teórica peso de muestra ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	Concentración real de muestra (mcg/mL)
1	2.010	0.058	0.79
2	4.020	0.114	1.60
3	6.030	0.171	2.42
4	8.040	0.223	3.16
5	10.050	0.275	3.91
PARAMETROS: Temperatura: 85°C - 95°C Agitación: 325 rpm Tiempo: 1 hora			

Tabla No. 19 Robustez variando agitación.			
Nivel de concentración	Concentración teórica peso de muestra ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	Concentración real de muestra (mcg/mL)
1	2.04	0.039	0.52
2	4.09	0.077	1.07
3	6.13	0.111	1.55
4	8.17	0.149	2.10
5	10.22	0.185	2.62
PARAMETROS: Temperatura: 75°C - 85°C Agitación: 250 rpm Tiempo: 1 hora 30 minutos			

Tabla No. 21 Robustez variando Temperatura.

Nivel de concentración	Concentración teórica peso de muestra ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	Concentración real de muestra (mcg/mL)
1	2.01	0.048	0.52
2	4.02	0.094	1.07
3	6.03	0.139	1.55
4	8.04	0.186	2.10
5	10.05	0.229	2.62
PARAMETROS: Temperatura: 65°C - 75°C Agitación: 300 rpm Tiempo: 1 hora 30 minutos			

Tabla No. 22 Resumen de Parámetros alterados y Concentraciones obtenidas.

Nivel de concentración	Concentración real en condiciones normales ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración real variando temperatura, agitación y tiempo ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración real variando temperatura ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración real variando agitación ($\mu\text{g/ml}$)
1	0.88	0.79	0.65	0.52
2	1.74	1.60	1.31	1.07
3	2.66	2.42	1.96	1.55
4	3.52	3.16	2.63	2.10
5	4.35	3.91	3.25	2.62

En la **robustez** se observa como disminuye la concentración de la muestra al variar los parámetros del método, manteniendo una proporcionalidad por nivel de concentración.

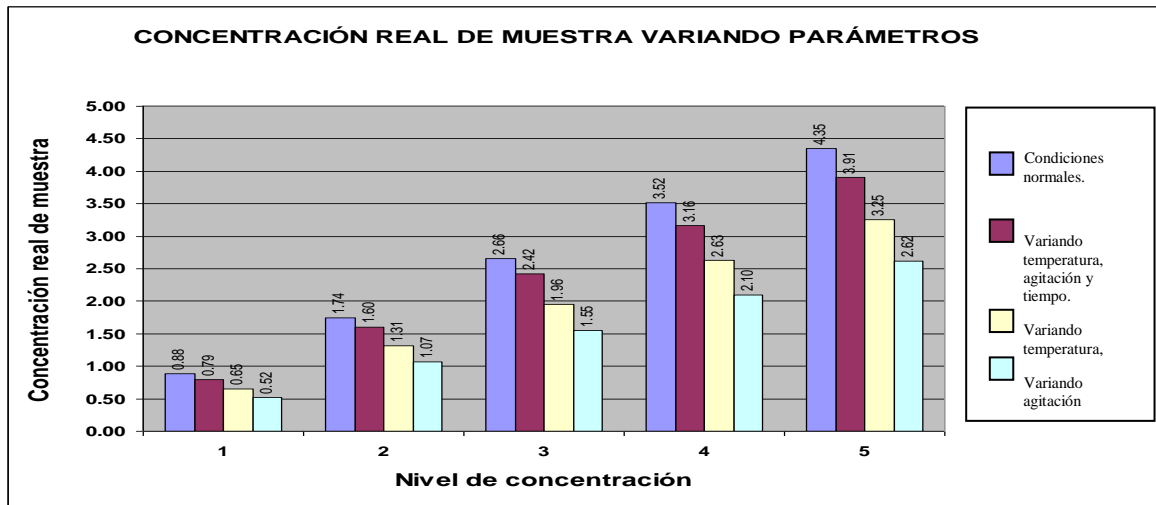


Figura N° 6 Concentraciones variando parámetros para Robustez

En el gráfico de **robustez** se hace evidente que al variar los parámetros no se obtienen resultados reproducibles con respecto al método propuesto por lo que el método propuesto no está sujeto a cambios.

El parámetro más crítico para realizar el análisis de la muestra es la agitación, por lo que se debe poner especial cuidado en este parámetro al realizar el análisis de la muestra.

5.9 Resumen de evaluación de parámetros y resultados.

Tabla No. 23 Resumen de evaluación de parámetros y resultados.

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
LIMITE DE DETECCIÓN			
Concentración más baja de muestra detectada.	Encontrar la concentración más baja que puede ser detectado por el equipo U.V.	El límite de detección detectado tiene un valor de 0.006 µg/ml.	La sensibilidad del método es adecuada ya que pequeñas trazas de indigotina pueden ser detectadas.
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN			
Nivel de concentración con una variación cercano 10%.	Nivel de concentración más baja que posee un coeficiente de variación de 10% o el más cercano.	El límite de cuantificación está en la concentración de 2 µg/ml, con un coeficiente de variación de 9.04%	La concentración más baja para obtener resultados lineales, precisos y exactos es la concentración 2 µg/ml.
Determinar concentración.			
SELECTIVIDAD			
Interferencias por productos de degradación.	Se espera una modificación en la absorbancia de la muestra.	Se dio una modificación en las absorbancias obtenidas debido a degradación de la muestra.	El método es selectivo.
LINEALIDAD			
Error del método.	Se espera un error menor del 2%.	Los valores de error porcentual obtenido para ambos días de análisis fueron menores al 2%.	Lo que indica que la inexactitud del método es adecuada.
Coeficiente de variación.	Se espera un error menor del 2%.	Los valores de coeficiente de variación obtenido para ambos días de	Indicando buena variabilidad del método.

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
		análisis fueron menores al 2%.	
Coefficiente de variación de los factores de respuesta.	Se espera un error menor del 2%.	Los valores de coeficiente de variación de los factores de respuesta obtenido para ambos días de análisis fueron menores al 2%.	El sistema es preciso.
Recta de Regresión.	Que la recta se ajuste a la ecuación; $Y = ax + b$	La recta de regresión para ambos días de análisis se ajusta a la ecuación $Y = ax + b$	Existe una relación de dependencia entre al variable x por y.
Coefficiente de correlación (R).	Valor recomendable: ≥ 0.999	El coeficiente de correlación para ambos días de análisis fueron > 0.999 .	Existe un adecuado grado de relación entre la concentración de muestra y la absorbancia obtenida en el equipo U.V.
El coeficiente de determinación R^2.	Valor máximo 1	Los coeficientes de determinación para ambos días de análisis fueron > 0.999 y < 1	Indicando que la variación de la absorbancia se explica por la concentración.
Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente	La probabilidad de que la pendiente sea distinta de cero debe ser muy baja, y se confirma ya que los límites inferior y superior no deben incluir el cero con un nivel de confianza del 95%.	Para ambos días de análisis la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente es distinta de cero debido a la muy baja probabilidad de que sea igual a cero.	Se acepta la hipótesis alternativa que dice que la pendiente es distinta de cero.
Test de Proporcionalidad	La probabilidad de que el intercepto sea igual a cero debe ser alta, y se confirma ya que los límites inferior y superior no deben incluir el cero con un nivel de confianza del 95%.	Los límites inferior y superior obtenidos para ambos días de análisis no incluyen el cero con un nivel de confianza del 95%.	Se rechaza la hipótesis nula que dice que el intercepto es igual a cero, debido a un error tipo alfa el cual es corregido por el uso de un blanco en la lectura de la muestra.

PARÁMETRO	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Gráfico de residuales	Se espera que la distribución de puntos sea aleatoria sin ninguna tendencia.	En el gráfico de residuales para ambos días de análisis, la distribución de puntos es aleatoria sin ninguna tendencia.	Se acepta la hipótesis nula que dicen que no existe diferencia entre la distribución normal y la distribución de los residuales.
PRECISIÓN			
Repetibilidad del método	Los coeficientes de variación, deben ser menores al 2 %.	Todos los coeficientes de variación por nivel de concentración analizados, son menores al 2 %.	Existe una baja variabilidad del método analítico.
Precisión intermedia	Los coeficientes de variación, deben ser menores al 2 %.	El coeficiente de variación promedio para ambos días de análisis es de 0.33 %.	Existe poca variabilidad del método en días distintos.
EXACTITUD			
Test G de Cochran	$G_{exp} < G_{tab}$	$G_{exp} < G_{tab}$	las varianzas de los datos son semejantes
Test t de Student	$t_{exp} < t_{tab}$	$t_{exp} < t_{tab}$	Los datos provienen de distribuciones con varianzas semejantes
ROBUSTEZ			
Influencia de temperatura, agitación y tiempo sobre el método.	Se espera poder determinar si el método puede ser modificado.	Todos los parámetros involucrados en el método son críticos por lo que el método no puede ser modificado.	El método está ajustado con los parámetros de temperatura, agitación y tiempo especificado.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. En el ensayo de límite de detección, se comprobó experimentalmente que el equipo U.V. es muy sensible a concentraciones muy bajas de indigotina en la muestra, debido a que el método y el equipo son lo suficientemente sensibles para detectar trazas de indigotina.
2. En el Límite de cuantificación, se establece experimentalmente que la cantidad mínima de muestra necesaria para obtener resultados lineales, exactos y precisos es de 2 mcg/mL, el cual es el rango menor establecido en el método propuesto.
3. El Rango de trabajo propuesto es el adecuado ya que se obtiene resultados lineales, exactos y precisos, por lo que si se necesita variar este rango de trabajo es necesario validar nuevamente el método de análisis dentro del rango nuevo propuesto debido a que en la presente investigación solo se trabajó dentro del rango de 2 – 10 mcg/mL obteniendo resultados satisfactorios.
4. El método es selectivo siempre y cuando los parámetros establecidos previamente no son modificados.

5. El método es lineal dentro del rango de trabajo propuesto (2 – 10 mcg/mL).
6. El método es preciso ya que existe una baja variabilidad del método analítico en el rango de trabajo propuesto, indicándonos que no existe diferencia significativa en los resultados obtenidos en días diferentes de análisis de muestra.
7. El método es exacto ya que se demostró experimentalmente que el método es lo suficientemente exacto como para obtener resultados confiables, esto debido a la baja variabilidad de los resultados obtenidos, lo cual se comprobó estadísticamente.
8. El método no es robusto como para hacerle modificaciones debido que al hacer pequeñas variaciones los resultados no son los esperados.
9. El método de análisis de indigotina propuesto ha sido validado satisfactoriamente debido a que cumple con las especificaciones de validación propuestas inicialmente, por lo que se concluye que puede ser usado como método de referencia para obtener resultados lineales, exactos y precisos.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que al iniciar la validación de un método se debe tener previamente validado el proceso de lavado de cristalería para evitar interferencias en el método.
2. Asegurar que todos los equipos utilizados estén calibrados por un proveedor de servicios que a su vez esté certificados por una autoridad competente.
3. Hacer el análisis de la muestra el mismo día sin interrupciones hasta comprobar experimentalmente la estabilidad de la muestra preparada, evitando así interferencia por degradaciones.
4. No hacer ajustes al método de análisis propuesto sin antes hacer un nuevo estudio de validación donde se demuestre que se obtendrán resultados lineales, precisos y exactos.
5. Que en la evaluación de parámetros. Recomendable realizar los cálculos estadísticos por medio del procesador de texto Microsoft Excel, con lo cual se obtienen resultados de forma inmediata y confiable.

6. Realizar la digestión de la muestra en cámara extractora de gases ya que se da la liberación de vapores tóxicos, resultado del calentamiento del ácido sulfúrico.
7. Que después de digerir la muestra en ácido sulfúrico, y diluir esta con agua destilada hacerlo poco a poco y con agitación dentro de un baño de agua fría, la cual debe ser cambiada cada vez que se calienta.
8. Que se haga la validación de métodos analíticos internos de cada laboratorio para comprobar científicamente que dichos métodos producen resultados confiables, precisos y reproducibles dando confianza y seguridad en los resultados obtenidos, Esto es tan importante que se está convirtiendo en una exigencia de buenas prácticas de manufactura para la industria farmacéutica debido a que es un paso previo a la validación de métodos de producción y limpieza.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Asociación Española de Farmacéuticos Industriales (A.E.F.I.), 2001. Validación de métodos analíticos. 1ª Ed. La Bisbal Es. Gispert S.A. p 256-311.
2. Guzmán Julián, O. D., clase de validación impartida en Control de Calidad I, año 2004.
3. Guzmán Julián, O. D., "VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE HUMOS LÍQUIDOS". Universidad de Navarra, España. Octubre de 2003.
4. Organización panamericana para la salud/ Organización mundial para la salud (OPS/OMS), 2001. Buenas Prácticas de Manufactura Vigente. Inspección y Auditoria. 2ª Ed. Bogota Co. Trazo Ltda. p 3-38.
5. Remington, 1995. Farmacia. 19ª Ed. Buenos Aires Ar. Editorial Médica Panamericana. Tomo II. p 846-852.
6. Skoog, D. y otros, 2001. Principios de Análisis Instrumental. 5ª Ed. Madrid Es. McGrawHill. P 323-3.
7. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I.), Validación de Métodos Analíticos, Girona, 2001.
8. Microsoft Encarta, Biblioteca interactiva versión 2006.
9. http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol34_2_00/far02200.html, junio 2005.

10. <http://www.termo.esigie.ipn.mx/seminarios/pablo%20colindres2pcb.html>,
junio 2005.

11. <http://indigo.esmartdesingn.com/historia.html>, junio 2005.

12. <http://www.elsalvador-online.com/ani/html/otro.html>, junio 2005.

13. http://www.infoq.org.sv/alcance_de_la_acreditacion.html, junio 2005.

GLOSARIO

GLOSARIO

1. Añil ⁽⁸⁾: Arbusto perenne, de tallo derecho, hojas compuestas, flores rojizas en espiga o racimo, y fruto en vaina arqueada; Pasta de color azul oscuro, con visos cobrizos, que se saca de los tallos y hojas de esta planta.
2. Obraje ⁽⁸⁾: Lugar donde se procesa el añil.
3. Pila ⁽⁸⁾: Pieza grande de piedra o de otra materia, cóncava y profunda, donde cae o se echa el agua para varios usos.
4. Bitoquera ⁽¹²⁾: Tarugo de madera con que se cierra el agujero para regular el paso de líquidos de los toneles.
5. Puntero ⁽¹⁰⁾: Persona que sobresale en una actividad asignada.
6. Remo ⁽⁸⁾: Vara larga y delgada que llevan en un extremo unas tablillas de madera liviana, casi cuadradas que hacen la función de paletas para batido.
7. Lejías ⁽⁸⁾: Agua en que se han disuelto álcalis o sus carbonatos.
8. Canastero ⁽⁵⁾: Artefacto que cumple la función de colador.
9. Capitán⁽⁹⁾: Monte o bejuco colocado en el canastero tiene hojas velludas que detienen las partículas de basura, tierra, arena, etc. Que pueden arrastrar la tinta.
10. Tendales ⁽¹⁰⁾: Lienzos sostenidos por viguetas donde se seca el añil.
11. Vigueta ⁽¹⁰⁾: Madero largo, grueso y horizontal que soporta cargas.

12. Panes ⁽¹⁰⁾: masa de añil húmeda a la que se le da forma con huacales de morro, para su posterior secado al sol.

ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO 1

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN ⁽³⁾

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 1 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<ol style="list-style-type: none">1. OBJETIVO.2. RESPONSABLES.3. FACTORES CRITICOS.4. PARAMETROS A EVALUAR.5. MUESTRAS.6. EQUIPOS.7. MATERIALES.8. REACTIVOS.9. PREPARACION DE SOLUCIONES DE TRABAJO.10. METODOLOGIA ANALITICA PARA LA VALUACION DE PARAMETROS.11. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 2 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN: Plan experimental diseñado para que cuando se ejecute sea una prueba evidente de que el sistema ha sido validado.</p> <p>1. OBJETIVO:</p> <p>Validar un método analítico para la cuantificación de Indigotina en Añil.</p> <p>2. RESPONSABLES:</p> <p>El trabajo experimental y la evaluación de los parámetros de desempeño de la validación estarán a cargo de las siguientes personas:</p> <p>XIOMARA ROCIO MOLINA.</p> <p>JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ.</p> <p>La supervisión y aprobación de la validación estará a cargo de:</p> <p>OSCAR DAVID GUZMÁN JULIAN.</p> <p>3. FACTORES CRITICOS:</p> <p>Los factores de mayor influencia sobre las características del funcionamiento del método analítico son:</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 3 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>Factores propios del sistema: Temperatura, tiempo, agitación y formación de productos de degradación durante la digestión de la muestra, etc.</p> <p>Factores externos al sistema: Presencia de contaminantes en la matriz del producto, Calibraciones de equipos, Presencia de contaminación por mal lavado de cristalería, etc.</p> <p>Todos los parámetros (internos y externos) que influyen en el sistema, se toman en cuenta durante el desarrollo de la validación, para determinar si el método es el ideal para ser usado como método de referencia.</p> <p>4. PARAMETROS A EVALUAR:</p> <p>Para la validación del método propuesto se estudió los siguientes parámetros:</p> <p>4.1 Limite de detección.</p> <p>4.2 Limite de cuantificación.</p> <p>4.3 Rango.</p> <p>4.4 Selectividad.</p> <p>4.5 Linealidad.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 4 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>4.6 Precisión.</p> <p>4.6.1 Repetibilidad.</p> <p>4.6.2 Precisión intermedia.</p> <p>4.7 Exactitud.</p> <p>4.8 Robustez.</p> <p>5. MUESTRAS:</p> <p>Las muestras utilizadas fueron solicitudes de análisis que ingresaron a un Laboratorio Nacional acreditado bajo la Norma ISO/IEC 17025 las cuales en algunos casos fueron previamente analizadas.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN		Página 5 de 26			
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07				
	Código: MP0001				
	Tipo de validación: Retrospectiva				
Nombre del activo: Indigotina					
6. EQUIPOS:					
Tabla No. 1: Equipos utilizados en la validación y condiciones de operación					
Nombre del equipo	Marca	Modelo	Especificaciones de uso en el método	Fecha de ultima calibración	Nombre del proveedor certificado para calibración
Equipo Espectrofotómetro Ultravioleta	Spectronic	Génesis™	<ul style="list-style-type: none"> • Longitud de onda: 610 nm • Blanco: Acido sulfúrico 5% 	Feb-07	Compañía X
Hotplate	Daigger®	SL-25066	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura: 75°C – 85°C • Agitación: 300 rpm. • Tiempo: 1 ½ hora 	Nov-06	Compañía X
Balanza analítica	Shimadzu	AP-36987	Rango: 0.001 – 200.0000	Ene-06	Compañía X
7. MATERIALES:					
3- Espátulas.					
1- Balón de fondo plano de 250 mL.					
2- Beakers de 100 mL.					
2- Beakers de 1000mL.					
3- Beakers de 250 mL.					

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 6 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>2- Balones volumétricos de 1000.0 mL.</p> <p>10- Balones volumétricos de 100.0 mL.</p> <p>1- Agitador magnético.</p> <p>1- Embudo de vidrio.</p> <p>2- Probetas de 250 mL.</p> <p>3- Probetas de 25 mL.</p> <p>3- Probetas de 10 mL.</p> <p>1- Termómetro capacidad mínima 100°C.</p> <p>1- Pizeta.</p> <p>2- Pipetas volumétricas de 2.0 mL.</p> <p>2- Pipetas volumétricas de 4.0 mL.</p> <p>2- Pipetas volumétricas de 6.0 mL.</p> <p>2- Pipetas volumétricas de 8.0 mL.</p> <p>2 Pipetas volumétricas de 10 .0 mL.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 7 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>2- Pipetas volumétricas de 20.0 mL.</p> <p>1- Agitador magnético.</p> <p>8. REACTIVOS:</p> <p>Todos los reactivos que se utilizaron fueron de calidad adecuada y se enlistan a continuación:</p> <p>8.1 Acido sulfúrico concentrado.</p> <p>8.2 Acido clorhídrico concentrado.</p> <p>8.3 Perlas de hidróxido de sodio.</p> <p>9. PREPARACION DE SOLUCIONES DE TRABAJO:</p> <p>9.1 Preparación de H₂SO₄ al 5% (Blanco):</p> <p>Medir con pipeta volumétrica 5.5 mL de acido sulfúrico concentrado calidad reactivo, lo colocamos en un balón volumétrico de 100 mL y aforamos con agua destilada.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 8 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>9.2 Preparación de NaOH 3N:</p> <p>Pesar exactamente 120g de perlas de Hidróxido de sodio, diluir y pasar a un balón de 100 mL y aforar.</p> <p>9.3 Preparación del estándar:</p> <p>Pesar exactamente 10 mg de estándar de indigotina calidad USP (estándar al100% de concentración), colocar en un balón de 100 mL y aforar con H₂SO₄ 5% (Solución madre concentración: 100 mcg/mL), de la solución madre preparar las siguientes diluciones.</p> <p>Preparación del estándar 2.0 mcg/mL:</p> <p>De la solución madre tomar 2.0 mL, colocar en un balón volumétrico de100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.</p> <p>Preparación del estándar 4.0 mcg/mL:</p> <p>De la solución madre tomar 4.0 mL, colocar en un balón volumétrico de100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 9 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>Preparación del estándar 6.0 mcg/mL:</p> <p>De la solución madre tomar 6.0 mL, colocar en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.</p> <p>Preparación del estándar 8.0 mcg/mL:</p> <p>De la solución madre tomar 8.0 mL, colocar en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.</p> <p>Preparación del estándar 10.0 mcg/mL:</p> <p>De la solución madre tomar 10.0 mL, colocar en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.</p> <p>Leer todas las alícuotas preparadas en el equipo U.V. a $\lambda = 610$ nm usando H₂SO₄ 5% como blanco.</p> <p>Con las lecturas obtenidas anteriormente obtener una curva de calibración, la cual nos sirvió como referencia para obtener la concentración de la muestra analizada.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 10 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>9.4 Preparación de la muestra:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar 500.0 mg de muestra a analizar. 2. Pasar a un balón de fondo plano de 250 mL. 3. Agregar 120 mL de ácido sulfúrico concentrado. 4. Agitar con agitador magnético por 1 ½ hora en baño María a 80°C. 5. Pasar a un balón volumétrico de 1000.0 mL y aforar con agua destilada. 6. Llevar a volumen de 1000 mL con agua desmineralizada. 7. Tomar 20 mL de la solución anterior y pasar a un balón volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con ácido sulfúrico al 5% (Solución madre: Concentración: 100 mcg/mL.) <p>Preparación de la muestra de 2.0 mcg/mL:</p> <p>De la solución madre tomar 2.0 mL, colocar en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 11 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>Preparación la muestra 4.0 mcg/mL:</p> <p>De la solución madre tomar 4.0 mL, colocar en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.</p> <p>Preparación de la muestra 6.0 mcg/mL:</p> <p>De la solución madre tomar 6.0 mL, colocar en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.</p> <p>Preparación de la muestra 8.0 mcg/mL:</p> <p>De la solución madre tomar 8.0 mL, colocar en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.</p> <p>Preparación de la muestra 10.0 mcg/mL:</p> <p>De la solución madre tomar 10.0 mL, colocar en un balón volumétrico de 100.0 mL y aforar con H₂SO₄ 5%.</p> <p>Las alícuotas preparadas son leídas a $\lambda = 610$ nm usando H₂SO₄ 5% como blanco.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 12 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>Con las lecturas obtenidas anteriormente en el equipo U.V. determinar la concentración real de la muestra por medio de la curva de calibración obtenida con el estándar de trabajo.</p> <p>10. METODOLOGIA ANALITICA PARA LA EVALUACION DE PARAMETROS:</p> <p>10.1 LÍMITE DE DETECCION:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Determinar el ruido del equipo U.V. utilizado por medio del manual de especificaciones. 2. Multiplicar el ruido del equipo por tres, ese valor encontrado es la absorbancia teórica del límite de detección. 3. Para encontrar la concentración teórica utilizar la ecuación de la recta obtenida en la linealidad, sustituir el valor de absorbancia teórica. 4. Con la ayuda de este valor teórico de concentración preparar muestras de concentración cercana al teórico, hasta detectar ruido en el equipo U.V. 	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 13 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>Resultado esperado: El límite de detección es la alícuota de concentración conocida más baja a la cual el equipo U.V. da una lectura.</p> <p>10.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Determinar el ruido del equipo U.V. utilizado por medio del manual de especificaciones. 2. Multiplicar el ruido del equipo por diez, ese valor encontrado es la absorbancia teórica del límite de cuantificación. 3. Para encontrar la concentración teórica utilizar la ecuación de la recta obtenida en la linealidad, sustituir el valor de absorbancia teórica dentro de la misma. 4. Con la ayuda de este valor teórico de concentración preparar muestras de concentración cercana al teórico. 	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 14 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>5. Leer cada alícuota preparada seis veces.</p> <p>6. Determinar el coeficiente de variación porcentual para cada nivel de concentración preparada (ver anexo N° 1).</p> <p>Resultado esperado: El límite de detección es el nivel de concentración preparado, en el cual el coeficiente de variación porcentual es del 10% o el más cercano a este valor.</p> <p>10.3 RANGO DE TRABAJO:</p> <p>El rango de trabajo es el rango en el cual se obtienen resultados con linealidad, precisión y con exactitud.</p> <p>El rango de trabajo, se comprobó experimentalmente que el rango de trabajo propuesto (2 mcg/mL – 10 mcg/mL) es el adecuado para obtener resultados lineales, precisos y exactos.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 15 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>10.4 ENSAYO DE SELECTIVIDAD ⁽³⁾:</p> <p>Preparar con la muestra una solución madre de concentración conocida de 100 mcg/mL siguiendo el método de análisis propuesto y tres diluciones de la siguiente manera:</p> <p>a) Primera muestra:</p> <p>Seguir el método propuesto para el análisis de la muestra preparamos alícuotas de 2, 4, 6, 8, 10 mcg/mL para efectos de comparación.</p> <p>b) Segunda muestra:</p> <p>Tomar 2 mL de la solución madre y los colocamos en un beaker de 100 mL + 38 mL de H₂SO₄ 5%, agregar poco a poco y con agitación 10 mL de NaOH 3N, tapar con un vidrio de reloj y calentar a temperatura de 40 – 50° C, con agitación de 200 rpm, pasar a un balón volumétrico de 100 mL, aforar con H₂SO₄ 5% y leer a una longitud de onda de 610 nm usando H₂SO₄ 5% como blanco.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 16 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>c) Tercera muestra:</p> <p>Tomar 2.0 mL de la solución madre y colocar en un beaker de 100 mL + 43 mL de H₂SO₄ 5%, agregar poco a poco y con agitación 5 mL de HCL concentrado, tapar con un vidrio de reloj y calentar a temperatura de 40 – 50° C, con agitación de 200 rpm, luego pasar a un balón volumétrico de 100 mL, aforar con H₂SO₄ 5% y leer a una longitud de onda de 610 nm usando H₂SO₄ 5% como Limite de aceptación: Al hacer la comparación de las concentraciones encontradas para cada muestra se espera una modificación en la absorbancia con respecto a la muestra patrón debido a la degradación de la muestra con lo que se demostrará que el método es capaz de sufrir variaciones debido a interferencias adicionadas o desarrolladas.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 17 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>10.5 ENSAYO DE LINEALIDAD ⁽³⁾:</p> <p>Preparar una serie de alícuotas de la muestra siguiendo el método propuesto de concentración 2, 4, 6, 8 y 10 mcg/mL, haciendo seis lecturas en el equipo U.V. por nivel de concentración, hacer el análisis por quintuplicado, llevar dos rectas para días distintos de análisis, para hacer una comparación entre resultados hechos por dos analistas en forma independiente.</p> <p>Los datos obtenidos en cada análisis son tabulados en hojas de cálculo de Excel, y la evaluación estadística la realizamos con dicho programa. Los parámetros a evaluar en estas lecturas obtenidas fueron:</p> <p>10.5.1 Obtener el error ⁽⁷⁾ o inexactitud del método para cada lectura obtenida usando los valores corregidos por interpolación y utilizando la siguiente formula:</p> <p>(ver anexo N° 2)</p> $\% \text{ Error} = \frac{\text{ABS} (A - B)}{A} \times 100$	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 18 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>Donde:</p> <p>ABS: Valor absoluto.</p> <p>A: Concentración real de muestra encontrada (mcg/mL).</p> <p>B: Concentración corregida por interpolación (mcg/mL).</p> <p>Limite de aceptación ⁽⁷⁾: Se esperan valores menores del 2%, lo que indica que la inexactitud es adecuada.</p> <p>10.5.2 Coeficiente de variación ⁽⁶⁾ de las concentraciones encontradas de muestra (ver anexo N° 1).</p> <p>Limite de aceptación ⁽⁷⁾: Se esperan resultados menores del 2%, indicando buena variabilidad del método, es decir que la dispersión de los resultados es la adecuada para los niveles de concentración de prueba.</p> <p>10.5.3 Coeficiente de variación de los factores de respuesta ⁽⁶⁾</p> <p>Limite de aceptación ⁽⁷⁾: % cv menores del 2% (ver anexo N° 1), indicando que la dispersión de los resultados es baja, por lo tanto una buena sensibilidad entre</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 19 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>la respuesta y la cantidad de muestra, concluyéndose que el sistema es preciso.</p> <p>10.5.4 Recta de regresión⁽⁶⁾</p> <p>Limite de aceptación ⁽⁷⁾: Se espera una recta de regresión que se ajuste a una línea recta cuya ecuación es: $Y = ax + b$</p> <p>Donde : x = concentración o cantidad de analito.</p> <p> b = pendiente.</p> <p> y = respuesta.</p> <p> a = intercepto.</p> <p>10.5.5 Coeficiente de correlación R⁽⁶⁾.</p> <p>Limite de aceptación ⁽¹⁾: Valor recomendable: ≥ 0.999, se interpreta diciendo que existe buena correlación entre las variables, es decir un adecuado grado de relación entre la variable x por la variable y.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 20 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>10.5.6 Coeficiente de determinación R^2⁽³⁾.</p> <p>Limite de aceptación ⁽³⁾: Valor máximo 1, Indicando que la variación de “X” (concentración) se explica por la “Y” (Absorbancia).</p> <p>10.5.7 Significación estadística de la desviación de la pendiente ⁽⁶⁾.</p> <p>Se acepta la hipótesis alternativa que dice que la pendiente es distinta de cero debido a la muy baja probabilidad de que sea igual a cero.</p> <p>Limite de aceptación ⁽⁷⁾:</p> <p>Valor de probabilidad diferente de cero.</p> <p>Límite inferior y superior no deben incluir el cero con un nivel de confianza del 95%.</p> <p>10.5.8 Test de Proporcionalidad ⁽¹⁾.</p> <p>Se acepta la hipótesis nula que dice que el intercepto es igual a cero debido a la alta probabilidad de que esto ocurra.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 21 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>Límite de aceptación ⁽³⁾:</p> <p>Valor de probabilidad igual de cero.</p> <p>Límite inferior y superior debe incluir el cero con un nivel de confianza del 95%.</p> <p>10.5.9 Gráfico de residuales ⁽³⁾.</p> <p>Se aceptan la hipótesis nula que dicen que no existe diferencia entre la distribución normal y la distribución de los residuales.</p> <p>Límite de aceptación ⁽³⁾:</p> <p>La distribución de puntos en la grafica debe ser aleatoria sin ninguna tendencia.</p> <p>10.6 ENSAYO DE PRECISIÓN ⁽¹⁾:</p> <p>10.6.1 Repetibilidad.</p> <p>Preparar tres muestras a tres niveles de concentración (2, 4 y 6 mcg/mL).</p> <p>Límite de aceptación ⁽¹⁾:</p> <p>Se espera una variación < 2%, lo cual indica el grado adecuado de dispersión entre los resultados, es decir la variabilidad del método analítico.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 22 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>10.6.2 Precisión intermedia del método.</p> <p>Preparar una muestra a tres niveles de concentración (2, 4 y 6 mcg/mL), haciendo lecturas por triplicado. Realizar el análisis en dos días diferentes y por dos diferentes analistas.</p> <p><i>Limite de aceptación</i>₍₁₎:</p> <p>Se espera una variación < 2%, lo cual indicara un grado adecuado de dispersión entre los resultados, es decir la variabilidad del método analítico.</p> <p>10.7 ENSAYO DE EXACTITUD₍₁₎:</p> <p>Realizar 9 determinaciones sobre tres niveles de concentración (2, 4 y 6 mcg/mL) de analito y evaluar los resultados con las siguientes pruebas estadísticas:</p> <p>10.7.1 Prueba de G de Cochran: Prueba de homogeneidad de varianzas por nivel de concentración.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 23 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p><i>Limite de aceptación</i>₍₁₎:</p> <p>Se acepta la hipótesis nula que dice que las varianzas de los datos a analizar poseen una variación adecuada observadas en K muestras del mismo tamaño, esto se comprueba diciendo $G_{exp} < G_{tab}$.</p> <p>10.7.2 Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales:</p> <p><i>Limite de aceptación</i>₍₁₎:</p> <p>Se acepta la hipótesis nula de que los datos provengan de distribuciones con varianzas iguales, esto se comprueba diciendo que $t_{exp} < t_{tab}$.</p> <p>10.8 ROBUSTEZ₍₁₎:</p> <p>Realizar el análisis por cuadruplicado de una misma muestra de la siguiente manera:</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 24 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>1. Seguir el método propuesto, el cual nos sirvió para efectos de comparación, manteniendo los parámetros propuestos:</p> <p>Temperatura= 75°C – 85°C.</p> <p>Agitación= 300 rpm.</p> <p>Tiempo= 1 hora 30 minutos.</p> <p>2. Seguir el método propuesto variando los tres parámetros de la siguiente manera:</p> <p>Temperatura= 85°C – 95°C.</p> <p>Agitación= 325 rpm</p> <p>Tiempo= 1 hora.</p> <p>3. Seguir el método propuesto variando la agitación y mantener temperatura y tiempo constante de la siguiente manera:</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 25 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>Temperatura= 75°C – 85°C.</p> <p>Agitación= 250 rpm</p> <p>Tiempo= 1 hora 30 minutos.</p> <p>4. Seguir el método propuesto variando la temperatura y mantener agitación y tiempo constante de la siguiente manera:</p> <p>Temperatura= 65°C – 75°C.</p> <p>Agitación= 300 rpm</p> <p>Tiempo= 1 hora 30 minutos.</p> <p>Elaborar una grafica de comparación de las concentraciones obtenidas de cada análisis para interpretar resultados.</p> <p>Limite de aceptación⁽⁶⁾ :</p> <p>Se espera que el método permanezca inalterado ante estos pequeños pero deliberados cambios, esto se hará evidente al graficar las concentraciones obtenidas para cada análisis.</p>	

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	Página 26 de 26
Nombre del producto: <i>Indigofera dossua</i>	Fecha: 04 – 07
	Código: MP0001
	Tipo de validación: Retrospectiva
Nombre del activo: Indigotina	
<p>11. Referencia bibliográfica.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Asociación Española de Farmacéuticos Industriales (A.E.F.I.), 2001. Validación de métodos analíticos. 1ª Ed. La Bisbal Es. Gispert S.A. p 256-311. 2. Guzmán Julián, O. D., clase de validación impartida en Control de Calidad I, año 2004. 3. Guzmán Julián, O. D., “VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE HUMOS LÍQUIDOS”. Universidad de Navarra, España. Octubre de 2003. 4. Organización panamericana para la salud/ Organización mundial para la salud (OPS/OMS), 2001. Buenas Prácticas de Manufactura Vigente. Inspección y Auditoria. 2ª Ed. Bogota Co. Trazo Ltda. p 3-38. 5. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I.), Validación de Métodos Analíticos, Girona, 2001. 	

ANEXO 2

ANEXO 2

CALCULO ESTADISTICO DE PARAMETROS.

Sistema operativo utilizado: Windows XP (Microsoft Excel); Microsoft 2007.

1. LÌMITE DE CUANTIFICACIÒN:

a) Calculo de Coeficiente de variaci3n.

✓ Poner en la barra de formulas el siguiente c3digo.

=DESVEST(E3:E8)/PROMEDIO(E3:E8)

Donde:

E3:E8: Rango donde se encuentran los datos a analizar.

	D	E	F	G	H
1		CONCENTRACI3N REAL DE MUESTRA (mcg/mL)			
2		0.0600	0.1000	0.6000	2.0000
3		0.006	0.069	0.011	0.013
4		0.009	0.056	0.010	0.016
5		0.008	0.064	0.010	0.013
6		0.007	0.085	0.012	0.015
7		0.006	0.051	0.008	0.013
8		0.010	0.069	0.012	0.014
9	%	20.52%	18.11%	14.44%	9.04%
10					
11					
12					

2. ENSAYO DE LINEALIDAD:

a) Calculo de Error %.

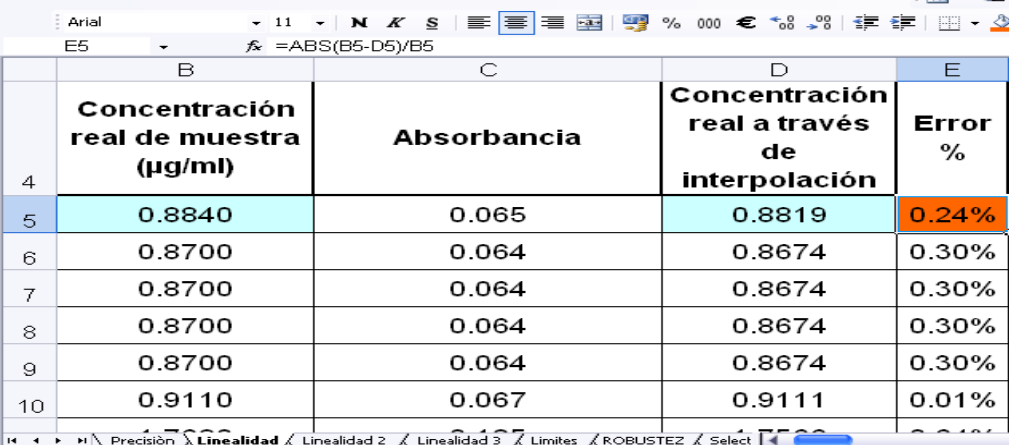
✓ Poner en la barra de formulas el siguiente código.

=ABS(B5-D5)/B5

Donde:

B5: Es la concentración real de la muestra.

D5: Es la concentración real de la muestra a través de interpolación.



	B	C	D	E
	Concentración real de muestra (µg/ml)	Absorbancia	Concentración real a través de interpolación	Error %
4				
5	0.8840	0.065	0.8819	0.24%
6	0.8700	0.064	0.8674	0.30%
7	0.8700	0.064	0.8674	0.30%
8	0.8700	0.064	0.8674	0.30%
9	0.8700	0.064	0.8674	0.30%
10	0.9110	0.067	0.9111	0.01%

b) Promedio de Error %.

✓ Poner en la barra de formulas el siguiente código.

=PROMEDIO(E5:E10)

Donde:

E5:E10: Rango donde se encuentran los datos a promediar.

	D	E	F
	Concentración real a través de interpolación	Error %	Promedio Error %
4			
5	0.8819	0.24%	0.24%
6	0.8674	0.30%	
7	0.8674	0.30%	
8	0.8674	0.30%	
9	0.8674	0.30%	
10	0.9111	0.01%	

c) Coeficiente de variación de las concentraciones reales de muestra.

✓ Poner en la barra de formulas el siguiente código.

=DESVEST(B5:B10)/PROMEDIO(B5:B10)

Donde:

B5:B10: Rango donde se encuentran los datos a analizar.

	B	C	D	E	F	G
2	DIA 1					
3	Análisis estadístico					
4	Concentración real de muestra (µg/ml)	Absorbancia	Concentración real a través de interpolación	Error %	Promedio Error %	%CV
5	0.8840	0.065	0.8819	0.24%	0.24%	1.88%
6	0.8700	0.064	0.8674	0.30%		
7	0.8700	0.064	0.8674	0.30%		
8	0.8700	0.064	0.8674	0.30%		
9	0.8700	0.064	0.8674	0.30%		
10	0.9110	0.067	0.9111	0.01%		

d) Factores de respuesta.

✓ Poner en la barra de formulas el siguiente código.

=(C5/B5)

Donde:

C: Absorbancia.

B: Concentración real de la muestra.

	B	C	D	E	F	G	H
1	0.88		0.9				
2	DIA 1						
3	Análisis estadístico						
4	Concentración real de muestra (µg/ml)	Absorbancia	Concentración real a analizar	Error %	Promedio Error %	% CV	Factores de Respuesta
5	0.8840	0.065	#####	####			0.0735
6	0.8700	0.064	#####	####			0.0736

e) Coeficiente de variación de los factores de respuesta.

✓ Poner en la barra de formulas el siguiente código.

=DESVEST(H5:H34)/PROMEDIO(H5:H34)

Donde:

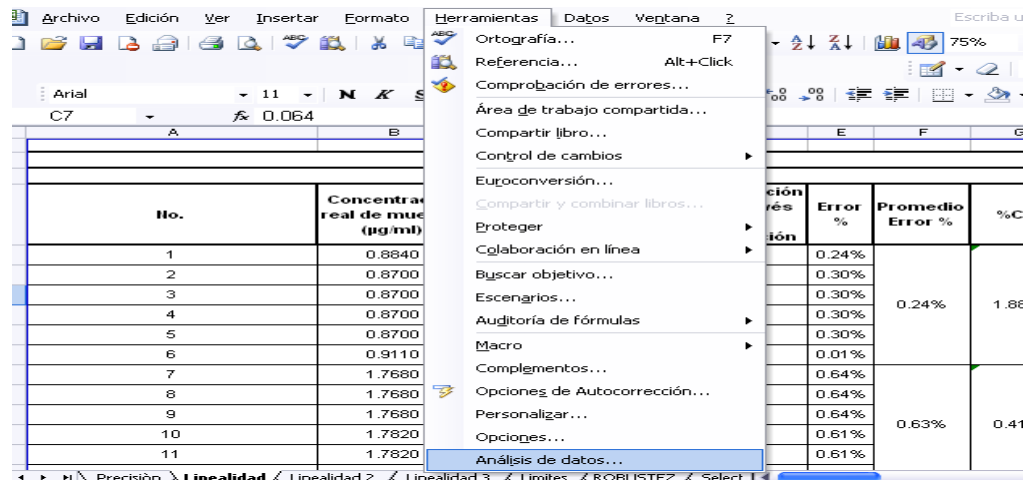
H5:H34: Rango donde se encuentran los datos a analizar.

	F	G	H	I	J	K	L	M
	Promedio Error	% CV	Factores de Respuesta	CV FR	N.º	Concentración real de muestra (µg/ml)	Absorbancia	
1			0.0735		1	0.8379	0.06	
2			0.0736		2	0.8560	0.06	
3			0.0736		3	0.8700	0.06	
4			0.0736		4	0.8560	0.06	
5			0.0736		5	0.8570	0.06	
6			0.0735		6	0.8570	0.06	
7			0.0707		7	1.7960	0.12	
8			0.0707		8	1.7960	0.12	
9			0.0707		9	1.7960	0.12	
10			0.0707		10	1.7960	0.12	
11			0.0707		11	1.8240	0.12	
12			0.0707		12	1.8010	0.12	
13			0.0705		13	2.7461	0.15	
14			0.0705		14	2.7604	0.15	
15			0.0705		15	2.7461	0.15	
16			0.0705		16	2.8178	0.15	

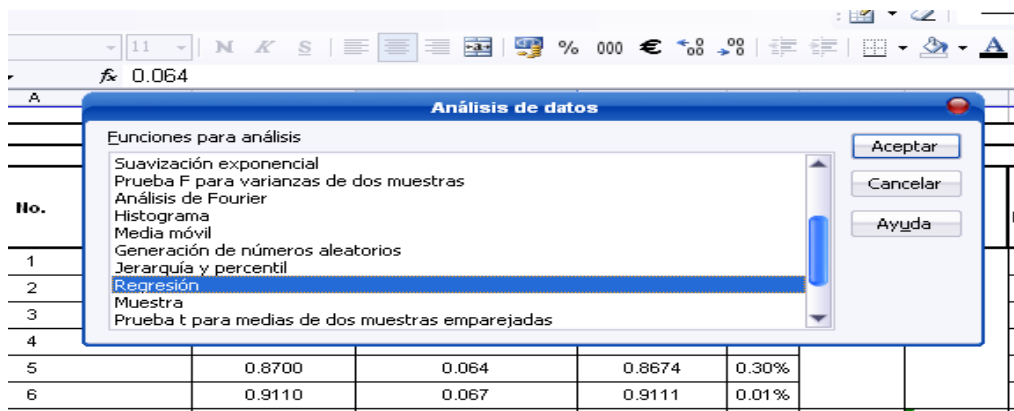
f) Determinación de coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, análisis de varianza, análisis de residuales, grafico de recta de regresión, grafico de residuales:

✓ Ir a herramientas.

✓ Análisis de datos.



✓ Regresión.



✓ Ingresar la ubicación de los datos a analizar.

- ✓ En el cuadro de dialogo principal solicitar que se den resultados de residuos, residuos estándares, grafico de residuales y curva de regresión ajustada y dar clic en aceptar.

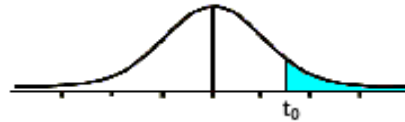


ANEXO 3

ANEXO 3

TABLA DE VALORES CRÍTICOS PRUEBA t-Student ⁽⁷⁾

Tabla t-Student



Grados de libertad	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	1.0000	3.0777	6.3137	12.7062	31.8210	63.6559
2	0.8165	1.8856	2.9200	4.3027	6.9645	9.9250
3	0.7649	1.6377	2.3534	3.1824	4.5407	5.8408
4	0.7407	1.5332	2.1318	2.7765	3.7469	4.8041
5	0.7267	1.4759	2.0150	2.5706	3.3649	4.0321
6	0.7176	1.4398	1.9432	2.4469	3.1427	3.7074
7	0.7111	1.4149	1.8946	2.3646	2.9979	3.4995
8	0.7064	1.3968	1.8595	2.3060	2.8965	3.3554
9	0.7027	1.3830	1.8331	2.2622	2.8214	3.2498
10	0.6998	1.3722	1.8125	2.2281	2.7638	3.1693
11	0.6974	1.3634	1.7959	2.2010	2.7181	3.1058
12	0.6955	1.3562	1.7823	2.1788	2.6810	3.0545
13	0.6938	1.3502	1.7709	2.1604	2.6503	3.0123
14	0.6924	1.3450	1.7613	2.1448	2.6245	2.9768
15	0.6912	1.3406	1.7531	2.1315	2.6025	2.9467
16	0.6901	1.3368	1.7459	2.1199	2.5835	2.9208
17	0.6892	1.3334	1.7396	2.1088	2.5669	2.8982
18	0.6884	1.3304	1.7341	2.1009	2.5524	2.8784
19	0.6876	1.3277	1.7291	2.0930	2.5395	2.8609
20	0.6870	1.3253	1.7247	2.0860	2.5280	2.8453
21	0.6864	1.3232	1.7207	2.0796	2.5176	2.8314
22	0.6858	1.3212	1.7171	2.0739	2.5083	2.8188
23	0.6853	1.3195	1.7139	2.0687	2.4999	2.8073
24	0.6848	1.3178	1.7109	2.0639	2.4922	2.7970
25	0.6844	1.3163	1.7081	2.0595	2.4851	2.7874
26	0.6840	1.3150	1.7056	2.0555	2.4786	2.7787
27	0.6837	1.3137	1.7033	2.0518	2.4727	2.7707
28	0.6834	1.3125	1.7011	2.0484	2.4671	2.7633
29	0.6830	1.3114	1.6991	2.0452	2.4620	2.7564
30	0.6828	1.3104	1.6973	2.0423	2.4573	2.7500
31	0.6825	1.3095	1.6955	2.0395	2.4528	2.7440
32	0.6822	1.3086	1.6939	2.0369	2.4487	2.7385
33	0.6820	1.3077	1.6924	2.0345	2.4448	2.7333
34	0.6818	1.3070	1.6909	2.0322	2.4411	2.7284
35	0.6816	1.3062	1.6896	2.0301	2.4377	2.7238
36	0.6814	1.3055	1.6883	2.0281	2.4345	2.7195
37	0.6812	1.3049	1.6871	2.0262	2.4314	2.7154
38	0.6810	1.3042	1.6860	2.0244	2.4286	2.7116
39	0.6808	1.3036	1.6849	2.0227	2.4258	2.7079
40	0.6807	1.3031	1.6839	2.0211	2.4233	2.7045
41	0.6805	1.3025	1.6829	2.0195	2.4208	2.7012
42	0.6804	1.3020	1.6820	2.0181	2.4185	2.6981
43	0.6802	1.3016	1.6811	2.0167	2.4163	2.6951
44	0.6801	1.3011	1.6802	2.0154	2.4141	2.6923
45	0.6800	1.3007	1.6794	2.0141	2.4121	2.6896
46	0.6799	1.3002	1.6787	2.0129	2.4102	2.6870
47	0.6797	1.2998	1.6779	2.0117	2.4083	2.6846
48	0.6796	1.2994	1.6772	2.0106	2.4066	2.6822
49	0.6795	1.2991	1.6766	2.0096	2.4049	2.6800

50	0.8784	1.2987	1.8759	2.0086	2.4033	2.6778
51	0.8793	1.2984	1.8753	2.0076	2.4017	2.6757
52	0.8792	1.2980	1.8747	2.0086	2.4002	2.6737
53	0.8791	1.2977	1.8741	2.0057	2.3988	2.6718
54	0.8791	1.2974	1.8736	2.0049	2.3974	2.6700
55	0.8790	1.2971	1.8730	2.0040	2.3961	2.6682
56	0.8789	1.2969	1.8725	2.0032	2.3948	2.6665
57	0.8788	1.2966	1.8720	2.0025	2.3936	2.6649
58	0.8787	1.2963	1.8716	2.0017	2.3924	2.6633
59	0.8787	1.2961	1.8711	2.0010	2.3912	2.6618
60	0.8786	1.2958	1.8706	2.0003	2.3901	2.6603
61	0.8785	1.2956	1.8702	1.9996	2.3890	2.6589
62	0.8785	1.2954	1.8698	1.9990	2.3880	2.6575
63	0.8784	1.2951	1.8694	1.9983	2.3870	2.6561
64	0.8783	1.2949	1.8690	1.9977	2.3860	2.6549
65	0.8783	1.2947	1.8686	1.9971	2.3851	2.6536
66	0.8782	1.2945	1.8683	1.9966	2.3842	2.6524
67	0.8782	1.2943	1.8679	1.9960	2.3833	2.6512
68	0.8781	1.2941	1.8676	1.9955	2.3824	2.6501
69	0.8781	1.2939	1.8672	1.9949	2.3816	2.6490
70	0.8780	1.2938	1.8669	1.9944	2.3808	2.6479
71	0.8780	1.2936	1.8666	1.9939	2.3800	2.6469
72	0.8779	1.2934	1.8663	1.9935	2.3793	2.6458
73	0.8779	1.2933	1.8660	1.9930	2.3785	2.6449
74	0.8778	1.2931	1.8657	1.9925	2.3778	2.6439
75	0.8778	1.2929	1.8654	1.9921	2.3771	2.6430
76	0.8777	1.2928	1.8652	1.9917	2.3764	2.6421
77	0.8777	1.2926	1.8649	1.9913	2.3758	2.6412
78	0.8776	1.2925	1.8646	1.9908	2.3751	2.6403
79	0.8776	1.2924	1.8644	1.9905	2.3745	2.6395
80	0.8776	1.2922	1.8641	1.9901	2.3739	2.6387
81	0.8775	1.2921	1.8639	1.9897	2.3733	2.6379
82	0.8775	1.2920	1.8636	1.9893	2.3727	2.6371
83	0.8775	1.2918	1.8634	1.9890	2.3721	2.6364
84	0.8774	1.2917	1.8632	1.9886	2.3716	2.6356
85	0.8774	1.2916	1.8630	1.9883	2.3710	2.6349
86	0.8774	1.2915	1.8628	1.9879	2.3705	2.6342
87	0.8773	1.2914	1.8626	1.9876	2.3700	2.6335
88	0.8773	1.2912	1.8624	1.9873	2.3695	2.6329
89	0.8773	1.2911	1.8622	1.9870	2.3690	2.6322
90	0.8772	1.2910	1.8620	1.9867	2.3685	2.6316
91	0.8772	1.2909	1.8618	1.9864	2.3680	2.6309
92	0.8772	1.2908	1.8616	1.9861	2.3676	2.6303
93	0.8771	1.2907	1.8614	1.9858	2.3671	2.6297
94	0.8771	1.2906	1.8612	1.9855	2.3667	2.6291
95	0.8771	1.2905	1.8611	1.9852	2.3662	2.6286
96	0.8771	1.2904	1.8609	1.9850	2.3658	2.6280
97	0.8770	1.2903	1.8607	1.9847	2.3654	2.6275
98	0.8770	1.2903	1.8606	1.9845	2.3650	2.6269
99	0.8770	1.2902	1.8604	1.9842	2.3646	2.6264
100	0.8770	1.2901	1.8602	1.9840	2.3642	2.6259
∞	0.8745	1.2816	1.8449	1.9600	2.3263	2.5758

ANEXO 4

ANEXO 4

TABLA DE VALORES CRÍTICOS PARA PRUEBA DE COCHRAN (m)

Significación del cociente $\frac{\sigma_{\max}^2 / E\sigma^2}{k}$ (prueba de Cochran)

Tabla 7

$\frac{k}{v}$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30
1	0.9905 0.9999	0.9609 0.9933	0.9065 0.9678	0.8412 0.9279	0.7808 0.8828	0.7271 0.8376	0.6798 0.7965	0.6365 0.7644	0.6020 0.7375	0.5410 0.6588	0.4709 0.5747	0.3994 0.4789	0.2929 0.3638
2	0.9750 0.9950	0.8709 0.9483	0.7679 0.8643	0.6838 0.7885	0.6161 0.7228	0.5612 0.6644	0.5157 0.6162	0.4775 0.5727	0.4450 0.5358	0.3924 0.4751	0.3346 0.4089	0.2705 0.3387	0.1980 0.2412
3	0.9592 0.9794	0.7977 0.8831	0.6841 0.7814	0.5981 0.6957	0.5321 0.6258	0.4800 0.5685	0.4377 0.5209	0.4027 0.4810	0.3733 0.4469	0.3264 0.3919	0.2758 0.3317	0.2205 0.2854	0.1593 0.1913
4	0.9057 0.9608	0.7457 0.8235	0.6287 0.7212	0.5441 0.6329	0.4803 0.5635	0.4307 0.5080	0.3910 0.4687	0.3584 0.4351	0.3311 0.3934	0.2880 0.3428	0.2419 0.2985	0.1921 0.2488	0.1377 0.1635
5	0.8772 0.9373	0.7071 0.7953	0.5895 0.6767	0.5065 0.5875	0.4447 0.5195	0.3974 0.4659	0.3595 0.4236	0.3286 0.3879	0.3029 0.3572	0.2624 0.3099	0.2195 0.2593	0.1735 0.2048	0.1237 0.1454
6	0.8534 0.9172	0.6771 0.7606	0.5598 0.6410	0.4783 0.5537	0.4184 0.4865	0.3726 0.4247	0.3362 0.3832	0.3067 0.3492	0.2823 0.3197	0.2439 0.2821	0.2034 0.2387	0.1602 0.1877	0.1137 0.1327
7	0.8332 0.8988	0.6530 0.7316	0.5365 0.6129	0.4564 0.5269	0.3980 0.4600	0.3535 0.4105	0.3185 0.3704	0.2901 0.3379	0.2666 0.3107	0.2299 0.2699	0.1911 0.2288	0.1501 0.1748	0.1061 0.1232
8	0.8159 0.8823	0.6333 0.7107	0.5175 0.5897	0.4387 0.5037	0.3817 0.4401	0.3384 0.3911	0.3043 0.3522	0.2768 0.3207	0.2541 0.2945	0.2187 0.2535	0.1815 0.2104	0.1422 0.1616	0.1002 0.1157
9	0.8010 0.8674	0.6167 0.6912	0.5017 0.5703	0.4241 0.4854	0.3682 0.4229	0.3259 0.3751	0.2926 0.3373	0.2659 0.3097	0.2439 0.2813	0.2098 0.2419	0.1736 0.2005	0.1357 0.1587	0.0958 0.1109
10	0.7880 0.8539	0.6025 0.6742	0.4884 0.5539	0.4118 0.4697	0.3568 0.4084	0.3154 0.3626	0.2829 0.3249	0.2568 0.2956	0.2353 0.2709	0.2020 0.2329	0.1671 0.1918	0.1303 0.1501	0.0921 0.1084
16	0.7341 0.7949	0.5486 0.6059	0.4366 0.4884	0.3645 0.4094	0.3135 0.3529	0.2756 0.3105	0.2462 0.2779	0.2226 0.2516	0.2032 0.2297	0.1737 0.1967	0.1429 0.1612	0.1108 0.1248	0.0771 0.0867
36	0.6602 0.7087	0.4748 0.5153	0.3720 0.4057	0.3066 0.3351	0.2612 0.2858	0.2270 0.2494	0.2022 0.2214	0.1820 0.1992	0.1655 0.1811	0.1403 0.1535	0.1144 0.1251	0.0879 0.0980	0.0604 0.0658
144	0.5813 0.6062	0.4031 0.4250	0.3093 0.3267	0.2513 0.2644	0.2119 0.2229	0.1833 0.1928	0.1616 0.1705	0.1446 0.1521	0.1308 0.1378	0.1100 0.1157	0.0889 0.0934	0.0675 0.0709	0.0457 0.0480
∞	0.5000 0.5000	0.3333 0.3333	0.2500 0.2500	0.2000 0.2000	0.1667 0.1667	0.1429 0.1429	0.1250 0.1250	0.1111 0.1111	0.1000 0.1000	0.0833 0.0833	0.0667 0.0667	0.0500 0.0500	0.0333 0.0333

$\alpha = 0.05$ (redonda), $\alpha = 0.01$ (curvada)

ANEXO 5

ANEXO 5

GRÁFICO DE CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR CONCENTRACION DE INDIGOTINA

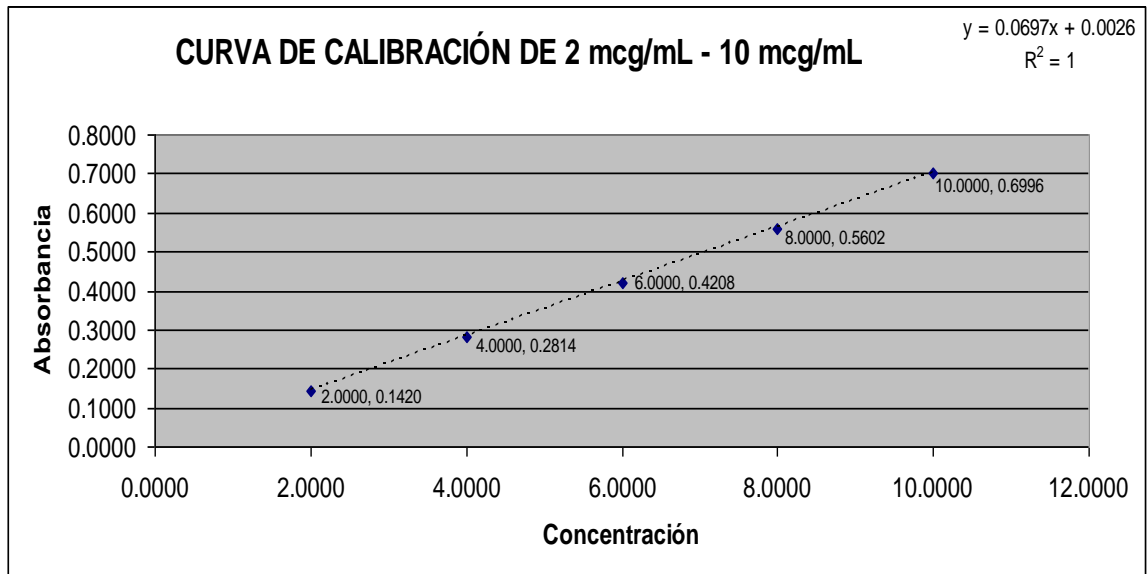
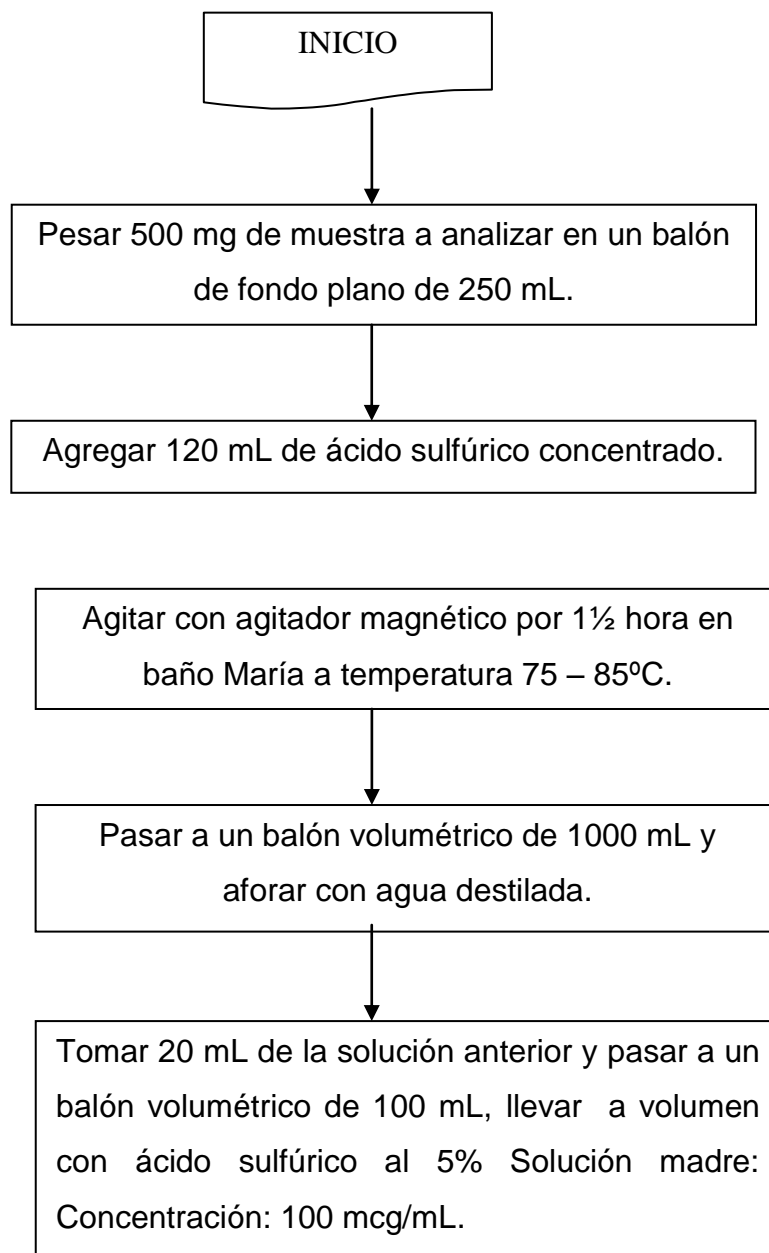


Figura N° 7 Curva de calibración de indigotina

ANEXO 6

ANEXO 6

PREPARACION DE SOLUCION MADRE (100 mcg/mL) PARA ANALISIS DE MUESTRA



ANEXO 7

ANEXO 7

TABLA Kg. DE AÑIL PROCESADO/EXPORTADO ENTRE 1997 Y 2005 ⁽⁶⁾

Tabla No. 23 Kg. De añil procesado/exportado entre 1997 y 2005

Año	1997	2000	2002	2005
Procesado(Kg.)	No se tiene datos	100	1800	No se tiene datos
Exportado(Kg.)	30	No se tiene datos	No se tiene datos	1200

ANEXO 8

ANEXO 8

GRAFICA Kg. de añil procesado/exportados entre 1997 y 2005 ⁽⁶⁾

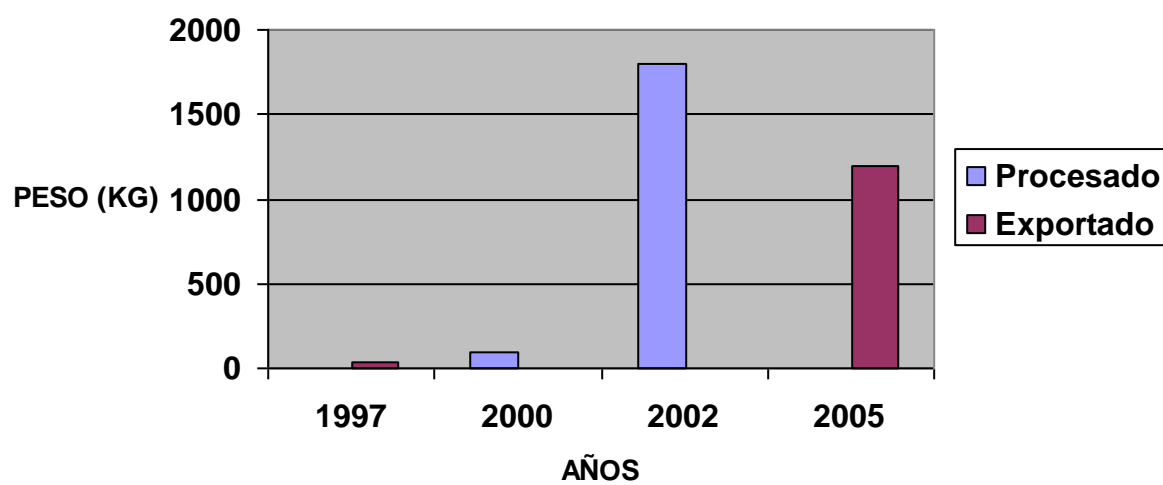


Figura N° 8 Kg. de añil procesado/exportados entre 1997 y 2005