

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE QUIMICA**  
**MAESTRIA EN QUIMICA**



**Universidad de El Salvador**  
*Hacia la libertad por la cultura*

**VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE CONTENIDO QUÍMICO DE  
IBUPROFENO EN TABLETAS POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:  
**ENRIQUE POSADA GRANADOS**

PARA OPTAR AL GRADO DE  
**MAESTRO EN QUÍMICA**

Ciudad Universitaria. 2014-Diciembre  
EL SALVADOR, SAN SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

# **UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

## **RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO.

## **SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA.

## **FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

### **DECANO**

MSC. MARTÍN ENRIQUE GUERRA CÁCERES

### **SECRETARIO**

LIC. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO

### **DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA**

LIC. NELSON MAURICIO COTO MENDOZA

## **TRIBUNAL EXAMINADOR DE TRABAJO DE GRADUACION**

### **COORDINADOR DE MAESTRÍA EN QUÍMICA**

DR. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE

### **MIEMBRO DEL TRIBUNAL EXAMINADOR**

MSC. DINA ANGÉLICA DE GUIDOS

### **MIEMBRO DEL TRIBUNAL EXAMINADOR**

DR. ORLANDO CANJURA URRUTIA

### **PROFESOR ASESOR**

DR. NÉSTOR GUILLERMO ORELLANA VELADO

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a *Jesús el Cristo*, mi Amigo, Dios y Señor, quien me dio la fuerza, voluntad y soporte necesario a través de las formas más sutiles que él tiene, para poder caminar por este trayecto que muchas veces se tornó muy largo, pero con su presencia nunca me sentí desfallecer y he podido llegar a la meta, para poder seguir otro nuevo reto siempre con su compañía.

Mis más sinceros agradecimientos y respeto para mi profesor asesor Dr. *Néstor Guillermo Orellana Velado*, a quien, aparte de considerarlo mi mentor en esta rama del conocimiento de la química analítica, lo considero un apreciable ser humano.

También estoy muy agradecido con todo el tribunal examinador de trabajo de graduación, Dr. *Alex Adonai Osorio Landaverde*, MSc. *Dina Angélica de Guidos* y Dr. *Orlando Canjura Urrutia*, quienes a través de todo el seguimiento del trabajo de graduación han mostrado su profesionalismo para la conclusión del mismo. Sepan que sus recomendaciones no han caído en saco roto, sino que las he guardado para futuros proyectos.

Finalmente quiero agradecer a Licda. *Concepción Marina Vidaurre* y al Lic. *Alejandro Alarcón* quienes me dieron su apoyo en Corporación Bonima (Bayer El Salvador) para la realización del trabajo experimental de esta investigación que aportará datos significativos de la química analítica en el control de calidad de medicamentos.

# DEDICATORIAS

El presente trabajo de graduación lo dedico con todo mi amor y cariño a las siguientes personas:

A *Jesús el Cristo*, mi Amigo, Dios y Señor, por ser mi amigo fiel, por su amor infinito que me demuestra cada día como todo un caballero de la cruz, y por eso es mi eterno tesoro.

A mi esposa *Marelis Carolina Menjívar González* y a mi hija *Marelis Isabella Posada Menjívar*, quienes sufrieron junto conmigo las noches de desvelos en la redacción del trabajo de graduación y los preparativos para las defensas del mismo. Sinceramente muchas gracias por su amor, por esa comprensión y apoyo incondicional. Son mis tesoros. Los amo mucho.

A mis padres, *Enrique Posada Leiva* y *Arminda Granados Zelaya*, quienes siempre me han dado el apoyo y el esfuerzo de toda una vida (amor de toda su vida), no solo para verme crecer académica y profesionalmente, sino para verme crecer como ser humano. Los amo mucho.

A mi amada hermana *Ana Raquel Posada Granados*, por ser especial en su corazón y en su alma. Siempre estaré ahí.

A todos mis difuntos abuelos, quienes solidificaron con amor el futuro de varias generaciones.

A mis familiares que siempre han mostrado su amor genuino a mi persona.

A mis amigos que me aceptan y apoyan tal cual soy

Finalmente a todos los futuros investigadores que quieran seguir expandiendo el conocimiento del análisis térmico aplicado a los medicamentos.

Con amor, para todos ustedes.

**ENRIQUE POSADA GRANADOS**

# CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>XVI</b>
<b>1. FUNDAMENTO TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1. ANÁLISIS DE MEDICAMENTOS.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2. GENERALIDADES FISICOQUÍMICAS EN LA CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO .....</b>	<b>23</b>
1.2.1. Primera Ley de la Termodinámica.....	23
1.2.2. Entalpía.....	24
1.2.3. Capacidad Calorífica .....	26
<b>1.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO .....</b>	<b>28</b>
1.3.1. INTERPRETACIÓN BÁSICA DE LOS TERMOGRAMAS .....	30
1.3.2. OPTIMIZACIÓN DE EXPERIMENTOS.....	33
<b>1.4. VALIDACIÓN .....</b>	<b>49</b>
1.4.1. DOCUMENTACION DE LA VALIDACIÓN.....	50
1.4.2. CRITERIOS FUNDAMENTALES DE VALIDACIÓN .....	52
1.4.3. SELECTIVIDAD - ESPECIFICIDAD.....	54
1.4.4. LINEALIDAD.....	59
1.4.5. SENSIBILIDAD, LIMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN. ....	67
1.4.6. PRECISION (REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD) .....	74
1.4.7. EXACTITUD (RECUPERACION) .....	78
<b>2. METODOLOGÍA .....</b>	<b>82</b>
<b>2.1. DELIMITACIÓN ESPACIAL.....</b>	<b>83</b>
<b>2.2. EQUIPO Y MATERIALES.....</b>	<b>83</b>
<b>2.3. EXPLORACIÓN .....</b>	<b>83</b>
<b>2.4. ESPECIFICIDAD .....</b>	<b>85</b>

<b>2.5.</b>	<b>LINEALIDAD Y RANGO .....</b>	<b>86</b>
<b>2.6.</b>	<b>LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (ESTIMACIÓN) .....</b>	<b>88</b>
<b>2.7.</b>	<b>PRECISIÓN .....</b>	<b>89</b>
2.7.1.	PRECISIÓN DEL EQUIPO .....	89
2.7.2.	REPETIBILIDAD DE ESTÁNDAR.....	90
2.7.3.	REPETIBILIDAD DE MUESTRA.....	92
2.7.4.	REPRODUCIBILIDAD DE ESTÁNDAR (PRECISIÓN INTERMEDIA. VARIABLE: DÍA).....	93
2.7.5.	REPRODUCIBILIDAD DE MUESTRA (PRECISIÓN INTERMEDIA. VARIABLE: DÍA) .....	95
<b>2.8.</b>	<b>RECUPERACIÓN .....</b>	<b>96</b>
<b>2.9.</b>	<b>COMPARACIÓN METODOLOGÍA DSC VRS METODOLOGÍA HPLC.....</b>	<b>99</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>101</b>
<b>3.1.</b>	<b>EXPLORACIÓN .....</b>	<b>102</b>
3.1.1.	EXPLORACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE EQUIPO.....	102
3.1.2.	EXPLORACIÓN DE CONTENIDO QUÍMICO.....	104
3.1.3.	COMPARACIÓN DE LÍNEA DE CALIBRADO DE LA MUESTRA RESPECTO A LA LÍNEA DE CALIBRADO DEL ESTÁNDAR.....	106
<b>3.2.</b>	<b>ESPECIFICIDAD .....</b>	<b>110</b>
<b>3.3.</b>	<b>LINEALIDAD Y RANGO .....</b>	<b>112</b>
3.3.1.	EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LINEALIDAD 01 Y LINEALIDAD 02.....	115
3.3.2.	ECUACIÓN DE LA LÍNEA DE ESTANDARIZACIÓN.....	117
<b>3.4.</b>	<b>LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (estimación) .....</b>	<b>123</b>
<b>3.5.</b>	<b>PRECISIÓN .....</b>	<b>126</b>
3.5.1.	PRECISIÓN DEL EQUIPO .....	126
3.5.2.	REPETIBILIDAD DE ESTÁNDAR.....	127
3.5.3.	REPETIBILIDAD DE MUESTRA .....	133
3.5.4.	REPRODUCIBILIDAD DE ESTÁNDAR (PRECISIÓN INTERMEDIA. VARIABLE: DÍA).....	137
3.5.5.	REPRODUCIBILIDAD DE MUESTRA (PRECISIÓN INTERMEDIA. VARIABLE: DÍA) .....	142
<b>3.6.</b>	<b>RECUPERACIÓN .....</b>	<b>146</b>

<b>3.7. COMPARACIÓN DE METODOLOGÍA DSC Y METODOLOGÍA PHLC.....</b>	<b>152</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>157</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>163</b>
<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>165</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>166</b>



# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Efecto del tamaño de muestra sobre las transiciones medidas en DSC.....	42
Tabla 1-2 CV máximo aceptable según el número de réplicas en determinados intervalos de aceptación.....	76
Tabla 2-1 Exploración: Evaluaciones, Criterios y Límites .....	84
Tabla 2-2 Especificidad: Etapas, Diseño y Evaluación.....	85
Tabla 2-3 Linealidad: Etapas, Diseño y Evaluación.....	86
Tabla 2-4 Linealidad: Evaluaciones, Criterios y Límites.....	87
Tabla 2-5 LOD y LOQ: Criterios y Límites de Aceptación.....	88
Tabla 2-6 Repetibilidad de Estándar: Etapas, Diseño y Evaluaciones.....	90
Tabla 2-7 Repetibilidad de Estándar: Evaluaciones, Criterios y Límites.....	91
Tabla 2-8 Repetibilidad de Muestra: Etapas, Diseño y Evaluaciones.....	92
Tabla 2-9 Repetibilidad de Muestra: Evaluación, Criterio y Límite de Aceptación.....	92
Tabla 2-10 Reproducibilidad de Estándar: Evaluaciones, Criterios y Límites de Aceptación.....	94
Tabla 2-11 Reproducibilidad de Muestra: Evaluaciones, Criterios y Límites de Aceptación.....	95
Tabla 2-12 Recuperación: Diseño de Fracción de Analito con Matriz respecto al peso total de Tableta.....	96
Tabla 2-13 Recuperación: Etapas, Diseño y Evaluación.....	96
Tabla 2-14 Recuperación: Evaluaciones, Criterios y Límites de Aceptación.....	98
Tabla 2-15 Comparación de Metodologías DSC y HPLC. Diseño y Evaluación.....	99
Tabla 2-16 Comparación de Metodologías DSC y HPLC: Evaluaciones, Criterios y Límites de Aceptación.....	100
Tabla 3-1 Exploración de Estándares en DSC.....	102
Tabla 3-2 Exploración de Muestras en DSC.....	103
Tabla 3-3 Exploración de Contenido Químico en DSC.....	105
Tabla 3-4 Exploración: Comparación entre Línea de Estándar y Línea de Muestra.....	107
Tabla 3-5 Exploración: Análisis de Datos en Hoja de Cálculo Electrónica.....	108
Tabla 3-6 Exploración. Resumen de Resultados.....	109
Tabla 3-7 Resumen de los Resultados de Especificidad.....	111
Tabla 3-8 Linealidad Día 01: Factores de Respuesta.....	113
Tabla 3-9 Linealidad Día 02: Factores de Respuesta.....	114

Tabla 3-10 Linealidad: Factores de Respuesta de Día 01 y 02.....	115
Tabla 3-11 Linealidad: Evaluación Estadística de los Factores de Respuesta de Día 01 y 02 .....	116
Tabla 3-12 Linealidad: Datos de la Ecuación de la Línea de Estandarización.....	118
Tabla 3-13 Linealidad: Datos de la Ecuación de la Línea de Estandarización (continuación).....	119
Tabla 3-14 Linealidad: Evaluación Estadística de la Ecuación de la Línea de Estandarización .....	120
Tabla 3-15 Linealidad: Límites de Confianza de la Ecuación de la Línea de Estandarización.....	121
Tabla 3-16 Resumen de los Resultados de Linealidad y Rango.....	122
Tabla 3-17 Linealidad: Estimación de LOD y LOQ.....	123
Tabla 3-18 Resumen de Resultados de LOD y LOQ.....	125
Tabla 3-19 Precisión: Precisión del Equipo .....	126
Tabla 3-20 Precisión: Repetibilidad del Estándar (Día 01) .....	128
Tabla 3-21 Precisión: Repetibilidad del Estándar (Día 01)...Continuación. ....	129
Tabla 3-22 Precisión: Repetibilidad del Estándar (Día 02) .....	130
Tabla 3-23 Precisión: Repetibilidad del Estándar (Día 02)...Continuación. ....	131
Tabla 3-24 Precisión: Resumen de los Resultados de Repetibilidad del Estándar.....	132
Tabla 3-25 Precisión: Repetibilidad de la Muestra (Día 01) .....	134
Tabla 3-26 Precisión: Repetibilidad de la Muestra (Día 02) .....	135
Tabla 3-27 Precisión: Resumen de los Resultados de Repetibilidad de la Muestra .....	136
Tabla 3-28 Precisión: Datos de Repetibilidad del Estándar del Día 01 y 02.....	137
Tabla 3-29 Precisión: Evaluación Estadística de Reproducibilidad del Estándar.....	138
Tabla 3-30 Precisión: Reproducibilidad del Estándar (Variable: Día) .....	139
Tabla 3-31 Precisión: Límites de Confianza del Factor de Respuesta del Estándar .....	140
Tabla 3-32 Precisión: Resumen de los Resultados de Reproducibilidad del Estándar.....	141
Tabla 3-33 Precisión: Datos de Repetibilidad de la Muestra (Día 01 y Día 02).....	142
Tabla 3-34 Precisión: Evaluación Estadística de Reproducibilidad de la Muestra .....	143
Tabla 3-35 Precisión: Reproducibilidad de la Muestra (Variable Día).....	144
Tabla 3-36 Precisión: Resumen de los Resultados de Reproducibilidad de la Muestra .....	145
Tabla 3-37 Recuperación: Datos de Porcentaje de Recuperación .....	147
Tabla 3-38 Recuperación: Porcentajes de Recuperación en cada Nivel.....	148
Tabla 3-39 Recuperación: Evaluación de la Exactitud de los Porcentajes de Recuperación .....	149

Tabla 3-40 Recuperación: Límites de Confianza de los Porcentaje de Recuperación de los Valores Individuales y Promedio .....	150
Tabla 3-41 Recuperación: Resumen de los Resultados de Recuperación.....	151
Tabla 3-42 Determinación de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC .....	153
Tabla 3-43 Datos de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC y HPLC .....	154
Tabla 3-44 Evaluación Estadística de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC y HPLC.....	155
Tabla 3-45 Resumen de los Resultados de la Comparación Estadística de la Metodologías DSC y HPLC.....	156

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Diagrama de DSC. A: Horno, B: Termocuplas .....	28
Figura 1-2 Típica endoterma de fusión para un material ultrapuro de bajo peso molecular. ....	30
Figura 1-3 Efecto de la Velocidad de Calentamiento en la sensibilidad de la señal. ....	32
Figura 1-4 Efecto de la velocidad de calentamiento en la Temperatura Onset de fusión del Indio.....	38
Figura 1-5 Termograma de salbutamol sulfato amorfo, mostrando transición vítrea, recristalización, fusión y degradación.....	40
Figura 1-6 Comparación de tres muestras de Indio variando la masa. Velocidad de calentamiento 10°C/min. Las curvas superiores corresponden al flujo de calor y las inferiores a la temperatura de la muestra ploteadas contra el tiempo. ....	41
Figura 1-7 Comparación de tres muestras de Indio variando la masa. Velocidad de calentamiento 10°C/min.....	42
Figura 1-8: Crisol estándar (Cazuela y Tapa).....	43
Figura 1-9 Comparación del efecto de la velocidad de calentamiento sobre la caída inicial de línea base.....	44
Figura 1-10 Comparación de varios termogramas de una droga utilizando varias configuraciones de crisol de referencia. Todas las corridas se efectuaron a 10°C/min y utilizando nitrógeno como gas de purga a 10 ml/min. ....	45
Figura 1-11 Flujo de Calor y datos de derivada de temperatura para los primeros cinco minutos de un experimento DSC. ....	46
Figura 1-12 Efecto en la velocidad de calentamiento en experimentos DSC. Experimento realizado con 2,78 mg de Indio en un crisol de aluminio, y como gas de purga Nitrógeno a 25 mL/min. ....	47
Figura 1-13 Esquema de las fases de una validación.....	50
Figura 1-14 (A) Relación entre Desviación Estándar y Concentración. (B) Relación entre Coeficiente de Variación y Concentración.....	68
Figura 3-1 Linealidad: Ecuación de Línea de Estandarización.....	117
Figura 3-2 Termogramas de Valores Experimentales de Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ).....	124

Figura A - 1 Metodología Analítica de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC (Parámetros Operativos) .....	168
Figura A - 2 Especificidad: Termogramas de la matriz .....	170
Figura A - 3 Especificidad: Termogramas de Matriz luego de haber sido expuesta a 80°C durante 15 días.....	170
Figura A - 4 Linealidad: Termogramas del Nivel de 2 mg.....	172
Figura A - 5 Linealidad: Termogramas del Nivel de 3 mg.....	172
Figura A - 6 Linealidad: Termogramas del Nivel de 4 mg.....	173
Figura A - 7 Linealidad: Termogramas del Nivel de 5 mg.....	173
Figura A - 8 Linealidad: Termogramas del Nivel de 6 mg.....	174
Figura A - 9 Linealidad: Termogramas del Nivel de 7 mg.....	174
Figura A - 10 Linealidad: Termogramas del Nivel de 8 mg.....	175
Figura A - 11 Linealidad: Termogramas del Nivel de 9 mg.....	175
Figura A - 12 Linealidad: Termogramas del Nivel de 10 mg.....	176
Figura A - 13 Precisión: Termogramas de Precisión de Equipo utilizando como metal Patrón el Indio.....	178
Figura A - 14 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 3 mg, Termogramas Día 01 .....	179
Figura A - 15 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 3 mg, Termogramas del Día 01 (continuación) .....	179
Figura A - 16 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 6 mg, Termogramas del Día 01 .....	180
Figura A - 17 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 6 mg, Termogramas del Día 01 (continuación) .....	180
Figura A - 18 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 3 mg, Termogramas del Día 02 .....	181
Figura A - 19 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 3 mg, Termogramas del Día 02 (continuación) .....	181
Figura A - 20 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 6 mg, Termogramas del Día 02.....	182
Figura A - 21 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 6 mg, Termogramas del Día 02 (continuación) .....	182
Figura A - 22 Precisión: Repetibilidad de la Muestra, Termogramas del Día 01 .....	183
Figura A - 23 Precisión: Repetibilidad de la Muestra, Termogramas del Día 01 (continuación) .....	183
Figura A - 24 Precisión: Repetibilidad de la Muestra, Termogramas del Día 02.....	184

Figura A - 25 Precisión: Repetibilidad de la Muestra, Termogramas del Día 02 (continuación) .....	184
Figura A - 26 Recuperación: Termogramas del Nivel de Fracción de Analito correspondiente a 0,25.....	186
Figura A - 27 Recuperación: Termogramas del Nivel de Fracción de Analito correspondiente a 0,5.....	186
Figura A - 28 Recuperación: Termogramas del Nivel de Fracción de Analito correspondiente a 0,75.....	187
Figura A - 29 Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, Termogramas del Lote 09060042 .....	189
Figura A - 30 Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, Termogramas del Lote 1020202 .....	189
Figura A - 31 Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, Termogramas del Lote 10060124 .....	190
Figura A - 32 Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, Termogramas del Lote 10070102 .....	190
Figura A - 33 Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, Termogramas del Lote 10110217 .....	191

## **RESUMEN**

En esta investigación se presenta una aplicación de la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) en la prueba de Contenido Químico para la cuantificación de Ibuprofeno bajo la presentación de la forma farmacéutica de tabletas.

Una exploración previa a una validación de la metodología, confirmó la aplicación de la técnica DSC y se demostró la factibilidad a través de herramientas estadísticas. Posteriormente, se desarrolló con mayor detalle la metodología analítica y se procedió a su completa validación, donde se realizaron todos los parámetros de validación, desde la Especificidad, Linealidad y Rango, Límite de Detección y Límite de Cuantificación, Precisión y finalmente Recuperación. En el parámetro de Precisión se efectuó la precisión del Equipo, Repetibilidad de Estándar, Repetibilidad de Muestra, Reproducibilidad de Estándar y Reproducibilidad de Muestra. Los resultados de la validación de la metodología analítica de Contenido Químico en Tabletas de Ibuprofeno, utilizando la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido, refleja datos muy satisfactorios en todos los parámetros de la validación.

Finalmente, se compararon los resultados de Contenido Químico de diversos lotes de Ibuprofeno Tabletas bajo la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido con los resultados de los mismos lotes analizados con la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) de la monografía de Ibuprofeno Tabletas de la Farmacopea Estadounidense. El análisis estadístico demuestra que no existe diferencia significativa en el uso de la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido y la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia para la determinación del Contenido Químico de Ibuprofeno en Tabletas, favoreciendo así el uso de la técnica calorimétrica como alternativa de confianza para un análisis rápido, confiable y preciso del Contenido Químico de Ibuprofeno en Tabletas.

# INTRODUCCIÓN

El análisis fisicoquímico de medicamentos utiliza actualmente varias técnicas instrumentales, dentro de las diversas metodologías, en la determinación de toda la gama pruebas de control de calidad, necesarias para asegurar la eficacia y la inocuidad de los medicamentos. Entre las pruebas efectuadas a los medicamentos bajo la forma farmacéutica de tabletas, figuran: Contenido Químico (conocido también como Ensayo), Disolución, Uniformidad De Unidades De Dosificación, Impurezas, entre otras. [1][2]

La prueba de Contenido Químico determina la cantidad de fármaco que está presente dentro la forma farmacéutica Tableta con la ayuda de técnicas Espectrofotométricas y Cromatográficas, en su mayoría, tanto en las metodologías analíticas oficiales (farmacopéicas) y no oficiales. Éstas metodologías utilizan una considerable cantidad de solventes, generalmente contaminantes del medio ambiente y tóxicos o nocivos para la salud del analista de control de calidad. Además, el tratamiento de la muestra es compendioso debido a las diversas etapas de la metodología, genera tiempos de análisis prolongados, en donde las diferentes etapas le suman incertidumbre a los resultados, desde la pesada de la porción de muestra, la volumetría, hasta llegar a la incertidumbre generada por el instrumento de lectura utilizado. [1][2]

A pesar de las ventajas que poseen las metodologías analíticas de Contenido Químico basadas en técnicas cromatográficas y espectrofotométricas, poseen las desventajas citadas anteriormente. Por otra parte, es difícil poder desarrollar técnicas suficientemente exactas y precisas que puedan competir con las técnicas cromatográficas y espectrofotométricas, y que además, ofrezcan ventajas en términos de tiempo de análisis, tamaño de muestra y uso de solventes, entre otras.

En los últimos años se ha ido perfeccionando la instrumentación para diversas técnicas instrumentales, dentro de las cuales, las técnicas basadas en el análisis térmico han ido ofreciendo alternativas tanto para la determinación cualitativa como la cuantitativa. El análisis térmico, en el sentido más amplio, es la medición de las propiedades fisicoquímicas de los materiales en función de la temperatura. Provee información analítica de las sustancias, en donde se puede determinar el polimorfismo, la temperatura de fusión, la sublimación, las transiciones vítreas, la deshidratación, la evaporación, la pirolisis, las interacciones sólido-sólido y la pureza, entre muchas otras propiedades de las sustancias. [3]



Dentro de las técnicas del análisis térmico se encuentran la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry), Termogravimetría (TGA, Thermogravimetric Analysis), y Análisis Térmico Diferencial (DTA, Differential Thermal Analysis) entre otras. La Calorimetría Diferencial de Barrido es la técnica más utilizada del análisis térmico para diversos campos de aplicación, que van desde los polímeros, alimentos, cosméticos, hasta llegar al campo farmacéutico. Las aplicaciones generalmente involucran el calentamiento o enfriamiento de una muestra asociada con eventos térmicos, tales como: fusión, cristalización, transición vítrea y reacciones de descomposición. Entre los beneficios de esta técnica está la pequeña cantidad de muestra requerida para el análisis, al mismo tiempo que un amplio rango de temperatura disponible en la mayoría de los instrumentos comerciales, al igual que la simplicidad y rapidez de la medición. [4]

Dentro de las aplicaciones de la DSC en el campo químico farmacéutico, se encuentra principalmente el estudio de compatibilidad fisicoquímica entre el fármaco y los excipientes, en donde se determina si existirá o no alguna reacción debida al calor aplicado a una mezcla del fármaco con los excipientes. En segundo lugar está el estudio del polimorfismo tanto de fármacos como excipientes, ello determina si las materias primas sólidas para la fabricación de medicamentos poseen diferentes formas cristalinas las cuales puedan o no influenciar el proceso de producción o la estabilidad del medicamento. [5]

Sin embargo, aplicaciones cuantitativas de la DSC en el campo del control de calidad de medicamentos no han sido explotadas todavía, a pesar de algunos estudios realizados por Jinfang Lu, Miaozen Wang, Anfan Wu y Xiuyuan Qiu, quienes efectuaron una determinación exploratoria de la prueba de Contenido Químico de Ibuprofeno en Tabletas por dicha técnica, en donde la señal del fármaco fue directamente proporcional al peso de la droga, y la recuperación promedio del fármaco en las tabletas fue de 99,59% y el coeficiente de variación fue de 0,946%, además, los excipientes de las tabletas no interfirieron con el ensayo. Una gran ventaja de esta metodología analítica es su rapidez, y además los resultados exploratorios fueron exactos y reproducibles. Sin embargo el método analítico no fue sometido a un proceso de validación formal para completar los parámetros de especificidad, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación, precisión, recuperación y comparación contra otra técnica analítica como lo es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, High Performace Liquid Cromatography). [6]

La Calorimetría Diferencial de Barrido ofrece posibilidades analíticas cuantitativas de medicamentos sólo si el principio activo y los excipientes no poseen interacción o poseen una interacción limitada (ejemplo: comportamiento eutéctico). No obstante, metodologías por Calorimetría Diferencial de Barrido son rápidas y solamente requieren unos cuantos miligramos de muestra, aparte de ser automatizadas y un barrido puede ofrecer buena información cualitativa y cuantitativa. [4]

Hasta la fecha no se ha registrado la aplicación de la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido en la prueba de Contenido Químico de Tabletas en los libros oficiales (farmacopeas). No obstante, los mismos establecen que una prueba no oficial (Contenido Químico, Uniformidad de Unidades de Dosificación, Disolución, etc.) con una metodología o técnica instrumental diferente a la citada en la monografía oficial para el análisis de una materia prima o producto terminado, puede ser utilizada siempre y cuando ésta sea validada. [7]

Por lo tanto, el desarrollo y validación de una metodología de cuantificación de un fármaco en Tabletas bajo la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido ofrece las ventajas de un análisis rápido y más económico respecto a otras metodologías que utilizan técnicas espectrofotométricas o cromatográficas en los libros farmacopeicos, debido a el ahorro de disolventes, tratamiento mínimo de muestra, utilización de poca cantidad de muestra, una vez realizada la línea de estandarización se puede ocupar en análisis de días posteriores, generando todas estas ventajas tiempos reducidos de análisis, ahorro en aspectos monetarios, beneficios ambientales, disminución de operaciones en la metodología analítica, se evita el uso cristalería, disminución del consumo de estándares, disminución de incertidumbre analítica acumulada dentro de la metodología; en resumen, aumenta la eficiencia y eficacia para la obtención de los resultados analíticos.

Para el desarrollo del presente trabajo se abordó, mediante una validación, la confiabilidad de la determinación del Contenido Químico de Ibuprofeno en Tabletas a través de la Calorimetría Diferencial de Barrido, donde se pretende evaluar la factibilidad de la utilización de la técnica calorimétrica para la determinación del Ibuprofeno en tabletas, a través de una exploración, luego desarrollar y validar una metodología para la determinación de Ibuprofeno en Tabletas a través de la técnica DSC; posteriormente evaluar los resultados de los diferentes parámetros de validación para la determinación de Contenido Químico, y finalmente comparar los resultados de la metodología desarrollada en Calorimetría Diferencial de Barrido con los obtenidos por la metodología oficial basada en la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).

## **1. FUNDAMENTO TEÓRICO**

## 1.1. ANÁLISIS DE MEDICAMENTOS

El uso de técnicas analíticas muy sensibles es imprescindible para el control de calidad que determina la eficacia y seguridad de los medicamentos, de tal forma que el desarrollo de un fármaco incluye necesariamente la puesta a punto de ensayos analíticos para su determinación, así como la posible degradación física, química o metabólica. Para proponer un nuevo método de análisis, o seleccionar para su aplicación uno conocido, es necesario hacer uso de propiedades físicas y químicas correspondientes a la estructura y composición del producto en cuestión. [8] [9] [10]

La elección de una técnica de análisis depende del propósito de la valoración, según sea cualitativa, cuantitativa o semicuantitativa, y de la complejidad de la muestra. La cantidad y la pureza de esta, junto con las disponibilidades económicas y de técnicas instrumentales, son los parámetros más determinantes. El mejor método de análisis será el más sencillo de los que posean la sensibilidad que se precise. Un método puede ser muy sensible para una sustancia pura, pero inaplicable a una mezcla compleja, por lo que, frecuentemente es necesaria la preparación previa de la muestra a fin de separar sus constituyentes. [8] [9]

El control de calidad del producto final requiere especificar muy estrechamente los límites de pureza y concentración, para lo cual se usa Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) o Cromatografía de Gases (GC, Gas Chromatography), en donde para el análisis cuantitativo del fármaco, a fin de determinar el porcentaje de pureza o el contenido del (o los) ingrediente(s) activo(s), se usan metodologías que requieren un estándar de referencia de pureza definida, el cual sirve a los cálculos de la materia prima o producto terminado. Es de hacer notar que el uso de los estándares de referencia se hace obligatorio en cada sesión de análisis debido a los cambios instrumentales que puede sufrir tanto el HPLC o el GC en cualquiera de sus módulos. [8]

Las técnicas basadas en la Calorimetría Diferencial de Barrido para el análisis de medicamentos se enfocan principalmente a determinaciones cualitativas, como la compatibilidad fisicoquímica entre fármacos y excipientes, y en determinaciones de polimorfismo de materias primas. Por otra parte, las determinaciones cuantitativas, se encuentran todavía en una etapa reciente de las aplicaciones químico-farmacéuticas, donde se puede resaltar la determinación de la pureza de los Principios Activos Farmacéuticos (conocida como “Base Tal Cual” en el ámbito químico farmacéutico), que se determina calorimétricamente con la ayuda de la ecuación de Van't Hoff; cálculo que ya viene programado en el software de los equipos DSC y no es necesario efectuar cálculos compendiosos.

[5]

La aplicación de la Calorimetría Diferencial de Barrido para la cuantificación de fármacos dentro de Formas Farmacéuticas, prueba conocida como Contenido Químico, es una de las aplicaciones menos estudiadas, pues la demanda de la prueba es tal que requiere aspectos de sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud por parte de la técnica, además de que la metodología preparatoria de la muestra sea sencilla y rápida. Por lo tanto para la realización de la prueba de Contenido Químico en producto terminado, por ejemplo tabletas, se requiere de una balanza capaz de pesar con exactitud y precisión las pequeñas cantidades que se colocarán dentro del DSC, y que éste provea las señales calorimétricas con la mejor sensibilidad y resolución, facilitando una relación directa entre el fármaco (analito) y la señal calorimétrica respectiva, a fin de poder utilizar esta propiedad como una herramienta de cuantificación con resultados precisos y confiables. [9]

## 1.2. GENERALIDADES FÍSICOQUÍMICAS EN LA CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

### 1.2.1. Primera Ley de la Termodinámica

La energía total de un cuerpo o sistema cerrado es la suma de la energía cinética macroscópica  $E_k$ , más la energía potencial  $E_p$  y la energía interna  $U$ , la cual consta de energía molecular (electrónica, traslacional, vibracional, rotacional). Las energías cinéticas y potenciales son energías no moleculares, debidas al movimiento del cuerpo a través del espacio y a la presencia de campos que actúan sobre él. El planteamiento matemático es el siguiente:

$$E = E_k + E_p + U \quad (1-1)$$

Debido a que la termodinámica es una ciencia macroscópica, su desarrollo no requiere conocer la naturaleza de  $U$ ; todo lo que se necesita son formas de medir la variación de  $U$  en un proceso, es decir que son funciones de estado. Por otro lado, en la mayor parte de las aplicaciones de la termodinámica el sistema está en reposo y en ausencia de campos externos, por lo que  $E_k$  y  $E_p$  son cero, y la energía total del sistema será igual a la energía interna  $U$ . [11][12]

$$E = U \quad (1-2)$$

La primera ley de la termodinámica establece la conservación de energía, es decir, ésta ni se crea, ni se destruye. En otras palabras, establece que para una cantidad dada de una forma de energía que desaparece otra forma de la misma aparecerá en una cantidad igual a la cantidad desaparecida.

Para ser más específicos, planteando el destino de cierta cantidad de calor  $Q$  agregada a un sistema; esta cantidad dará origen a un incremento de la energía  $E$  del sistema cerrado y también efectuará cierto trabajo  $w$  externo como consecuencia de dicha absorción calorífica. Entonces el planteamiento matemático sería el siguiente:

$$\Delta E - w = Q$$

Al limitar el sistema cerrado a un estado de reposo y en ausencia de campos externos, se tiene que  $E = U$ , y la ecuación anterior se puede expresar de la siguiente forma:

$$\Delta U - w = Q$$

Y despejando la energía interna se llega a la siguiente expresión:

$$\Delta U = Q + w \quad (1-3)$$

Tanto  $Q$  como  $w$  no son funciones de estado, por lo que no tiene sentido preguntar cuánto calor o cuánto trabajo contiene un sistema. Antes y después del proceso de transferencia de energía entre el sistema y su entorno, el calor y el trabajo no existen. El calor es una transferencia de energía entre el sistema y su entorno debido a una diferencia de temperatura (es un trabajo realizado a nivel molecular); mientras que el trabajo es una transferencia de energía entre el sistema y su entorno debido a una fuerza macroscópica que actúa a lo largo de una distancia. En resumen, el calor y el trabajo son formas de transferencia de energía.

### 1.2.2. Entalpía

La Entalpía  $H$  de un sistema cuya energía interna, presión y volumen son  $U$ ,  $P$  y  $V$  se define como:

$$H \equiv U + PV \quad (1-4)$$

Puesto, que  $U$ ,  $P$  y  $V$  son funciones de estado,  $H$  también lo es. Además definiendo también que el producto de  $P$  y  $V$  tiene dimensiones de trabajo según la siguiente expresión  $dw = -PdV$ , y por lo tanto de energía. En consecuencia es correcto sumar  $U$  y  $PV$ , donde naturalmente  $H$  tiene unidades de energía. [12] [13] [14]



La razón de que se de un nombre especial a la función de estado  $U + PV$ , es que esta combinación de  $U$ ,  $P$  y  $V$  se encuentra con frecuencia en termodinámica. Por ejemplo, sea  $Q_p$  el calor absorbido por un sistema cerrado en un proceso a presión constante. A partir de la primera ley  $\Delta U = Q + w$  se obtiene:

$$U_2 - U_1 = Q + w = Q - \int_{V_1}^{V_2} P dV = Q_p - P \int_{V_1}^{V_2} dV = Q_p - P(V_2 - V_1)$$

$$Q_p = U_2 + PV_2 - U_1 - PV_1 = (U_2 + PV_2) - (U_1 + PV_1)$$

Sustituyendo la ecuación (1-4) en la expresión anterior, se obtiene:

$$Q_p = U_2 + PV_2 - U_1 - PV_1 = (U_2 + PV_2) - (U_1 + PV_1) = H_2 - H_1$$

Y por lo tanto:

$$\Delta H = Q_p \quad (1-5)$$

La ecuación anterior (1-5) expresa que en un sistema cerrado el calor absorbido  $Q_p$  en un proceso a presión constante es igual a la variación de entalpía del sistema, lo cual se puede aplicar a la ecuación (1-4) para obtener la expresión:

$$\Delta H = \Delta U + \Delta(PV) \quad (1-6)$$

Considerando por otra parte, un proceso a volumen constante; si el sistema cerrado sólo puede llevar a cabo trabajo  $PV$ , entonces  $dw = -PdV = 0$ , puesto que  $dV = 0$ , por lo que la primera ley  $\Delta U = Q + w$  para un proceso a volumen constante en un sistema cerrado se transforma en:

$$\Delta U = Q_v \quad (1-7)$$

La comparación de  $\Delta H = Q_p$  y  $\Delta U = Q_v$ , muestra que un proceso a presión constante  $H$  desempeña un papel análogo al que tiene  $U$  en un proceso a volumen constante.

La expresión del cambio de entalpía puede definirse como  $\Delta H = \Delta U + \Delta(PV)$ , sin embargo los sólidos y los líquidos tienen cambios de volúmenes relativamente pequeños durante procesos cerrados, por lo que el término  $\Delta(PV)$  es despreciable frente al término  $\Delta U$  en casi todos los procesos que implican exclusivamente sólidos o líquidos a presiones bajas o moderadas. Por lo que a presiones no demasiado altas, el cambio de entalpía en un proceso, es esencialmente el mismo que el cambio de energía interna. Y para los procesos cerrados a presión baja constante aplicados a sustancias sólidas y líquidas la expresión  $\Delta H = \Delta U + \Delta(PV)$  se convierte en: [12] [13] [14]

$$\Delta H \approx \Delta U \quad (1-8)$$

### 1.2.3. Capacidad Calorífica

La Capacidad Calorífica  $C_{pr}$  de un sistema cerrado en un proceso "pr" infinitesimal, se define como:

$$C_{pr} \equiv \frac{dQ_{pr}}{dT} \quad (1-9)$$

Donde  $dQ_{pr}$  y  $dT$  son el calor transferido al sistema y la variación de la temperatura del mismo durante el proceso. El subíndice "pr" indica que la capacidad calorífica depende de la naturaleza del proceso. Por ejemplo en un proceso a presión constante, se tiene  $C_p$  la cual es la capacidad calorífica a presión constante (o capacidad calorífica isobárica); en donde la expresión matemática es:

$$C_p \equiv \frac{dQ_p}{dT} \quad (1-10)$$

De forma similar la capacidad calorífica a volumen constante (o capacidad calorífica isocórica)  $C_v$  de un sistema cerrado es:

$$C_v \equiv \frac{dQ_v}{dT} \quad (1-11)$$

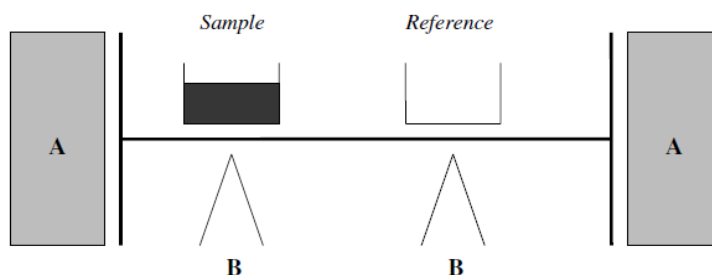
Donde  $dQ_v$  y  $dT$  son el calor transferido al sistema y la variación de la temperatura del mismo durante un proceso infinitesimal a volumen constante.

La explicación física de que  $C_p \neq C_v$  radica en  $dQ_p$  y  $dQ_v$ , ya que los calores añadidos a presión constante y a volumen constante para producir el mismo incremento de temperatura  $dT$ , son distintos. En un proceso a presión constante, parte del calor añadido se invierte en realizar trabajo de expansión  $PdV_p$ , mientras que en un proceso a volumen constante el sistema no realiza trabajo sobre el entorno. Además la variación de energía interna a presión constante es diferente de la que se produce a volumen constante:  $dU_p \neq dU_v$  [12] [13] [14]

### 1.3. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

El principio básico de la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido es que la muestra sujeta a análisis es sometida a una señal de calor y la respuesta es medida en términos de energía y temperatura de los eventos térmicos que toman lugar en la medición en un rango de temperatura o tiempo bajo estudio. El perfil de temperatura puede efectuarse en forma de calentamiento, enfriamiento o un programa isotérmico, donde el calentamiento es el perfil de temperatura más utilizado. Consecuentemente el uso de esta técnica en el campo farmacéutico va enfocado generalmente a la medición de respuestas de fusión de la muestra. [4]

Operativamente, se coloca la porción de muestra dentro de un crisol metálico (generalmente de 5 mg a 10 mg dentro de un crisol de aluminio), llevando simultáneamente un crisol de referencia vacío; los cuales son colocados dentro de un horno donde se someten a un programa de enfriamiento o calentamiento a una velocidad controlada, generalmente de 5 °C/min a 10 °C/min. Cuando la porción de muestra sufre un evento térmico de cambio de fase (fusión o cristalización, etc.) la temperatura y la energía asociada a ese evento es registrada para ser posteriormente relacionada al fenómeno en estudio (Figura 1-1). [4]



**Figura 1-1** Diagrama de DSC. A: Horno, B: Termocuplas

En esencia, el calor aportado a la muestra contribuye al proceso de fusión en vez de aumentar la temperatura; al mismo tiempo, el calor aportado al crisol de referencia se invierte en aumento de temperatura del mismo. Cuando la fusión se completa la muestra regresa al programa de temperatura, de aquí que el resultado de la diferencia del programa de temperatura de los dos crisoles, es un pico el cual representa el fenómeno termodinámico de transición de fase. [4]

Generalmente, el programa de temperatura para un análisis DSC es diseñado de tal modo que la temperatura del portador de muestra aumenta linealmente como función del tiempo. Por otra parte, la muestra de referencia debería tener una capacidad calorífica bien definida en el intervalo de temperaturas en que vaya a tener lugar el barrido. El principio básico subyacente a esta técnica es que, cuando la muestra experimenta una transformación física tal como una transición de fase, se necesitará que fluya más (o menos) calor a la muestra que a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. [4]

Que fluya más o menos calor a la muestra depende de si el proceso es exotérmico o endotérmico. Por ejemplo, para que una muestra sólida funda se requerirá que fluya más calor a la muestra para aumentar su temperatura a la misma velocidad que la de referencia. Esto se debe a la absorción de calor de la muestra, en tanto ésta experimenta la transición de fase endotérmica desde sólido a líquido. Por el contrario, cuando la muestra experimenta procesos exotérmicos (como una cristalización) se requiere menos calor para alcanzar la temperatura de la muestra. Determinando la diferencia de flujo calorífico entre la muestra y la referencia, los calorímetros DSC son capaces de medir la cantidad de calor absorbido o eliminado durante tales transiciones. [4]

A cada termograma de la transferencia de calor, se debe adjuntar una descripción completa de las condiciones empleadas, incluyendo marca y modelo del instrumento, registro de la última calibración, tamaño e identificación de la muestra (incluyendo los antecedentes térmicos), envase, identidad, velocidad de flujo y presión de la atmósfera gaseosa; dirección y velocidad del cambio de temperatura y la sensibilidad del instrumento y del registrador. [4]

Es apropiado realizar un examen preliminar a lo largo de un intervalo amplio de temperatura (típicamente desde temperatura ambiente hasta temperatura de descomposición o hasta aproximadamente de 10° a 20° por encima del punto de fusión), y sobre un amplio intervalo de velocidades de calentamiento (de 2° a 20° por minuto), lo cual podría revelar efectos inesperados; luego, se puede realizar un examen simple o exámenes repetidos a lo largo de un intervalo estrecho, delimitando la transición de interés a una o más velocidades de calentamiento menores. Al examinar los materiales cristalinos puros, las velocidades de calentamiento de tan sólo 1°C/min pueden resultar apropiadas, mientras que las velocidades de hasta 10° por minuto son más adecuadas para los materiales poliméricos y otros materiales semi-cristalinos. [4]

### 1.3.1. INTERPRETACIÓN BÁSICA DE LOS TERMOGRAMAS

Los datos del DSC son usualmente expresados en términos de Potencia (J/s) como función de la temperatura, como es representado en la figura siguiente:

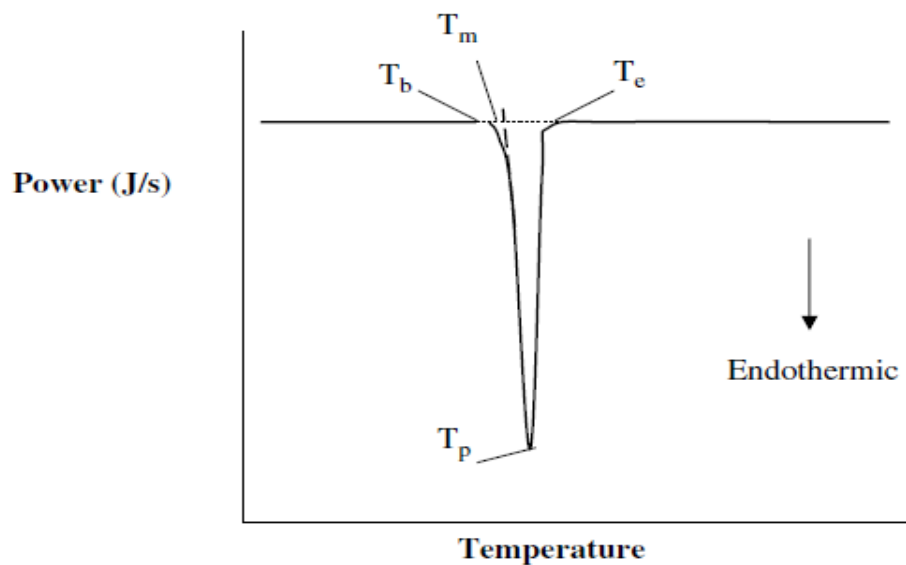


Figura 1-2 Típica endoterma de fusión para un material ultrapuro de bajo peso molecular.

El termograma anterior (Figura 1-2), muestra que a temperaturas inferiores a la del proceso de fusión es trazada una línea base, que indica el flujo de calor requerido para elevar la temperatura de la muestra, con el fin de mantenerla a la temperatura que demanda el programa de temperatura. Esto es, por lo tanto, una función de la Capacidad Calorífica  $C_p$  de la muestra. Este parámetro representa la energía requerida para elevar la temperatura de la muestra en 1K. En términos de una señal en el DSC, puede ser expresado en la siguiente forma:

$$\frac{dQ}{dt} = C_p \cdot \frac{dT}{dt} \quad (1-12)$$

Donde  $\frac{dQ}{dt}$  es el Flujo de Calor y  $\frac{dT}{dt}$  es la Velocidad de Calentamiento. Por lo tanto en principio el Flujo de Calor correspondiente a la línea base conlleva la Capacidad Calorífica de la muestra (ver ecuación 1-10). [4] [12]

Al seguir el calentamiento, el proceso de fusión comienza. Sin embargo se requieren ciertos cuidados en la interpretación de los datos, pues el termograma presenta la señal de fusión de un compuesto ultrapuro de bajo peso molecular, el cual por definición da picos de fusión estrechos. En la práctica, muchos materiales presentan picos de fusión anchos debido a la naturaleza de la muestra y presencia de gradientes térmicos dentro del crisol de muestra. También muchos materiales muestran múltiples picos debido a la naturaleza multicomponente del material y de la tendencia de estos componentes a cocrystalizar en distintas estructuras. [4]

Debido a esto, surge la pregunta en qué punto del pico debe ser considerado el punto de fusión. Existen varias opciones para elegir el punto de fusión del pico (Figura 1-2): la temperatura en donde comienza una desviación de la línea base ( $T_b$ ), la temperatura “onset” extrapolada ( $T_m$ ), la temperatura del pico ( $T_p$ ), y la temperatura en la cual el trazo de la señal regresa a línea base ( $T_e$ ), o la temperatura “offset” extrapolada. Algunos autores recomiendan que para las muestras en donde los gradientes de temperatura son pequeños y el proceso de fusión es estrecho, el “onset”

extrapolado debe ser usado, y Temperatura de Pico debe ser usado para procesos de fusión anchos. [4]

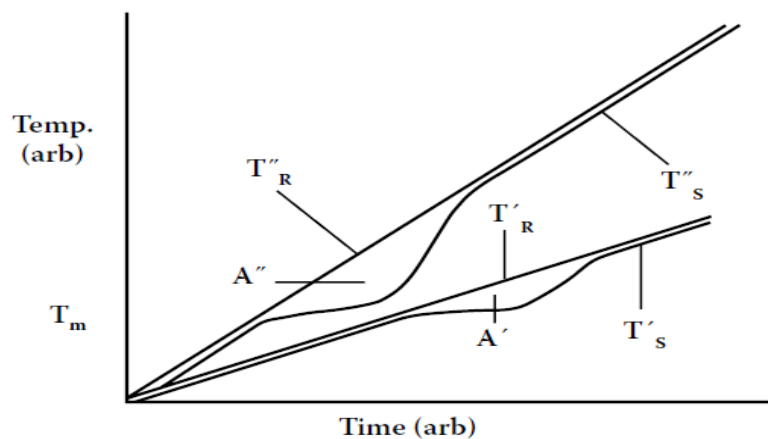
El área bajo el pico A (Figura 1-3) representa la entalpía de cambio asociada al proceso de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$A = k' m(-\Delta H) \quad (1-13)$$

donde  $k'$  es la Sensibilidad Calorimétrica (un factor de conversión eléctrico),  $m$  es la masa de la muestra, y  $\Delta H$  es la entalpía.

Consecuentemente es necesario calibrar el instrumento bajo condiciones similares a las del experimento y medir el área del patrón de calibración. Para muchos experimentos es aceptable usar el metal Indio como patrón, el cual posee un calor de fusión de 28.71 J/g. Sin embargo, si los eventos o fenómenos a estudiar difieren considerablemente de la temperatura de fusión del Indio (156.61 °C), es necesario utilizar un patrón que funda cerca de la región de experimentación. [4]

Una consideración extra, es la relación entre el área absoluta del pico y de la velocidad de calentamiento; a mayores velocidades de calentamiento el pico aparecerá considerablemente más grande. Esto puede ser comprendido a través de la Figura 1-3:



**Figura 1-3** Efecto de la Velocidad de Calentamiento en la sensibilidad de la señal.



Durante el proceso de fusión, el calor aportado a la muestra va a ser utilizado para fundir el material, por lo que un diferencial de temperatura se desarrollará entre la muestra y la referencia, en donde la muestra se mantiene isotérmica durante el proceso; a velocidades de calentamiento pequeñas ( $T'_s$ ,  $T'_r$ ,  $A'$ ) el retraso va a ser relativamente pequeño a cualquier temperatura dada, debido a que la temperatura de referencia  $T'_r$  no habrá incrementado grandemente en el tiempo de fusión a velocidad de calentamiento baja, por lo tanto  $A'$  va a ser pequeño. Para velocidades de calentamiento mayores ( $T''_s$ ,  $T''_r$ ,  $A''$ ) la diferencia entre  $T''_s$  y  $T''_r$  será mayor durante la fusión, por lo tanto  $A''$  va a ser mayor. También se concluye lo siguiente: velocidades de calentamiento bajas favorecen la resolución, sin embargo la Sensibilidad mejora a velocidades de calentamiento grandes. De aquí, que cualquier experimento debe encontrar la velocidad de calentamiento que le proporcione el balance entre Resolución y Sensibilidad. [4]

### 1.3.2. OPTIMIZACIÓN DE EXPERIMENTOS

Un calorímetro diferencial de barrido mide el Flujo de Calor hacia o desde una muestra, donde usualmente la muestra es calentada. Cualquier cambio que afecte las características del flujo de calor, dentro del DSC o la muestra, va a afectar la recolección de datos registrados por el instrumento. Por lo tanto es necesario conocer y entender las variables que pueden afectar la señal del flujo de calor. [4] [12]

Un experimento típico DSC recolecta información del flujo de calor que se transfiere desde o hacia la muestra como una función de la temperatura o el tiempo. En ausencia de cualquier transición la información del flujo de calor puede ser representado por la siguiente ecuación:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{dQ}{dT} \times \frac{dT}{dt} \quad (1-14)$$

En donde  $\frac{dQ}{dt}$  es el flujo de calor,  $\frac{dQ}{dT}$  es la capacidad calorífica y  $\frac{dT}{dt}$  es la velocidad de calentamiento, en otras palabras:

Flujo de Calor = Capacidad Calorífica · Velocidad de Calentamiento

Cuando una muestra sufre una transición térmica, por ejemplo fusión, puede ser considerada como un cambio significativo en la capacidad calorífica de la muestra o como un término extra en la ecuación de flujo de calor  $f(T,t)$ , el cual representa los eventos cinéticos:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{dQ}{dT} \times \frac{dT}{dt} + f(T,t) \quad (1-15)$$

o

Flujo de Calor = Capacidad Calorífica · Velocidad de Calentamiento + Eventos Cinéticos

Como no existe un instrumento que mida el flujo de calor neto, es necesario efectuar medidas diferenciales midiendo el flujo de calor entre la muestra y la referencia inerte. La magnitud de este flujo de calor va a ser gobernada por la resistencia térmica del sistema, y de la diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia:

$$\frac{dQ}{dt} = (T_R - T_S) / R \quad (1-16)$$

donde  $T_R$  y  $T_S$  son las temperaturas de la referencia y la muestra respectivamente, y  $R$  es la resistencia térmica entre la referencia y la muestra.

De las dos ecuaciones anteriores se puede apreciar que los términos claves que pueden afectar la medición del flujo de calor son:

- La velocidad de calentamiento
- La capacidad calorífica
- Eventos cinéticos (fusión, degradación, etc.)
- La resistencia térmica entre la muestra y la referencia
- La diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia

Estas variables deben ser entendidas y controladas para obtener datos DSC de calidad, es decir, datos reproducibles y representativos de las propiedades de la muestra.

Algunas de estas variables pueden ser controladas o al menos influenciadas por el operador el equipo. La velocidad de calentamiento es claramente una variable sobre la que el operador tiene control. El operador sólo puede influir en otras, como la resistencia térmica del DSC; por ejemplo al cambiar el gas de purga a otro con mayor conductividad térmica se mejora la transferencia de calor.

En un típico experimento DSC, una muestra con peso conocido se coloca en un crisol de aluminio, junto con un crisol de referencia dentro del equipo. Ambos se calientan en un entorno controlado, y se registra la diferencia de flujo de calor entre ambas. Experimentos similares se efectúan con materiales de referencia con el fin de obtener constantes de calibración como temperatura y flujo de calor que en experimentos subsecuentes puedan ser reproducidos.

Las variables que afectan el experimento DSC pueden ser agrupadas en las siguientes categorías: equipo, muestra y experimento.

### **1.3.2.1. Equipo:**

Además del equipo DSC hay otros implementos auxiliares y equipos que necesitan ser calibrados y provistos de mantenimiento para asegurar que los datos producidos por el DSC son exactos. [4]

#### *1.3.2.1.1. Balanzas analíticas.*

La balanza analítica usada para pesar la muestra es a menudo el factor determinante que influye en la exactitud de los resultados calorimétricos. La balanza debe ser monitoreada y calibrada contra una masa patrón cada vez que se efectúe una determinación en el DSC. Además, la balanza debe ser lo suficientemente exacta para que la cantidad de muestra a pesar posea una masa confiable, la cual refleje una entalpía correcta durante las determinaciones calorimétricas. Una balanza con 5 dígitos es considerada como la mínima necesaria cuando se pesan muestras en un rango de 10 mg a 20 mg, una balanza con 6 dígitos para pesos entre 1 mg y 10 mg; una con 7 dígitos, para muestras menores a 1 mg. Las balanzas deben permanecer limpias y el plato de la balanza se debe limpiar antes de efectuar la pesada correspondiente, con el fin de asegurar que no exista algún residuo que se adhiera a la parte externa del crisol. [4]

#### *1.3.2.1.2. Gas de purga.*

La mayoría de experimentos en materiales farmacéuticos son llevados a cabo en una atmósfera inerte, usualmente nitrógeno ( $N_2$ ). El gas Helio (He), el cual tiene una mayor conductividad térmica, puede ser usado si la resistencia térmica del DSC necesita ser disminuida. Esto tiene el efecto de incrementar la resolución de las señales que están cerca unas de otras con respecto a la temperatura. [4]

#### *1.3.2.1.3. Flujo de purga.*

Un gas de purga con flujo constante a través del DSC asegura que los productos volátiles producidos durante el experimento son acarreados fuera del sensor de medición. También asegura un ambiente constante e inerte alrededor del área de la muestra, lo cual ayuda a mantener una reproducibilidad de la línea base de experimento a experimento.

Un cambio en la velocidad del gas de purga usado en el DSC puede afectar de varias formas; en primer lugar es posible que pueda cambiar la temperatura y entalpía de calibración, la magnitud de esta variación puede cambiar dependiendo del tipo de la configuración del diseño del DSC, por ejemplo hay dispositivos que pueden calentar el gas de purga antes de que entre a la celda del DSC; en segundo lugar, para experimentos donde las sustancias volátiles son generadas mientras la muestra es calentada, la forma del pico puede ser afectada por la velocidad a la cual las sustancias volátiles son removidas. [4]

#### *1.3.2.1.4. Calibración de temperatura del DSC*

En cualquier experimento en DSC cuando la muestra es calentada, la muestra y sus alrededores no están en equilibrio térmico. La temperatura de la muestra va a ser ligeramente menor que la temperatura del horno. La transferencia del calor entre el horno, la muestra y la referencia no es instantánea y depende de las características de la transferencia de calor del diseño particular del DSC. Consecuentemente, se requiere una corrección para que temperaturas de transición exactas sean medidas en los registros de flujo de calor del DSC. Esto introduce el concepto de Retraso Térmico dentro del sistema. De hecho existen varios retrasos térmicos a ser considerados: el retraso entre el horno y el fondo del crisol de muestra, el retraso entre el fondo de crisol de muestra y la muestra y el retraso dentro de la muestra misma. Existen varias metodologías para compensar

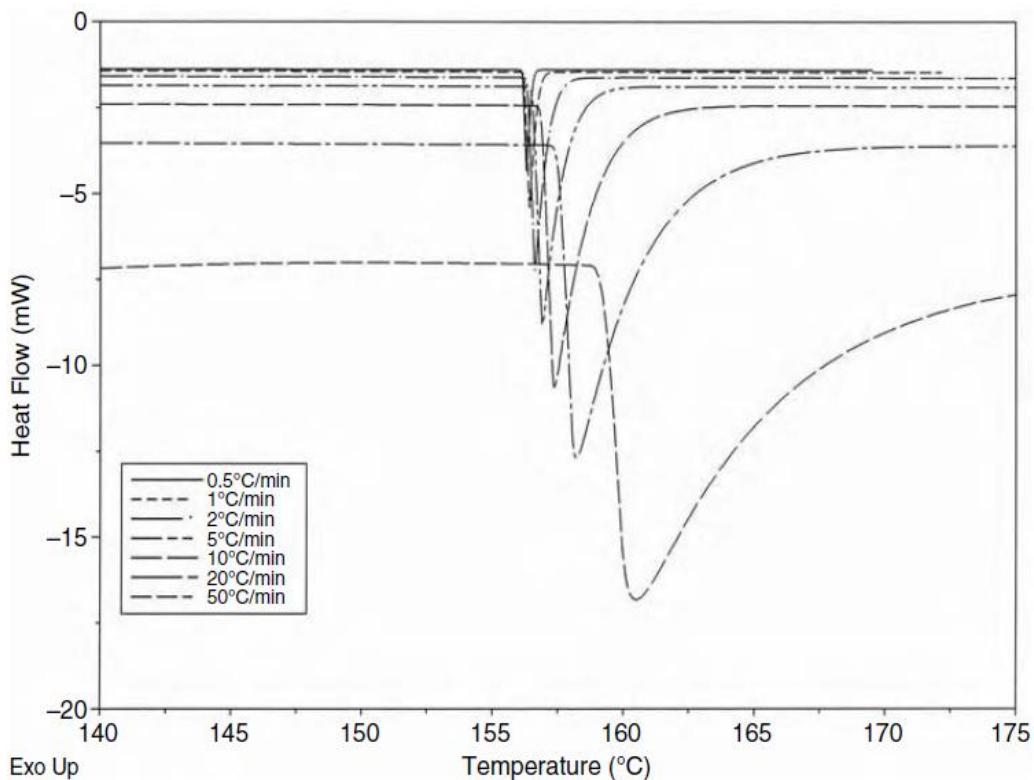
uno o todos los retrasos. Los gradientes de temperatura dentro la muestra pueden ser disminuidos, por ejemplo, utilizando pequeñas cantidades de muestra, crisoles con una característica de buena transferencia de calor y velocidades de calentamiento bajas. Sin embargo el retraso térmico nunca va a poder ser removido y por lo tanto debe medirse.

La calibración de la temperatura requiere de patrones trazables, con transiciones de temperatura conocidas y ser corridos en condiciones similares o iguales a las condiciones a las que van a ser corridas las muestras. La temperatura de transición del flujo de calor observada en el DSC para el patrón es comparada con el valor conocido y es aplicada la corrección, en general con la ayuda de software. Los patrones para calibración de temperatura usados en DSC son los de punto de fusión de metales puros como Indio (In), Plomo (Pb) y Estaño (Sn). Estos metales están disponibles con alto grado de pureza y con puntos de fusión bien conocidos. Varias organizaciones como el NIST (National Institute of Standards and Technology) proveen estos patrones con certificado de trazabilidad.

Los patrones de temperatura no abarcan el retraso térmico dentro de la muestra, por lo tanto este argumento pone de manifiesto la necesidad del uso de materiales orgánicos para la calibración de temperatura en determinaciones farmacéuticas; sin embargo, la escasa disponibilidad de patrones puros y certificados es un importante argumento en contra del uso de patrones orgánicos.

La calibración de la temperatura debe ser efectuada en el rango de interés de experimentación. Al menos efectuar dos puntos de calibración, y éstos deben abarcar el rango de interés; por lo tanto se puede utilizar Indio (156.6°C) y otro metal con punto de fusión superior, por ejemplo Plomo (327.5°C) o Estaño (231.93°C).

La Figura 1-4 muestra la Temperatura Onset del punto de fusión del Indio a diferentes velocidades de calentamiento. A medida que la velocidad de calentamiento incrementa el retraso térmico entre el horno y la muestra incrementa. [4]



**Figura 1-4** Efecto de la velocidad de calentamiento en la Temperatura Onset de fusión del Indio.

#### 1.3.2.1.5. Calibración de entalpía del DSC

Existen muy pocos materiales que tengan entalpías exactamente conocidas y que estén disponibles con certificado de trazabilidad. Muchos libros de texto citan valores de calor de fusión para diversos materiales. Hay algunas instituciones de química que proveen para el patrón Indio un certificado que incluye trazabilidad de temperatura y entalpía, y por lo tanto puede ser utilizado para calibrar el DSC tanto para las abscisas (temperatura) como para la ordenada (entalpía). [4]

#### 1.3.2.1.6. Accesorios de enfriamiento.

Cualquiera sea el accesorio de enfriamiento utilizado, es importante que ambos, enfriador y DSC, hayan alcanzado un equilibrio térmico antes de que sean efectuados posteriores determinaciones. La cantidad de tiempo necesario para la estabilización puede variar considerablemente DSC y sistemas de enfriamiento, sin embargo el experimento debe efectuarse hasta que ambos se hayan estabilizado. [4]

### **1.3.2.2. Muestra.**

Idealmente la muestra debería ser un disco circular delgado, de alta conductividad térmica que no interacciones con las celdas del DSC de tal forma que pueda ser colocado directamente dentro del horno sin la necesidad de crisoles. Estos criterios son necesarios para minimizar los gradientes térmicos en la muestra y reducir la resistencia térmica del DSC. Desafortunadamente escasos materiales farmacéuticos cumplen estos criterios. Debido a esto, se deben tomar en cuenta ciertos cuidados durante la preparación de la muestra con el fin de minimizar el retraso térmico y gradientes térmicos al mismo tiempo que la muestra es todavía representativa respecto al material a granel. [4]

#### *1.3.2.2.1. Forma de muestra: Polvos.*

Idealmente, estos deberían ser de libre flujo, y si es posible de una consistente distribución de tamaño de partícula; si el material contiene grumos, puede ser necesario pasar una porción a través de dos mallas (50  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ ) y correr la porción de muestra recolectada entre estos dos tamaños de malla. La presencia de aglomerados u otros grumos dentro de la muestra puede llevar a la formación de “Hombros” en los picos durante las transiciones. Se debe evitar la utilización de mortero y pistilo hasta demostrar analíticamente que este proceso no afecta la estabilidad polimórfica del material. [4]

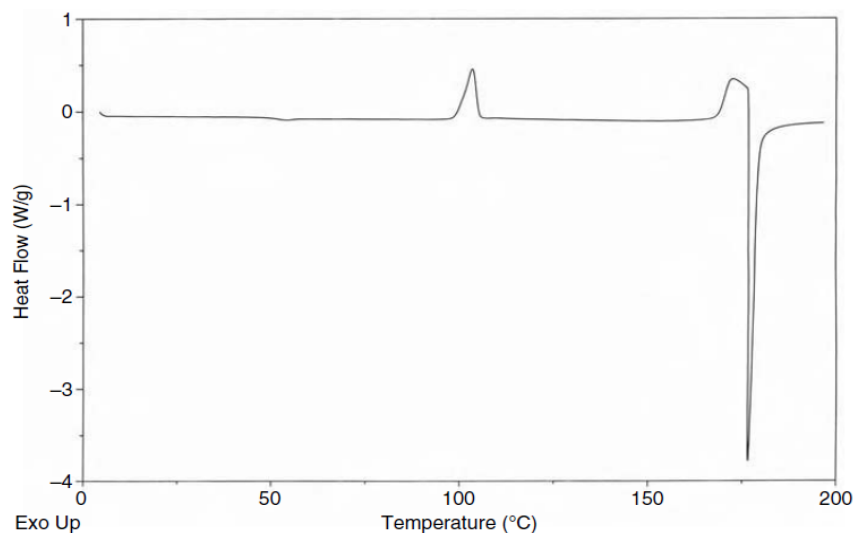
#### *1.3.2.2.2. Cristalinidad e Historia Térmica.*

Los efectos de tratamientos térmicos previos (historia térmica) pueden afectar significativamente la forma de la curva para materiales semicristalinos; esto puede provocar dificultades de comparación, a menos que hayan sido aplicadas historias térmicas similares a ambas muestras. Este efecto es bien conocido para polímeros, grasas y ceras.

Para hidrocarburos de cadena larga, la cantidad u orden de cristalinidad va a depender de que tan lento haya sido el proceso de enfriamiento desde el estado líquido hasta temperatura ambiente. Para muestras que han sido enfriadas rápidamente existe menos tiempo disponible para que las moléculas se ordenen en estructuras regulares; el resultado va a ser un material con un pico pequeño de fusión. Por otro lado si la muestra es enfriada lentamente hay suficiente tiempo para una mayor cristalización, dando como resultado un pico grande de fusión.

Cuando se estudian este tipo de materiales, es de mucha importancia establecer si es apropiado estandarizar la historia térmica del mismo. Si este es el caso, un método simple de lograr esto es crear un programa de calentamiento, enfriamiento y recalentamiento en el DSC. El primer calentamiento borra la historia térmica de la muestra (asumiendo que la temperatura máxima a la que se llegue es suficiente para borrar cualquier núcleo sin causar problemas de degradación), la etapa de enfriamiento le proporciona a la muestra una historia térmica conocida, y el segundo calentamiento permite medir en la muestra propiedades con historia térmica conocida.

Las sustancias orgánicas pueden existir en forma cristalina y amorfa. Una sustancia amorfa puede presentar varias transiciones mientras es calentada, la primera transición es un cambio endotérmico en la línea base, esto es la temperatura de transición vítrea; mientras la temperatura incrementa se puede observar un pico exotérmico de cristalización, esto es si la muestra puede formar más estructuras cristalinas; y finalmente cualquier material cristalino funde y generalmente se descompone a mayores temperaturas. Todo este proceso se puede observar en la Figura 1-5: [4]

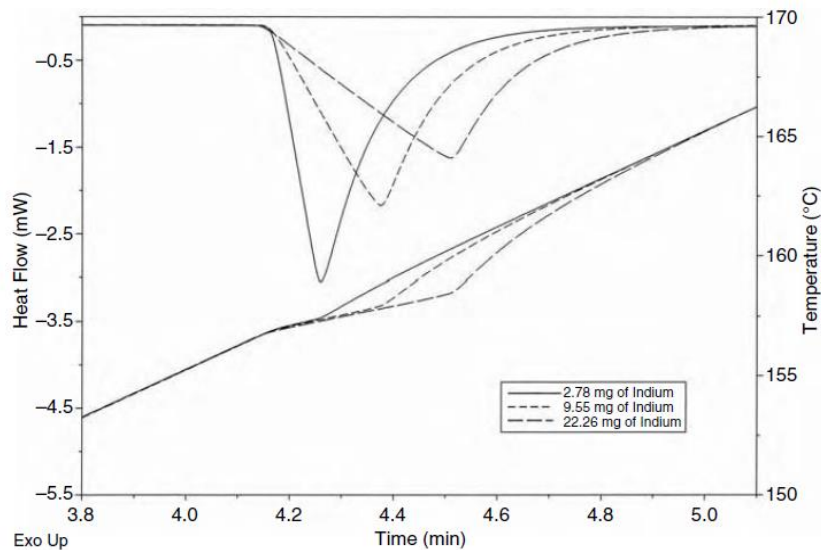


**Figura 1-5** Termograma de salbutamol sulfato amorfo, mostrando transición vítrea, recristalización, fusión y degradación.



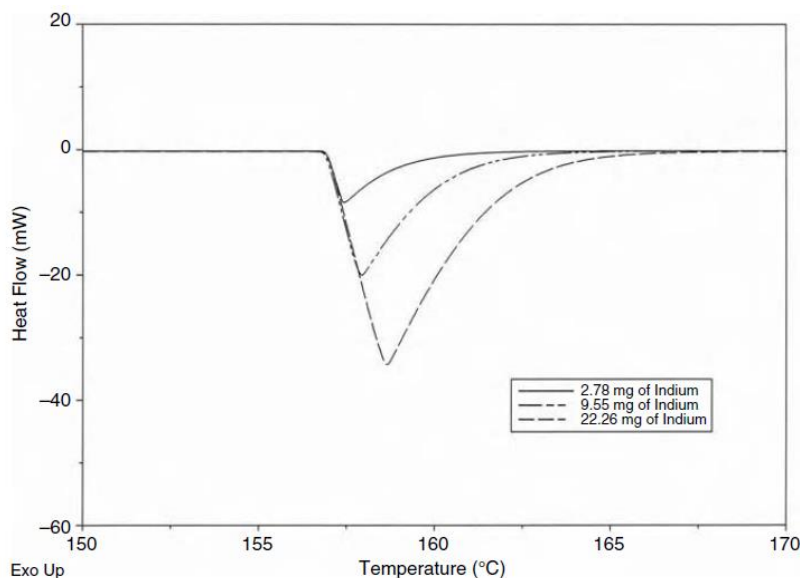
### 1.3.2.2.3. Tamaño de muestra.

A medida que la cantidad de masa incrementa, así también incrementa el tiempo necesario para que la muestra funda. Cuando una muestra funda la temperatura permanece constante. Esto puede ser observado como una discontinuidad en la señal de la temperatura de la muestra durante la transición de fusión. Cuando la masa de la muestra incrementa hay un incremento en el gradiente térmico dentro de la muestra, lo cual conlleva a una disminución de la pendiente en el borde entre la línea base y el pico de fusión (ver Figura 1-6). [4]



**Figura 1-6** Comparación de tres muestras de Indio variando la masa. Velocidad de calentamiento 10°C/min. Las curvas superiores corresponden al flujo de calor y las inferiores a la temperatura de la muestra ploteadas contra el tiempo.

La Figura 1-7 muestra los mismos datos de la Figura 1-6, pero en la Figura 1-7 los datos son ploteados contra la temperatura en sustitución del tiempo. Las tres muestras funden exactamente a la misma Temperatura Onset, pero el máximo del pico se mueve a una temperatura mayor a medida que la masa de la muestra incrementa.



**Figura 1-7** Comparación de tres muestras de Indio variando la masa. Velocidad de calentamiento 10°C/min.

En la Tabla 1-1 se muestra un resumen de los efectos de la masa de muestra sobre las transiciones.

**Tabla 1-1** Efecto del tamaño de muestra sobre las transiciones medidas en DSC.

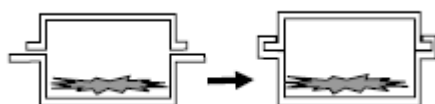
Tamaño de Muestra	Sensibilidad	Resolución	Temperatura Onset	Temperatura Máxima del Pico
<b>Aumenta</b>	Aumenta	Disminuye	Constante	Aumenta
<b>Disminuye</b>	Disminuye	Aumenta	Constante	Disminuye

#### 1.3.2.2.4. Crisol de muestra.

Existe una amplia gama de crisoles diseñados para cumplir necesidades específicas al igual que ciertas aplicaciones. Es importante determinar qué tipo de crisol se va a ocupar para una determinada muestra o aplicación. Está por demás decir que la calibración del equipo debe hacerse con el mismo tipo de crisoles a usar en los experimentos programados. Una vez colocados dentro del equipo el crisol con muestra y el de referencia, es importante proporcionarles un tiempo prudencial para que alcancen entre ellos el equilibrio térmico (señal estable de flujo de calor). Al DSC le va a costar más tiempo proporcionar el equilibrio térmico entre crisol de muestra y crisol de referencia a medida que la masa ya sea de la muestra o del crisol aumente.

Los crisoles disponibles para el DSC pueden ser clasificados en tres tipos: crisoles estándar, crisoles herméticos y crisoles de alta presión, siendo los más utilizados los crisoles estándar.

Los crisoles estándar son los más utilizados para muestras sólidas y polvos, y vienen en dos partes, cazuela y tapa (Figura 1-8). La cazuela es sellada presionando la tapa hacia la cazuela o plegando las orillas una sobre la otra con la ayuda de una prensa. Hay disponibles varios materiales de crisoles, siendo el más utilizado el de aluminio para aplicaciones farmacéuticas. Si la muestra reacciona con el aluminio se pueden utilizar crisoles de platino u oro. Los crisoles no son herméticos. Si por el proceso de sellado del crisol la muestra sufre transformación, entonces la tapa del crisol solamente debe colocarse sobre la cazuela y no ser sellado. Es importante el uso de la tapa ya que provee un buen flujo de calor hacia la parte superior de la muestra.



**Figura 1-8:** Crisol estándar (Cazuela y Tapa).

Después que el crisol es sellado hay que verificar que el fondo de la cazuela esté lo más plana posible, sino hay que frotarlo en una superficie plana para darle la forma plana deseada, todo con el fin de asegurar una buena transferencia de calor entre el DSC y el crisol. [4]

#### *1.3.2.2.5. Crisol de referencia*

El crisol de referencia debe ser del mismo material del que es usado para la muestra. Idealmente la masa del crisol de referencia debe estar lo más cercana a la masa del crisol de muestra más la muestra; esto disminuye la Caída Inicial de Línea Base observada al inicio de los termogramas. Para compensar la deficiencia de masa del crisol de referencia se pueden colocar una o dos tapas extras para alcanzar la masa total del crisol de muestra con la muestra.

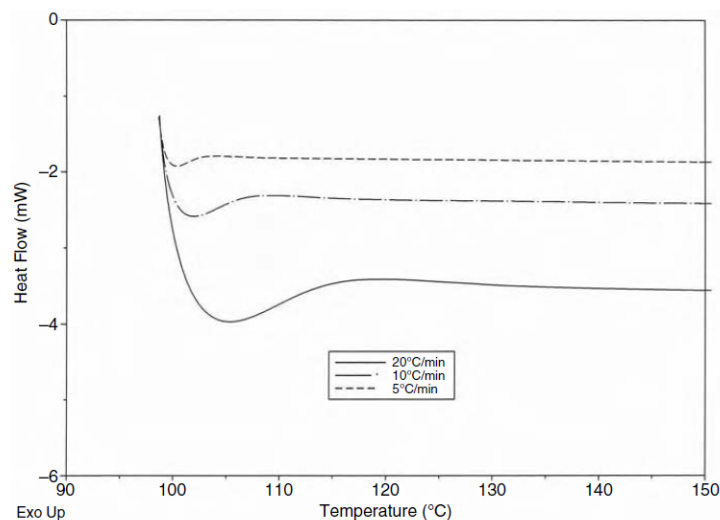
Una vez que los crisoles son sellados es difícil saber si contiene muestra o no, por lo tanto es recomendable hacer una pequeña marca de identificación en la tapa. Sería muy costoso descartar crisoles de referencia en buen estado solamente porque no se sabe que contienen.

El tipo específico de crisol utilizado para el diseño del DSC debe ser proporcionado por el proveedor. Es prudente investigar con el fabricante cuál es el tipo de crisol idóneo para una aplicación específica. [4]

### 1.3.2.3. Experimento

#### 1.3.2.3.1. Caída Inicial de Línea Base

La Figura 1-9 muestra los termogramas de tres experimentos a diferentes velocidades.

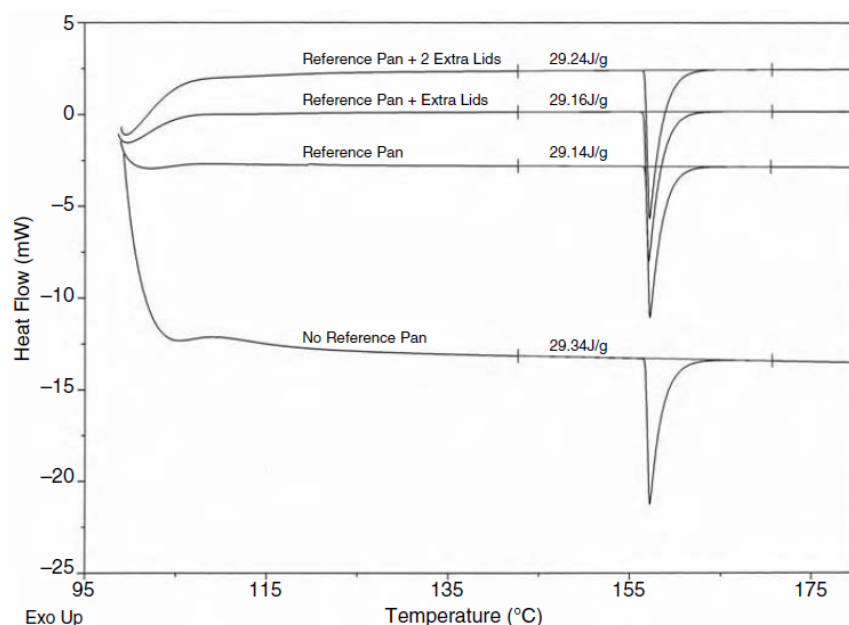


**Figura 1-9** Comparación del efecto de la velocidad de calentamiento sobre la caída inicial de línea base.

A medida que incrementa la velocidad de calentamiento también incrementa la caída inicial de la línea base y la señal de flujo de calor; debido a que al inicio de cada experimento la potencia es incrementada en el horno, de tal forma que caliente rápidamente y la velocidad de calentamiento aumenta al inicio del experimento hasta alcanzar la velocidad de calentamiento deseada. Esta transición puede ser descrita en la expresión siguiente:

$$\text{Flujo de Calor} = \text{Capacidad Calorífica} \cdot \text{Velocidad de Calentamiento.}$$

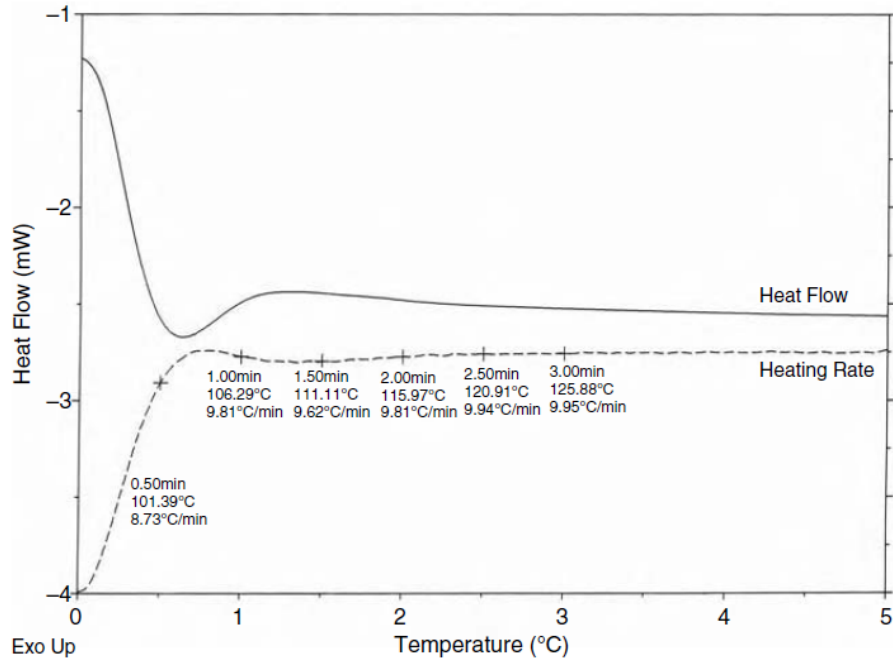
La magnitud de caída puede ser disminuida ajustando la masa entre los crisoles de muestra y referencia, tal como se muestra en la Figura 1-10:



**Figura 1-10** Comparación de varios termogramas de una droga utilizando varias configuraciones de crisol de referencia. Todas las corridas se efectuaron a 10°C/min y utilizando nitrógeno como gas de purga a 10 ml/min.

Nótese que la caída es minimizada cuando el crisol de referencia y muestra poseen masas similares, también se puede ver que la entalpía de fusión de esta sustancia permanece sin cambio significativo.

La Figura 1-11 muestra una expansión en la parte inicial del análisis efectuado a 10°C/min en donde la velocidad de calentamiento ha sido calculada de la derivada de la termocupla de muestra a intervalos de 30 segundos.

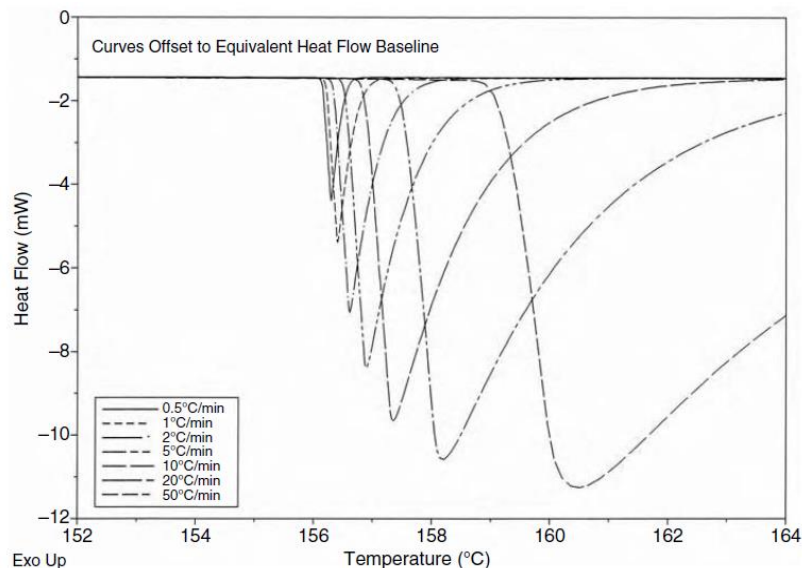


**Figura 1-11** Flujo de Calor y datos de derivada de temperatura para los primeros cinco minutos de un experimento DSC.

Para este sistema (específicamente: DSC, crisol de muestra, gas de purga, etc.) la velocidad de calentamiento y el flujo de calor se han estabilizado después de aproximadamente 2.5 min. En general este es un tiempo de estabilización aproximado para cualquier velocidad de calentamiento, es decir que es necesario iniciar el experimento abajo del primer fenómeno a estudiar por lo menos a 2.5 min del primer pico; por ejemplo si una sustancia funde a 55 °C y es utilizada una velocidad de calentamiento de 10°C/min, la máxima temperatura para comenzar el experimento es 30°C (55-[10 x 2.5]). [4]

### 1.3.2.3.2. Velocidad de Calentamiento

La Figura 1-12 muestra la fusión del Indio como una función de la velocidad de calentamiento.



**Figura 1-12** Efecto en la velocidad de calentamiento en experimentos DSC. Experimento realizado con 2,78 mg de Indio en un crisol de aluminio, y como gas de purga Nitrógeno a 25 mL/min.

Se pueden ver varios efectos al aumentar la velocidad de calentamiento:

- La Temperatura Offset de la línea base incrementa
- La altura, magnitud y ancho del pico de fusión incrementa
- La transición de fusión se observa a mayores temperaturas

Además se pueden efectuar las siguientes consideraciones, cuando la velocidad de calentamiento incrementa, también lo hace el ancho del pico, por lo tanto disminuye la resolución; no así la sensibilidad la cual incrementa y finalmente el tiempo del experimento disminuye. En la investigación farmacéutica es razonable comenzar con una velocidad de 10°C/min, y en donde las muestras tienen transiciones que son separadas por unos cuantos grados (por ejemplo polimorfismo) el criterio de resolución generalmente vence sobre el criterio de tiempo y sensibilidad, y en estos casos se utilizan velocidades de calentamiento bajas. [4]

#### *1.3.2.3.3. Manejo de datos*

Con la instrumentación computarizada de los DSC parámetros adicionales necesitan ser considerados. Los datos que son guardados en la computadora consisten en un conjunto de tiempo, temperatura y flujo de calor los cuales son enviados desde el microprocesador hasta el DSC. Los datos deben ser tratados matemáticamente y es de importancia entender el efecto que estos valores van a tener en los datos almacenados de flujo de calor.

Uno de estos parámetros de almacenamiento es La Velocidad de Muestreo de Datos, el cual con el fin de reducir el tamaño de los archivos, es una función del software que permite la selección del número de puntos de datos a ser recolectados a una velocidad de muestreo. A medida que el número de puntos colectados es menor en un experimento, cada transición térmica es descrita con un número menor de puntos; esto se refleja en una disminución de la entalpía de la señal debido a que se pierde cierta cantidad de área. En general utilizar menos de un punto por segundo afecta la integración del pico, así como también otras mediciones hechas sobre el pico. [4]



## 1.4. VALIDACIÓN

Considerando que el laboratorio de análisis es parte de un eslabón en la cadena productiva de medicamentos, la confiabilidad de los resultados es uno de los aspectos que debe ser abordado mediante lo que se conoce como validación. [15]

Se llama “validación” a la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un método de fabricación o control es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos. Por lo que, “Validar” es verificar documentalmente que un método o proceso hace lo que tienen que hacer. [16] [17]

La validación es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, además, permite un conocimiento profundo de las características de funcionamiento del método analítico. Este conocimiento y seguridad se traduce en una disminución del número de fallos y repeticiones de análisis, con el consiguiente ahorro de los costos asociados. También, la validación brinda una eficiencia para el cumplimiento de los plazos previstos de los análisis de los lotes que necesitan ser liberados en la producción. Por otra parte, los métodos analíticos deben validarse para cumplir con las exigencias legales de los organismos reguladores de productos, entre los cuales destacan los organismos reguladores de medicamentos. El FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés), el cual es un organismo regulador de medicamentos en Estados Unidos de América, requiere para el registro de nuevos productos que los métodos analíticos sean validados y debidamente documentados. La producción de medicamentos en El Salvador está legislada bajo el Reglamento Técnico Centroamericano sobre las Buenas Prácticas de Manufactura para la Industria Farmacéutica, en donde en el capítulo de control de calidad, establece que las metodologías analíticas deben estar validadas y documentadas. [7] [16]

[17]

### 1.4.1. DOCUMENTACION DE LA VALIDACIÓN

La documentación es una parte esencial de la validación ya que interviene en todo el proceso. La Figura 1-13 resume las fases de que consta una validación.

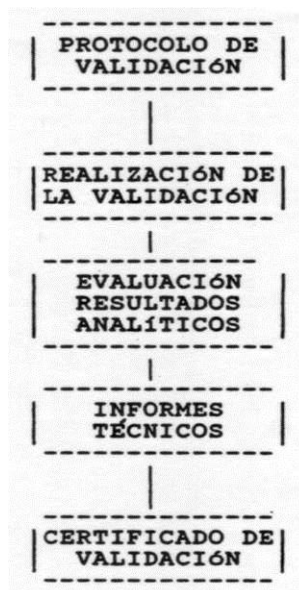


Figura 1-13 Esquema de las fases de una validación.

#### 1.4.1.1. Protocolo de validación

El primer paso es redactar el "Protocolo de Validación" que consiste en un plan experimental diseñado para que, cuando se ejecute, sea una prueba evidencial de que el sistema ha sido validado.

En el protocolo se ha de incluir una definición del sistema a validar e identificar los parámetros a validar, así como sus criterios de aceptación. Debe ser específico para cada producto y método y debe ir firmado y fechado por las personas responsables de la validación y de su aprobación. [16]

El esquema de un protocolo de validación incluye los aspectos siguientes:

- Objetivo  
Exposición clara de la finalidad de la validación y propuesta de fechas de inicio y final.
- Responsables  
Relación de las personas que llevarán a cabo la validación y de las que la aprobarán.
- Factores críticos

Es fundamental identificar los factores de mayor influencia sobre las características de funcionamiento del método analítico; por ejemplo, efecto de los excipientes en la valoración de principios activos, influencia de los procedimientos de fabricación, presencia de impurezas que pueden interferir, efecto de la temperatura, pH, tiempo de preparación de la muestra, etc.

- Parámetros a estudiar

Los parámetros a estudiar se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito.

- Muestras

El muestreo de lotes industriales se realizará de acuerdo con procedimientos escritos que indicarán también los sistemas de rotulación y tratamiento previo de las muestras.

Si se precisan placebos, existirán procedimientos escritos del método de preparación.

- Equipos

Se han de identificar los equipos a utilizar en el proceso de validación (pH-metros, balanzas, cromatógrafos, etc.), y comprobar que están convenientemente cualificados, incluyendo estos datos en el informe de validación.

- Métodos analíticos

Existirán métodos escritos provisionales describiendo el procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar, con indicación de reactivos, patrones, materiales, técnica y cálculos.

- Límites de aceptación

Se establecerán a priori para cada uno de los parámetros, basándose en las necesidades o finalidad del método y en la información recogida durante la fase de desarrollo del procedimiento analítico.

#### **1.4.1.2. Realización de la validación y evaluación de los resultados analíticos**

Todos los datos primarios deben ser perfectamente auditables en los diarios de laboratorio.

Una vez realizada la validación, se evaluarán los resultados obtenidos y si difieren de los esperados se añadirá un addendum al protocolo, explicando los cambios introducidos respecto al protocolo original y las razones que los justifican. [1] [2] [16]

### **1.4.1.3. Informes técnicos**

Los informes técnicos deberán incluir:

Referencias de la calibración y cualificación de los instrumentos utilizados y resultados de la verificación de los parámetros de idoneidad antes de iniciar el estudio de validación.

Métodos escritos definitivos descubriendo el procedimiento para la determinación de cada uno de los parámetros a evaluar.

Resultados de las determinaciones de cada parámetro incluyendo esquemas, copias originales de los espectros, cromatogramas, curvas de valoración, etc.

Discusión de los resultados y conclusiones. Se indicará la aceptación o no de la validación del método analítico. También se puede aceptar un método analítico con limitaciones para un tipo de muestras concreto.

### **1.4.1.4. Certificado de validación**

Por último, se extenderá un Certificado de Validación o documento formal de aprobación firmado por las personas responsables. Este certificado puede ser independiente, incluyendo un resumen del protocolo de validación y de los resultados obtenidos, o bien anexarse al final del informe. [1] [2] [16]

## **1.4.2. CRITERIOS FUNDAMENTALES DE VALIDACIÓN**

### **1.4.2.1. Características De Funcionamiento De Los Métodos Analíticos**

Las características de los métodos analíticos deben definirse y usarse experimentalmente de forma que cualquier analista pueda interpretarlos correctamente.

Sin embargo, existe una terminología tan abundante y tantas opiniones diferentes (incluso "filosofías analíticas" diferentes) que no resulta fácil para el analista decidir qué atributos debe utilizar. [16]

Las características de funcionamiento de un método analítico comprenden todos los datos y resultados experimentales que demuestran su aptitud para el uso al que se destina. Se consideran los siguientes grupos de características de funcionamiento:

- Características de fiabilidad. Son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.
- Características de practicabilidad. Son las que deciden si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica.
- Características de idoneidad. Son el conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en la validación del método.

#### *1.4.2.1.1. Fiabilidad*

Las características de fiabilidad comprenden los cinco criterios fundamentales de validación, no necesariamente aplicables en todos los casos y de los que derivan en la práctica todos los parámetros de validación. [16]

- Proporcionalidad entre concentración del analito y respuesta del instrumento. Este concepto se relaciona con los parámetros linealidad, intervalo o rango y también con la sensibilidad.
- Dispersión de una serie de resultados alrededor del valor medio o central, es decir, el " más-menos" de un procedimiento analítico. Este concepto se relaciona con los siguientes parámetros: precisión, repetibilidad, reproducibilidad y robustez.
- Diferencia entre el valor determinado en el análisis y el valor verdadero. Concepto relacionado con los parámetros exactitud y recuperación.
- Cantidad mínima de analito requerida para obtener un resultado significativo. Concepto relacionado con los parámetros sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación.
- Capacidad de un método para determinar el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación, excipientes u otras sustancias presentes en la muestra. Concepto relacionado con los parámetros selectividad y especificidad.

#### *1.4.2.1.2. Practicabilidad*

Los parámetros de practicabilidad se evalúan en la fase de desarrollo del método analítico: tiempo, coste, tamaño de la muestra, cualificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

Hay que tener en cuenta los objetivos del método analítico. Así, en un laboratorio de I+D es corriente utilizar métodos laboriosos que requieren un consumo elevado de tiempo, sin importar demasiado la rentabilidad global del procedimiento que, a lo mejor, se ha diseñado para obtener unos pocos resultados en relación a un estudio concreto. En cambio, en un Laboratorio de Control, el tiempo de preparación de la muestra y de utilización de aparatos, el tiempo global del análisis y, en general, los criterios de rentabilidad del personal y del equipo tienen una importancia primordial.

[16]

#### *1.4.2.1.3. Idoneidad*

Los parámetros de idoneidad no son de validación y deben considerarse dentro de las Buenas Prácticas del Laboratorio Analítico.

Normalmente el término idoneidad se aplica al conjunto de parámetros relacionados con la verificación del buen funcionamiento de los instrumentos analíticos. Así, en un método por cromatografía líquida o de gases serían: número de platos teóricos, factores de resolución, simetría, y capacidad, tiempo de retención relativo y coeficiente de variación del sistema. Las monografías de la USP que utilizan métodos cromatográficos cuantitativos, establecen los valores apropiados de estos parámetros para que el sistema instrumental sea considerado idóneo.

Un sistema analítico es idóneo si responde, en el momento de su utilización, a los requisitos fijados en la validación del método. Los instrumentos se cualifican, los métodos se validan y la idoneidad verifica el buen funcionamiento del sistema (instrumento y método) en el momento de su uso. [2]

### **1.4.3. SELECTIVIDAD - ESPECIFICIDAD**

En alguna literatura de validación los términos selectividad y especificidad se consideran equivalentes y se definen como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito, sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados o excipientes que puedan estar presentes en la matriz de la muestra. [1][2][16][17]

Algunos autores diferencian ambos términos y así consideran 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 ningún otro compuesto. [1][2][16][17]

En el análisis farmacéutico actual, la tendencia mayoritaria es la utilización de métodos relativamente selectivos (por ejemplo cromatografía líquida y de gases) en los que la presencia de otros componentes tienen escasa influencia en los resultados. No obstante, se pueden utilizar métodos poco específicos (por ejemplo potenciométricos o espectrofotométricos) si existen métodos complementarios que demuestren la ausencia de sustancias que puedan interferir. [1] [2] [16] [17]

La selectividad de un método analítico se determina comparando los resultados del análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes con los resultados del análisis de muestras que no contienen dichas sustancias. [1] [2] [16]

[17]

#### **1.4.3.1. Tipos de métodos analíticos y selectividad**

La selectividad es una condición esencial para conseguir una buena exactitud por lo que es, en todos los casos, un criterio clave. Los estudios de selectividad varían según el tipo de método analítico: [2]

Métodos de identificación: La selectividad debe demostrar que el método funciona en presencia de otras sustancias que pueden interferir y de las de composición similar.

Ensayos de pureza: La selectividad debe garantizar que el método analítico permite una evaluación de las impurezas que se pretenden analizar cualitativamente o cuantitativamente. Si, por ejemplo, se trata de determinar impurezas y sustancias extrañas por cromatografía en capa fina, hay que demostrar que el método es capaz de separarlas todas de acuerdo con los límites de detección y/o cuantificación establecidos.

Determinación cuantitativa de un componente: Cuando se determina la riqueza de una materia prima o el contenido en principio activo u otro componente (conservador, antioxidante) en un medicamento, el estudio de selectividad debe asegurar que la señal medida con el método analítico procede únicamente de la sustancia a analizar sin interferencias de excipientes, productos de degradación y/o impurezas.

Los requerimientos de selectividad pueden ser muy diferentes según sean los objetivos del método analítico y la fase de desarrollo del fármaco. Por ejemplo, en las fases iniciales de obtención de un producto nuevo de síntesis, es importantísimo determinar la estructura (análisis elemental, espectroscopía IR, RMN, masas, difracción de rayos X, etc.) para demostrar la "identificación"; en cambio, en un control rutinario de materia prima la "identificación" puede consistir en una

comparación con un patrón de referencia. Análogamente, el estudio de selectividad de un método UV puesto a punto para valorar el principio activo de unos comprimidos, será diferente si se aplica el método para determinar la velocidad de disolución o bien para hallar el contenido en principio activo; en este último caso se requerirá un estudio más completo que incluya la comparación con un método alternativo más específico que el método UV. [1] [2] [16] [17]

Para efectuar estudios de selectividad se precisa la máxima información sobre impurezas y productos de degradación; potencialmente presentes en la muestra, así como de interferencias debidas a excipientes u otros componentes. Conseguir esta información y disponer de estas sustancias puede suponer un ingente trabajo pluridepartamental entre los técnicos de Síntesis, Análisis y Galénica.

Resulta evidente, después de lo dicho, que la selectividad es un criterio complejo, difícil de validar y que las pautas generales para su determinación exigen una interpretación cautelosa por parte del técnico que deba adaptarlas a un método analítico particular. [1] [2] [16] [17]

#### **1.4.3.2. Selectividad en métodos analíticos de determinación cuantitativa de componentes**

Se supone que se han efectuado estudios previos y que se han definido las impurezas y productos de degradación (aunque no necesariamente se conoce su estructura).

Cabe distinguir dos casos perfectamente diferenciados: materias primas y formas farmacéuticas. [2]

##### *1.4.3.2.1. Materia prima*

- La determinación de la selectividad se obtiene comparando los resultados analíticos de un patrón de referencia (o de un patrón de trabajo preparado a partir de otro de referencia) con los de un Patrón cargado con todas las sustancias (impurezas y productos de degradación) que, potencialmente, puedan estar presentes como contaminantes. La concentración de contaminantes añadidos como carga no debe ser inferior a los límites establecidos para cada uno de ellos. Si dichos límites no se han estudiado suele añadirse un 1% de cada uno.



- Si no se dispone de productos de degradación se deberá efectuar ensayo para las impurezas, tal como se ha descrito anteriormente y otro especial para productos de degradación. En este ensayo se puede comparar un patrón con un lote de materia prima caducado o bien con el mismo patrón sometido a un proceso de degradación. Las condiciones del proceso de degradación deben estudiarse para cada materia prima; por lo general se incluyen luz, temperatura y humedad y en ocasiones pH extremos (ácidos, básicos) y acción de oxidantes y/o reductores. Se procura que la proporción de materia prima degradada no sobrepase el 10% del total.
- Cuando no se dispone de muestra de ciertos contaminantes o existen contaminantes de estructura desconocida, se debe utilizar además, algún método alternativo. Se analiza un patrón de referencia y una muestra de materia prima conteniendo impurezas y productos de degradación, (puede tratarse de una materia prima degradada o de un lote caducado) por el método en cuestión y por un método alternativo. El grado de coincidencia de los resultados demostrará la selectividad.
- El método alternativo debe ser indicativo de estabilidad, es decir, con una capacidad alta de proporcionar información sobre la pureza de la muestra. Por ejemplo, métodos cromatográficos (capa fina, gases, líquido) o termométricos (análisis térmico y calorimetría diferencial). Si el método analítico a validar es cromatográfico, el método alternativo puede ser una cromatografía en condiciones diferentes.
- En cualquier caso, se recomienda que por lo menos uno de los dos métodos sea cromatográfico y que exista la posibilidad de comprobar la pureza de los componentes del cromatograma: cromatografía de gases-espectrometría de masas, cromatografía líquida con detector de diodos, recolección y análisis de las fracciones que eluyen del sistema cromatográfico, elución y análisis de las manchas de una placa de cromatografía en capa fina, etc.

- Cuando un estudio de selectividad demuestra interferencia de alguna sustancia presente en la muestra no significa, necesariamente, que el método analítico deba rechazarse por falta de especificidad. Se podrá utilizar siempre que en el método de control de rutina de la materia prima se incluya, además del procedimiento de determinación cuantitativa, el procedimiento alternativo complementario que demuestre que aquellas sustancias están ausentes, o bien que se hallan en concentraciones inferiores a las que pueden producir una interferencia significativa en el resultado.

#### 1.4.3.2.2. *Forma farmacéutica*

El estudio de selectividad debe demostrar que las impurezas y especialmente, los productos de degradación no interfieren en los resultados. Hay que comprobar, además que la presencia de excipientes y/u otros principios activos y las posibles interacciones medicamento-envase primario no tienen efectos relevantes sobre la determinación del principio activo. [1] [2] [16] [17]

Las posibilidades analíticas en un estudio de selectividad de una forma farmacéutica son diferentes:

- Preparación de un placebo reciente conteniendo todos los ingredientes de una muestra normal excepto el analito y determinación del mismo en las condiciones del método. De forma ideal ninguno de los componentes debería dar una respuesta cuantificable.
- Preparación de un placebo degradado y análisis del mismo.
- Adición de patrón de analito al placebo reciente y comparación de la respuesta con la de un patrón puro de analito. Los resultados deben ser concordantes. En métodos cromatográficos (HPLC, CG) la resolución entre el pico del analito y los debidos a las interferencias debe ser, en general, superior a 1.0.
- Adición de un patrón de analito cargado con impurezas y productos de degradación al placebo reciente y comparación con la respuesta de un patrón puro de analito, utilizando además, un método alternativo apropiado para ensayo de estabilidad.

- Degradación de una muestra de medicamento (o del placebo reciente más analito) acondicionada en su envase definitivo y comparación con la respuesta de un patrón puro de analito. El medicamento degradado se obtiene a partir de muestras procedentes de los estudios de estabilidad acelerada a diferentes condiciones ambientales. Si se trata de una validación retrospectiva pueden utilizarse muestras de medicamentos en el límite de su fecha de validez.

En la práctica habitual en la demostración de la selectividad se utiliza placebo reciente (primer caso), placebo reciente cargado con analito (tercer caso) y uno de los dos métodos (cuarto o quinto caso, placebo reciente cargado con analito degradado o bien muestra de medicamento degradado o caducado). Los datos del estudio de placebo degradado (segundo caso) suelen obtenerse implícitamente del estudio (quinto caso). [1] [2] [16] [17]

Igual que ocurre con las materias primas, hay que destacar la importancia de los sistemas de comprobación de pureza de los picos en métodos de cromatografía líquida.

#### **1.4.4. LINEALIDAD**

Dentro de este término se incluye la proporcionalidad entre cantidad o concentración de analito y respuesta, así como el intervalo o rango de concentraciones de analito para los cuales el método es satisfactorio. La linealidad se relaciona, además, con la sensibilidad de calibrado o cociente diferencial entre la señal medida y la concentración de analito.

Se entiende como linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado. [1] [2]

[16] [17]

#### 1.4.4.1. Determinación de la proporcionalidad y de la linealidad

El ensayo de linealidad puede efectuarse tanto sobre cantidades o soluciones patrón del analito, como sobre muestras problema que contengan cantidades o concentraciones crecientes de analito, efectuándose posteriormente el tratamiento matemático de los resultados analíticos. Normalmente estos cálculos se efectúan con programas de ordenador. [1] [2] [16] [17]

Las fases de este ensayo son las siguientes:

- En primer lugar, conviene cerciorarse de que el intervalo lineal dinámico del sistema instrumental sea más amplio que el intervalo de concentraciones a estudiar. Para ello puede efectuarse un tanteo previo con unos cuantos patrones que abarquen un rango de concentraciones más amplio que el intervalo de concentraciones a establecer (por ejemplo 10 - 200 % del valor declarado). Si la sensibilidad del sistema instrumental se mantiene constante se puede continuar con el estudio completo de linealidad. Si la sensibilidad es variable, es recomendable efectuar el estudio de linealidad a dos niveles de concentración.
- Preparar una serie de patrones de analito de cantidades o concentraciones crecientes. El número de patrones puede estar comprendido entre 3 y 10 y el intervalo de cantidades o concentraciones se selecciona de acuerdo con las cantidades esperadas de analito en la muestra. Así, por ejemplo:
  - Valoración de una materia prima. Analizar 3-5 patrones a un intervalo de cantidades o concentraciones del 80-120% de la teórica.
  - Valoración de un principio activo en un producto terminado. Analizar 5-7 soluciones patrón con un intervalo de concentraciones del 50 - 150 % de la teórica.
  - Si se supone que la cantidad o concentración del analito puede variar ampliamente (ensayos de impurezas o productos de descomposición, determinación de un analito en fluidos biológicos, etc.) los patrones deberán abarcar todo el intervalo de concentraciones previsto (por ejemplo: 10-100 ppm para una impureza; 10 % - 200 % de la concentración promedio del analito en fluidos biológicos).
- Efectuar el análisis siguiendo exactamente el procedimiento descrito. Cada análisis se efectuará como mínimo por duplicado. En procedimientos cromatográficos se recomienda efectuar las inyecciones por triplicado, a no ser que se utilice un procedimiento con patrón interno.

- Determinar la línea de calibración que relaciona respuesta (áreas, alturas, absorbancias, etc.) con cantidad o concentración de analito. Generalmente se halla la recta de regresión por el método de ajuste de los " mínimos cuadrados". En algunos casos se necesita alguna transformación matemática previa (logaritmos, recíprocos) para obtener funciones de calibrado lineales.

La recta de calibración es del tipo:

$$y = a + bx \quad (1-17)$$

siendo  $x$  la cantidad o concentración,  $y$  la respuesta,  $b$  el valor de la pendiente y  $a$  el valor de la ordenada en el origen

- Tratamiento estadístico de los datos analíticos, a fin de evaluar la linealidad y la proporcionalidad.

#### **1.4.4.2. Representación gráfica de la recta de regresión**

Se puede efectuar en papel milimetrado o, preferiblemente, mediante un programa gráfico de ordenador. Conviene representar también los valores experimentales de  $y$ . Una gráfica realizada de esta forma da una idea inmediata de la relación entre las dos variables  $x$ ,  $y$ : [1][2][16][17]

- Si la recta no pasa por el origen de coordenadas el método a evaluar está afectado por un error sistemático (sesgo) por defecto o por exceso.
- Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta, significa que la linealidad no es muy buena o que el error experimental es importante y los límites de confianza serán amplios.

### 1.4.4.3. Interpretación estadística de la regresión lineal

La representación anterior suele ser suficiente. Sin embargo, conviene efectuar una interpretación estadística de la regresión [1] [2] [16] [17]

#### 1.4.4.3.1. Coeficiente de Correlación $r$

El coeficiente de correlación refleja el grado de relación entre las variables  $x$  (cantidad o concentración),  $y$  (respuesta). Su valor máximo es 1. Si  $r$  es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Existen tablas de  $r$  que dan el grado de significación del valor obtenido para el coeficiente de correlación.

Fórmula para hallar  $r$  :

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad (1-18)$$

En análisis químico se obtienen valores de  $r$  elevados, iguales o superiores a 0,999, si bien en análisis de trazas se aceptan valores más bajos (iguales o superiores a 0,990). Valores muy elevados de  $r$  no deben tomarse erróneamente como indicadores de linealidad.

El cuadrado del coeficiente de correlación se denomina coeficiente de determinación e indica la proporción de la varianza total de  $y$  que es explicada por el modelo lineal de regresión.

La linealidad se demuestra estadísticamente por otros procedimientos que se describen a continuación.

#### 1.4.4.3.2. Test de linealidad

Existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

- Coeficiente de variación de los factores de respuesta ( $F$ )  
El factor de respuesta es la relación entre la lectura y la cantidad o concentración. Para una cantidad o concentración determinada, el factor de respuesta puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado a esta cantidad o concentración. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente; por este motivo se puede tomar el coeficiente de variación de los factores de respuesta como una expresión de la linealidad. Se considera que coeficientes de variación superiores al 5% indican falta de linealidad. En la mayor parte de los casos se trata de una curva sigmoidea (en forma de ese) sobre la cual deberá determinarse la zona de linealidad.
  
- Análisis de la varianza de la regresión.  
Este método es más riguroso desde el punto de vista matemático, pero sólo puede aplicarse si existen réplicas para cada concentración. El valor de  $F_{exp}$  es la relación entre la varianza de curvatura o no linealidad (debida a la falta de ajuste entre la recta de regresión y los datos experimentales) y la varianza dentro de las series (debido al error experimental dentro de las series). Si  $F_{exp} < F$  tablas para un grado de significación determinado (generalmente  $P = 0,050$  ó  $0,01$ ) implica que la linealidad es correcta.
  
- Significación Estadística de la Desviación Estándar de la Pendiente  $b$  (Test de Proporcionalidad)  
A la pendiente  $b$  se le llama también coeficiente de regresión. A mayor pendiente, mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito).
  - La Desviación Estándar de la Pendiente  $s_b$  se utiliza como expresión matemática de la linealidad: a menor Desviación Estándar mejor linealidad. Se determina con una de las fórmulas siguientes:

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (1-19)$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum x^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}} \quad (1-20)$$

Siendo  $s_{y/x}$  la Desviación Estándar de los Residuos de  $y$  (También conocido como: Desviación Estándar del Error Experimental, Error Típico Experimental, Error Aleatorio de la Ordena o Desviación Estándar de la Regresión) debida a la variación dentro de las series más la variación debida a la falta de ajuste entre la recta de regresión y los datos experimentales.

El valor de  $s_{y/x}$  se obtiene por diferentes fórmulas:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (1-21)$$

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - a \sum y_i - b \sum x_i y_i}{n-2}} \quad (1-22)$$

- Para expresar la linealidad también se utiliza la desviación estándar relativa  $DER(b)$ :

$$DER(b) = \frac{s_b}{b} 100 \quad (1-23)$$

- Los **Límites de Confianza** de la Pendiente  $LC(b)$  se hallan a partir de la expresión:



$$LC(b) = b \pm ts_b \quad (1-24)$$

siendo  $t$  el valor de la distribución de Student para  $\nu = (n - 2)$  grados de libertad a la probabilidad escogida.

- Otro test estadístico de importancia es el Contraste de Significación de la Pendiente  $t_{\text{exp}}(b)$ :

$$t_{\text{exp}}(b) = \frac{|b|}{s_b} \quad (1-25)$$

En la tabla de  $t_{\alpha, \nu}$  de Student se halla el grado de significación para  $\nu = (n - 2)$  grados de libertad a la probabilidad escogida, en donde la Hipótesis Nula es  $H_0 : b = 0$

- Significación Estadística de la Desviación Estándar de la Ordenada en el Origen  $a$  (Test de Error Sistemático)

El valor de  $a$ , ordenada en el origen (También conocido como: intercepción con el eje de ordenadas), indica el error sistemático del método. En el caso ideal debe ser cero.

- La Desviación Estándar de la Ordenada en el Origen  $s_a$  se obtiene por las fórmulas:

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1-26)$$

$$s_a = s_b \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n}} \quad (1-27)$$

- La desviación estándar relativa de la Ordenada en el Origen  $DER(a)$  es igual a:

$$DER(a) = \frac{s_a}{a} 100 \quad (1-28)$$

- Los límites de confianza de la Ordenada en el Origen  $LC(a)$  se hallan a partir de la expresión:

$$LC(a) = a \pm t s_a \quad (1-29)$$

siendo  $t$  el valor de la distribución de Student para  $\nu = (n - 2)$  grados de libertad a la probabilidad escogida.

Si estos límites incluyen el cero, se cumple la condición de falta de error sistemático.

- La significación estadística de la Ordenada en el Origen  $t_{\text{exp}}(a)$  se puede deducir también de la expresión:

$$t_{\text{exp}}(a) = \frac{|a|}{s_a} \quad (1-30)$$

En la tabla de  $t_{\alpha, \nu}$  de Student se halla el grado de significación para  $\nu = (n - 2)$  grados de libertad a la probabilidad escogida, en donde la Hipótesis nula es  $H_0 : a = 0$

#### 1.4.4.4. Comparación de pendientes y términos independientes

Cuando se dispone de dos rectas de calibración surge la necesidad de demostrar que son estadísticamente idénticas. Dos rectas de calibración efectuadas con el mismo procedimiento analítico, con series de concentraciones similares, no deben diferir significativamente en los valores de **a** y **b**. [1] [2] [16] [17]

Existen varias pruebas estadísticas para la comparación de dos pendientes y de dos términos independientes

Si una recta es  $y = a + bx$  y la otra es  $y = a' + b'x$  los valores **a'** y **b'** son aceptables si están comprendidos respectivamente dentro de los límites de confianza de **a** ( $a \pm ts_a$ ) y **b** ( $b \pm ts_b$ ).

#### **1.4.5. SENSIBILIDAD, LIMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.**

Estos parámetros se relacionan con la cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo.

La sensibilidad es la capacidad de un método analítico de registrar ligeras variaciones de la concentración.

Debe distinguirse entre sensibilidad de calibrado y sensibilidad analítica.

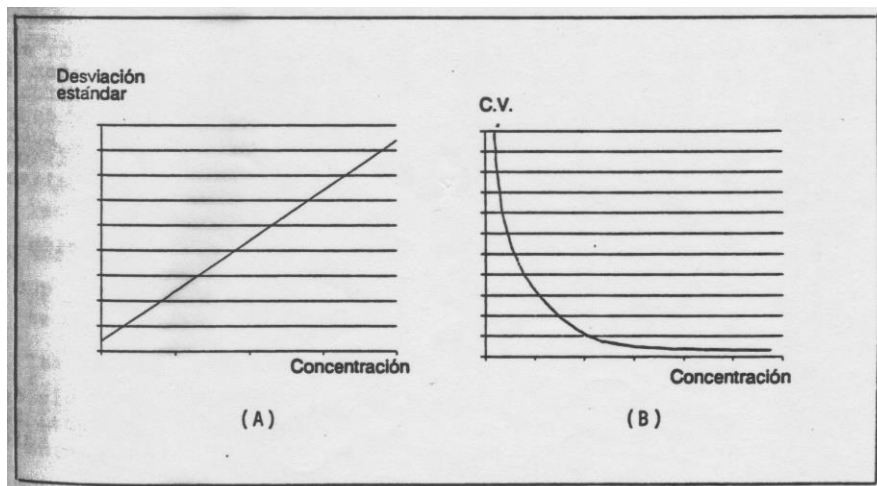
La **sensibilidad de calibrado** es igual a la pendiente de la recta de calibración, es decir, la señal o respuesta por unidad de concentración o cantidad.

La **sensibilidad analítica** es la sensibilidad de calibrado dividida por la desviación estándar de la respuesta.

Dos técnicas pueden tener la misma sensibilidad de calibrado pero la sensibilidad analítica será mayor en la más precisa.

Mientras que la sensibilidad de calibrado es constante dentro de un intervalo determinado, la sensibilidad analítica varía con la concentración del analito, puesto que la precisión cambia con la cantidad de analito presente en la muestra. [1] [2] [16] [17]

Si la precisión del método se expresa como desviación estándar, se observa generalmente un incremento lineal de ésta al aumentar la concentración. Si, en cambio, se expresa como CV se observa una disminución no lineal al aumentar la concentración (Figura 1-14). A concentraciones muy bajas el CV es muy elevado y los resultados son inciertos.



**Figura 1-14** (A) Relación entre Desviación Estándar y Concentración. (B) Relación entre Coeficiente de Variación y Concentración.

#### 1.4.5.1. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

En términos generales, el límite de detección de un analito  $LOD$  se puede describir como aquella cantidad o concentración que proporciona una señal  $y$  en el instrumento, la cual es significativamente diferente de la señal del “Blanco” o “Ruido de Fondo”. Aún no existe un acuerdo total entre investigadores, editores y asociaciones profesionales y estatutarias sobre la frase “significativamente diferente”. Sin embargo, va en aumento en definir el límite de detección como la cantidad o concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco  $y_{bl}$ , más tres veces la desviación estándar del blanco  $s_{bl}$ .

$$LOD: y_{LOD} \approx y_{bl} + 3s_{bl} \quad (1-31)$$

El límite de detección, según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), es la menor concentración  $C_L$  o cantidad  $Q_L$  de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado. Es decir, es la cantidad o concentración mínima de analito a partir de la cual es factible realizar el análisis.

Según USP, el límite de detección es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas. [1] [2] [16] [17]

Un resultado "positivo" no es suficiente para que el analista considere detectado un analito. Se precisa, además, conocer el límite de detección en las condiciones del método. De lo contrario se puede incurrir en un falso positivo: suponer el analito presente en la muestra cuando de hecho no lo está.

El límite de detección es un parámetro analítico de gran interés en ensayos límite, análisis de trazas, contaminantes y productos de degradación. Los términos cualitativos del tipo "ausencia de..." o "resultado negativo" tienen su expresión numérica en el límite de detección. Es más correcto decir "menos de 1 ppm de ..." que "ausencia de..." [1] [2] [16] [17]

El **límite de cuantificación o determinación** *LOQ* es, según la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés), la menor concentración ( $C_L$ ) o cantidad ( $Q_L$ ) de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible) mientras que el límite de detección es cualitativo (menor cantidad detectable). Numéricamente es mayor el límite de cuantificación y representa la menor cantidad de analito que puede analizarse con un CV aceptable. Concentraciones menores pueden detectarse pero no cuantificarse.

La determinación de los límites de detección y cuantificación es laboriosa, por lo que sólo se efectúa cuando el nivel inferior de rango del método analítico se acerca a los límites de detección o cuantificación, como es el caso de impurezas y productos de degradación. Si las concentraciones a determinar son elevadas, se puede sustituir su estudio por la determinación de la precisión y la exactitud a la concentración más baja que presenta el analito en la práctica. [1] [2] [16] [17]

#### *1.4.5.1.1. Determinación de los límites de detección y cuantificación*

- Relación Señal/Ruido

Se compara la respuesta del blanco de la muestra (matriz de la muestra conteniendo todos los ingredientes excepto el analito a estudiar) con la respuesta de muestras preparadas por la adición de pequeñas cantidades de analito al blanco.

Para ello en primer lugar, se obtiene el nivel medio de ruido del blanco, y se multiplica por 3 para el límite de detección o por 6 ó 10 para el límite de cuantificación; estos valores se comparan con las respuestas de la serie de blancos con analito, hallándose finalmente la concentración de analito que corresponde al valor de la señal.

– Estudio de la menor cantidad detectable

El límite de detección se determina mediante el análisis de muestras con cantidades o concentraciones conocidas de analito y estableciendo el nivel mínimo en el que éste puede detectarse fiablemente.

Este método se emplea, por ejemplo, en cromatografía en capa fina para hallar el límite de detección de las impurezas y/o productos de degradación en una materia prima. Primero se determina experimentalmente la máxima cantidad de materia prima (carga máxima) que se separa correctamente en las condiciones cromatográficas establecidas (sin "colas", ni distorsión en la mancha). Después se halla experimentalmente la menor cantidad de impureza o producto de degradación que puede detectarse fiablemente sin interferencia de la mancha principal. Para ello se preparan una serie de soluciones conteniendo una cantidad constante de materia prima, del orden de la carga máxima, y cantidades decrecientes del analito que se desea estudiar. El límite de detección se calculará a partir de la dilución en que no se pueda distinguir la respuesta del analito de la del blanco.

El resultado se expresa en valor absoluto o bien en forma de porcentaje respecto a la "carga máxima" de materia prima. Este último sistema es el utilizado habitualmente por las Farmacopeas en los ensayos de pureza por cromatografía en capa fina.

– Estimación del límite de detección mediante la utilización de parámetros de la línea de calibración.

Si la recta de calibración del ensayo de linealidad  $y = a + bx$  se ha confeccionado con un rango de concentraciones bajo, se admite utilizar la ordenada en el origen  $a$  para estimar,

aproximadamente, el límite de detección. El límite inferior de la respuesta se toma como  $3|a|$  y el límite de detección expresado en las mismas unidades que las abscisas en la recta de calibración, es  $\frac{3|a|}{b}$ .

Además de la estimación anterior está la siguiente:

Una suposición básica del método de los mínimos cuadrados no ponderados es que cada punto en la representación gráfica (incluido el punto que representa al blanco o fondo) tiene una variación distribuida normalmente (sólo en dirección de  $y$ ) con una desviación estándar estimada por  $s_{y/x}$ .

Es, por tanto, adecuado utilizar  $s_{y/x}$  en lugar de  $s_{bl}$  en la estimación de los límites de detección y cuantificación. Es, por supuesto, posible realizar el experimento del blanco varias veces y obtener un valor independiente para  $s_{bl}$ , y si son correctos los supuestos mencionados, los dos métodos para estimar  $s_{bl}$  no diferirán significativamente. Sin embargo, las determinaciones múltiples del blanco consumen mucho tiempo, y el uso de  $s_{y/x}$  es muy adecuado en la práctica. El valor de  $a$ , la ordenada en el origen calculada, se puede utilizar como una estimación de  $y_{bl}$ , en donde se tiene el supuesto que esta apreciación debería ser una medida más exacta de  $y_{bl}$  que la simple determinación de la medida del blanco.

Por lo tanto:

$$LOD: y_{LOD} \approx a + 3s_{y/x} \quad (1-32)$$

$$LOQ: y_{LOQ} \equiv a + Ks_{y/x} \quad (1-33)$$

- Análisis repetido del blanco de la muestra

Se analizan una serie de blancos de la muestra ( $n \geq 10$ ) y se calcula la media  $y_{bl}$  y la desviación estándar  $s_{bl}$  de las respuestas obtenidas. A partir de estos valores, existen

diferentes expresiones en las que intervienen la sensibilidad (pendiente de la recta de calibración) y que dan una estimación de los límites de detección y cuantificación expresados en unidades de concentración.

Las fórmulas a utilizar varían en función de:

- a) El procedimiento: métodos con corrección de lectura frente al blanco o métodos sin corrección
- b) El grado de ajuste de la recta de calibración: si el ajuste es defectuoso intervienen las desviaciones estándar de la pendiente  $s_b$  y de la ordenada en el origen  $s_a$
- c) Del número de réplicas que se efectúan al analizar la muestra problema: **medición única** o  $n$  mediciones.

- Existe corrección de la lectura frente al blanco.

Este es el caso de muchos procedimientos espectroscópicos (espectrofotometría UV/VIS, espectrofluorimetría) en los que la lectura del problema se obtiene por comparación con un blanco.

$$L = \frac{K \times s_{bl}}{b} \quad (1-34)$$

$L$  : Límite de detección o cuantificación

$K$  : Constante  $\geq 3$ . (Usualmente  $K = 3$  para límite de detección y  $K : 6-10$  para límite de cuantificación).

$s_{bl}$  : Desviación estándar de la respuesta de los  $n$  blancos

$b$  : Pendiente de la recta de calibración

- No existe corrección de la lectura frente al blanco. Este es el caso de los procedimientos cromatográficos (GC, HPLC).

Se aplica la fórmula siguiente:



$$L = \frac{K \times s_{bl} + \bar{y}_{bl}}{b} \quad (1-35)$$

$L, K, s_{bl}, b$  : Igual que en fórmula anterior

$\bar{y}_{bl}$  : Media de la respuesta de los  $n$  blancos

Las dos fórmulas anteriores sólo son válidas si la mayor fuente de error es la desviación estándar del blanco, es decir si  $s_{bl} \gg s_a$  y  $s_b$

- Cuando los test de linealidad y proporcionalidad de la recta de calibración revelan falta de ajuste hay que sustituir la desviación estándar del blanco  $s_{bl}$  en las dos fórmulas anteriores por la siguiente expresión:

$$\sqrt{s_{bl}^2 + s_a^2 + \left(\frac{a}{b}\right)^2 s_b^2} \quad (1-36)$$

Esta expresión tiene en cuenta los errores por falta de linealidad y la existencia de sesgo.

Quando el ajuste de la recta es muy defectuoso, la estimación obtenida aún con esta fórmula será poco fiable; al no presentar ninguna ventaja, es preferible en este caso determinar los límites de detección y/o cuantificación por un método que suponga menos trabajo experimental (relación señal-ruido u otro).

- Si en el método analítico se efectúa la medición final por duplicado o triplicado, disminuye la incertidumbre de la medición y mejora la precisión. Por este motivo el límite de detección es menor y se introduce el factor  $\frac{1}{\sqrt{n}}$  en las fórmulas dos primeras formulas:

$$L = \frac{K \times s_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (1-37)$$

$$L = \frac{K \times s_{bl} + \bar{y}_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (1-38)$$

- Determinación por extrapolación a concentración cero de muestras conteniendo bajas concentraciones de analito.

Los límites de detección y cuantificación pueden estimarse también por extrapolación a partir del análisis de muestras conteniendo concentraciones bajas, menos de 50 L de analito.

Se efectúa una serie de lecturas de (k) niveles de baja cantidad o concentración con (n) repeticiones. Con la respuesta de todas la repeticiones se determina la respuesta promedio y su desviación estándar para cada nivel.

Luego se calcula la ecuación de línea de calibración de “respuesta promedio” versus “cantidad o concentración”, y de la extrapolación de la “respuesta promedio” a concentración cero se estimará el valor como  $\bar{y}_{bl}$ .

A continuación, se calcula la ecuación de la “desviación estándar de respuesta” versus “cantidad o concentración” y de la extrapolación de “desviación estándar de respuesta” a concentración cero se estimará el valor como  $s_{bl}$ .

Conociendo  $\bar{y}_{bl}$  y  $s_{bl}$  se aplicarán las mismas fórmulas descritas anteriormente.

#### 1.4.6. PRECISION (REPETIBILIDAD, REPRODUCIBILIDAD)

Es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos analíticos efectuados sobre una muestra homogénea o, expresado de otra forma, la distribución de los valores analíticos alrededor de su media. [1] [2] [16] [17]

La precisión indica el "más-menos" o grado de reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de trabajo, es decir la capacidad del método para dar resultados semejantes cuando se aplica repetidamente a una muestra. [1] [2] [16] [17]

La idea de precisión, en general, viene expresada por la media para el valor central y la desviación estándar para la dispersión de los resultados. [1] [2] [16] [17]

Un estudio de precisión requiere la repetición del análisis sobre una muestra. La precisión así obtenida se denomina "del método", puesto que incluye todo el procedimiento analítico, desde la preparación de la muestra hasta la lectura instrumental. También se puede determinar directamente la precisión del "sistema instrumental", hallando la variabilidad de respuesta de una solución patrón.

[1] [2] [16] [17]

Dentro del término precisión del método se pueden distinguir tres tipos de estudios:

- **Repetibilidad:** es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente, en un corto intervalo de tiempo.
- **Reproducibilidad:** es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.). Cuando, además, los laboratorios son distintos se habla de precisión interlaboratorios.

El término "Reproducibilidad" es utilizado generalmente para referirse a la variación entre laboratorios diferentes, dejando el término "Precisión Intermedia" para referirse a la variación dentro de un mismo laboratorio.

- **Robustez:** el estudio de robustez evalúa los efectos de pequeños cambios en las condiciones operacionales del análisis sobre la fiabilidad del método analítico.

Aunque en sentido estricto no pueden considerarse equivalentes, la distinción entre reproducibilidad y robustez no deja de ser sutil ya que, al fin y al cabo, la robustez es el grado de reproducibilidad de un método analítico sometido deliberadamente a pequeñas variaciones en el "modus operandi" con objeto de conocer su estabilidad frente a ellas y definir las de mayor influencia sobre la variabilidad de los resultados.

### 1.4.6.1. Expresión de la precisión de un método analítico

#### 1.4.6.1.1. Desviación estándar y coeficiente de variación

La precisión se expresa matemáticamente por la desviación estándar  $s$  o, preferiblemente, por el *coeficiente de variación CV* (desviación estándar relativa *DER*). El valor aceptable de precisión de un método depende de la concentración del analito y del número de repeticiones del análisis. Existen tablas que establecen el *CV* máximo aceptable de un método analítico en función de los límites de aceptación del resultado y del número de réplicas. (Ver ejemplo en Tabla 1-2)

**Tabla 1-2** CV máximo aceptable según el número de réplicas en determinados intervalos de aceptación.

Intervalo de Aceptación (%)	CV (%) Máximo Aceptable				
	$n = 1$	$n = 2$	$n = 3$	$n = 4$	$n = 5$
95 – 105	1,9	2,7	3,3	3,8	4,2
90 – 110	3,9	5,5	6,7	7,8	8,7
85 – 115	5,8	8,2	11,6	11,6	12,9
99 – 101	0,39	0,55	0,67	0,78	0,87
95,5 – 101,5	0,58	0,82	1,00	1,16	1,30
98,0 – 102,0	,077	1,09	1,33	1,54	1,72

Así por ejemplo, si el intervalo de aceptación es 90-110%, el *CV* máximo del método debe ser inferior al 3,9% para una única determinación. Si el *CV* es más alto pero es inferior a 5,5%, convendrá efectuar el ensayo por duplicado ( $n=2$ ).

Por lo que se refiere a la precisión del sistema instrumental (más pequeña que la del método) suelen aceptarse coeficientes de variación inferiores al 1-2%.

La relación entre  $CV_{\text{método}}$  y  $CV_{\text{sistema}}$  es aproximadamente la siguiente:

$$CV_{\text{método}} = CV_{\text{sistema}} \sqrt{2}$$

Y basada en el principio de la aditividad de varianzas:

$$(CV_{\text{método}})^2 = (CV_{\text{sistema}})^2 + (CV_{\text{otros}})^2$$

#### 1.4.6.1.2. Límites de confianza

Se pueden expresar de diferentes maneras:

- De los resultados individuales
  - Media más-menos la desviación estándar:  $\bar{x} \pm s$
  - Media más-menos dos veces la desviación estándar:  $\bar{x} \pm 2s$
  - Media más-menos la desviación estándar multiplicada por la  $t_{\alpha, \nu}$  de Student:

$$LC(x) = \bar{x} \pm ts \quad (1-39)$$

Estadísticamente ésta es la expresión más correcta ya que tiene en cuenta la distribución de Student cuando el número de réplicas es inferior a 30. El valor de  $t_{\alpha, \nu}$  se halla en las tablas de Student para  $\nu = (n - 1)$  grados de libertad y una significación, generalmente del 5%.

- De los resultados promedio

Los límites de confianza de la media de una serie de resultados son:

$$LC(\bar{x}) = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (1-40)$$

#### 1.4.6.2. Determinación de la repetibilidad

El ensayo de repetibilidad del método se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analizan independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo analista y el mismo instrumento. El número de repeticiones del análisis debería ser superior a 5 y la concentración del analito en la muestra problema suele ser similar a la nominal o declarada. [2]

Puede ser necesario utilizar dos concentraciones del analito (alta y baja) o más (alta, media, baja), cada uno con sus replicados, cuando:

- La proporción de analito en la muestra puede oscilar notablemente (rango amplio).

- El intervalo lineal del sistema instrumental es pequeño.

En análisis de producto terminado suelen darse como buenos, coeficientes de variación inferiores al 2-3% en el ensayo de repetibilidad.

#### **1.4.6.3. Determinación de la reproducibilidad**

Un ensayo de reproducibilidad debe estudiar las principales condiciones de variabilidad del método analítico: tiempo (diferentes días), analistas e instrumentos. [2]

La reproducibilidad global se determina por el coeficiente de variación. Si se desea estudiar el efecto de cada uno de los tres factores (día, analista, instrumento) por separado, deberá realizarse un análisis de varianza.

En ocasiones se considera suficiente efectuar un ensayo de reproducibilidad teniendo en cuenta únicamente la variable tiempo.

En análisis de producto terminado suelen darse como buenos, coeficientes de variación inferiores del 4 - 5 % en el ensayo de reproducibilidad.

#### **1.4.7. EXACTITUD (RECUPERACION)**

La exactitud indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores determinados que deberían corregirse. [1][2][16][17]

No deben confundirse exactitud y precisión. La precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones, pero no da ninguna indicación de lo cerca que están del valor verdadero. Podemos tener mediciones muy precisas pero poco exactas; sin embargo, para que un método sea exacto se requiere un cierto grado de precisión. [1][2][16][17]

La falta de exactitud puede ser por defecto o por exceso.

- Las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas y la selectividad del método no es la adecuada: los resultados finales son superiores a los verdaderos. En este caso, debería modificarse el método para hacerlo más selectivo
- Las desviaciones por defecto suelen darse en métodos analítico muy laboriosos, con varias fases, extracciones, purificaciones etc., que se traducen, inevitablemente, en una disminución de la recuperación. Un estudio de exactitud permite establecer el porcentaje de recuperación promedio. Si el porcentaje es bajo se pueden utilizar unos factores de corrección en los cálculos finales que compensen las pérdidas de analito, debidas a las manipulaciones previas a la medición final.

Otra alternativa consiste en utilizar un método de patrón interno que se añade en las primeras fases de preparación de la muestra. En este caso la concentración del problema se relaciona con el cociente de lecturas (respuestas, áreas, absorbancias,...) entre la señal del analito y la señal del patrón interno, por lo que la exactitud del método se ve poco afectada; a lo largo del análisis se pueden producir pérdidas de analito y patrón interno pero su relación se mantiene constante. Los análisis con patrón interno también eliminan el error de inyección en los métodos cromatográficos. Sin embargo, la selección de un estándar interno adecuado, puede representar un problema analítico difícil y complica la validación de la selectividad, puesto que el método debe ser selectivo para ambos componentes.

#### **1.4.7.1. Expresión de la exactitud**

Matemáticamente la exactitud se expresa en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra o bien en forma de diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero. [1] [2] [16] [17]

Estadísticamente suele efectuarse un test de Student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado.

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad (1-41)$$

Si  $t_{\text{exp}} < t_{\alpha, \nu}$  para el riesgo escogido y  $\nu = n - 1$  grados de libertad, significa que ambos valores no son estadísticamente diferentes y que el método analítico tiene la exactitud requerida.

Si  $t_{\text{exp}} > t_{\alpha, \nu}$  significa que el método analítico no es exacto y existe un error sistemático, por defecto o por exceso.

Las fórmulas anteriores se pueden utilizar también con porcentajes de recuperación. Basta sustituir el valor  $\bar{x}$  por el porcentaje de recuperación  $\%R$ , y el valor verdadero  $\mu$  por "100%".

#### **1.4.7.2. Determinación de la exactitud**

##### *1.4.7.2.1. Análisis repetitivo de una muestra de concentración única conocida.*

La muestra, generalmente, será un placebo al que se añade una concentración conocida de analito patrón. Se analiza varias veces ( $n = 6 - 10$ ) y se evalúa la exactitud por uno de los dos procedimientos siguientes:

- Los resultados pueden expresarse en forma de porcentaje respecto al teórico (recuperación) y se efectúa con un test de  $t_{\alpha, \nu}$  de Student.
- También se pueden comparar los resultados del placebo + analito con los del analito solo a la misma concentración; por ejemplo, los obtenidos para la misma concentración de analito al efectuar la determinación de linealidad. En este caso se utilizan respuestas (áreas, absorbancias, etc.) y se comparan las dos series mediante un test de  $F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}$  de Snedecor seguido de un test de  $t_{\alpha, \nu}$  de Student.

##### *1.4.7.2.2. Análisis repetitivo de varias muestras de concentraciones diferentes conocidas*



Si la proporción de analito en la muestra varía notablemente (rango amplio) o se requiere un estudio de exactitud riguroso, deberá evaluarse este parámetro para diferentes concentraciones del analito. Un diseño habitual utiliza 3 concentraciones (alta, media, baja) dentro del rango de linealidad que se analizan por triplicado. Por ejemplo, en un producto acabado el estudio de exactitud se realiza a 120% - 150% (alta), 100% (media, igual a la declarada) y 50% - 80% (baja).

## **2. METODOLOGÍA**

## 2.1. DELIMITACIÓN ESPACIAL

El estudio de la validación se llevó a cabo en el Laboratorio de Desarrollo de la Industria Farmacéutica “Corporación Bonima S.A. de C.V.”, durante un período aproximado de 4 meses.

## 2.2. EQUIPO Y MATERIALES

- Equipo:
  - Calorímetro Diferencial de Barrido. Marca Mettler Toledo, Modelo DSC1  
El dato utilizado de los termogramas durante toda la exploración y la validación, fue la entalpía de fusión  $\Delta H_{(mJ)}$ , la cual aparece dentro del termograma como “Integral”.
  - Microbalanza. Marca Mettler Toledo, Modelo XP26
- Recursos Electrónicos  
Para el cálculo y análisis matemático y estadístico de los datos se usó tanto la opción de “Función” como la “Herramienta de Análisis de Datos” del software Microsoft Excel

## 2.3. EXPLORACIÓN

Para iniciar la exploración de la metodología de contenido químico de Ibuprofeno en Tabletas bajo la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido se seleccionaron los parámetros de equipo, entre ellos la Velocidad de Calentamiento, Rango de Temperaturas, ambiente dentro del horno (gas de purga), tipo de Crisol y las características del mismo (abertura o no); la selección de los parámetros a utilizar dependieron de la estabilidad que presentó el Ibuprofeno a través de la señal de entalpía de fusión. Lo que se esperó es que la pureza del Ibuprofeno no fuera afectada por el calentamiento sufrido durante la determinación de la entalpía de fusión. Para la medición del grado de estabilidad del Ibuprofeno se efectuó el análisis de la pureza de la sustancia con la ayuda de la ecuación de Van't Hoff (aplicación incluida en el software del Calorímetro Diferencial de Barrido). Si la pureza de la señal no disminuía del 98.0%, entonces se pudo considerar que la programación de los parámetros del equipo fueron adecuados para la determinación del Ibuprofeno. [1] [2]

Luego se utilizó la entalpía de fusión como señal de medición de la masa de Ibuprofeno. Se determinó el porcentaje de contenido químico de Ibuprofeno en las tabletas, en donde la entalpía de fusión del Ibuprofeno dentro de la tableta se comparó con la entalpía de fusión de una masa conocida de estándar de Ibuprofeno. Se evaluó si el resultado de contenido de la exploración caía dentro del rango de especificación del 90,0% al 110,0% citado en las farmacopeas internacionales. Si caía dentro del rango significaba que la técnica era factible para efectuar la determinación de los parámetros de validación y así conocer el grado de exactitud y precisión que esta nueva aplicación de la técnica calorimétrica es capaz de producir. [1] [2] [7]

Para asegurar que la presencia de la matriz no afectaba significativamente los resultados de contenido de ibuprofeno en la tableta, se efectuó una comparación significativa de la línea de calibrado (recta de estandarización) de la muestra con los valores de la pendiente (**b**) y la ordenada en el origen (**a**), con respecto a los límites de confianza de la pendiente  $LC(b) = b \pm ts_b$  y de la ordenada en el origen  $LC(a) = a \pm ts_a$  de la línea de calibrado del estándar. La línea de calibrado de la muestra se consideró equivalente a la del estándar si los valores de (**b**) y (**a**) estaban comprendidos dentro de los límites de confianza de la línea de estandarización. Ver Tabla 2-1. [18] [19] [20]

**Tabla 2-1** Exploración: Evaluaciones, Criterios y Límites

Evaluación	Variables / Fórmulas	Criterios	Límites
Exploración de los parámetros del equipo	Velocidad de Calentamiento, Rango de Temperaturas, ambiente dentro del horno (gas de purga), tipo de Crisol y las características del mismo (abertura o no)	Pureza del componente a través de la Ecuación de Van't Hoff	Pureza del Ibuprofeno. $Pureza_{Ibuprofeno} \geq 98,0\%$
Exploración de Contenido Químico	Porcentaje sobre lo rotulado de Ibuprofeno: $\%Rot = \bar{F}_{St}^{-1} \times \Delta H_{Mx} \times \frac{P_{Tab}}{m_{Mx}} \times \frac{100}{R_{Tab}}$	$F_{St}^{-1} = \frac{m_{St}}{\Delta H_{St}}$	Porcentaje sobre lo rotulado de Ibuprofeno: $\%(C_{13}H_{18}O_3) : 90,0 - 110,0$
Comparación de línea de calibrado de la muestra respecto a la línea de calibrado del estándar.	Línea de Calibrado de la muestra: $y = a' + b'x$	Línea de Calibrado del estándar: $y = a + bx$ $LC(b) = b \pm ts_b$ $LC(a) = a \pm ts_a$	$b'$ y $a'$ deben estar dentro de $LC(b)$ y $LC(a)$

El nivel de masa que representó el 100% para el análisis rutinario se determinó sobre la base de las siguientes condiciones:

- Cantidad de masa (mg) que produjo una señal razonable de entalpía de fusión (mJ).
- Cantidad de masa tanto del estándar (Ibuprofeno) como de la muestra (Ibuprofeno y Excipientes) que cupieron dentro del crisol.

## 2.4. ESPECIFICIDAD

Se preparó una matriz con los diversos componentes de la formulación y en la proporción que posee la tableta. Se mezclaron los diversos componentes y se tamizó la mezcla final a través de una malla que deshizo los grumos presentes en la mezcla. Después de tamizar se procedió a un mezclado final, obteniéndose una mezcla de polvos uniformemente distribuida.

En primer lugar se corrió la matriz a fin de determinar si existía interferencia de alguna señal de los excipientes sobre la señal de Ibuprofeno. En segundo lugar se corrió la matriz previamente sometida a estrés de temperatura durante 15 días a 80°C, con el fin de determinar si debido a la temperatura se producía alguna impureza de los excipientes que pudiera interferir sobre la señal de Ibuprofeno durante su determinación, en lotes que se evalúen en estudios de estabilidad de las Tabletas de Ibuprofeno. Ver Tabla 2-2. [1] [2] [16]

**Tabla 2-2** Especificidad: Etapas, Diseño y Evaluación.

Etapa	Diseño	Evaluación / Fórmula
<b>Especificidad 01</b>	Matriz: Formulación de Tableta sin Principio Activo Ibuprofeno.	NO debe haber señal de interferencia alguna de la matriz en la región temperatura de fusión del Ibuprofeno
<b>Especificidad 02</b>	Matriz: Formulación de Tableta sin Principio Activo Ibuprofeno. Condición de estrés de la matriz: 80°C durante 15 días.	NO debe haber señal de interferencia alguna de la matriz en la región temperatura de fusión del Ibuprofeno

## 2.5. LINEALIDAD Y RANGO

Se efectuó una línea de calibración (línea de estandarización) compuesta de nueve niveles (grupos  $k$ ) de masa: 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9mg y 10 mg a los cuales se les determinó la respuesta de la entalpía de fusión. El nivel de 6 mg correspondió al 100%, por lo que el nivel de 2 mg correspondió al 33.33% respecto a 6 mg y el nivel de 10 mg correspondió al 166.67% respecto a 6 mg. Con este diseño se cumplió la recomendación de la norma ICH Q2 (Validation of Analytical Procedures), que en la determinación de Contenido Químico debe cubrirse como mínimo un Rango del 80% al 120%; y la Linealidad debe efectuarse por lo menos con 5 niveles.

La ecuación de la curva Entalpía de Fusión (mJ) versus la masa (mg) fue calculada por la unificación de dos curvas de estandarización de diferente día, en cada día se efectuaron los nueve niveles citados por duplicado. Por lo tanto, al momento del cálculo de la ecuación de la curva se contó con cuatro replicas por nivel. Los datos de la primera curva pudieron ser unificados con la segunda curva si los factores de respuesta de la primera no diferían significativamente de la segunda en una evaluación estadística t-Student. Ver Tabla 2-3. [1] [2] [16] [17]

**Tabla 2-3** Linealidad: Etapas, Diseño y Evaluación.

Etapa	Diseño	Evaluación / Fórmula
<b>Linealidad 01</b>	Sustancia: Estándar de Ibuprofeno Niveles ( $k$ ): 2mg, 3mg, 4mg, 5mg, 6mg, 7mg, 8mg, 9mg, 10mg Repeticiones ( $n$ ) por nivel: 2	Línea de Calibrado del estándar: $y = a_1 + b_1x$
<b>Linealidad 02</b>	Sustancia: Estándar de Ibuprofeno Niveles ( $k$ ): 2mg, 3mg, 4mg, 5mg, 6mg, 7mg, 8mg, 9mg, 10mg Repeticiones ( $n$ ) por nivel: 2	Línea de Calibrado del estándar: $y = a_2 + b_2x$
<b>Evaluación Estadística de Linealidad 01 versus Linealidad 02</b>	Linealidad 01: $y = a_1 + b_1x$ Linealidad 02: $y = a_2 + b_2x$	Prueba Student de los Factores de Respuesta promedio de cada linealidad: $H_0 : \bar{F}_1 = \bar{F}_2$ $t_{exp}$

Las evaluaciones para el rango lineal fueron: Ecuación de la Línea de Calibración, Coeficiente de Correlación, Coeficiente de Variación (DER: Desviación Estándar Relativa) de los Factores de Respuesta, Contraste de Significación de la Pendiente, Contraste de Significación y Límites de Confianza de la Ordenada en el Origen. Ver Tabla 2-4. [1] [2] [16] [17] [18] [19] [20]

**Tabla 2-4** Linealidad: Evaluaciones, Criterios y Límites.

Evaluación	Variables / Fórmulas	Criterio	Límites de Aceptación
Rango Lineal	---	---	Documentar Rango
Ecuación de la Línea de Estandarización	Ecuación de $\Delta H_{(mJ)}$ versus $m_{(mg)}$ de Ibuprofeno: $y = a + bx$	$x : m_{(mg)}$ $y : \Delta H_{(mJ)}$	Documentar Ecuación.
Coeficiente de Correlación	$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}}$		$ r  \geq 0,995$
Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta	$CV_F = s_F \frac{100}{\bar{F}}$	$F = \frac{\Delta H_{(mJ)}}{m_{(mg)}}$	$CV_F \leq 5,0\%$
Contraste de Significación de la Pendiente	$t_{\text{exp}}(b) = \frac{ b }{s_b}$	$H_0 : b = 0$ $\nu = (n - 2)$	$H_1 : b \neq 0$ $P t_{\text{exp}}(b)  < \alpha$
Contraste de Significación de la Ordenada en el Origen	$t_{\text{exp}}(a) = \frac{ a }{s_a}$	$H_1 : a \neq 0$ $\nu = (n - 2)$	$H_0 : a = 0$ $P t_{\text{exp}}(a)  > \alpha$
Límites de Confianza de la Ordenada en el Origen	$LC(a) = a \pm ts_a$	$\nu = (n - 2)$	$a - ts_a \leq 0 \leq a + ts_a$

## 2.6. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (ESTIMACIÓN)

Se estimó la señal de Entalpía de Fusión  $y: \Delta H_{(mJ)}$  del Límite de Detección y Límite de Cuantificación mediante la utilización de los parámetros de la línea de calibración. Donde  $s_{y/x}$  “Desviación Estándar de los Residuos de  $y$ ” se utilizó en lugar de  $s_{bl}$  “Desviación Estándar de la Señal del Blanco”. Y el valor de  $a$ , la “Ordenada en el Origen” se utilizó en sustitución de  $y_{bl}$  “Señal del Blanco” en las siguientes ecuaciones,  $LOD: y_{LOD} \approx y_{bl} + 3s_{bl}$  y  $LOQ: y_{LOQ} \equiv y_{bl} + Ks_{bl}$ , donde  $K = 10$ . Luego con ayuda de la línea de estandarización se calculó la cantidad correspondiente en masa  $x: m_{(mg)}$  de la señal estimada del Límite de Detección  $y_{LOD}$  y Límite de Cuantificación  $y_{LOQ}$ . Ver Tabla 2-5. [1] [2] [16] [17]

Tabla 2-5 LOD y LOQ: Criterios y Límites de Aceptación.

Parámetro	Variables / Fórmulas	Criterio	Límites de Aceptación
Límite de Detección	$LOD: y_{LOD} \approx y_{bl} + 3s_{bl}$	$y = a + bx$	Documentar límite estimado
	Equivalente a:	$y_{bl} \equiv a$	
	$LOD: y_{LOD} \approx a + 3s_{y/x}$	$s_{bl} \equiv s_{y/x}$	
Límite de Cuantificación	$LOQ: y_{LOQ} \equiv y_{bl} + Ks_{bl}$	$y = a + bx$	Documentar límite estimado
	Equivalente a:	$y_{bl} \equiv a$	
	$LOQ: y_{LOQ} \equiv a + Ks_{y/x}$	$s_{bl} \equiv s_{y/x}$	
		$K = 10$	



## 2.7. PRECISIÓN

### 2.7.1. PRECISIÓN DEL EQUIPO

Se determinó la precisión del equipo, utilizando como referencia el patrón Indio. El cual fue corrido bajo los mismos parámetros de equipo seleccionados para la presente validación, a excepción del rango de temperatura, el cual fue modificado de tal manera que sobrepasara la temperatura de fusión del Indio.

Los parámetros de operación del Calorímetro Diferencial de Barrido son los siguientes:

- Tipo y Material del Crisol: Estándar de Aluminio
- Capacidad del Crisol: 40  $\mu$ L
- Características del Crisol: Sellado sin perforar
- Gas y Flujo: Aire, 0 mL/min.
- Temperatura Inicial: 40,0°C
- Temperatura Final: 180,0°C
- Velocidad de Calentamiento: 5,00°C/min

Además, ya que el metal patrón Indio no es destruido durante la determinación, se efectuó una preparación, es decir una sola pesada, para efectuar los seis “registros” del metal, y eliminar así el efecto del error en el pesaje del metal. Debido a lo explicado anterior, es posible determinar la variabilidad solamente de la respuesta del equipo Calorímetro Diferencial de Barrido para una masa constante de un metal patrón, en este caso el metal Indio.

La evaluación fue: Coeficiente de Variación  $CV$  de los factores de respuesta. [1] [2] [16] [17] [18] [19] [20]

## 2.7.2. REPETIBILIDAD DE ESTÁNDAR

Se determinó la repetibilidad del estándar utilizando estándar de Ibuprofeno al nivel seleccionado de análisis rutinario que representa el 100% y el 50%. Los cuales son 6mg y 3mg de Ibuprofeno respectivamente. Cada nivel tuvo seis repeticiones.

Este diseño se realizó dos veces, cada vez en días distintos a fin de utilizar los datos obtenidos para el cálculo de la precisión intermedia del estándar (reproducibilidad teniendo como variable el día de análisis). Ver Tabla 2-6.

**Tabla 2-6** Repetibilidad de Estándar: Etapas, Diseño y Evaluaciones.

Etapa	Diseño	Evaluación / Fórmula
<b>Repetibilidad de Estándar 01</b>	Sustancia: Estándar de Ibuprofeno Niveles ( <i>k</i> ): Equivalentes en cantidad de masas de 50% y 100% Repeticiones ( <i>n</i> ) por nivel: 6	Coefficiente de variación del factor de respuesta en cada nivel: $CV_{Fk}$
<b>Repetibilidad de Estándar 02</b>	Sustancia: Estándar de Ibuprofeno Niveles ( <i>k</i> ): Equivalentes en cantidad de masas de 50% y 100% Repeticiones ( <i>n</i> ) por nivel: 6	Coefficiente de variación del factor de respuesta en cada nivel: $CV_{Fk}$

La evaluación fue: Coeficiente de Variación  $CV$  del factor de respuesta de cada nivel; además se efectuó un test de igualdad de varianzas  $G_{(\alpha,k,n)}$  de Cochran para determinar si el factor “cantidad de masa” tenía alguna influencia en la variabilidad del factor de respuesta, y posteriormente si no había influencia del factor masa se procedió a determinar el coeficiente de variación total del factor de respuesta de ambos niveles. Ver Tabla 2-7. [1] [2] [16] [17] [18] [19] [20]

**Tabla 2-7** Repetibilidad de Estándar: Evaluaciones, Criterios y Límites

Evaluación	Variables / Fórmulas	Criterio	Límites de Aceptación
<b>Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta en cada nivel</b>	$CV_{Fk} = s_{Fk} \frac{100}{\bar{F}_k}$	$F_k = \frac{\Delta H_{k(mI)}}{m_{k(mg)}}$	$CV_{Fk} \leq 3,0\%$
<b>Contraste de significación de Homogeneidad de Varianzas</b>	$G_{\text{exp}}(s^2) = \frac{(s_{\text{max}}^2)_k}{\sum s_k^2}$	$H_1 : s_1^2 \neq s_2^2 \dots \neq s_k^2$ $G_{(\alpha,k,n)}$ $0$ $G_{(\alpha,k,\nu)}$ $\nu = (n_{\text{max}} - 1)$	$H_0 : s_1^2 = s_2^2 \dots = s_k^2$  $G_{\text{exp}} \leq G_{(\alpha,k,n)}$
<b>Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta de ambos niveles</b>	$CV_F = s_F \frac{100}{\bar{F}}$	$H_0 : s_1^2 = s_2^2 \dots = s_k^2$	$CV_F \leq 3,0\%$

### 2.7.3. REPETIBILIDAD DE MUESTRA

Para determinar la repetibilidad de la muestra se seleccionó un lote de Ibuprofeno 600 mg Tableta, al cual se le determinó el contenido químico utilizando seis pesadas individuales de la muestra al nivel seleccionado de análisis rutinario que represente el 100%.

Este diseño se realizó dos veces, cada vez en días distintos a fin de utilizar los datos obtenidos para el cálculo de la precisión intermedia de la muestra (reproducibilidad teniendo como variable el día de análisis). Ver Tabla 2-8. [1] [2] [16] [17] [18] [19] [20]

**Tabla 2-8** Repetibilidad de Muestra: Etapas, Diseño y Evaluaciones.

Etapa	Diseño	Evaluación / Fórmula
<b>Repetibilidad de Muestra 01</b>	Sustancia: Ibuprofeno 600 mg Tableta Nivel: Equivalente en cantidad de masa al 100% de Ibuprofeno a determinar. Repeticiones ( <i>n</i> ) por nivel: 6	Coefficiente de variación del porcentaje sobre lo rotulado: $CV_{\% Rot}$
<b>Repetibilidad de Muestra 02</b>	Sustancia: Ibuprofeno 600 mg Tableta Nivel: Equivalente en cantidad de masa al 100% de Ibuprofeno a determinar. Repeticiones ( <i>n</i> ) por nivel: 6	Coefficiente de variación del porcentaje sobre lo rotulado: $CV_{\% Rot}$

La evaluación fue: Coeficiente de Variación *CV* de los porcentajes sobre lo rotulado evaluados contra la línea de calibración. Ver Tabla 2-9.

**Tabla 2-9** Repetibilidad de Muestra: Evaluación, Criterio y Límite de Aceptación.

Evaluación	Variables / Fórmulas	Criterio	Límites de Aceptación
<b>Coeficiente de Variación de los porcentajes sobre lo rotulado</b>	$CV_{\% Rot} = S_{\% Rot} \frac{100}{\% Rot}$	$\% Rot = \left( \frac{\Delta H_{Mx} - a}{b} \right) \times \frac{P_{Tab}}{m_{Mx}} \times \frac{100}{R_{Tab}}$ $y = a + bx$ $a : \Delta H_{(mJ)}$ $b : \frac{\Delta H_{(mJ)}}{m_{(mg)}}$	$CV_{\% Rot} \leq 3,0\%$

#### **2.7.4. REPRODUCIBILIDAD DE ESTÁNDAR (PRECISIÓN INTERMEDIA. VARIABLE: DÍA)**

Se utilizaron los datos de las dos repetibilidades efectuadas a fin de determinar la influencia de la variable día sobre los factores de respuestas.

La evaluación fue: Coeficiente de Variación  $CV$  del factor de respuesta. En primer lugar se efectuó un contraste estadístico  $F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}$  de Snedecor de comparación de varianzas muestrales y posteriormente, si no había diferencia significativa de las varianzas muestrales de cada repetibilidad, se procedía a determinar el coeficiente de variación total del factor de respuesta de ambas repetibilidades (incluidos ambos niveles).

También se determinaron los límites de confianza del factor de respuesta. Ver Tabla 2-10. [1] [2] [16] [17]

[18] [19] [20]

Tabla 2-10 Reproducibilidad de Estándar: Evaluaciones, Criterios y Límites de Aceptación.

Evaluación	Variables / Fórmulas	Criterio	Límites de Aceptación
<b>Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas iguales</b>	$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$ <p style="text-align: center;">o</p> $t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$	$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$ <p style="text-align: center;"><math>t_{\alpha, \nu}</math></p> $\nu = n_1 + n_2 - 2$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ $P t_{\text{exp}}  \geq \alpha$
<b>Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas NO iguales</b>	$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$	<p style="text-align: center;"><math>t_{\alpha, \nu}</math></p> $\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ $P t_{\text{exp}}  \geq \alpha$
<b>Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta en cada nivel</b>	$CV_F = s_F \frac{100}{\bar{F}}$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ F: Factor de Respuesta $F = \frac{\Delta H_{(mJ)}}{m_{(mg)}}$	$CV_F \leq 5,0\%$
<b>Límites de Confianza de los Factores de Respuesta de ambos niveles</b>	$LC(F) = \bar{F} \pm t_{\alpha, \nu} s_F$	F: Factor de Respuesta $\nu = (n - 1)$	Documentar límites

## 2.7.5. REPRODUCIBILIDAD DE MUESTRA (PRECISIÓN INTERMEDIA. VARIABLE: DÍA)

Se utilizaron los datos de las dos repetibilidades efectuadas a fin de determinar la influencia de la variable día sobre los porcentajes de recuperación.

La evaluación fue: Coeficiente de Variación  $CV$  del factor de respuesta. En primer lugar se efectuó un contraste estadístico  $F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}$  de Snedecor de comparación de varianzas muestrales y posteriormente, al determinar la correlación de las varianzas promedio de cada repetibilidad mediante  $t_{\alpha, \nu}$  Student, se determinó el coeficiente de variación total del factor de respuesta de ambas repetibilidades. Ver Tabla 2-11. [1] [2] [16] [17] [18] [19] [20]

Tabla 2-11 Reproducibilidad de Muestra: Evaluaciones, Criterios y Límites de Aceptación.

Evaluación	Variables / Fórmulas	Criterio	Límites de Aceptación
Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas iguales	$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$ <p style="text-align: center;">o</p> $t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$	$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$ $t_{\alpha, \nu}$ $\nu = n_1 + n_2 - 2$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ $P t_{\text{exp}}  \geq \alpha$
Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas NO iguales	$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$	$t_{\alpha, \nu}$ $\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ $P t_{\text{exp}}  \geq \alpha$
Coeficiente de Variación de los porcentajes sobre lo rotulado	$CV_{\% \text{ Rot}} = s_{\% \text{ Rot}} \frac{100}{\% \text{ Rot}}$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$	$CV_{\% \text{ Rot}} \leq 5,0\%$

## 2.8. RECUPERACIÓN

Se determinó la recuperación de la metodología en la muestra desde el tratamiento de la muestra, pasando por la etapa de pesada, hasta llegar a la colocación del crisol con la muestra en el Calorímetro Diferencial de Barrido, a través del diseño de la adición de analito Ibuprofeno a la matriz de la tableta. Se utilizaron tres niveles de adición de masa, y cada nivel fue realizado por triplicado. La suma de masa del analito y la matriz es equivalente al peso promedio de la Tableta de Ibuprofeno 600 mg (1200 mg), sin embargo la proporción entre el analito y la matriz varía en cada nivel de acuerdo a la cantidad adicionada de analito (Ibuprofeno). Ver Tabla 2-12 y Tabla 2-13. Este diseño se efectuó con el propósito de evaluar si la metodología analítica por DSC es capaz de recuperar el 100,0% de analito independientemente de la fracción en que se encuentre dentro de la tableta. [1] [2] [16] [17]

**Tabla 2-12** Recuperación: Diseño de Fracción de Analito con Matriz respecto al peso total de Tableta.

Fracción de Analito respecto al peso total de tableta	0,25	0,50	0,75
<b>Analito (Ibuprofeno)</b>	300 mg	600 mg	900 mg
<b>Matriz</b>	900 mg	600 mg	300 mg
<b>Peso total de tableta</b>	1200 mg	1200 mg	1200 mg

**Tabla 2-13** Recuperación: Etapas, Diseño y Evaluación.

Etapa	Diseño	Evaluación / Fórmula
<b>Recuperación</b>	Sustancia a adicionar: Ibuprofeno Matriz: Componentes de la Tableta (exceptuando Ibuprofeno) Niveles (k): Equivalentes en fracción de analito en tableta correspondientes a 0,25 0,50 y 0,75 Repeticiones (n) por nivel: 3	Porcentaje Promedio Recuperado: $\% \overline{R}_k$



La evaluación fue: Porcentaje de Recuperación  $\%R$  de cada nivel calculado contra la ecuación de la línea de calibración. Además se efectuó un test de igualdad de varianzas  $G_{(\alpha,k,n)}$  de Cochran para determinar si el factor “cantidad de masa” tenía alguna influencia en los resultados en los diversos niveles, y posteriormente, si no había influencia del factor masa, se procedió a realizar una prueba  $t_{\alpha,v}$  Student para estimar si no existía una diferencia significativa entre la recuperación media de todos los niveles y el 100,0% esperado.

También se determinaron los límites de confianza de los porcentajes de recuperación. En primer lugar los límites de confianza para estimar con un 95% de confianza los resultados de recuperación de datos individuales en la prueba de contenido químico para lotes de Ibuprofeno Tableta analizados rutinariamente. Y en segundo lugar se determinaron los límites de confianza para estimar con un 95% de confianza los resultados de recuperación promedio en la prueba de contenidos químico para lotes de Ibuprofeno Tableta analizado rutinariamente. Ver Tabla 2-14. [18]

[19] [20]

Tabla 2-14 Recuperación: Evaluaciones, Criterios y Límites de Aceptación.

Evaluación	Variables / Fórmulas	Criterio	Límites de Aceptación
Porcentaje Promedio de Recuperación de cada nivel	$\overline{\%R}_k$	$\%R = \left( \frac{\Delta H_{Mx} - a}{b} \right) \times \frac{100}{m_{Mx}}$ $y = a + bx$ $a : \Delta H_{(mJ)}$ $b : \frac{\Delta H_{(mJ)}}{m_{(mg)}}$	$98,0\% \leq \overline{\%R}_k \leq 102,0\%$
Contraste de significación de Homogeneidad de Varianzas	$G_{\text{exp}}(s^2) = \frac{(s_{\text{max}}^2)_k}{\sum s_k^2}$	$H_1 : s_1^2 \neq s_2^2 \dots \neq s_k^2$ $G_{(\alpha,k,n)}$ 0 $G_{(\alpha,k,v)}$ $\nu = (n_{\text{max}} - 1)$	$H_0 : s_1^2 = s_2^2 \dots = s_k^2$ $G_{\text{exp}} \leq G_{(\alpha,k,n)}$
Contraste de significación de Student para la Exactitud	$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$	$H_0 : \bar{x} = \mu$ $t_{\alpha,\nu}$ $\nu = n - 1$ Donde: $\bar{x} : \overline{\%R}$ $\mu : 100,0\%$ $s : s_{\%R}$	$P t_{\text{exp}}  > \alpha$ 0 $t_{\text{exp}} \leq t_{\alpha,\nu}$
Límites de Confianza de los valores individuales de porcentaje de recuperación	$LC(\%R) = \overline{\%R} \pm t_{\alpha,\nu} s_{\%R}$	$\nu = (n_{\%R} - 1)$	Documentar límites
Límites de Confianza de los valores promedio de porcentaje de recuperación	$LC(\overline{\%R}) = \overline{\%R} \pm t_{\alpha,\nu} \times \frac{s_{\%R}}{\sqrt{n}}$	$\nu = (n_{\%R} - 1)$	Documentar límites

## 2.9. COMPARACIÓN METODOLOGÍA DSC VRS METODOLOGÍA HPLC

Los análisis de cuantificación de contenido químico de Ibuprofeno en las Tabletas se realizaron bajo los lineamientos de la Farmacopea Estadounidense (USP), en donde la metodología de contenido químico utiliza la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación de Ibuprofeno.

Se contrastó si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos utilizando la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido y la técnica cromatográfica de la Farmacopea Estadounidense, comparando los resultados de las metodologías utilizando una evaluación estadística  $t_{\alpha,v}$  Student sobre los promedios del porcentaje sobre lo rotulado de cada metodología.

Se utilizaron 5 lotes. Cada muestra de cada lote se analizó por duplicado en donde se obtuvo un promedio por lote de porcentaje sobre lo rotulado. Finalmente se efectuó la comparación estadística sobre los promedios de cada lote en cada metodología. Ver Tabla 2-15.

Los resultados de Contenido Químico de Ibuprofeno 600 Tabletas utilizando la metodología de la USP, fueron proporcionados por la empresa a través de los certificados de análisis de cada lote. [1] [2] [7] [16]

[17] [18] [19] [20]

**Tabla 2-15** Comparación de Metodologías DSC y HPLC. Diseño y Evaluación.

Etapa	Diseño	Evaluación / Fórmula
<b>Determinación de contenido químico de Ibuprofeno tabletas</b>	Producto: Ibuprofeno 600 mg Tableta	Porcentaje sobre lo rotulado:
	Lotes: 5 a 10	$\overline{\%R}_{HPLC}$
	Repeticiones ( $n$ ) por lote: 2	$\overline{\%R}_{DSC}$
	Metodologías: DSC y HPLC	$\% Rot = \left( \frac{\Delta H_{Mx} - a}{b} \right) \times \frac{P_{Tab}}{m_{Mx}} \times \frac{100}{R_{Tab}}$
		$y = a + bx$

La evaluación fue: estimar si existía diferencia significativa entre los porcentajes sobre lo rotulado de cada metodología con la ayuda de la evaluación estadística  $t_{\alpha, \nu}$  Student. En primer se efectuó un contraste estadístico  $F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}$  de Snedecor de comparación de varianzas muestrales a fin de determinar qué tipo de contraste  $t_{\alpha, \nu}$  Student se utilizaría dependiendo si las varianzas muestrales eran iguales o no. Ver Tabla 2-16.

**Tabla 2-16** Comparación de Metodologías DSC y HPLC: Evaluaciones, Criterios y Límites de Aceptación.

Evaluación	Variables / Fórmulas	Criterio	Límites de Aceptación
<b>Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias (metodologías) suponiendo varianzas iguales</b>	$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$ $t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$	$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$ $t_{\alpha, \nu}$ $\nu = n_1 + n_2 - 2$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ $P t_{\text{exp}}  \geq \alpha$
<b>Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias (metodologías) suponiendo varianzas NO iguales</b>	$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$	$t_{\alpha, \nu}$ $\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ $P t_{\text{exp}}  \geq \alpha$

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. EXPLORACIÓN

Durante el desarrollo de la metodología de contenido químico de Ibuprofeno en Tabletas bajo la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido se efectuaron varios parámetros de exploración, los cuales fueron:

- Exploración de los parámetros de equipo
- Exploración de Contenido Químico
- Comparación de línea de calibrado de la muestra respecto a la línea de calibrado del estándar.

#### 3.1.1. EXPLORACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE EQUIPO

Con el fin de encontrar los parámetros de operación del calorímetro diferencial de barrido, tales como Rango de Temperaturas, Velocidad de Calentamiento, ambiente dentro del horno, etc., se efectuaron varias “registros” de Estándar de Ibuprofeno y de Ibuprofeno 600 mg Tableta a varios niveles de masa de Ibuprofeno, a fin de determinar la respuesta de Pureza de Ibuprofeno en cada nivel a través de la Ecuación de Van't Hoff. El software del Calorímetro Diferencial de Barrido posee la opción de calcular la pureza, por lo que el porcentaje de Pureza Molar se refleja en el termograma. La Tabla 3-1 y Tabla 3-2 poseen los resultados de Pureza en cada nivel.

Tabla 3-1 Exploración de Estándares en DSC

Nivel (masa) [mg]	Pureza [%]
2,1140	99,601 ± 0,167 mol%
2,3440	99,402 ± 0,216 mol%
2,4840	99,443 ± 0,124 mol%
4,0120	99,433 ± 0,209 mol%
4,0060	99,433 ± 0,226 mol%
4,4560	99,002 ± 0,183 mol%
6,7800	99,060 ± 0,268 mol%
6,2080	99,188 ± 0,234 mol%
9,9040	97,535 ± 0,482 mol%
8,7600	98,150 ± 0,565 mol%
9,4020	98,774 ± 0,412 mol%

**Tabla 3-2** Exploración de Muestras en DSC

Nivel (masa) [mg]	Pureza [%]
2,2208	99,632 ± 0,052 mol%
2,0888	99,616 ± 0,035 mol%
2,0238	99,546 ± 0,107 mol%
3,9196	99,599 ± 0,087 mol%
4,1146	99,605 ± 0,085 mol%
4,4256	99,640 ± 0,074 mol%
9,2771	99,735 ± 0,057 mol%
7,9812	99,723 ± 0,059 mol%
9,4981	99,753 ± 0,052 mol%

Para todos los “registros” se utilizaron los siguientes parámetros de operación del calorímetro diferencial de barrido (ver Figura A - 1 en Anexo 01) :

- Tipo y Material del Crisol: Estándar de Aluminio
- Capacidad del Crisol: 40 µL
- Características del Crisol: Sellado sin perforar
- Gas y Flujo: Aire, 0 mL/min.
- Temperatura Inicial: 40,0°C
- Temperatura Final: 90,0°C
- Velocidad de Calentamiento: 5,00°C/min

La razón por la que no se tuvieron que cambiar los parámetros desde el primer “registro” de la exploración es porque se obtuvo un buen resultado de pureza en el primer “registro” y por lo tanto se procedió a verificar que la pureza se mantuviera dentro de los límites esperados aun cambiando la cantidad de masa de Ibuprofeno.

De acuerdo a los porcentajes de pureza reflejados en la Tabla 3-1 y Tabla 3-2, se puede establecer que los parámetros de operación del Calorímetro Diferencial de Barrido son los satisfactorios para efectuar la determinación de Contenido Químico. Por lo tanto los parámetros de operación seleccionados del Calorímetro Diferencial de Barrido para la exploración son adecuados para el desarrollo y validación de la metodología.

### **3.1.2. EXPLORACIÓN DE CONTENIDO QUÍMICO**

Con el fin de poder determinar si es posible obtener porcentajes sobre lo rotulado de Ibuprofeno en Tabletas, que cumplan especificaciones farmacopeicas, utilizando la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido, se procedió a efectuar una prueba de Contenido Químico, la cual determina la cantidad de Ibuprofeno presente en las tabletas.

En primer lugar se “corrieron” seis estándares a varios de niveles de masa de Ibuprofeno, a los cuales se les determinó el Factor de Respuesta promedio. Luego se procedió a “registrar” seis preparaciones de muestra a un mismo nivel de masa de Ibuprofeno teórico, y posteriormente calcular con respecto al Factor de Respuesta promedio de los estándares la cantidad real de Ibuprofeno en las tabletas expresado en porcentaje sobre lo rotulado.



**Tabla 3-3** Exploración de Contenido Químico en DSC

## Exploración de Metodología / Contenido Químico en DSC

Producto	Ibuprofeno Tableta	
Cantidad Rotulada	600	mg/Tab
Peso promedio de Tableta	1200,12	mg

### ESTÁNDARES

Número	Peso (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Factor de Respuesta Inverso (mg/mJ)
1	2,1140	270,12	127,78	7,82615E-03
2	2,3440	304,77	130,02	7,69105E-03
3	4,0120	534,92	133,33	7,50019E-03
4	4,0060	533,94	133,29	7,50272E-03
5	6,7800	900,03	132,75	7,53308E-03
6	6,2080	826,09	133,07	7,51492E-03
Media ( $\mu$ )			131,70	7,59468 E-03
Desviación Estándar (s)			2,30	1,34468 E-04
CV (%)			1,74	1,77

### MUESTRAS

Preparación de Muestra	Peso porción tab. (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)
1	7,8400	498,91	127,29	96,7
2	8,2300	539,91	131,22	99,7
3	8,8520	562,83	127,18	96,6
4	8,5540	572,26	133,81	101,6
5	8,8140	588,29	133,50	101,4
6	9,2960	617,95	132,96	101,0
Media ( $\mu$ )			130,99	<b>99,5</b>
Desviación Estándar (s)			3,05	2,3
CV (%)			2,33	2,33

En los datos de la exploración de la metodología de Contenido Químico se puede observar que el factor de respuesta inverso del estándar presenta un coeficiente de variación de 1,77%, lo cual demuestra que los estándares poseen preliminarmente un comportamiento con poca variabilidad. Por otra parte, el dato promedio de 99,5% Contenido Químico en las muestras se encuentra dentro de los límites especificados en las farmacopeas (90,0% - 110,0%), soporta preliminar y fuertemente, que es posible utilizar la técnica de calorimetría diferencial de barrido para la cuantificación de ibuprofeno en tabletas (ver Tabla 3-3).

### **3.1.3. COMPARACIÓN DE LÍNEA DE CALIBRADO DE LA MUESTRA RESPECTO A LA LÍNEA DE CALIBRADO DEL ESTÁNDAR**

Con el fin de determinar si la proporcionalidad de las preparaciones de muestra no difieren de la proporcionalidad de las preparaciones de estándares, se efectuaron “registros” de estándar y muestra a los mismos niveles de masa de Ibuprofeno. Luego se determinó la línea de calibrado tanto para los estándares  $y = a + bx$  como para las muestras  $y = a' + b'x$  en donde los coeficientes de la muestra  $b'$  y  $a'$  se compararon con los límites de confianza de los coeficientes del estándar tanto la pendiente  $LC(b) = b \pm ts_b$  como la ordenada en el origen  $LC(a) = a \pm ts_a$  de la línea de calibrado de los estándares. La Tabla 3-4 posee la comparación de los coeficientes de la muestra con respecto a los límites de confianza de los coeficientes de la línea de calibrado del estándar.

Tabla 3-4 Exploración: Comparación entre Línea de Estándar y Línea de Muestra

Exploración: Comparación entre Línea de Estándar y Línea de Muestra						
ESTÁNDARES				MUESTRAS		
Nivel	Peso (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Peso (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]
2 mg	2,1140	270,12	127,78	2,2208	275,17	123,91
	2,3440	304,77	130,02	2,0888	273,68	131,02
	2,4840	326,50	131,44	2,0238	242,94	120,04
4 mg	4,0120	534,92	133,33	4,2766	572,26	133,81
	4,0060	533,94	133,29	4,4066	588,29	133,50
	4,4560	594,90	133,51	4,6475	617,95	132,96
9 mg	9,9040	1299,30	131,19	9,2771	1189,13	128,18
	8,7600	1166,35	133,14	7,9812	1052,60	131,88
	9,4020	1213,56	129,07	9,4981	1237,51	130,29
Media ( $\mu$ )			<b>131,42</b>			<b>129,51</b>
Desviación Estándar (s)			2,10			4,71
RSD (%)			1,60			3,64
Min.			127,78			120,04
Máx.			133,51			133,81
Cantidad de Datos (n)			9			9

LINEALIDAD DEL ESTÁNDAR		Límite de Confianza Inferior	Límite de Confianza Superior	LINEALIDAD DE LA MUESTRA	
Pendiente (b)	<b>130,90</b>	<b>127,81</b>	<b>133,99</b>	Pendiente (b)	<b>130,66</b>
Intercepción (a)	<b>3,21</b>	<b>-15,55</b>	<b>21,96</b>	Intercepción (a)	<b>-1,74</b>
Coef. Correlación( r)	<b>0,9997</b>			Coef. Correlación( r)	<b>0,9993</b>
Coef. Determinación (r <sup>2</sup> )	0,9993				
Error Típico Experimental (s <sub>y/x</sub> )	11,7536				
Grados de Libertad (n-2)	7				
Nivel de significación (α)	0,050				
Estadístico t <sub>α, (n-2)</sub>	2,3646				
Error Típico de la Pendiente (s <sub>b</sub> )	1,307				
Error Típico de la Intercepción (s <sub>a</sub> )	7,931				

Los datos de Error Típico de la Pendiente como Error Típico de la Intercepción se obtuvieron con la ayuda del Análisis de Datos, opción Regresión, en la hoja de cálculo electrónica, los cuales se pueden ver reflejados en la Tabla 3-5.

**Tabla 3-5** Exploración: Análisis de Datos en Hoja de Cálculo Electrónica

<b>ANÁLISIS DE DATOS-REGRESIÓN</b>						
<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple	0,999651188					
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,999302498					
R <sup>2</sup> ajustado	0,999202855					
Error típico	11,75361273					
Observaciones	9					

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>		
Intercepción	3,207746317	7,931386905	0,404436999	0,697963651		
Pendiente	130,902032	1,307138418	100,1439711	2,60891E-12		

	<i>Inferior 90,0%</i>	<i>Superior 90,0%</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 99,0%</i>	<i>Superior 99,0%</i>
Intercepción	-11,8188896	18,23438224	-15,5470035	21,96249614	-24,54800968	30,96350231
Pendiente	128,4255555	133,3785085	127,8111408	133,9929232	126,3277229	135,4763411

En la Tabla 3-4, los valores de la pendiente “130,66” y la ordenada en el origen (intercepción) “-1,74” de la línea de calibrado de la muestra se encuentran dentro de los límites de confianza de la pendiente “127,81...133,99” y la ordenada en el origen “-15,55...21,96” de la línea de calibrado del estándar; lo cual indica preliminarmente que la matriz no afecta significativamente los resultados de contenido químico de Ibuprofeno en tabletas. Esta afirmación va a ser desafiada con el parámetro de validación de especificidad, pues la comparación de línea de calibrado de la muestra respecto a la línea de calibrado del estándar se ha efectuado en condiciones fuera de estrés de la matriz de Ibuprofeno.

El resumen de los resultados de las evaluaciones de Exploración de los parámetros de equipo, Exploración de Contenido Químico y Comparación de línea de calibrado de la muestra respecto a la línea de calibrado del estándar, están en la Tabla 3-6

**Tabla 3-6** Exploración. Resumen de Resultados

Evaluación	Fórmula / Criterios Importantes	Resultado del Estándar	Resultado de la Muestra
<b>Exploración de los parámetros del equipo</b>	Pureza del Ibuprofeno. $Pureza_{Ibuprofeno} \geq 98,0\%$	Mayoría $\geq 98,0\%$	Todos $\geq 98,0\%$
<b>Exploración de Contenido Químico</b>	Porcentaje sobre lo rotulado de Ibuprofeno: $\%(C_{13}H_{18}O_3) : 90,0 - 110,0$	---	99,5%
<b>Comparación de línea de calibrado de la muestra respecto a la línea de calibrado del estándar</b>	Línea de Calibrado de la muestra: $y = a' + b'x$ Donde $b'$ y $a'$ deben estar dentro de $LC(b)$ y $LC(a)$ de la línea de calibrado del estándar $y = a + bx$	$y = 3,21 + 130,9x$ $\alpha : 0,05$ $LC(b) : 127,81 \dots 133,99$ $LC(a) : -15,55 \dots 21,96$	$y = -1,74 + 130,66x$ $b' : 130,66$ $a' : -1,74$

A partir de los parámetros desarrollados durante la exploración se puede definir el nivel de masa que representará el 100% para el análisis rutinario, ya que sobre la base de las siguientes condiciones Cantidad de masa (mg) que produce una señal razonable de entalpía de fusión (mJ) y Cantidad de masa tanto del estándar (Ibuprofeno) como de la muestra (Ibuprofeno y Excipientes) que quepan dentro del crisol de aluminio de 40  $\mu$ L, la cantidad idónea corresponde a 6 mg de Ibuprofeno. Alrededor de esta cantidad girará tanto el análisis rutinario así como el desarrollo de la validación de la metodología analítica.

## 3.2. ESPECIFICIDAD

En la primera etapa se “corrió” la matriz, sin condiciones de estrés térmico, a fin de determinar si existe interferencia de alguna señal de los excipientes sobre la señal de Ibuprofeno.

La Figura A - 2 del anexo 02 refleja los termogramas de la matriz sin haber sido sometida a condiciones de estrés térmico. En donde se puede observar en cada termograma que la matriz no aporta señal alguna interferente en la región de interés de integración de la señal de Ibuprofeno (aproximadamente entre 72°C y 83°C). La pequeña señal del orden de  $\mu\text{W}$  (comparada con los mW de las señales de estándar y muestra) es debida, probablemente, a movimientos de la matriz dentro del crisol durante el calentamiento, los cuales son movimientos aleatorios que no están dentro del control del analista.

En la segunda etapa se corrió la matriz previamente sometida a estrés de temperatura durante 15 días a 80°C, con el fin de determinar si debido a la temperatura se produce alguna impureza de los excipientes que pueda interferir sobre la señal de Ibuprofeno durante su determinación en lotes que se evalúen en estudios de estabilidad de las Tabletas de Ibuprofeno: ello se observa en la Figura A - 3 del Anexo 02. Los termogramas reflejan que la matriz en condiciones de estrés, no aporta señal alguna interferente en la región de interés de integración de la señal de Ibuprofeno; aproximadamente desde 72°C hasta 83°C. La pequeña señal del orden de  $\mu\text{W}$  tiene la misma explicación que el caso de los termogramas de la matriz en condiciones de no estrés.

El resumen de los resultados de las evaluaciones del parámetro de Especificidad, está en la Tabla 3-7.

**Tabla 3-7** Resumen de los Resultados de Especificidad

Evaluación	Límite Propuesto	Resultado
<b>Matriz: Formulación de Tableta sin Principio Activo Ibuprofeno.</b>	NO debe haber señal de interferencia alguna de la matriz en la región temperatura de fusión del Ibuprofeno	NO hay interferencia
<b>Matriz: Formulación de Tableta sin Principio Activo Ibuprofeno. Condición de estrés de la matriz: 80°C durante 15 días.</b>	NO debe haber señal de interferencia alguna de la matriz en la región temperatura de fusión del Ibuprofeno	NO hay interferencia

La matriz, tanto en condiciones no estresantes como en condiciones de estrés, cumple satisfactoriamente el parámetro de validación de especificidad, no aportando señal interferente alguna en la región de interés de integración de la señal de Ibuprofeno; aproximadamente desde 72°C hasta 83°C.

### **3.3. LINEALIDAD Y RANGO**

Se efectuaron dos líneas de estandarización en días diferentes. Y en cada día se efectuaron los nueve niveles citados por duplicado.

Los termogramas referentes a la linealidad del día 01 y linealidad linealidad del día 02, están desde la Figura A - 4 hasta la Figura A - 12 del Anexo 03.

La Tabla 3-8 y

Tabla 3-9 contienen los datos de las linealidades efectuadas tanto en el día 01 como en el día 02. La línea de estandarización del día 01 posee un coeficiente de correlación lineal de 0,9993 y el de la línea de estandarización del día 02 es también 0,9993; lo cual indica fuertemente que ambas líneas de estandarización poseen un comportamiento de proporcionalidad directa lineal. Además, ambas linealidades poseen datos similares en cuanto a la pendiente, lo cual al compararlo con el valor promedio de sus factores de respuesta, el cual también es similar al valor de la pendiente, se puede constatar que la respuesta del DSC de la entalpía de fusión de cualquier masa de Ibuprofeno va a presentar valores directamente proporcionales a la cantidad de masa adicionada del analito.



**Tabla 3-8** Linealidad Día 01: Factores de Respuesta

<b>Linealidad 01</b>			
Nombre del Estándar	Ibuprofeno		
Lote	ET0802000288		
Potencia Base Tal Cual (%)	100,0		
<b>ESTÁNDARES</b>			
Nivel	Peso (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]
2 mg	2,1200	277,36	130,83
	2,1340	282,92	132,58
3 mg	3,1880	426,47	133,77
	3,1140	411,50	132,15
4 mg	4,0780	537,58	131,82
	4,1180	531,79	129,14
5 mg	5,1520	685,93	133,14
	5,1000	675,38	132,43
6 mg	6,1660	829,66	134,55
	6,0780	790,91	130,13
7 mg	7,0780	924,58	130,63
	7,1760	937,87	130,70
8 mg	8,1120	1067,56	131,60
	8,1360	1073,62	131,96
9 mg	9,1100	1177,35	129,24
	9,1840	1227,74	133,68
10 mg	10,0360	1339,44	133,46
	10,1940	1382,98	135,67
Media ( $\mu$ )			<b>132,08</b>
Desviación Estándar (s)			2,13
Coefficiente de Variación (%)			1,61
Dato Mínimo			129,14
Dato Máximo			135,67
<b>LINEALIDAD</b>			
Pendiente (b)	133,34		
Intercepción (a)	-6,85		
Coef. Correlación (r)	<b>0,9993</b>		
Coef. Determinación (r <sup>2</sup> )	0,9986		

**Tabla 3-9** Linealidad Día 02: Factores de Respuesta

## Linealidad 02

Nombre del Estándar	Ibuprofeno
Lote	ET0802000288
Potencia Base Tal Cual (%)	100,0

### ESTÁNDARES

Nivel	Peso (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]
2 mg	2,1020	282,26	134,28
	2,0860	277,99	133,26
3 mg	3,1840	421,27	132,31
	3,1060	411,53	132,50
4 mg	4,0860	534,17	130,73
	4,0600	530,43	130,65
5 mg	5,0620	665,29	131,43
	5,0860	661,28	130,02
6 mg	6,0020	787,39	131,19
	6,0740	784,13	129,10
7 mg	7,1260	930,47	130,57
	7,1080	946,67	133,18
8 mg	8,0180	1060,14	132,22
	8,1340	1052,57	129,40
9 mg	9,1580	1186,45	129,55
	9,0280	1156,58	128,11
10 mg	10,0360	1345,34	134,05
	10,0180	1329,45	132,71
Media ( $\mu$ )			<b>131,40</b>
Desviación Estándar (s)			2,26
Coefficiente de Variación (%)			1,72
Dato Mínimo			128,11
Dato Máximo			134,28

### LINEALIDAD

Pendiente (b)	131,10
Intercepción (a)	0,65
Coef. Correlación (r)	<b>0,9993</b>
Coef. Determinación (r <sup>2</sup> )	0,9986

### 3.3.1. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE LINEALIDAD 01 Y LINEALIDAD 02

A fin de determinar si no existe variabilidad en los factores de respuesta de los niveles de los estándares corridos en días diferentes, es necesaria la ayuda de una evaluación estadística t-Student, en donde se compararon estadísticamente los factores de respuesta promedio de cada a partir de sus datos individuales de todos los niveles.

**Tabla 3-10** Linealidad: Factores de Respuesta de Día 01 y 02

Factores de Respuesta de Linealidad Día 01 y Linealidad Día 02		
ESTÁNDARES	Linealidad 01	Linealidad 02
	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]
	130,83	134,28
	132,58	133,26
	133,77	132,31
	132,15	132,50
	131,82	130,73
	129,14	130,65
	133,14	131,43
	132,43	130,02
	134,55	131,19
	130,13	129,10
	130,63	130,57
	130,70	133,18
	131,60	132,22
	131,96	129,40
	129,24	129,55
	133,68	128,11
	133,46	134,05
	135,67	132,71
Media ( $\mu$ )	<b>132,08</b>	<b>131,40</b>
Desviación Estándar (s)	1,79	1,78
Varianza ( $s^2$ )	3,19	3,15
Coficiente de Variación (%)	<b>1,35</b>	<b>1,35</b>
Dato Mínimo	129,14	128,11
Dato Máximo	135,67	134,28

**Tabla 3-11** Linealidad: Evaluación Estadística de los Factores de Respuesta de Día 01 y 02

<b>Prueba F para varianzas de dos muestras</b>		
<b>CI:</b> 0,05		
	<i>Linealidad 01</i>	<i>Linealidad 02</i>
Media	132,0816055	131,4035627
Varianza	3,192610593	3,150921876
Observaciones	18	18
Grados de libertad	17	17
F	1,013230641	
P(F<=f) una cola	0,489348962	
Valor crítico para F (una cola)	2,271892889	
<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales</b>		
<b>CI:</b> 0,05		
	<i>Linealidad 01</i>	<i>Linealidad 02</i>
Media	132,0816055	131,4035627
Varianza	3,192610593	3,150921876
Observaciones	18	18
Varianza agrupada	3,171766234	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	34	
Estadístico t	1,142162264	
P(T<=t) dos colas	0,261366538	
Valor crítico de t (dos colas)	2,032244498	

En la Tabla 3-10 se puede observar que los datos de Linealidad 01 y Linealidad 02 se comportan con una variabilidad similar, lo cual se puede verificar en la Prueba F que presenta un valor de  $F$  menor que el valor crítico de  $F$  (una cola) y también presenta una probabilidad mucho mayor que el nivel de significancia (Ver Tabla 3-11). Por lo tanto se procede a evaluar el factor de respuesta promedio de Linealidad 01 y Linealidad 02 mediante la Prueba t suponiendo varianzas iguales; en donde con ayuda del análisis estadístico se verifica que los factores de respuesta promedio que otorgan los datos individuales de ambas linealidades son similares ya que el valor estadístico  $t$  es menor que el valor crítico de  $t$  (dos colas) y también posee una probabilidad de ocurrencia mayor que el nivel de significancia (Ver Tabla 3-11).

Dado que no hay diferencia significativa entre la variabilidad y la media de los datos de Linealidad 01 y Linealidad 02 se procede a calcular la ecuación de la línea de estandarización de Entalpía de Fusión (mJ) versus la masa de Ibuprofeno (mg). La ecuación fue calculada por la unificación de los datos de las líneas de estandarización.

### 3.3.2. ECUACIÓN DE LA LÍNEA DE ESTANDARIZACIÓN

La línea de estandarización de la Entalpía de Fusión (mJ) versus la masa de Ibuprofeno (mg) fue calculada por la unificación de dos líneas de estandarización de diferente día, en cada día se efectuaron nueve niveles de masa por duplicado y por lo tanto al momento del cálculo de la ecuación de la línea se cuenta con cuatro replicas por nivel. Los niveles (grupos  $k$ ) de masa son: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mg.

La línea de estandarización (ver Figura 3-1) correspondiente a la ecuación  $y = -3,18 + 132,24x$  posee un coeficiente de correlación de  $|r|: 0,999(2)$  el cual es mayor que el límite propuesto de  $|r| \geq 0,995$ . Lo cual demuestra fuertemente que existe una correlación de tipo lineal entre la Entalpía de Fusión (mJ) versus la masa de Ibuprofeno (mg). Además los datos individuales graficados ofrecen una perspectiva visual de esta correlación lineal.

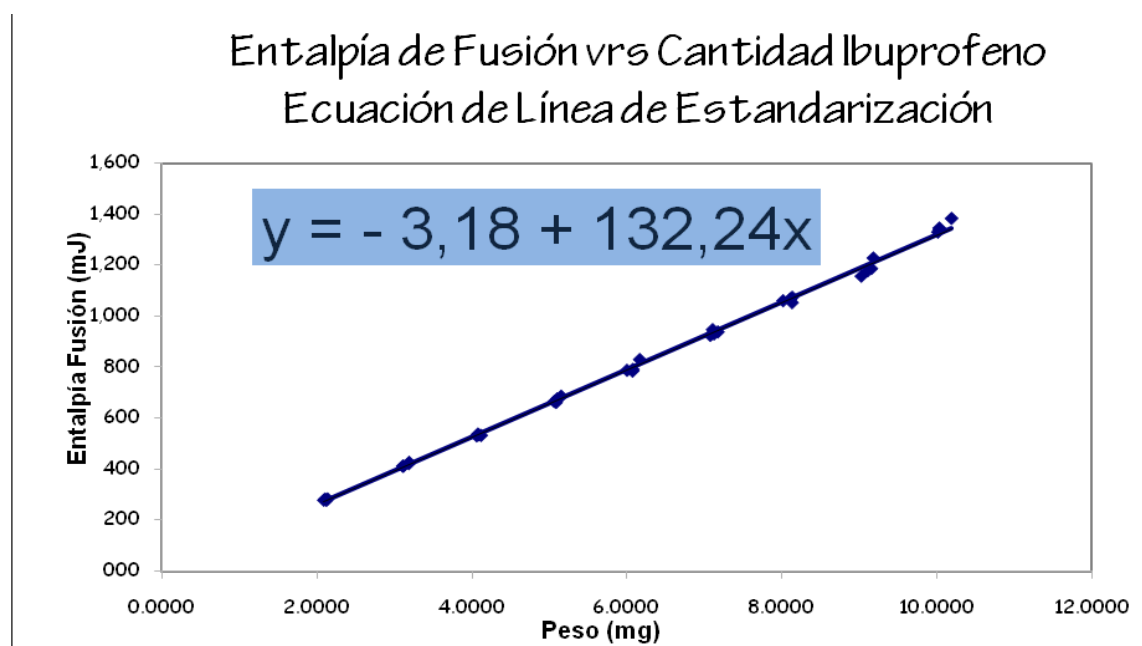


Figura 3-1 Linealidad: Ecuación de Línea de Estandarización

Tabla 3-12 Linealidad: Datos de la Ecuación de la Línea de Estandarización

## Datos de la Ecuación de la Línea de Estandarización

### ESTÁNDARES

Nivel	Peso (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía		
			Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Recuperación	Exactitud
2 mg	2,1200	277,36	130,83	2,1215	100,07
	2,1340	282,92	132,58	2,1636	101,39
3 mg	3,1880	426,47	133,77	3,2491	101,92
	3,1140	411,50	132,15	3,1359	100,70
4 mg	4,0780	537,58	131,82	4,0894	100,28
	4,1180	531,79	129,14	4,0456	98,24
5 mg	5,1520	685,93	133,14	5,2112	101,15
	5,1000	675,38	132,43	5,1314	100,62
6 mg	6,1660	829,66	134,55	6,2981	102,14
	6,0780	790,91	130,13	6,0051	98,80
7 mg	7,0780	924,58	130,63	7,0160	99,12
	7,1760	937,87	130,70	7,1165	99,17
8 mg	8,1120	1067,56	131,60	8,0972	99,82
	8,1360	1073,62	131,96	8,1430	100,09
9 mg	9,1100	1177,35	129,24	8,9275	98,00
	9,1840	1227,74	133,68	9,3085	101,36
10 mg	10,0360	1339,44	133,46	10,1532	101,17
	10,1940	1382,98	135,67	10,4825	102,83

**Tabla 3-13** Linealidad: Datos de la Ecuación de la Línea de Estandarización (continuación)

Nivel	Peso (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía		
			Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Recuperación	Exactitud
2 mg	2,1020	282,26	134,28	2,1586	102,69
	2,0860	277,99	133,26	2,1263	101,93
3 mg	3,1840	421,27	132,31	3,2098	100,81
	3,1060	411,53	132,50	3,1361	100,97
4 mg	4,0860	534,17	130,73	4,0636	99,45
	4,0600	530,43	130,65	4,0353	99,39
5 mg	5,0620	665,29	131,43	5,0551	99,86
	5,0860	661,28	130,02	5,0248	98,80
6 mg	6,0020	787,39	131,19	5,9785	99,61
	6,0740	784,13	129,10	5,9538	98,02
7 mg	7,1260	930,47	130,57	7,0605	99,08
	7,1080	946,67	133,18	7,1830	101,06
8 mg	8,0180	1060,14	132,22	8,0411	100,29
	8,1340	1052,57	129,40	7,9839	98,15
9 mg	9,1580	1186,45	129,55	8,9963	98,23
	9,0280	1156,58	128,11	8,7704	97,15
10 mg	10,0360	1345,34	134,05	10,1979	101,61
	10,0180	1329,45	132,71	10,0777	100,60
Media ( $\mu$ )			<b>131,74</b>		<b>100,13</b>
Desviación Estándar (s)			1,79		1,43
Coeficiente de Variación (%)			<b>1,36</b>		1,43
Dato Mínimo			128,11		97,15
Dato Máximo			135,67		102,83
Cantidad de Datos (n)			36		36

El coeficiente de variación de los Factores de Respuesta de los datos individuales es  $CV_F : 1,36\%$  , dato apreciablemente menor que el límite propuesto de  $CV_F \leq 5,0\%$  (ver Tabla 3-12 y Tabla 3-13). Esta variabilidad mínima de los nueve niveles de la línea de estandarización demuestra que la proporcionalidad directa lineal se mantiene independientemente el nivel en el rango de niveles seleccionados, desde 2 mg de Ibuprofeno hasta 9 mg de Ibuprofeno.

**Tabla 3-14** Linealidad: Evaluación Estadística de la Ecuación de la Línea de Estandarización

ANÁLISIS DE DATOS-REGRESIÓN						
<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coeficiente de correlación múltiple	0,99921967					
Coeficiente de determinación R^2	0,99843996					
R^2 ajustado	0,99839407					
Error típico	13,8458852					
Observaciones	36					
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>		
Intercepción	-3,17941429	5,93860461	-0,5353807	0,59587148		
Pendiente	132,235601	0,8964301	147,513566	2,6101E-49		
	<i>Inferior 90.0%</i>	<i>Superior 90.0%</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 99.0%</i>	<i>Superior 99.0%</i>
Intercepción	-13,2211445	6,86231595	-15,2481108	8,88928225	-19,3822696	13,0234411
Pendiente	130,719806	133,751397	130,413836	134,057366	129,789786	134,681416

Los datos del contraste de significación de la pendiente demuestran una correlación lineal alta de la línea de estandarización correspondiente a la ecuación  $y = -3,18 + 132,24x$  , pues el valor de la probabilidad  $P|t_{\text{exp}}(b)| : 2,610E^{-49}$  es mucho menor que cualquier nivel de significancia comúnmente seleccionado  $P|t_{\text{exp}}(b)| \ll \alpha$  . Desde otro punto de vista también se puede apreciar que el valor  $t_{\text{exp}}(b) = 147,51$  es mucho mayor que lo propuesto por la hipótesis nula  $H_0 : b = 0$  . Por lo tanto, desde ambas perspectivas la hipótesis alternativa  $H_1 : b \neq 0$  sugiere fuertemente que existe una correlación lineal (ver Tabla 3-14).



Los datos del contraste de significación de la ordenada en el origen demuestran que los datos estadísticamente tiene su origen de proporcionalidad lineal cercana a cero y que no existe un sesgo en la respuesta de la Entalpía de Fusión (mJ) versus la masa de Ibuprofeno (mg), pues el valor de la probabilidad  $P|t_{\text{exp}}(a)|:0,5958(7)$  es mayor que cualquier nivel de significancia comúnmente seleccionado  $P|t_{\text{exp}}(a)| > \alpha$  (ver Tabla 3-14).

Desde otro punto de vista también se puede apreciar que los límites de confianza de la ordenada en el origen  $LC(a) = a \pm ts_a$  incluyen el valor de “Cero”  $a - ts_a \leq 0 \leq a + ts_a$  para los niveles de significancia comúnmente seleccionados. Por lo tanto, desde ambas perspectivas la hipótesis alternativa  $H_0 : a = 0$  sugiere fuertemente que línea de estandarización correspondiente a la ecuación  $y = -3,18 + 132,24x$  pasa estadísticamente por el origen y que está libre de sesgo (ver Tabla 3-15).

**Tabla 3-15** Linealidad: Límites de Confianza de la Ecuación de la Línea de Estandarización

LINEALIDAD DEL ESTÁNDAR		Límite de Confianza	
		Inferior	Superior
Pendiente (b)	132,24	130,41	134,06
Intercepción (a)	-3,18	-15,25	8,89
Coef. Correlación (r )	0,9992		
Coef. Determinación (r <sup>2</sup> )	0,9984		
Error Típico Experimental (s <sub>y/x</sub> )	13,8458852		
Grados de Libertad (n-2)	34		
Nivel de significación (α)	0,050		
Estadístico t <sub>α, (n-2)</sub>	2,0322		
Error Típico de la Pendiente (s <sub>b</sub> )	0,896		
Error Típico de la Intercepción (s <sub>a</sub> )	5,939		
EXACTITUD		Límite de Confianza	
		Inferior	Superior
Intervalo de Exactitud		99,64	100,61
Grados de Libertad (n-1)	35		
Nivel de significación (α)	0,050		
Estadístico t <sub>α, (n-1)</sub>	2,0301		

El resumen de los resultados de las evaluaciones del parámetro de Linealidad y Rango, están en la Tabla 3-16.

**Tabla 3-16** Resumen de los Resultados de Linealidad y Rango

Evaluación	Fórmula / Criterios Importantes	Límite Propuesto	Resultado
Rango Lineal	---	Documentar rango	2 mg...10 mg
Ecuación de la Línea de Estandarización	Ecuación de $\Delta H_{(mJ)}$ versus $m_{(mg)}$ de Ibuprofeno	Documentar ecuación	$y = -3,18 + 132,24x$
Coefficiente de Correlación	---	$ r  \geq 0,995$	$ r  : 0,999(2)$
Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta	$CV_F = s_F \frac{100}{\bar{F}}$	$CV_F \leq 5,0\%$	$CV_F : 1,36\%$
Contraste de Significación de la Pendiente	$t_{\text{exp}}(b) = \frac{ b }{s_b}$ $H_0 : b = 0$ $\nu = (n - 2)$	$H_1 : b \neq 0$ $P t_{\text{exp}}(b)  < \alpha$ $\alpha : 0,1...0,05...0,01$	$t_{\text{exp}}(b) = 147,51$ $P t_{\text{exp}}(b)  : 2,610E^{-49}$ $P t_{\text{exp}}(b)  \ll \alpha$
Contraste de Significación de la Ordenada en el Origen	$t_{\text{exp}}(a) = \frac{ a }{s_a}$ $H_1 : a \neq 0$ $\nu = (n - 2)$	$H_0 : a = 0$ $P t_{\text{exp}}(a)  > \alpha$ $\alpha : 0,1...0,05...0,01$	$t_{\text{exp}}(a) = -0,5353$ $P t_{\text{exp}}(a)  : 0,5958(7)$ $P t_{\text{exp}}(a)  > \alpha$
Límites de Confianza de la Ordenada en el Origen	$LC(a) = a \pm ts_a$ $\nu = (n - 2)$	$a - ts_a \leq 0 \leq a + ts_a$ $\alpha : 0,1$ $\alpha : 0,05$ $\alpha : 0,01$	$-13,22 < 0 < 6,86$ $-15,25 < 0 < 8,89$ $-19,38 < 0 < 13,02$

### 3.4. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (estimación)

Se calcularon los valores del límite de detección y límite de cuantificación mediante la utilización de los datos de la línea de estandarización a través de las siguientes ecuaciones,  $LOD: y_{LOD} \approx a + 3s_{y/x}$  y  $LOQ: y_{LOQ} \equiv a + Ks_{y/x}$ , donde  $K = 10$ . Los datos estimados se pueden visualizar en la Tabla 3-17

Tabla 3-17 Linealidad: Estimación de LOD y LOQ

#### Estimación de Límite de Detección y Límite de Cuantificación

##### LINEALIDAD DEL ESTÁNDAR

Pendiente (b)	<b>132,24</b>
Intercepción (a)	<b>-3,18</b>
Coef. Correlación (r)	<b>0,9992</b>
Coef. Determinación (r <sup>2</sup> )	0,9984
Error Típico Experimental (s <sub>y/x</sub> )	13,846

##### Límites de Detección y Cuantificación

	Valor Estimado	Valor Experimental	Exactitud (%)
<b>Límite de Detección</b>			
LOD (Entalpía mJ)	<b>38,36</b>	39,34	
LOD (PESO mg)	<b>0,3141</b>	0,3140	
LOD Entalpía Normalizada (mJ/mg)	<b>122,11</b>	<b>125,29</b>	<b>102,60</b>
<b>Límite de Cuantificación</b>			
LOQ (Entalpía mJ)	<b>135,28</b>	131,29	
LOQ (PESO mg)	<b>1,0471</b>	1,0380	
LOQ Entalpía Normalizada (mJ/mg)	<b>129,20</b>	<b>126,48</b>	<b>97,90</b>

Los límites de detección y cuantificación de Ibuprofeno estimados a partir de ecuación de la línea de estandarización son 0,3141 mg (38,36 mJ) y 1,0471 mg (135,28) respectivamente.

Para verificar experimentalmente los Límites de Detección y Cuantificación estimados mediante la utilización de los parámetros de la línea de calibración, se pesó la cantidad de Ibuprofeno estimada para el Límite de Detección y el Límite de Cuantificación a fin de obtener una respuesta  $y$ :  $\Delta H_{(mJ)}$  experimental y posteriormente determinar la exactitud de la respuesta experimental respecto a la respuesta estimada a través de sus factores de respuesta.

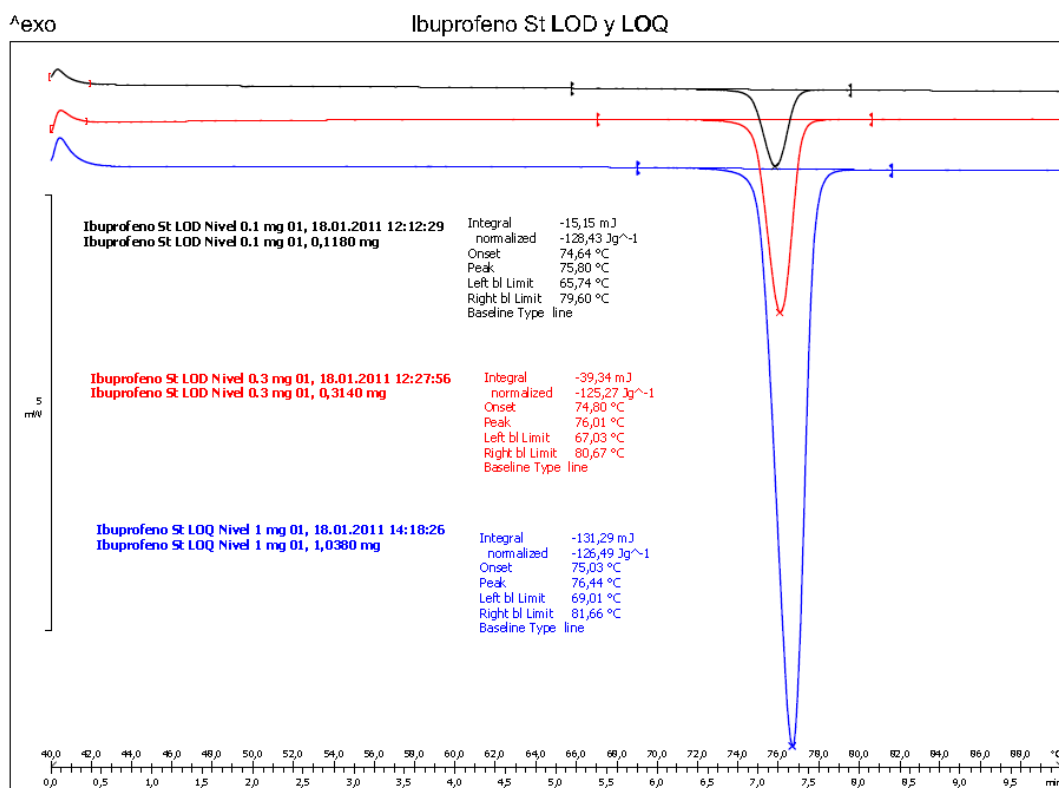


Figura 3-2 Termogramas de Valores Experimentales de Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)

En la Figura 3-2 se pueden apreciar las señales de las masas de Ibuprofeno experimentales para verificar la respuesta del límite de detección y límite de cuantificación. Además se puede observar que hay un termograma con una cantidad de masa de 0,1180 mg de Ibuprofeno que posee una respuesta de entalpía de 15,15 mJ; lo cual corresponde a un valor de entalpía normalizada de 128,43 mJ/mg (factor de respuesta). Al determinar la exactitud de este valor respecto al valor estimado de la entalpía normalizada del límite de detección (122,11 mJ/mg), se obtiene una exactitud de 105,18%, el cual en términos de diferencia es un 5,18%. Si con esta diferencia tomamos en cuenta los valores de diferencia del límite de detección y límite de cuantificación se

confirma experimentalmente que entre más pequeña sea la cantidad de masa de Ibuprofeno, más grande será la diferencia de la exactitud.

Los límites estimados contrastan aceptablemente con los datos experimentales de la respuesta de entalpía de las masas pesadas tanto para el límite de detección como para el límite de cuantificación, ya que la exactitud de los factores de respuesta experimentales respecto a los factores de respuesta estimados es de 102,60% para el límite de detección y 97,90% para el límite de cuantificación. En términos de diferencia respecto al 100,00% esperado, estos representan 2,60% de diferencia para el límite de detección y 2,10% de diferencia para el límite de cuantificación, lo cual es una diferencia muy aceptable tratándose de que las cantidades de masa pesadas son muy pequeñas (ver Tabla 3-17).

El resumen de los resultados de las evaluaciones de los parámetros de Límites de Detección y Cuantificación, están en la Tabla 3-18.

**Tabla 3-18** Resumen de Resultados de LOD y LOQ

Parámetro	Fórmula	Criterios Importantes	Resultado Estimado
Límite de Detección	$LOD: y_{LOD} \approx y_{bl} + 3s_{bl}$	$y = -3,18 + 132,24x$	$m_{(mg)} : 0,3141$
	Equivalente a:	$y_{bl} \equiv a$	
	$LOD: y_{LOD} \approx a + 3s_{y/x}$	$s_{bl} \equiv s_{y/x}$	
Límite de Cuantificación		$y = -3,18 + 132,24x$	$m_{(mg)} : 1,0471$
	$LOQ: y_{LOQ} \equiv y_{bl} + Ks_{bl}$	$y_{bl} \equiv a$	
	Equivalente a:	$s_{bl} \equiv s_{y/x}$	
	$LOQ: y_{LOQ} \equiv a + Ks_{y/x}$	$K = 10$	

## 3.5. PRECISIÓN

### 3.5.1. PRECISIÓN DEL EQUIPO

Se determinó la precisión del equipo, utilizando como referencia el patrón Indio. El cual fue corrido bajo los mismos parámetros de equipo seleccionados para la presente validación, a excepción del rango de temperatura, desde 40,0°C hasta 180,0°C, el cual fue modificado de tal manera que sobrepasara la temperatura de fusión del Indio.

Los termogramas referentes a la Precisión el Equipo Calorímetro Diferencial de Barrido, están la Figura A - 13 del Anexo 04.

**Tabla 3-19** Precisión: Precisión del Equipo

Precisión del Equipo			
<b>Patrón</b>			
Identidad	Indio (metal)		
Lote	WE 9677		
	Peso (mg)	Entalpia de Fusión (mJ)	Entalpia Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]
	6,4180	184,85	28,80
	6,4180	184,09	28,68
	6,4180	184,25	28,71
	6,4180	184,21	28,70
	6,4180	184,51	28,75
	6,4180	184,73	28,78
Media ( $\mu$ )			28,74
Desviación Estándar (s)			0,05
Varianza (s <sup>2</sup> )			0,00
<b>Coefficiente de Variación (%)</b>			<b>0,17</b>
Dato Mínimo			28,68
Dato Máximo			28,80

El Coeficiente de Variación  $CV$  de los factores de respuesta del metal patrón Indio es  $CV : 0,17\%$  , el cual representa la variabilidad de respuesta que el equipo Calorímetro Diferencial de Barrido para la metodología de determinación de Ibuprofeno en tabletas (ver Tabla 3-19).

### **3.5.2. REPETIBILIDAD DE ESTÁNDAR.**

Se determinó la repetibilidad del estándar utilizando estándar de Ibuprofeno al nivel seleccionado de análisis rutinario que representa el 100% y el 50%. Los cuales son 6mg y 3mg de Ibuprofeno respectivamente. Cada nivel tuvo seis repeticiones.

Los termogramas referentes a la repetibilidad del estándar del día 01 están desde la Figura A - 14 hasta la Figura A - 17 del Anexo 04.

Tabla 3-20 Precisión: Repetibilidad del Estándar (Día 01)

## Repetibilidad con Estándar Día 01

Estándar

Ibuprofeno

Lote

ET0802000288

Potencia Base Tal Cual (%)

100,0

### ESTÁNDAR

Nivel	Peso (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]
<b>3 mg</b>	3,1560	414,68	131,39
	3,0120	395,87	131,43
	3,0660	402,72	131,35
	3,0360	391,79	129,05
	3,1680	409,43	129,24
	3,0260	393,39	130,00
Media ( $\mu$ )	3,0773		<b>130,41</b>
Desviación Estándar (s)	0,0680		1,12
Varianza ( $s^2$ )	0,0046		<b>1,26</b>
Coefficiente de Variación (%)	2,21		<b>0,86</b>
Dato Mínimo	3,0120		129,05
Dato Máximo	3,1680		131,43
<b>6 mg</b>	6,0760	793,84	130,65
	6,0080	780,91	129,98
	6,1140	812,96	132,97
	6,1040	807,31	132,26
	6,0680	809,20	133,36
	6,1280	814,61	132,93
Media ( $\mu$ )	6,0830		<b>132,02</b>
Desviación Estándar (s)	0,0432		1,39
Varianza ( $s^2$ )	0,0019		<b>1,92</b>
Coefficiente de Variación (%)	0,71		<b>1,05</b>
Dato Mínimo	6,0080		129,98
Dato Máximo	6,1280		133,36



**Tabla 3-21** Precisión: Repetibilidad del Estándar (Día 01)...Continuación.

<b>Repetibilidad con Estándar Día 01</b>	
<b>COCHRAN</b>	
s <sup>2</sup> Max	1,92
Sumatoria s <sup>2</sup>	3,18
Cochran Calculado	<b>0,6046</b>
Cochran Tabla k: 2, n:6 (α = 0,05)	0,8772
<b>DATOS DE NIVEL 3 mg y 6 mg</b>	
Media (μ) de Nivel 3 mg y 6 mg	131,22
Desviación Estándar (s) de Nivel 3 mg y 6 mg	1,47
Coefficiente de Variación (%) de Nivel 3 mg y 6 mg	<b>1,12</b>

Al observar los datos en la Tabla 3-20 y la Tabla 3-21, la repetibilidad con estándar de Ibuprofeno en el día 01, el coeficiente de variación de los factores de respuesta del nivel de 3 mg es  $CV_{F(Nivel3mg)} : 0,86\%$  , y el nivel de 6 mg es  $CV_{F(Nivel6mg)} : 1,05\%$  , lo cual indica inicialmente que en ambos niveles el comportamiento de la variabilidad del Factor de Respuesta es bastante aceptable.

Para verificar con mayor cantidad de datos la variabilidad del Factor de Respuesta del estándar de Ibuprofeno en el mismo día, fue necesario realizar un contraste de Cochran en el cual se evalúa si no existe variabilidad significativa en el comportamiento de la varianza de ambos niveles. El resultado del contraste de Cochran indica que no existe variabilidad significativa de la varianza entre ambos niveles y por lo tanto los datos de los factores de respuesta del nivel de 3 mg y el nivel de 6 mg pueden utilizarse como si sólo fueran de un nivel. El coeficiente de variación de los factores de respuesta de ambos niveles es  $CV_F : 1,12\%$  ; un valor bastante aceptable para la reproducibilidad del estándar de Ibuprofeno en el día 01.

Los resultados de los coeficientes de variación, tanto de los niveles como el coeficiente de variación de ambos niveles indica que es posible obtener factores de respuesta de preparaciones de estándar repetibles durante el día de análisis en la determinación de la prueba de contenido químico.

Los termogramas referentes a la repetibilidad del estándar del día 02 están desde la Figura A - 18 hasta la Figura A - 21 del Anexo 04.

**Tabla 3-22** Precisión: Repetibilidad del Estándar (Día 02)

## Repetibilidad con Estándar Día 02

<b>Estándar</b>	Ibuprofeno
Lote	ET0802000288
Potencia Base Tal Cual (%)	100,0

### ESTÁNDAR

Nivel	Peso (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]
<b>3 mg</b>	3,1560	414,52	131,34
	3,0280	387,58	128,00
	3,0580	399,34	130,59
	3,1240	405,14	129,69
	3,0740	394,92	128,47
	3,1580	406,29	128,65
Media ( $\mu$ )	3,0997		<b>129,46</b>
Desviación Estándar (s)	0,0542		1,31
Varianza ( $s^2$ )	0,0029		<b>1,73</b>
Coefficiente de Variación (%)	1,75		<b>1,02</b>
Dato Mínimo	3,0280		128,00
Dato Máximo	3,1580		131,34
<b>6 mg</b>	6,0180	782,11	129,96
	6,0700	800,63	131,90
	6,0340	804,50	133,33
	6,1740	800,26	129,62
	6,1940	821,00	132,55
	6,0700	780,54	128,59
Media ( $\mu$ )	6,0933		<b>130,99</b>
Desviación Estándar (s)	0,0734		1,87
Varianza ( $s^2$ )	0,0054		<b>3,48</b>
Coefficiente de Variación (%)	1,20		<b>1,42</b>
Dato Mínimo	6,0180		128,59
Dato Máximo	6,1940		133,33

**Tabla 3-23** Precisión: Repetibilidad del Estándar (Día 02)...Continuación.

<b>Repetibilidad con Estándar Día 02</b>	
<b>COCHRAN</b>	
s <sup>2</sup> Max	3,48
Sumatoria s <sup>2</sup>	5,21
Cochran Calculado	<b>0,6686</b>
Cochran Tabla k: 2, n:6 (α = 0,05)	0,8772
<b>DATOS DE NIVEL 3 mg y 6 mg</b>	
Media (μ) de Nivel 3 mg y 6 mg	130,22
Desviación Estándar (s) de Nivel 3 mg y 6 mg	1,73
Coefficiente de Variación (%) de Nivel 3 mg y 6 mg	<b>1,33</b>

Al observar los datos en la Tabla 3-22 y la Tabla 3-23, en la repetibilidad con estándar de Ibuprofeno, en el día 02, el coeficiente de variación de los factores de respuesta del nivel de 3 mg es  $CV_{F(Nivel3mg)} : 1,02\%$  , y el nivel de 6 mg es  $CV_{F(Nivel6mg)} : 1,42\%$  , lo cual indica inicialmente que en ambos niveles el comportamiento de la variabilidad del Factor de Respuesta es bastante aceptable. Para verificar con mayor cantidad de datos la variabilidad del Factor de Respuesta del estándar de Ibuprofeno en el mismo día, fue necesario realizar un contraste de Cochran en el cual se evalúa si no existe variabilidad significativa en el comportamiento de la varianza de ambos niveles. El resultado del contraste de Cochran indica que no existe variabilidad significativa de la varianza entre ambos niveles y por lo tanto los datos de los factores de respuesta del nivel de 3 mg y el nivel de 6 mg pueden utilizarse como si sólo fueran de un nivel. El coeficiente de variación de los factores de respuesta de ambos niveles es  $CV_F : 1,33\%$  ; un valor bastante aceptable para la reproducibilidad del estándar de Ibuprofeno en el día 02.

Los resultados de los coeficientes de variación, tanto de los niveles como el coeficiente de variación de ambos niveles indica que es posible obtener factores de respuesta de preparaciones de estándar repetibles durante el día de análisis en la determinación de la prueba de contenido químico.

El resumen de los resultados de las evaluaciones de Repetibilidad del Estándar, están en la Tabla 3-24.

**Tabla 3-24** Precisión: Resumen de los Resultados de Repetibilidad del Estándar

Evaluación	Fórmula / Criterios Importantes	Límite Propuesto	Resultado Repetibilidad 01	Resultado Repetibilidad 02
Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta en cada nivel	$CV_{F_k} = s_{F_k} \frac{100}{\bar{F}_k}$	$CV_{F_k} \leq 3,0\%$	$CV_{F(Nivel3mg)} : 0,86\%$	$CV_{F(Nivel3mg)} : 1,02\%$
	$F_k = \frac{\Delta H_{k(mJ)}}{m_{k(mg)}}$		$CV_{F(Nivel6mg)} : 1,05\%$	$CV_{F(Nivel6mg)} : 1,42\%$
Contraste de significación de Homogeneidad de Varianzas	$G_{exp}(s^2) = \frac{(s_{max}^2)_k}{\sum s_k^2}$ $H_1 : s_1^2 \neq s_2^2 \dots \neq s_k^2$ $G_{(\alpha,k,n)}$ $0$ $G_{(\alpha,k,\nu)}$ $\nu = (n_{max} - 1)$	$H_0 : s_1^2 = s_2^2 \dots = s_k^2$ $G_{exp} \leq G_{(\alpha,k,n)}$	$0,6046 \leq 0,8772$	$0,6686 < 0,8772$
Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta de ambos niveles	$H_0 : s_1^2 = s_2^2 \dots = s_k^2$ $CV_F = s_F \frac{100}{\bar{F}}$	$CV_F \leq 3,0\%$	$CV_F : 1,12\%$	$CV_F : 1,33\%$

La variabilidad de los estándares de Ibuprofeno es un leve mayor para el día 02 comparado con el día, tanto para los factores de respuesta de cada nivel como para los factores de respuesta de cada día. Sin embargo ambas variabilidades son aceptables.

### **3.5.3. REPETIBILIDAD DE MUESTRA**

Para determinar la repetibilidad de la muestra se seleccionó un lote de Ibuprofeno 600 mg Tableta, al cual se le determinó el contenido químico utilizando seis preparaciones de la muestra al nivel seleccionado de análisis rutinario que represente el 100%.

Este diseño se realizó dos veces, cada vez en días distintos a fin de utilizar los datos obtenidos para el cálculo de la precisión intermedia de la muestra (reproducibilidad teniendo como variable el día de análisis).

Los termogramas referentes a la repetibilidad de la muestra del día 01 están en la Figura A - 22 y la Figura A - 23 del Anexo 04.

**Tabla 3-25** Precisión: Repetibilidad de la Muestra (Día 01)

## Repetibilidad con Producto Terminado Día 01

Producto	<b>Ibuprofeno Tableta</b>	
Cantidad Rotulada	600	mg/Tab
Peso promedio TEÓRICO de Tableta	1200,12	mg
Peso promedio de Tableta en LOTE	1209,27	mg
Porcentaje de Ibuprofeno teórico de LOTE	100,8	%
<b>LINEALIDAD (Ecuación de la Línea de Estandarización)</b>		
Pendiente (b)	132,24	
Intercepción (a)	-3,18	

### PRODUCTO TERMINADO

Porción de Muestra	Peso porción tab. (mg)	Ibuprofeno Teórico en Porción (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)
1	12,1340	6,0664	771,18	127,12	97,3
2	12,4260	6,2124	816,06	131,36	100,5
3	12,4960	6,2474	817,01	130,78	100,0
4	12,1000	6,0494	804,21	132,94	101,7
5	12,4560	6,2274	828,41	133,03	101,8
6	12,0340	6,0164	798,41	132,71	101,5
Media ( $\mu$ )	12,2743	6,1366	805,88	131,32	<b>100,5</b>
Desviación Estándar (s)	0,2064	0,1032	19,99	2,25	1,7
Coefficiente de Variación (%)	1,68	1,68	2,48	1,72	<b>1,71</b>
Dato Mínimo	12,0340	6,0164	771,18	127,1233	97,3
Dato Máximo	12,4960	6,2474	828,41	133,0271	101,8

En la repetibilidad con muestra de Tabletas de Ibuprofeno, en el día 01, el coeficiente de variación del porcentaje sobre lo rotulado es  $CV_{\% Rot} : 1,71\%$  (ver Tabla 3-25).

El resultado del coeficiente de variación del porcentaje sobre lo rotulado indica que es posible obtener resultados repetibles de Ibuprofeno en tabletas durante el día de análisis de la prueba de contenido químico a fin de determinar el porcentaje sobre lo rotulado de Ibuprofeno.

Los termogramas referentes a la repetibilidad de la muestra del día 02 están en la Figura A - 24 y la Figura A - 25 del Anexo 04.

**Tabla 3-26** Precisión: Repetibilidad de la Muestra (Día 02)

## Repetibilidad con Producto Terminado Día 02

Producto	<b>Ibuprofeno Tableta</b>	
Cantidad Rotulada	600	mg/Tab
Peso promedio TEÓRICO de Tableta	1200,12	mg
Peso promedio de Tableta en LOTE	1209,27	mg
Porcentaje de Ibuprofeno teórico de LOTE	100,8	%
<b>LINEALIDAD (Ecuación de la Línea de Estandarización)</b>		
Pendiente (b)	132,24	
Intercepción (a)	-3,18	

### PRODUCTO TERMINADO

Porción de Muestra	Peso porción tab. (mg)	Ibuprofeno Teórico en Porción (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)
1	12,3080	6,1534	792,84	128,85	98,6
2	12,2200	6,1094	830,47	135,93	104,0
3	12,3260	6,1624	835,81	135,63	103,7
4	12,2960	6,1474	849,08	138,12	105,6
5	12,3700	6,1844	805,49	130,25	99,6
6	12,0540	6,0264	813,85	135,05	103,3
Media ( $\mu$ )	12,2623	6,1306	821,26	133,97	<b>102,5</b>
Desviación Estándar (s)	0,1132	0,0566	20,89	3,61	2,8
Coefficiente de Variación (%)	0,92	0,92	2,54	2,69	<b>2,68</b>
Dato Mínimo	12,0540	6,0264	792,84	128,8462	98,6
Dato Máximo	12,3700	6,1844	849,08	138,1205	105,6

En la repetibilidad con muestra de Tabletas de Ibuprofeno, en el día 02, el coeficiente de variación del porcentaje sobre lo rotulado es  $CV_{\% Rot} : 2,68\%$  (ver Tabla 3-26).

El resultado del coeficiente de variación del porcentaje sobre lo rotulado indica que es posible obtener resultados repetibles de Ibuprofeno en tabletas durante el día de análisis de la prueba de contenido químico a fin de determinar el porcentaje sobre lo rotulado de Ibuprofeno.

El resumen de los resultados de las evaluaciones de Repetibilidad de la Muestra, están en la Tabla 3-27.

**Tabla 3-27** Precisión: Resumen de los Resultados de Repetibilidad de la Muestra

Evaluación	Fórmula / Criterios Importantes	Límite Propuesto	Resultado Repetibilidad 01	Resultado Repetibilidad 02
Coeficiente de Variación de los porcentajes sobre lo rotulado	$\% Rot = \left( \frac{\Delta H_{Mx} - a}{b} \right) \times \frac{P_{Tab}}{m_{Mx}} \times \frac{100}{R_{Tab}}$			
	$y = a + bx$			
	$a : \Delta H_{(mJ)}$	$CV_{\% Rot} \leq 3,0\%$	$CV_{\% Rot} : 1,71\%$	$CV_{\% Rot} : 2,68\%$
	$b : \frac{\Delta H_{(mJ)}}{m_{(mg)}}$			
	$CV_{\% Rot} = s_{\% Rot} \frac{100}{\% Rot}$			

La variabilidad del porcentaje sobre lo rotulado de Ibuprofeno en tabletas es mayor para el día 02 comparado con el día 01. Sin embargo ambas variabilidades son aceptables, ya que son menores que el límite propuesto. (ver Tabla 3-27).



### 3.5.4. REPRODUCIBILIDAD DE ESTÁNDAR (PRECISIÓN INTERMEDIA. VARIABLE: DÍA)

Se utilizaron los datos de las dos repetibilidades efectuadas a fin de determinar la influencia de la variable “día” sobre los factores de respuestas.

**Tabla 3-28** Precisión: Datos de Repetibilidad del Estándar del Día 01 y 02

Reproducibilidad del Estándar (Variable: Día)		
Evaluación Estadística de Repetibilidad 01 y Repetibilidad 02		
ESTÁNDARES	Repetibilidad 01	Repetibilidad 02
Nivel	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]
3 mg	131,39	131,34
	131,43	128,00
	131,35	130,59
	129,05	129,69
	129,24	128,47
6 mg	130,00	128,65
	130,65	129,96
	129,98	131,90
	132,97	133,33
	132,26	129,62
	133,36	132,55
	132,93	128,59
Media ( $\mu$ )	<b>131,22</b>	<b>130,22</b>
Desviación Estándar (s)	1,47	1,73
Varianza ( $s^2$ )	2,15	3,01
Coefficiente de Variación (%)	<b>1,12</b>	<b>1,33</b>
Dato Mínimo	129,05	128,00
Dato Máximo	133,36	133,33

**Tabla 3-29** Precisión: Evaluación Estadística de Reproducibilidad del Estándar

<b>Prueba F para varianzas de dos muestras</b>		
$\alpha$ : 0,05		
	<i>Repetibilidad 01</i>	<i>Repetibilidad 02</i>
Media	131,2175048	130,2238826
Varianza	2,154627319	3,010142129
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	0,715789231	
P(F<=f) una cola	0,294315462	
Valor crítico para F (una cola)	0,35487036	

<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales</b>		
$\alpha$ : 0,05		
	<i>Repetibilidad 01</i>	<i>Repetibilidad 02</i>
Media	131,2175048	130,2238826
Varianza	2,154627319	3,010142129
Observaciones	12	12
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	21	
Estadístico t	1,514559944	
P(T<=t) dos colas	0,144791066	
Valor crítico de t (dos colas)	2,079613837	

La repetibilidad del día 01 presenta una varianza de 2,15 y la repetibilidad del día 02 presenta una varianza de 3,01 de los factores de respuesta de las preparaciones de estándar (ver Tabla 3-28). Ambas varianzas fueron contrastadas estadísticamente mediante una prueba  $F_{\alpha, v_1, v_2}$  de Snedecor, dando como resultado que las varianzas de ambos días son estadísticamente desiguales, por lo tanto, la comparación de los factores de respuesta se realizó tomando en cuenta la desigualdad de las varianzas de ambos días al efectuar su comparación mediante la prueba  $t_{\alpha, v}$  de Student (ver Tabla 3-29).

La prueba de Student refleja que los valores de los factores de respuesta del día 01 y 02 son estadísticamente similares y por lo tanto es posible calcular el coeficiente de variación de los factores de respuesta  $CV_F$  de ambos días, es decir calcular su reproducibilidad tomado como variable el día de la determinación.

**Tabla 3-30** Precisión: Reproducibilidad del Estándar (Variable: Día)

<b>Reproducibilidad del Estándar (Variable: Día)</b>	
<b>ESTÁNDARES</b>	
Nivel	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]
3 mg	131,3942
	131,4309
	131,3503
	129,0481
	129,2393
	130,0033
	131,3435
	127,9987
	130,5886
	129,6863
	128,4710
	128,6542
6 mg	130,6517
	129,9784
	132,9670
	132,2592
	133,3553
	132,9324
	129,9618
	131,8995
	133,3278
	129,6178
	132,5476
	128,5898
Media ( $\mu$ )	<b>130,72</b>
Desviación Estándar (s)	1,65
Coefficiente de Variación (%)	<b>1,26</b>
Dato Mínimo	128,00
Dato Máximo	133,36
Cantidad de Datos (n)	24

El coeficiente de variación de los factores de respuesta de los días 01 y 02 es  $CV_F : 1,26\%$  , resultado muy satisfactorio que refleja la variabilidad de las preparaciones de estándar de un día de análisis hacia otro día de análisis (ver Tabla 3-30).

**Tabla 3-31** Precisión: Límites de Confianza del Factor de Respuesta del Estándar

		<i>Límite de Confianza</i> <i>Inferior</i>	<i>Límite de Confianza</i> <i>Superior</i>
Media ( $\mu$ )	<b>130,72</b>	<b>127,30</b>	<b>134,14</b>
Grados de Libertad (n-1)	23		
Nivel de significación ( $\alpha$ )	0,050		
Estadístico $t_{\alpha, (n-1)}$	2,0687		

Los límites de confianza de los factores de respuesta de los niveles de preparación de estándar a 3mg y 6mg son  $127,30mJ / mg \dots 134,14mJ / mg$  , los cuales indican que cada vez que se efectúe en diversos días una preparación de estándar, el factor de respuesta tiene una probabilidad del 95% de caer dentro de los límites calculados (ver Tabla 3-31).

El resumen de los resultados de las evaluaciones de Reproducibilidad del Estándar, están en la Tabla 3-32.

**Tabla 3-32** Precisión: Resumen de los Resultados de Reproducibilidad del Estándar

Evaluación	Fórmula / Criterios Importantes	Límite Propuesto	Resultado Reproducibilidad
<b>Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas NO iguales</b>	$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$ $t_{\alpha, \nu}$ $\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ $P t_{\text{exp}}  \geq \alpha$	0,145 > 0,05
<b>Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta de Ambos niveles</b>	$CV_F = s_F \frac{100}{\bar{F}}$	$CV_F \leq 5,0\%$	1,26% < 5,0%
<b>Límites de Confianza de los Factores de Respuesta de ambos niveles</b>	$LC(F) = \bar{F} \pm t_{\alpha, \nu} s_F$ $\nu = (n - 1)$	Documentar límites de confianza	127,30...134,14

### 3.5.5. REPRODUCIBILIDAD DE MUESTRA (PRECISIÓN INTERMEDIA. VARIABLE: DÍA)

Se utilizaron los datos de las dos repetibilidades efectuadas a fin de determinar la influencia de la variable día sobre los porcentajes de recuperación.

Tabla 3-33 Precisión: Datos de Repetibilidad de la Muestra (Día 01 y Día 02)

Datos de Repetibilidad de la Muestra (Día 01 y Día 02)		
MUESTRAS	Repetibilidad 01	Repetibilidad 02
	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)
	97,3	98,6
	100,5	104,0
	100,1	103,8
	101,7	105,7
	101,8	99,7
	101,6	103,3
Media ( $\mu$ )	<b>100,5</b>	<b>102,5</b>
Desviación Estándar (s)	1,7	2,8
Varianza ( $s^2$ )	2,9	7,6
Coefficiente de Variación (%)	<b>1,7</b>	<b>2,7</b>
Dato Mínimo	97,3	98,6
Dato Máximo	101,8	105,7

**Tabla 3-34** Precisión: Evaluación Estadística de Reproducibilidad de la Muestra

<b>Prueba F para varianzas de dos muestras</b>		
<b>CI: 0,05</b>		
	<i>Repetibilidad 01</i>	<i>Repetibilidad 02</i>
Media	100,4879237	102,5068213
Varianza	2,945814041	7,572959939
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	0,388991103	
P(F<=f) una cola	0,161659181	
Valor crítico para F (una cola)	0,1980069	
<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales</b>		
<b>CI: 0,05</b>		
	<i>Repetibilidad 01</i>	<i>Repetibilidad 02</i>
Media	100,4879237	102,5068213
Varianza	2,945814041	7,572959939
Observaciones	6	6
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-1,52478061	
P(T<=t) dos colas	0,165822088	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004133	

La repetibilidad del día 01 presenta una varianza de 2,95 y la repetibilidad del día 02 presenta una varianza de 7,57 de los porcentaje sobre los rotulado de Ibuprofeno en tabletas de las preparaciones de muestra (ver Tabla 3-33). Ambas varianzas fueron contrastadas estadísticamente mediante una prueba  $F_{\alpha, v_1, v_2}$  de Snedecor, dando como resultado que las varianzas de ambos días son estadísticamente desiguales, por lo tanto, la comparación de los porcentajes sobre lo rotulado de Ibuprofeno en tabletas se realizó tomado en cuenta la desigualdad de las varianzas de ambos días al efectuar su comparación mediante la prueba  $t_{\alpha, v}$  de Student (ver Tabla 3-34).

La prueba de Student refleja que los valores de los porcentajes sobre lo rotulado de Ibuprofeno en tabletas del día 01 y 02 son estadísticamente similares y por lo tanto es posible calcular el coeficiente de variación de los porcentaje sobre lo rotulado  $CV_{\% Rot}$  de ambos días, es decir calcular su reproducibilidad tomado como variable el día de la determinación.

**Tabla 3-35** Precisión: Reproducibilidad de la Muestra (Variable Día)

<b>MUESTRAS</b>	
Nivel	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)
6 mg	97,3
	100,5
	100,1
	101,7
	101,8
	101,6
6 mg	98,6
	104,0
	103,8
	105,7
	99,7
	103,3
Media ( $\mu$ )	<b>101,5</b>
Desviación Estándar (s)	2,4
Coefficiente de Variación (%)	<b>2,39</b>
Dato Mínimo	97,3
Dato Máximo	105,7
Cantidad de Datos (n)	12



El coeficiente de variación de los porcentaje sobre lo rotulado de Ibuprofeno en tabletas de los días 01 y 02 es  $CV_{\%Rot} : 2,39\%$  , resultado muy satisfactorio que refleja la variabilidad de los resultados de las preparaciones de muestra de un día de análisis hacia otro día de análisis (ver Tabla 3-35).

El resumen de los resultados de las evaluaciones de Reproducibilidad de la Muestra, están en la Tabla 3-36.

**Tabla 3-36** Precisión: Resumen de los Resultados de Reproducibilidad de la Muestra

Evaluación	Fórmula / Criterios Importantes	Límite Propuesto	Resultado Reproducibilidad
<p><b>Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias suponiendo varianzas NO iguales</b></p>	$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$ $t_{\alpha, \nu}$ $\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ $P t_{\text{exp}}  \geq \alpha$	<p>0,166 &gt; 0,05</p>
<p><b>Coeficiente de Variación de los porcentajes sobre lo rotulado</b></p>	$CV_{\%Rot} = s_{\%Rot} \frac{100}{\%Rot}$	$CV_{\%Rot} \leq 5,0\%$	<p>2,39% &lt; 5,0%</p>

### **3.6. RECUPERACIÓN**

Se determinó la recuperación de la metodología en la muestra desde el tratamiento de la muestra, pasando por la etapa de pesada, hasta llegar a la colocación del crisol con la muestra en el Calorímetro Diferencial de Barrido, a través del diseño de la adición de analito Ibuprofeno a la matriz de la tableta. Se utilizaron tres niveles de adición de masa (0,25 0,50 y 075), correspondientes a la fracción de analito (Ibuprofeno) respecto al peso total de tableta.

Los termogramas referentes a la recuperación están desde la Figura A - 26 hasta la Figura A - 28 del Anexo 05.

Tabla 3-37 Recuperación: Datos de Porcentaje de Recuperación

## Validación Recuperación: Adición del Analito a la Matriz

Producto	<b>Ibuprofeno Tableta</b>	
Cantidad Rotulada	600	mg/Tab
Peso promedio TEÓRICO de Tableta	1200,12	mg

### LINEALIDAD (Ecuación de la recta)

Pendiente (b)	132,24
Intercepción (a)	-3,18

### Adición del Analito a la Matriz

Nivel (mg)	Peso porción tab. (mg)	Ibuprofeno Teórico en Porción (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)
3 (Fracción de Analito Correspondiente a 0,25)	12,1580	3,0392	399,08	131,31	100,1
	12,1220	3,0302	399,95	131,99	100,6
	12,0120	3,0027	385,56	128,40	97,9
6 (Fracción de Analito Correspondiente a 0,50)	12,0780	6,0384	766,65	126,96	96,4
	12,1220	6,0604	811,08	133,83	101,6
	12,1160	6,0574	807,09	133,24	101,2
9 (Fracción de Analito Correspondiente a 0,75)	12,0980	9,0726	1214,7	133,89	101,5
	12,0720	9,0531	1202,5	132,82	100,7
	12,0820	9,0606	1215,8	134,18	101,7
Media ( $\mu$ )	12,0956			131,85	<b>100,2</b>
Desviación Estándar (s)	0,0415			2,56	1,8
Coefficiente de Variación (%)	0,34			1,94	<b>1,84</b>
Dato Mínimo	12,0120			126,9625	96,4
Dato Máximo	12,1580			134,1833	101,7
Cantidad de Datos (n)					9

En la Tabla 3-37 se puede observar que el porcentaje sobre lo rotulado de los datos individuales en cada nivel está dentro de los límites propuestos de  $98,0\% \leq \overline{\%R}_k \leq 102,0\%$ . Además en la Tabla 3-38 los resultados promedio de cada nivel  $\overline{\%R}_{Nivel3mg} : 99,5\%$ ,  $\overline{\%R}_{Nivel6mg} : 99,7\%$  y  $\overline{\%R}_{Nivel9mg} : 101,3\%$  : lo cual estima que si se produce un lote de tabletas de Ibuprofeno de la composición cualitativa de excipientes de la matriz de esta prueba de Recuperación, la metodología analítica al utilizar la técnica de calorimetría diferencial de barrido, es capaz de recuperar eficientemente, sin efecto de la matriz, la fracción que se encuentre de Ibuprofeno dentro de la Tableta, es decir desde 0,25 hasta 0,75 respecto al peso promedio de la tableta de Ibuprofeno.

**Tabla 3-38** Recuperación: Porcentajes de Recuperación en cada Nivel

Adición del Analito a la Matriz		
Nivel (mg)	COCHRAN	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)
3 (Fracción de Analito Correspondiente a 0,25)	Media (nivel) ►	99,5
	Varianza (nivel) ►	2,06
6 (Fracción de Analito Correspondiente a 0,50)	Media (nivel) ►	99,7
	Varianza (nivel) ►	8,28
9 (Fracción de Analito Correspondiente a 0,75)	Media (nivel) ►	101,3
	Varianza (nivel) ►	0,29
	$s^2$ Max	8,28
	$\sum s^2$	10,64
	Cochran Calculado	<b>0,7788</b>
	Valor Límite de Cochran según Tabla k:3, n:3 ( $\alpha = 0,05$ )	<b>0,8709</b>

Se puede verificar en el contraste de Cochran que la matriz no ejerce efecto significativo sobre los resultados de porcentaje sobre lo rotulado de Ibuprofeno en tabletas de cada nivel, ya que la variabilidad de los tres niveles reflejada en el Cochran calculado  $G_{exp} : 0,7788$ , es menor que el Cochran de tabla para los niveles y repeticiones realizados  $G_{(\alpha,k,n)} : 0,8709$  (ver Tabla 3-38).

**Tabla 3-39** Recuperación: Evaluación de la Exactitud de los Porcentajes de Recuperación

<b>EXACTITUD</b>	
Grados de Libertad (n-1)	8
Nivel de significación ( $\alpha$ )	0,050
Estadístico $t_{\alpha, (n-1)}$	2,3060
Porcentaje teórico de Recuperación (%)	100,0
Estadístico $t_{exp}$	0,309

Una vez verificado que no existe influencia de la cantidad de masa sobre los porcentajes de recuperación de Ibuprofeno de las matrices en cada nivel, los nueve porcentajes de recuperación se pueden promediar, para obtener un porcentaje de recuperación promedio de los tres niveles de fracción de Ibuprofeno en la tableta, el cual es  $\overline{\%R}_{Nivel3,6,y9mg} : 100,2\%$  (ver Tabla 3-37). A este promedio se le efectuó un contraste  $t_{\alpha, \nu}$  Student con el fin de evaluar si el porcentaje de recuperación promedio de los tres niveles de fracción de Ibuprofeno en la tableta es estadísticamente cercano al 100,0%. El resultado  $t_{exp} : 0,309$  es menor que el  $t_{\alpha, \nu} : 2.3060$ , lo cual indica fuertemente que el porcentaje de recuperación promedio de los tres niveles es igual al 100,0% planteado (ver Tabla 3-39).

**Tabla 3-40** Recuperación: Límites de Confianza de los Porcentaje de Recuperación de los Valores Individuales y Promedio

<b>Límites de Confianza de Valores Individuales de Porcentaje de Recuperación</b>			
		<i>Límite de Confianza Inferior</i>	<i>Límite de Confianza Superior</i>
Media ( $\mu$ )	<b>100,2</b>	<b>95,9</b>	<b>104,4</b>
Desviación Estándar (s)	1,8		
Grados de Libertad (n-1)	8		
Nivel de significación ( $\alpha$ )	0,050		
Estadístico $t_{\alpha, (n-1)}$	2,3060		

<b>Límites de Confianza de Valores Promedio de Porcentaje de Recuperación</b>			
		<i>Límite de Confianza Inferior</i>	<i>Límite de Confianza Superior</i>
Media ( $\mu$ )	<b>100,2</b>	<b>98,8</b>	<b>101,6</b>
Desviación Estándar (s)	1,8		
Cantidad de Datos (n)	9		
Grados de Libertad (n-1)	8		
Nivel de significación ( $\alpha$ )	0,050		
Estadístico $t_{\alpha, (n-1)}$	2,3060		

Los límites de confianza de los de los valores individuales de porcentaje de recuperación de Ibuprofeno en tableta en la preparación de muestra son 95,9%...104,4% , los cuales indican que cada vez que se efectúe una determinación individual de cuantificación de Ibuprofeno en tableta, el porcentaje sobre lo rotulado tiene una probabilidad del 95% de caer dentro de los límites calculados (ver Tabla 3-40).

Los límites de confianza de los de los valores promedio de porcentaje de recuperación de Ibuprofeno en tableta en la preparación de muestra son 98,8%...101,6% , los cuales indican que cada vez que se efectúe una determinación de cuantificación de Ibuprofeno en tableta, el porcentaje promedio sobre lo rotulado tiene una probabilidad del 95% de caer dentro de los límites calculados (ver Tabla 3-40).

El resumen de los resultados de las evaluaciones de Recuperación, están en la Tabla 3-41.

Tabla 3-41 Recuperación: Resumen de los Resultados de Recuperación

Evaluación	Fórmula / Criterios Importantes	Límite Propuesto	Resultado
Porcentaje Promedio de Recuperación de cada nivel	$\%R_k$ $\%R = \left( \frac{\Delta H_{Mx} - a}{b} \right) \times \frac{100}{m_{Mx}}$	$98,0\% \leq \overline{\%R}_k \leq 102,0\%$	$\overline{\%R}_{Nivel3mg} : 99,5\%$ $\overline{\%R}_{Nivel6mg} : 99,7\%$ $\overline{\%R}_{Nivel9mg} : 101,3\%$
Contraste de significación de Homogeneidad de Varianzas	$G_{exp}(s^2) = \frac{(s_{max}^2)_k}{\sum s_k^2}$ $H_1 : s_1^2 \neq s_2^2 \dots \neq s_k^2$ $G_{(\alpha,k,n)}$ $0$ $G_{(\alpha,k,v)}$ $v = (n_{max} - 1)$	$H_0 : s_1^2 = s_2^2 \dots = s_k^2$ $G_{exp} \leq G_{(\alpha,k,n)}$	$0,7788 < 0,8709$
Contraste de significación de Student para la Exactitud	$t_{exp} = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$ $H_0 : \bar{x} = \mu$ $t_{\alpha,v}$ $v = n - 1$	$P t_{exp}  > \alpha$ $0$ $t_{exp} \leq t_{\alpha,v}$	$\overline{\%R}_{Nivel3,6,y9mg} : 100,2\%$ $t_{exp} : 0,309$ $0,309 < 2,3060$
Límites de Confianza de los valores individuales de porcentaje de recuperación	$LC(\%R) = \overline{\%R} \pm t_{\alpha,v} s_{\%R}$ $v = (n_{\%R} - 1)$	Documentar Límites de Confianza	95,9%...104,4%
Límites de Confianza de los valores promedio de porcentaje de recuperación	$LC(\overline{\%R}) = \overline{\%R} \pm t_{\alpha,v} \times \frac{s_{\%R}}{\sqrt{n}}$ $v = (n_{\%R} - 1)$	Documentar Límites de Confianza	98,8%...101,6%

### 3.7. COMPARACIÓN DE METODOLOGÍA DSC Y METODOLOGÍA PHLC

Se contrastó si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos utilizando la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido y la técnica cromatográfica de la Farmacopea Estadounidense, comparando los resultados de las metodologías utilizando una evaluación estadística  $t_{\alpha,v}$  Student sobre los promedios del porcentaje sobre lo rotulado de cada metodología.

Los termogramas referentes a la determinación de Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, están desde la Figura A - 29 hasta la Figura A - 33 del Anexo 06.

Se puede verificar en la Tabla 3-42, que los resultados individuales de Contenido Químico a través del DSC de los 5 lotes evaluados se encuentran en el rango del 95,4% al 103,3% lo cual representa un coeficiente de variación de 2.56% para los 10 resultados individuales, variación que es muy aceptable tomando en cuenta lo pequeña cantidad de porción de muestra pesada, la cual oscila alrededor de 12 mg. Estos lotes presentan resultados promedios de Contenido Químico alrededor del 100%, siendo el resultado promedio más bajo 97,8% y el resultado promedio más alto 101,8. Tanto los resultados individuales como los resultados promedio de Contenido Químico reflejan un desempeño muy bueno de la metodología DSC para la cuantificación del Ibuprofeno en tabletas, ya que se encuentran dentro de lo especificado por las farmacopeas, que el Contenido Químico de las Tabletas de Ibuprofeno debe estar dentro del rango del 90,0% al 110,0%



Tabla 3-42 Determinación de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC

## Determinación de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC

Producto	<b>Ibuprofeno Tableta</b>	
Cantidad Rotulada	600	mg/Tab
Peso promedio TEÓRICO de Formulación de Tableta	1200,12	mg
Fracción de Ibuprofeno en formulación de Tableta	0,499950	

### LINEALIDAD (Ecuación de la recta)

Pendiente (b)	132,24
Intersección (a)	-3,18

### PRODUCTO TERMINADO

Lote	Peso Promedio Tableta (mg)	Porcentaje Teórico de Lote (%)	Peso porción tab. (mg)	Entalpía de Fusión (mJ)	Entalpía Normalizada de Fusión (mJ/mg) [Factor de Respuesta]	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)	Media Lote (%)
09060042	1206	100,5	12,0700	795,75	131,87	100,6	100,7
			12,1000	799,47	132,16	100,8	
10020202	1202	100,2	12,3080	792,84	128,85	98,0	100,7
			12,2200	830,47	135,93	103,3	
10060124	1201	100,1	12,4600	782,00	125,53	95,4	97,8
			12,3200	811,76	131,79	100,1	
10070102	1198	99,8	12,0100	772,46	128,65	97,5	100,0
			12,2300	826,89	135,24	102,5	
10110217	1200	100,0	12,0940	820,99	135,78	103,1	101,8
			12,1240	802,43	132,38	100,5	
Media ( $\mu$ )			12,1936	803,51	131,82	100,2	100,2
Desviación Estándar (s)			0,1393	19,05	3,39	2,6	1,5
Coefficiente de Variación (%)			1,14	2,37	2,57	2,56	1,50
Dato Mínimo			12,0100	772,46	125,5342	95,4	97,8
Dato Máximo			12,4600	830,47	135,9334	103,3	101,8

Tabla 3-43 Datos de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC y HPLC

<b>Datos de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC y HPLC</b>		
<b>Determinación de Contenido Químico</b>	<b>DSC</b>	<b>HPLC</b>
Lote	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)	Porcentaje sobre lo Rotulado (%)
09060042	100,7	99,8
10020202	100,7	100,2
10060124	97,8	100,3
10070102	100,0	97,7
10110217	101,8	101,7
Cantidad de Datos (n)	5,0	5,0
Media ( $\mu$ )	<b>100,2</b>	<b>99,9</b>
Desviación Estándar (s)	1,5	1,4
Varianza (s <sup>2</sup> )	2,2	2,1
Coefficiente de Variación (%)	<b>1,5</b>	<b>1,4</b>
Dato Mínimo	97,8	97,7
Dato Máximo	101,8	101,7

Se puede verificar en Tabla 3-43 que los datos promedios de los 5 lotes son similares. La media de los datos de cada lote en las metodologías de Calorimetría Diferencial de Barrido y Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia indican que existe una similitud de los resultados; además, los parámetros que miden la precisión de los datos, como lo es la desviación estándar, varianza, coeficiente de variación, dato mínimo y máximo, indican y sugieren fuertemente una similitud de los resultados independientemente la metodología que se utilice.

**Tabla 3-44** Evaluación Estadística de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC y HPLC

<b>Prueba F para varianzas de dos muestras</b>		
<b>CI: 0,05</b>		
	<i>DSC</i>	<i>HPLC</i>
Media	100,2	99,94
Varianza	2,215	2,083
Observaciones	5	5
Grados de libertad	4	4
F	1,063370139	
P(F<=f) una cola	0,476973273	
Valor crítico para F (una cola)	6,388232909	
<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales</b>		
<b>CI: 0,05</b>		
	<i>DSC</i>	<i>HPLC</i>
Media	100,2	99,94
Varianza	2,215	2,083
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	2,149	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	0,280430434	
P(T<=t) dos colas	0,786262568	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004133	

Los resultados de porcentaje sobre lo rotulado de Ibuprofeno a través de la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido presentan una varianza de 2,22 y los resultados a través de la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia presentan una varianza de 2,08 (ver Tabla 3-43). Ambas varianzas fueron contrastadas estadísticamente mediante una prueba  $F_{\alpha, v_1, v_2}$  de Snedecor, dando como resultado que las varianzas de los resultados bajo las técnicas de Calorimetría Diferencia de Barrido y Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia son estadísticamente iguales, por lo tanto, la comparación de los porcentajes sobre lo rotulado de Ibuprofeno en tabletas se realizó tomando en cuenta la igualdad de las varianzas de ambos días al efectuar su comparación mediante la prueba  $t_{\alpha, v}$  de Student (ver Tabla 3-44).

Al efectuar la prueba de Student se obtiene que  $0,786 \gg 0,05$ , es decir  $P|t_{\text{exp}}| \gg \alpha$ , y por lo tanto a prueba sugiere fuertemente que los resultados de los porcentajes sobre lo rotulado de Ibuprofeno en tabletas de los lotes analizados a través de las técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido y Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia son estadísticamente similares y se acepta la hipótesis nula  $H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$  de que los resultados son similares independientemente de su técnica. Por lo tanto es posible efectuar la determinación de Contenido Químico a través de ambas metodologías y obtener resultados estadísticamente similares (ver Tabla 3-44).

El resumen de los resultados de la evaluación de Comparación Metodología DSC Y Metodología HPLC, están en la Tabla 3-45.

**Tabla 3-45** Resumen de los Resultados de la Comparación Estadística de la Metodologías DSC y HPLC

Evaluación	Fórmula / Criterios Importantes	Límite Propuesto	Resultado
<b>Contraste de significación de Student para la Comparación de dos Medias (metodologías) suponiendo varianzas iguales</b>	$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$ $s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$ $t_{\alpha, \nu}$ $\nu = n_1 + n_2 - 2$	$H_0 : \bar{x}_1 = \bar{x}_2$ $P t_{\text{exp}}  \geq \alpha$	$0,786 \gg 0,05$

## **4. CONCLUSIONES**

- Al evaluar la factibilidad de la utilización de la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido para la determinación de Contenido Químico en Tabletas de Ibuprofeno, se pudo verificar en los diversos parámetros de exploración, que es posible proseguir con los parámetros de validación de la metodología analítica utilizando esta técnica calorimétrica, ya que la pureza del Ibuprofeno no disminuye significativamente a pesar de los parámetros de calentamiento. Además, los resultados preliminares del porcentaje sobre lo rotulado de Ibuprofeno están dentro del rango del 90,0% y 110,0% que especifica la prueba de contenido químico de las farmacopeas. Y en último lugar se puede constatar preliminarmente que la matriz no afecta significativamente los resultados de contenido químico de Ibuprofeno en las tabletas, ya que tanto estándares como muestras poseen una respuesta estadísticamente similar dentro de la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido.
  
- Los parámetros de exploración permitieron establecer que para el Desarrollo de la Metodología Analítica de determinación de Ibuprofeno en Tabletas, los parámetros de operación del Calorímetro Diferencial de Barrido fueron seleccionados apropiadamente para efectuar posteriormente los diferentes parámetros de validación analítica de la metodología para determinación de Contenido Químico de Ibuprofeno en Tabletas.
  
- Los resultados del parámetro de validación de Especificidad permiten establecer que durante el análisis de Ibuprofeno en las tabletas correspondientes a la formulación en estudio, la matriz no presentará señal de interferencia alguna, tanto para un lote de Ibuprofeno Tabletas recién elaborado, como para un lote de Ibuprofeno Tabletas en estudio de estabilidad con condiciones estresantes. Esto permite cuantificar al Ibuprofeno sin interferencia alguna utilizando la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido para la formulación en estudio.

- Los resultados del parámetro de validación de Linealidad establecen que durante el análisis de Ibuprofeno en las tabletas, la respuesta de entalpía de fusión es directamente proporcional a la cantidad de ibuprofeno en el rango de 2 mg a 10 mg que se encuentren dentro del crisol del DSC; y además sin sesgo significativo alguno. Estas aseveraciones provienen de las diversas pruebas efectuadas durante el parámetro de validación, en donde el coeficiente de correlación, coeficiente de variación de los factores de respuesta, y el contraste de significación de la pendiente respaldan sólidamente la proporcionalidad lineal de la entalpía de fusión con la cantidad de Ibuprofeno. El contraste de significación de la ordenada en el origen y los límites de confianza de la ordenada en el origen respaldan también sólidamente que la respuesta de la proporcionalidad lineal está libre de sesgo, ya que estadísticamente se ha demostrado que no existe respuesta de entalpía de fusión cuando no hay cantidad alguna de Ibuprofeno en el Calorímetro Diferencial de Barrido.
- En los parámetros de validación de límite de detección y límite de cuantificación, los resultados estimados reflejan que es posible detectar con reproducibilidad y certeza estadística una cantidad de Ibuprofeno mínima de aproximadamente 0,3 mg de Ibuprofeno. Además es posible cuantificar con reproducibilidad y certeza estadística una cantidad de Ibuprofeno mínima de aproximadamente 1,0 mg que se encuentren dentro del crisol de aluminio del DSC.
- Los resultados de la Precisión ratifican que es posible obtener datos repetibles y reproducibles tanto para la preparación del estándar como para la preparación de la muestra. En primer lugar se puede verificar a través de los datos de la precisión del equipo, que la variación que otorga el calorímetro diferencial de barrido es bastante baja, lo cual indica que la variabilidad de la metodología de contenido químico en el DSC depende de variabilidad de la preparación de estándar y preparación de muestra.

- Los resultados repetibles de la precisión están sustentados en la baja dispersión de los datos de la repetibilidad de los estándares tanto en los niveles individuales como en el cálculo de la variabilidad de todos los niveles. Además de la repetibilidad de los estándares, la repetibilidad de la preparación de la muestra es aceptablemente baja, ya que a pesar de que la preparación de la muestra se ha pesado en una microbalanza, los resultados han sido lo suficientemente cercanos para poder concluir que poseen una variabilidad aceptable en un análisis cuantitativo rutinario. Lo cual lleva a deducir que la variabilidad de los datos de la preparación de la muestra están mayormente influenciados durante la etapa de pesaje que en la etapa de los “registros” en el calorímetro diferencial de barrido, ya que la variabilidad del equipo es muy baja como para influenciar significativamente en los resultados de la preparación de muestra.
- Los resultados reproducibles de la precisión están sustentados en la poca dispersión de los datos de reproducibilidad de la preparación de estándares en diferentes días de trabajo, lo cual indica que es posible obtener respuestas de entalpía reproducibles en diferentes días de preparación de estándar. Por otra parte la reproducibilidad de las preparaciones de muestra es muy aceptable, ya que permite establecer que la metodología es capaz de ofrecer datos consistentes de varios lotes de Ibuprofeno Tableta que se analicen en diversos días.
- El parámetro de recuperación posee resultados muy satisfactorios a través de las diferentes pruebas estadísticas a las que fue sometida una representación de la preparación de muestra a través de la adición de analito a la matriz de la tableta. En primer lugar cada preparación de muestra con diferente fracción de analito (0,25...0,50...0,75) respecto al peso promedio de tableta, presenta datos de recuperación dentro del 98,0% al 102,0% sobre lo rotulado de la fracción de analito en la preparación de muestra; lo cual demuestra que la metodología es capaz de recuperar cualquier cantidad de analito que se encuentre presente dentro los rangos de fracción experimentado, lo cual es respaldado por la prueba de homogeneidad de varianzas de los diferentes niveles de fracción de analito.



- En el parámetro de recuperación es también posible concluir que los porcentajes de recuperación individuales como los porcentajes de recuperación promedios se encontrarán con un grado de confianza bastante alto, dentro del rango de aceptación que especifican las farmacopeas para los lotes de Ibuprofeno Tabletas producidos correctamente. Aún, la metodología es capaz de cuantificar con alto grado de exactitud la cantidad de Ibuprofeno en lotes de tabletas que no hayan sido producidos correctamente y que por alguna razón haya habido equivocación en la fracción de Ibuprofeno en las tabletas durante su producción, pues la metodología es capaz de cuantificar con mucha exactitud fracciones de Ibuprofeno del 0,25 al 0,75 dentro de la tableta. Lo mismo aplica también para el análisis de lotes de Ibuprofeno Tableta en estudios de estabilidad, ya sea estudios de seguimiento o estudios en condiciones estresantes; la cuantificación de Ibuprofeno será muy exacta debido a su buen porcentaje de recuperación, sumado también que no existe interferencia de la matriz como se pudo verificar con el parámetro de especificidad.
- Los resultados del parámetro de comparación estadística de las metodologías analíticas, una que utiliza como técnica la calorimetría diferencial de barrido y la otra la técnica convencional de cromatografía de líquidos de alta eficiencia, hacen posible concluir que es posible utilizar indistintamente ambas metodologías, ya que la variabilidad de los resultados promedio de contenido químico de cada lote son similares en ambas metodología, y además los valores de los resultado promedio son similares. Todo ello está respaldado por la inferencia estadística de la prueba  $t_{\alpha, v}$  de Student que compara las medias de dos poblaciones de datos.
- Se concluye que la metodología analítica utilizando la técnica de calorimetría diferencial de barrido es válida para la determinación de contenido químico de Ibuprofeno Tableta, ya que todos los parámetros de la validación ratifican que es posible cuantificar con una exactitud y precisión confiables la cantidad de Ibuprofeno presente en la formulación de tableta, sin interferencia alguna de la matriz y sin sesgo alguno; tanto para los lotes de Ibuprofeno Tableta producidos como para los lotes es estudios de estabilidad en condiciones de estantería o en condiciones estresantes.

- La metodología analítica de cuantificación de contenido químico a través de calorimetría diferencial de barrido es válida para la fórmula cualitativa y cuantitativa de la empresa donde se efectuó el estudio de validación. Lo cual no significa que sea exclusiva, sino que es necesario determinar a través de parámetros de validación si formulaciones de Ibuprofeno Tableta de otras marcas presentan resultados exactos y precisos libres de interferencias debido a excipientes, bajo los parámetros de operación del DSC de esta metodología para la prueba de Contenido Químico.

## **5. RECOMENDACIONES**

Se recomienda:

- Aplicar la metodología analítica de cuantificación de contenido químico a través de la calorimetría diferencial de barrido a los lotes producidos y estudio de estabilidad de Ibuprofeno Tabletas de la empresa donde realizó el estudio, si se quiere determinar de una manera rápida y confiable, debido a su exactitud y precisión, la cantidad de Ibuprofeno presente en tabletas; utilizando una metodología libre de solventes, y libre de operaciones que implican el uso de material volumétrico.
- Determinar a través de parámetros de validación si formulaciones de Ibuprofeno Tableta de otras marcas presentan resultados exactos y precisos y además libres de interferencias debido a excipientes, bajo los parámetros de operación del calorímetro diferencial de barrido en la presente metodología, haciendo los ajustes necesarios para poder aplicar el uso de la técnica calorimétrica como una alternativa de cuantificación a las metodologías presentadas en las farmacopeas.
- Aplicar los parámetros de validación realizados en el presente trabajo de a otras tabletas con diferentes principios activos que presenten una señal de fusión de sus cristales, para poder optar a una metodología en el calorímetro diferencial de barrido que les ofrezca las ventajas de una metodología libre de solventes y libre de operaciones que implica el uso de material volumétrico.
- Efectuar estudios de aplicación farmacéutica con el calorímetro diferencial de barrido a fin de ampliar el uso de esta técnica frente a las técnicas convencionales de cromatografía de líquidos y espectrofotometría, en todas las pruebas farmacéuticas que sea posible y factible aplicar esta técnica.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Riley, Christopher. *Development and Validation of Analytical Methods*. Elsevier Science. First Edition. 1996.
2. Fajgelj, A. *Principles and Practices of Method Validation*. Royal Society of Chemistry. 2000.
3. Ford, James. *Thermal Analysis and Calorimetry of Pharmaceuticals*. Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. Vol. 4, Chapter 17. Elsevier Science. 1999.
4. Craig, Duncan. *Thermal Analysis Of Pharmaceuticals*. CRC Press Taylor & Francis Group. 2007
5. D. Giron and C. Goldbronn. *Use Of DSC And TG For Identification And Quantification Of The Dosage Form*. Journal of Thermal Analysis, Vol. 48 (1997) 473-483
6. By Lu, Jinfang; Wang, Miaozen; Wu, Anfan; Qiu, Xiuyuan. *Determination of Ibuprofen in Tablets by Differential Scanning Calorimetry*. Shanghai Yike Daxue Xuebao (1990), 17(4), 275-7.
7. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Edición 30.
8. Higuchi, Takeru. *Pharmaceutical Analysis*. InterScience, New York. 1961
9. Pradeau. *Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos*. Editorial Limusa. México. 2001
10. Hidalgo y Mondragón. *Farmacía Química*. Alhambra, Madrid. 1969.
11. Silberberg. *Chemistry*. Editorial McGraw-Hill. Primera edición. 1996.
12. Levine, Ira. *FisicoQuímica*. Editorial McGraw-Hill. Quinta edición. 2004
13. Maron, Samuel. *Fundamentos de FisicoQuímica*. Editorial Limusa. 2012.
14. Castellan, Gilbert. *Fisicoquímica*. Editorial Addison-Wesley. Segunda edición. 1988.
15. Harris, Daniel. *Análisis Químico Cuantitativo*. Editorial Reverté. Tercera Edición. 2007.
16. Asociación Española De Farmacéuticos De La Industria. *Validación De Métodos Analíticos*. Castro Cels, Marta.
17. International Conference On Harmonisation. *Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)*. 2005.
18. Montgomery, Douglas. *Diseños y Análisis de Experimentos*. Limusa-Wiley, México. 2005
19. Massart, D.L.. *Chemometrics: A Textbook*. Elsevier Science Publishers B.V.. 1988.
20. Miller, James. *Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica*. Pearson Educación S.A. Madrid. 2002.

## **ANEXOS**

## **Anexo 01**

**Metodología Analítica de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC  
(Parámetros de Operación del equipo DSC)**

---

Ibuprofeno Tab Contenido

---

Method : Ibuprofeno Tab Contenido, 22.05.2010 09:50:29  
Created by : METTLER  
Sample Holder : Aluminum Standard 40ul  
TA Technique : DSC  
Start Temperature: 40 °C  
End Temperature : 90 °C

Sample

Preparation

Pesar en un crisol la cantidad de Materia Prima. Sellar el crisol. Usar como referencia un crisol sellado.

Range of Weight: 0 - 15 mg

Sampling Interval: 1 s

Insert Temperature

Automatic

Remove Temperature

Automatic

No Hold

Segment 1

Start temp : 40 °C

End temp : 90 °C

Heating rate : 5 °C/ min

Gas : Air, 0 ml/min

Synchronization enabled

Figura A - 1 Metodología Analítica de Contenido Químico de Ibuprofeno Tableta en DSC (Parámetros Operativos)



## **Anexo 02**

### **Termogramas de Especificidad**

^exo

Ibuprofeno Tab Selectividad Matriz 00

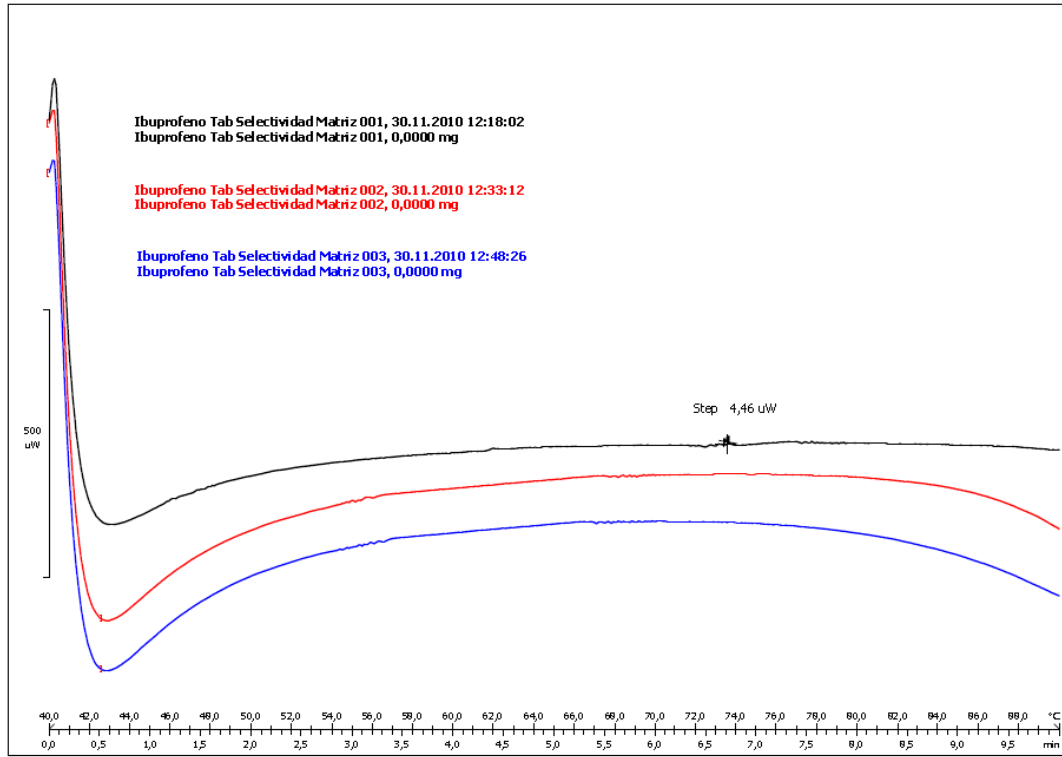


Figura A - 2 Especificidad: Termogramas de la matriz

^exo

Ibuprofeno Tab Selectividad Matriz 01

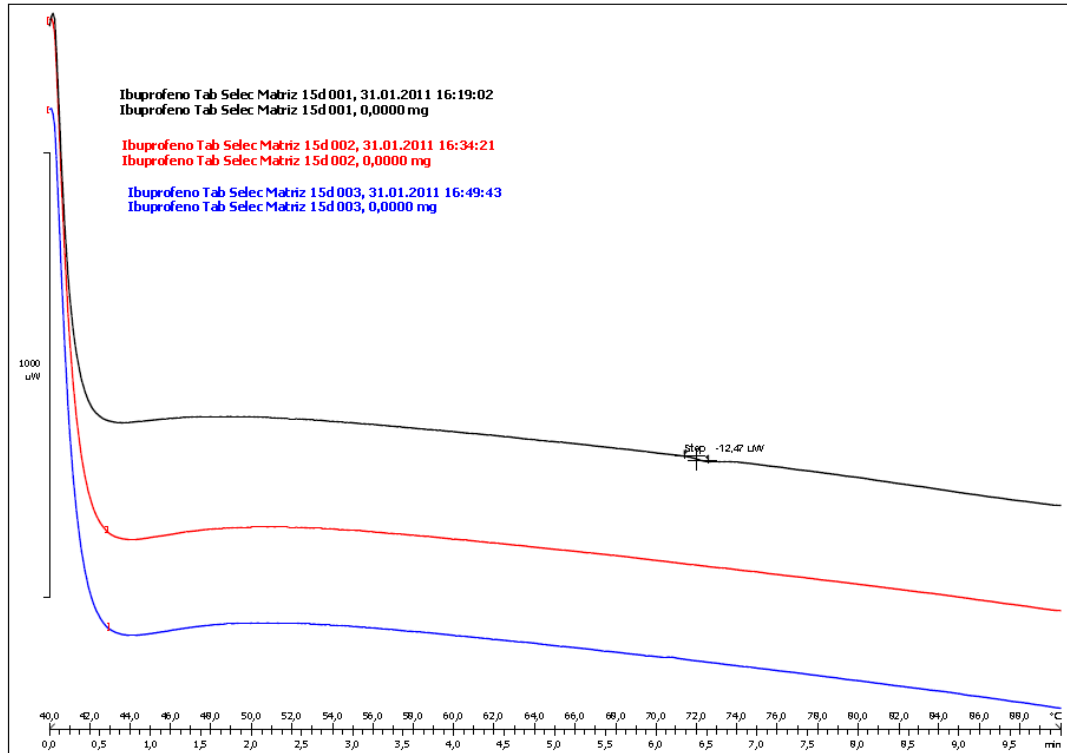


Figura A - 3 Especificidad: Termogramas de Matriz luego de haber sido expuesta a 80°C durante 15 días.

## **Anexo 03**

### **Termogramas de Linealidad y Rango**

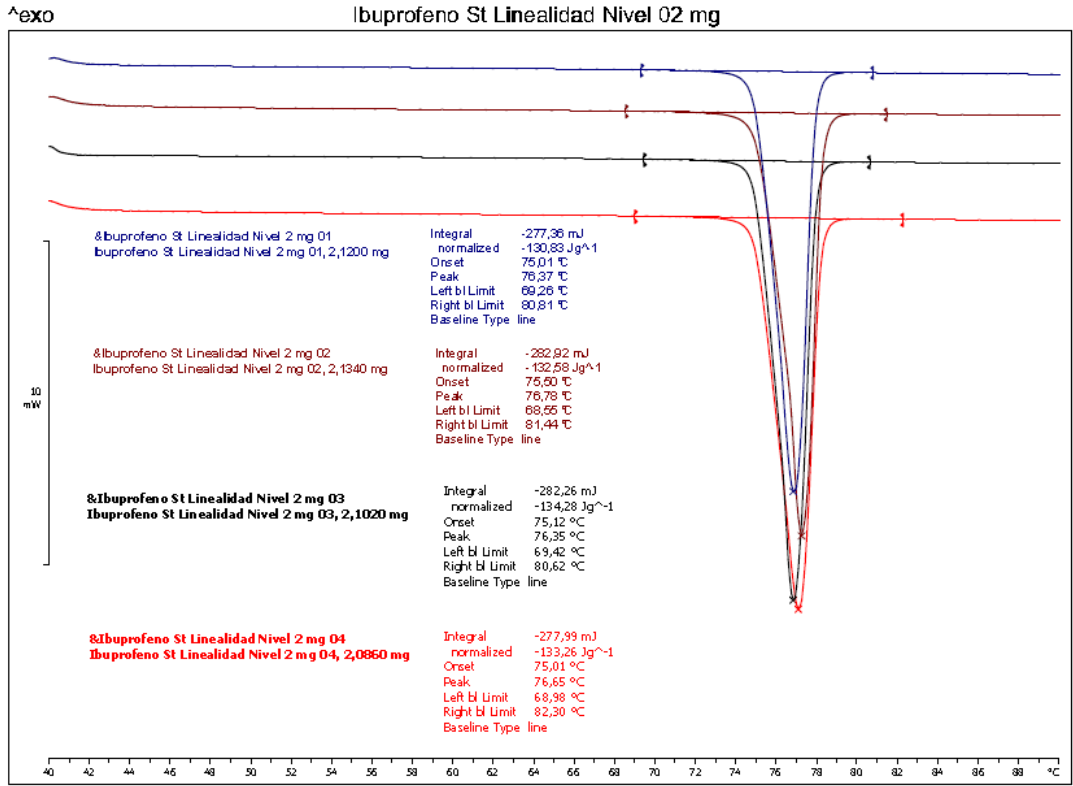


Figura A - 4 Linealidad: Termogramas del Nivel de 2 mg

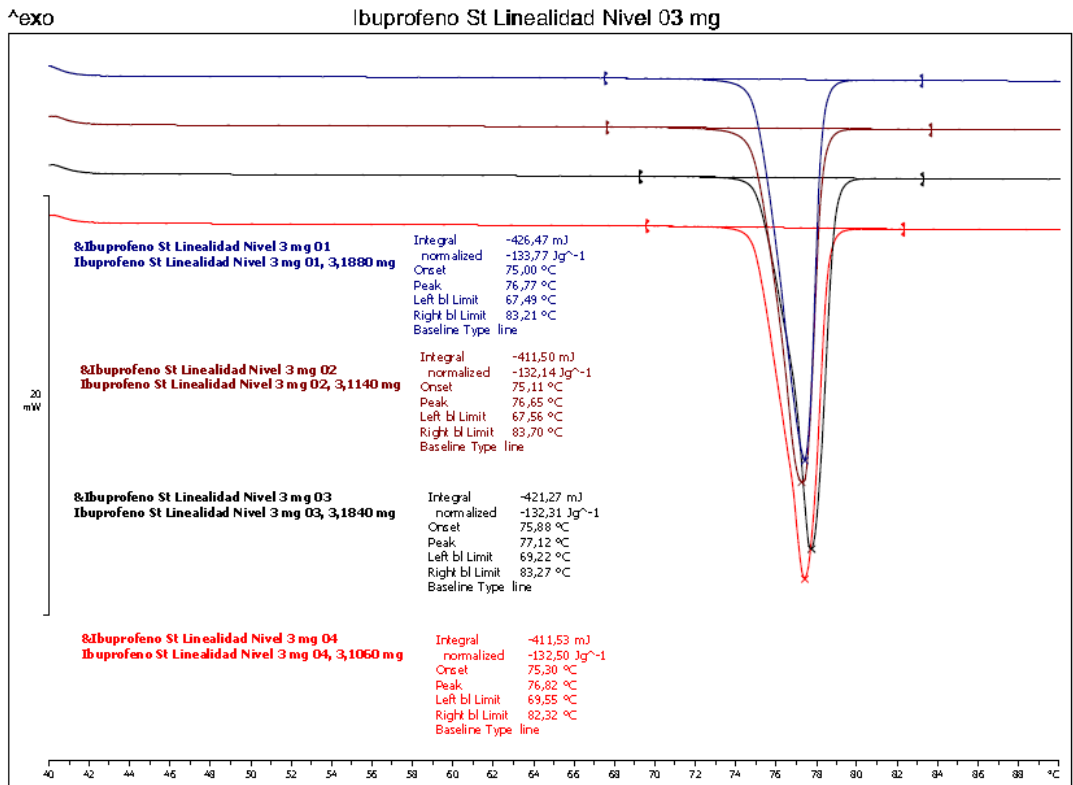


Figura A - 5 Linealidad: Termogramas del Nivel de 3 mg

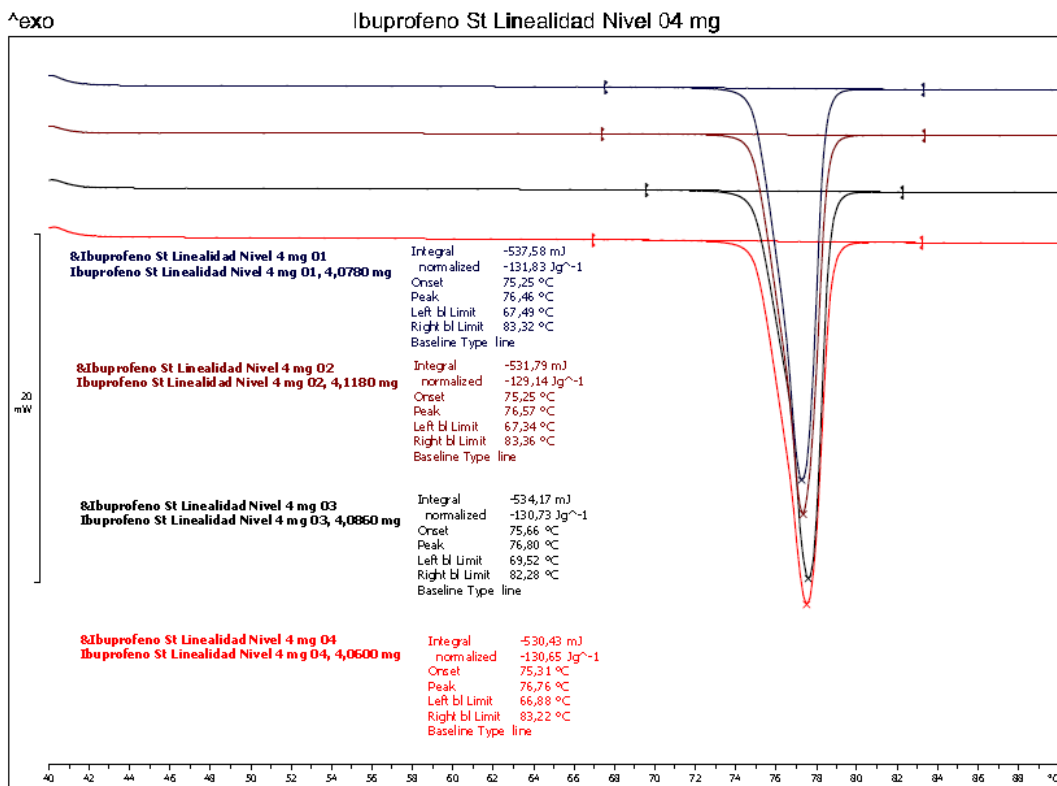


Figura A - 6 Linealidad: Termogramas del Nivel de 4 mg

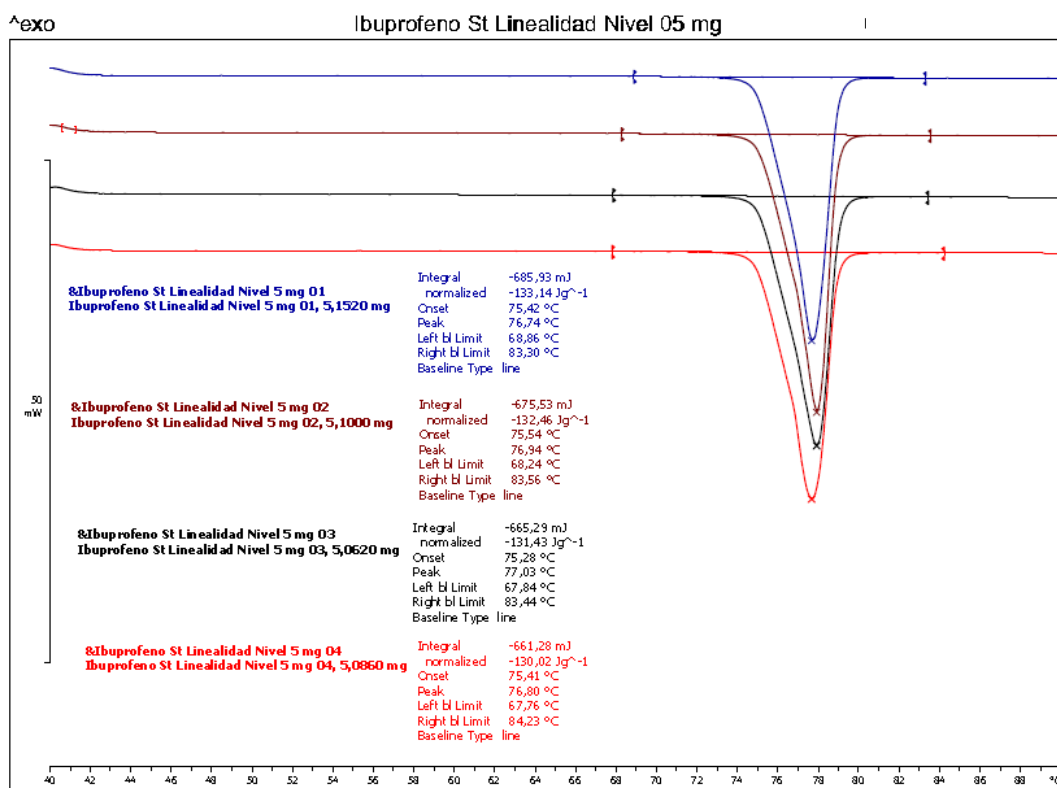


Figura A - 7 Linealidad: Termogramas del Nivel de 5 mg

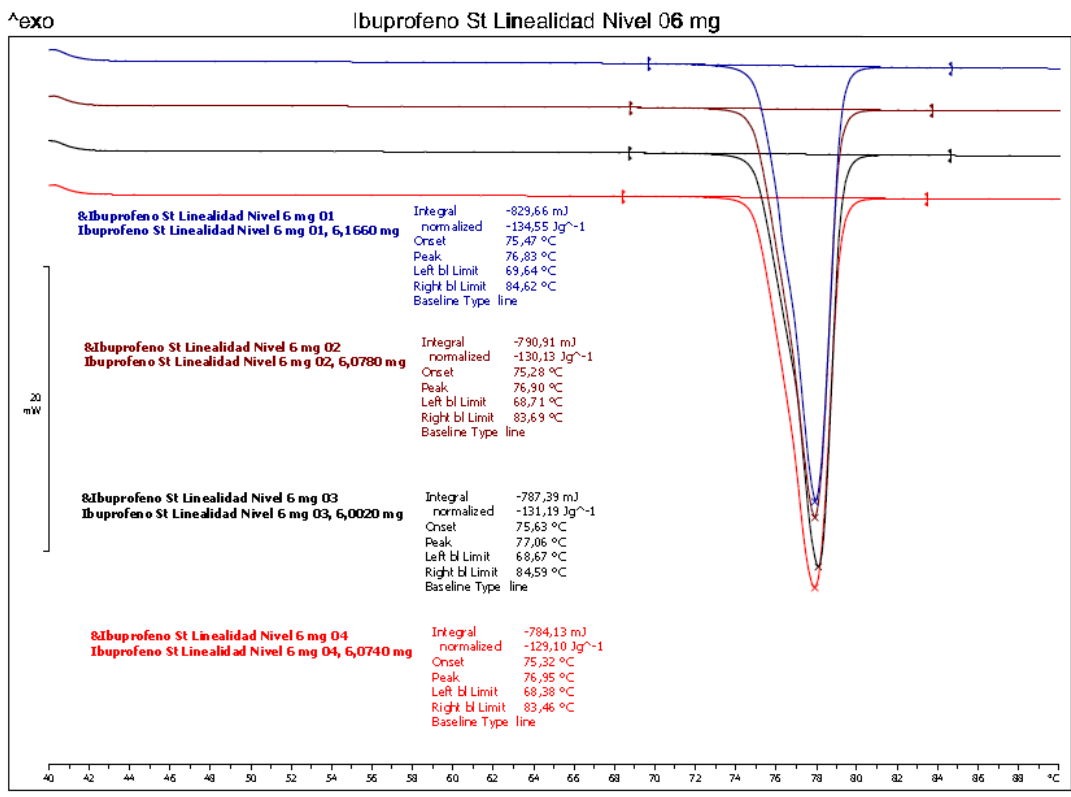


Figura A - 8 Linealidad: Termogramas del Nivel de 6 mg

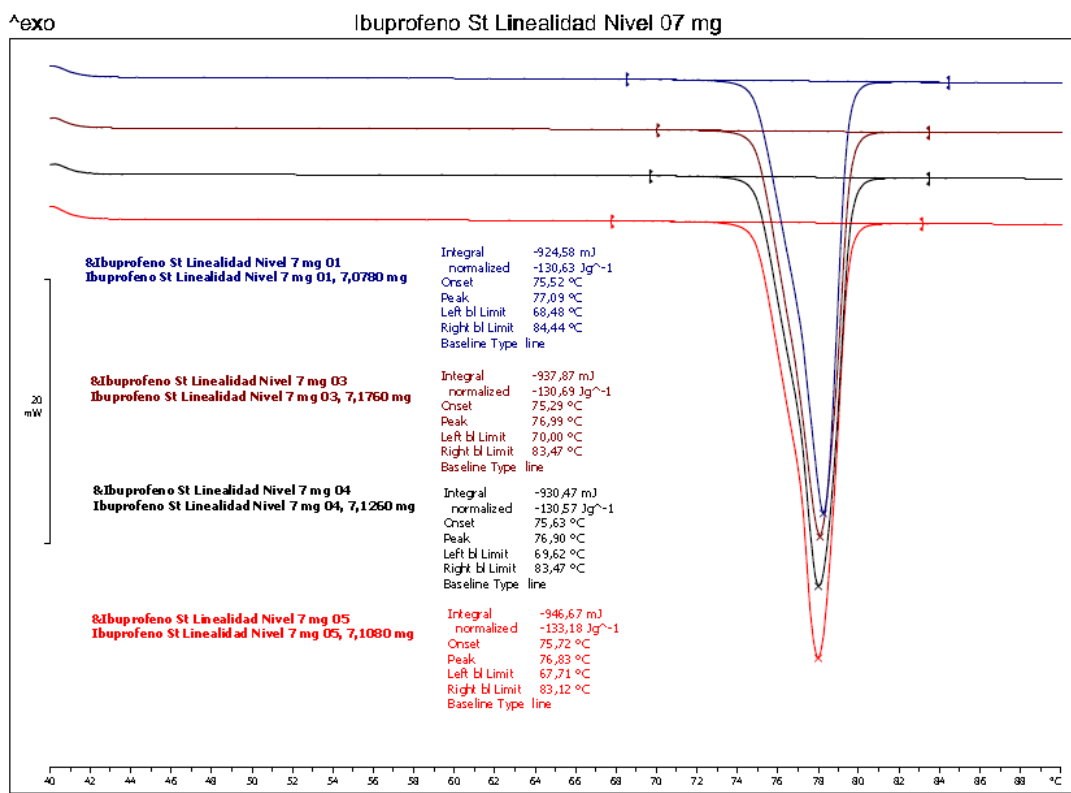


Figura A - 9 Linealidad: Termogramas del Nivel de 7 mg

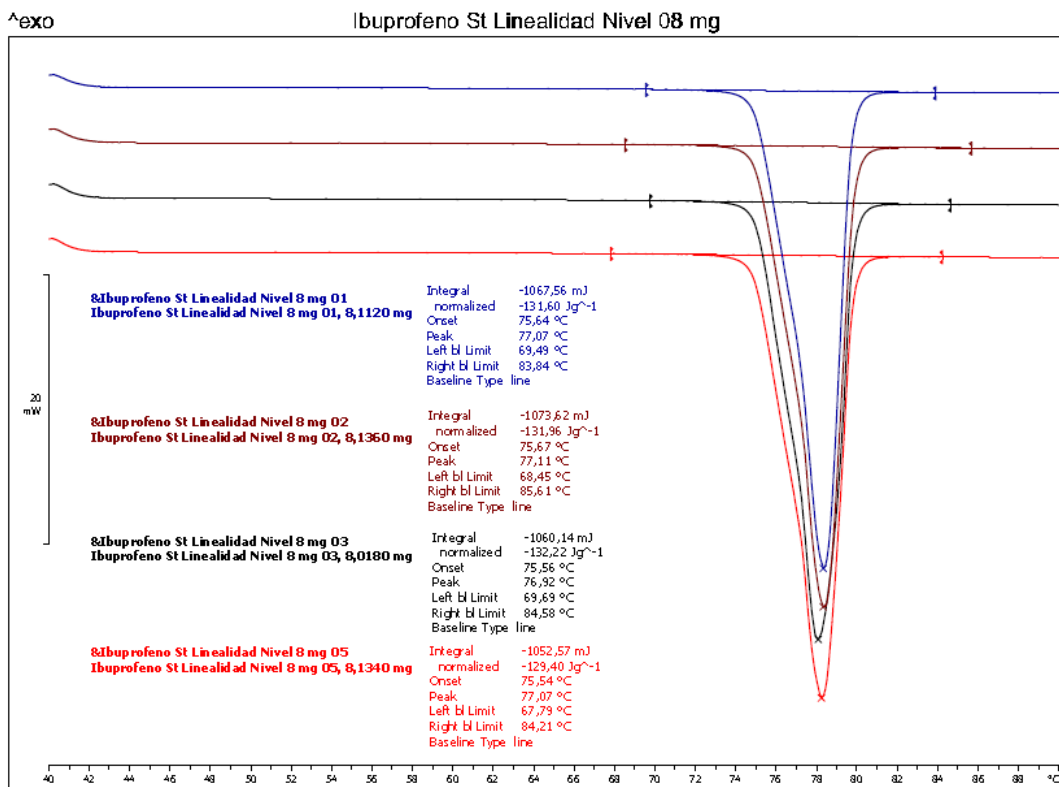


Figura A - 10 Linealidad: Termogramas del Nivel de 8 mg

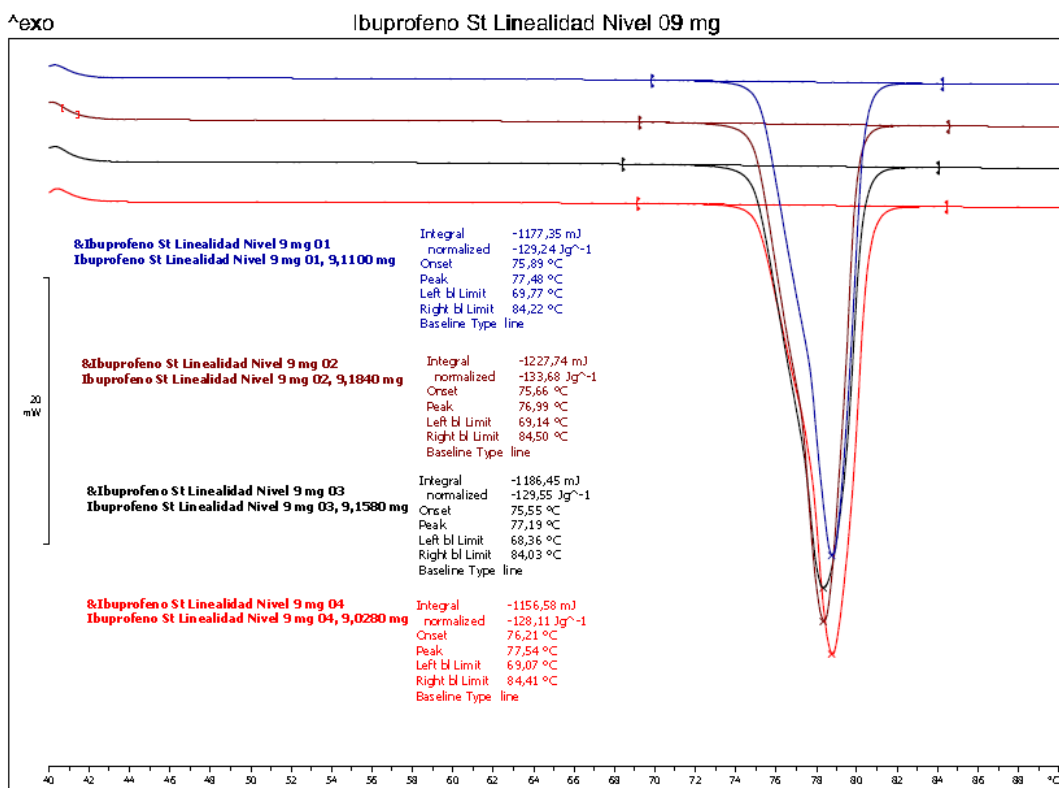


Figura A - 11 Linealidad: Termogramas del Nivel de 9 mg

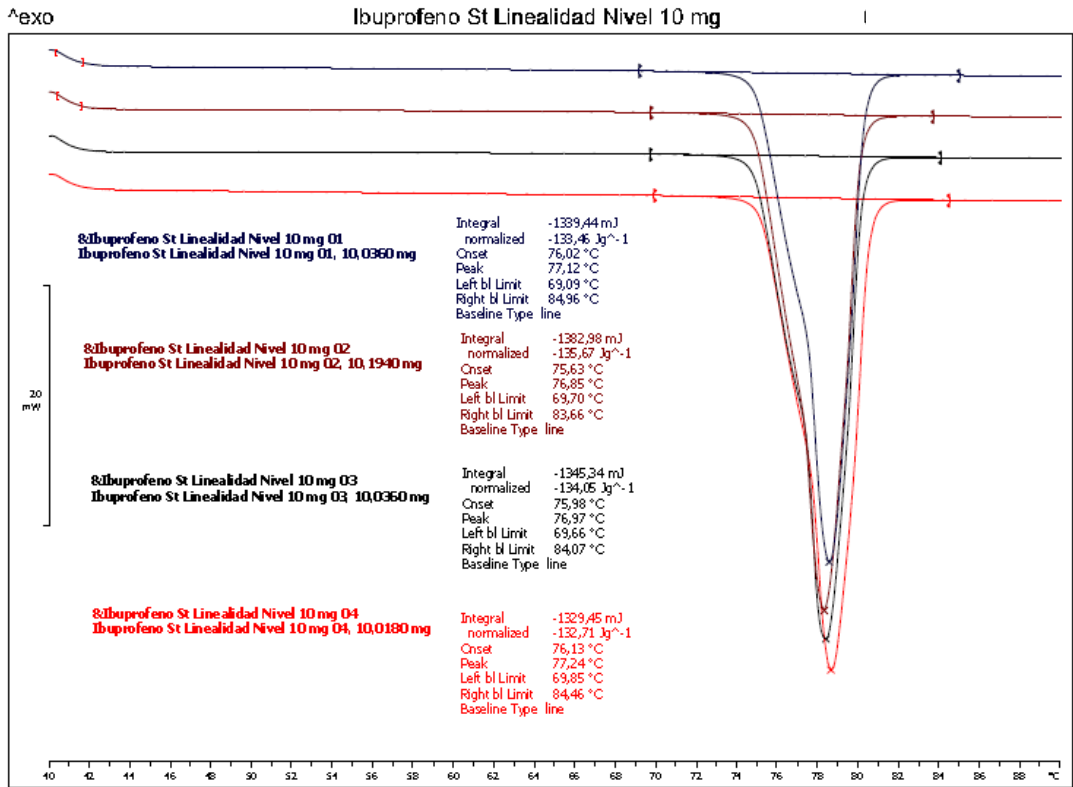


Figura A - 12 Linealidad: Termogramas del Nivel de 10 mg



## **Anexo 04**

### **Termogramas de Precisión**

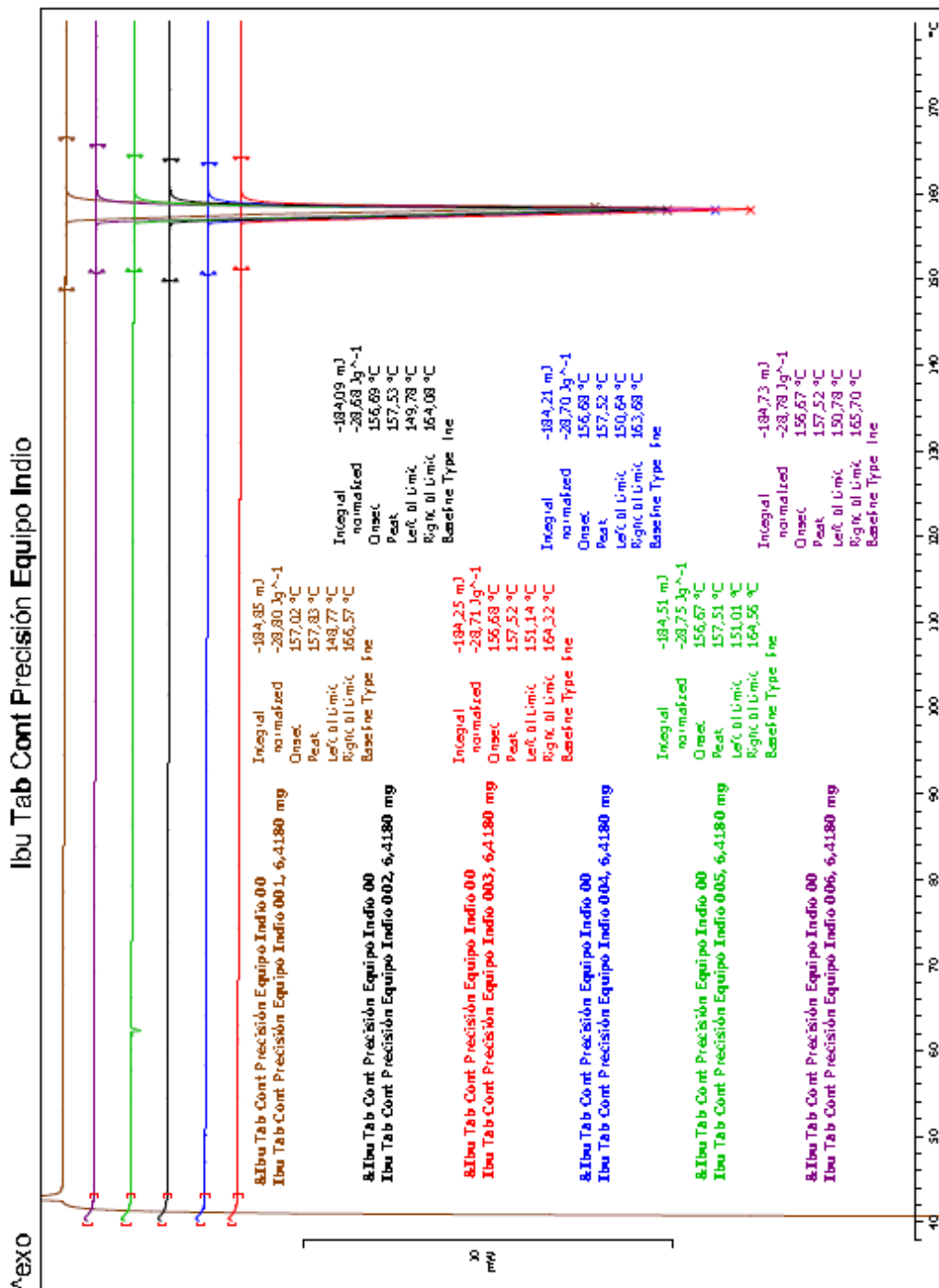


Figura A - 13 Precisión: Termogramas de Precisión de Equipo utilizando como metal Patrón el Indio.

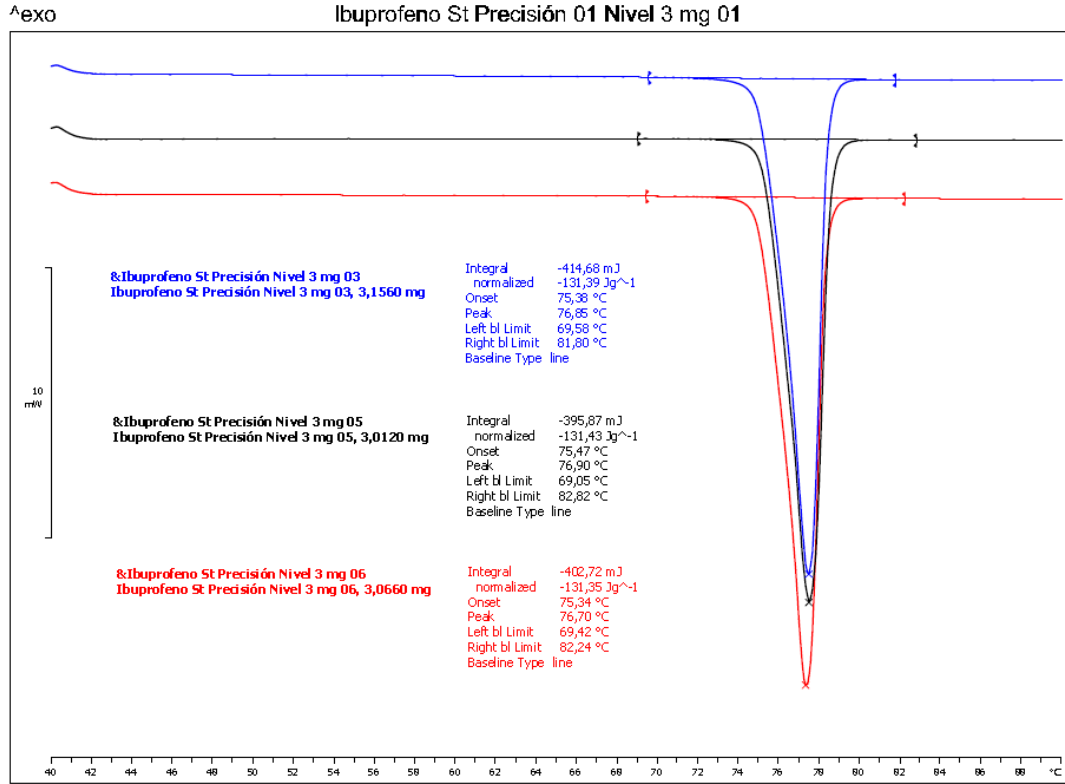


Figura A - 14 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 3 mg, Termogramas Día 01

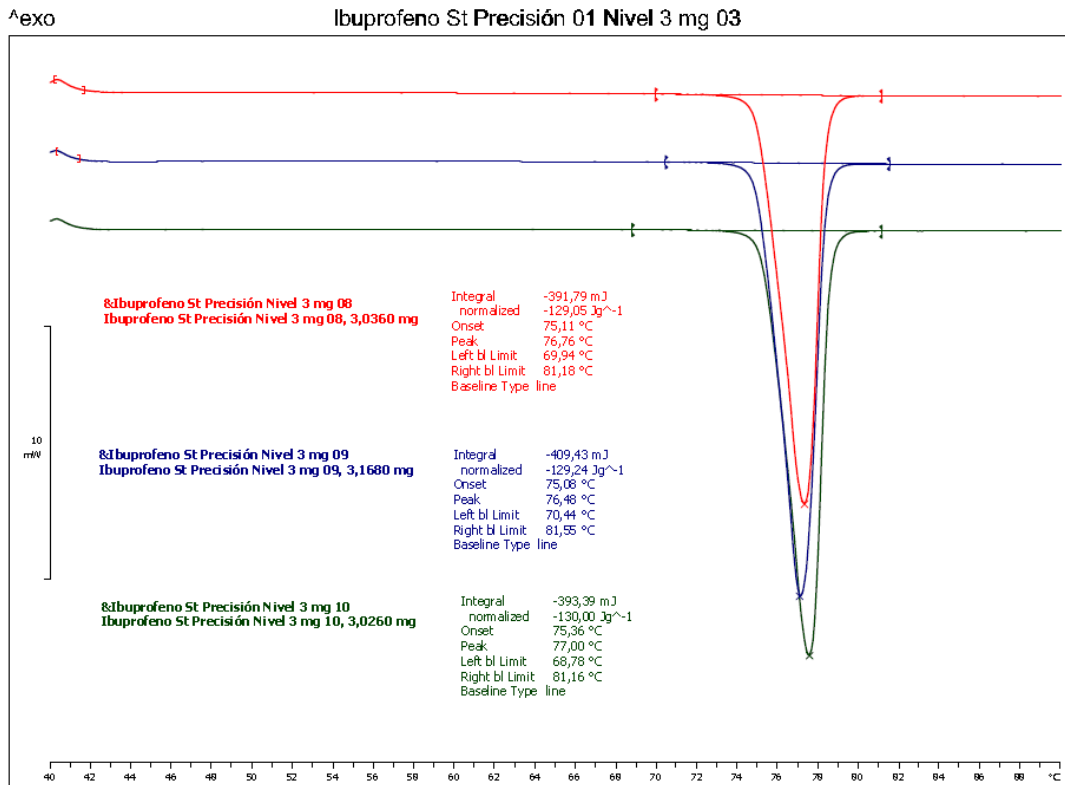


Figura A - 15 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 3 mg, Termogramas del Día 01 (continuación)

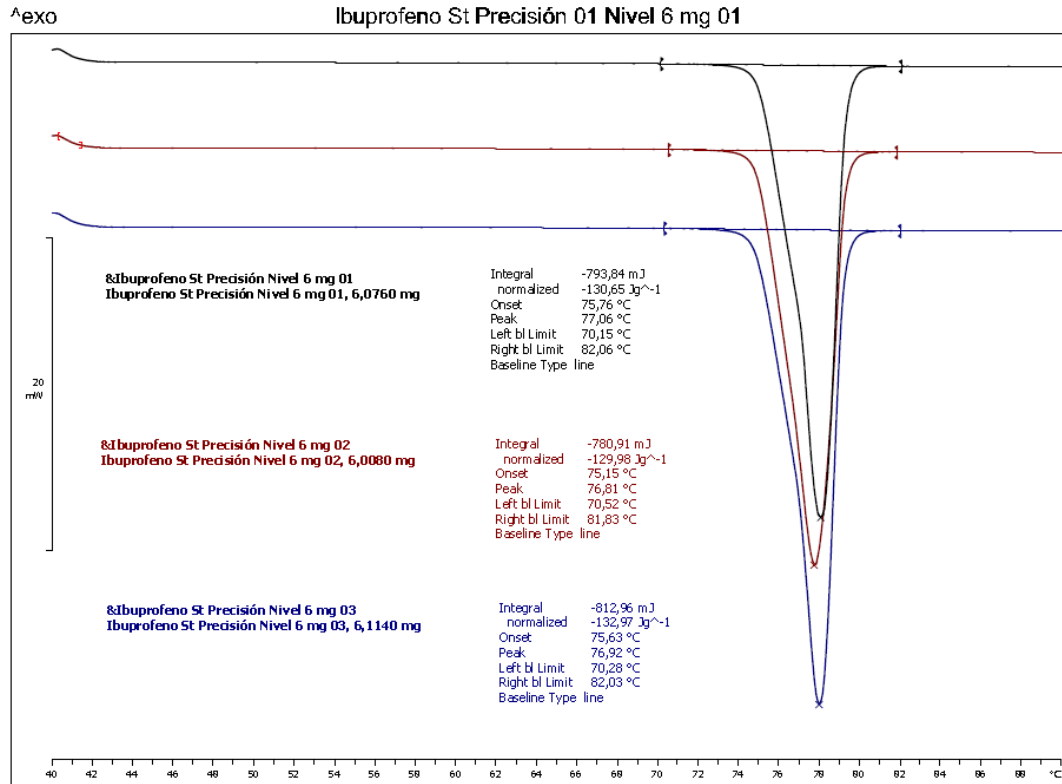


Figura A - 16 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 6 mg, Termogramas del Día 01

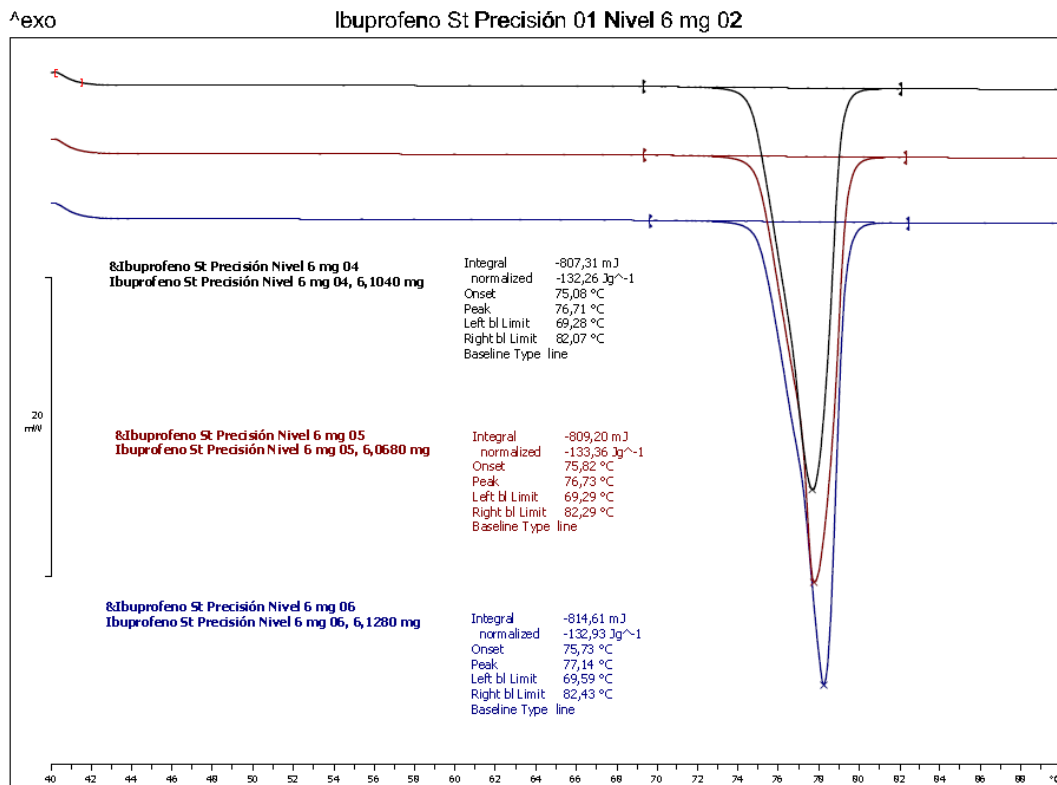


Figura A - 17 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 6 mg, Termogramas del Día 01 (continuación)

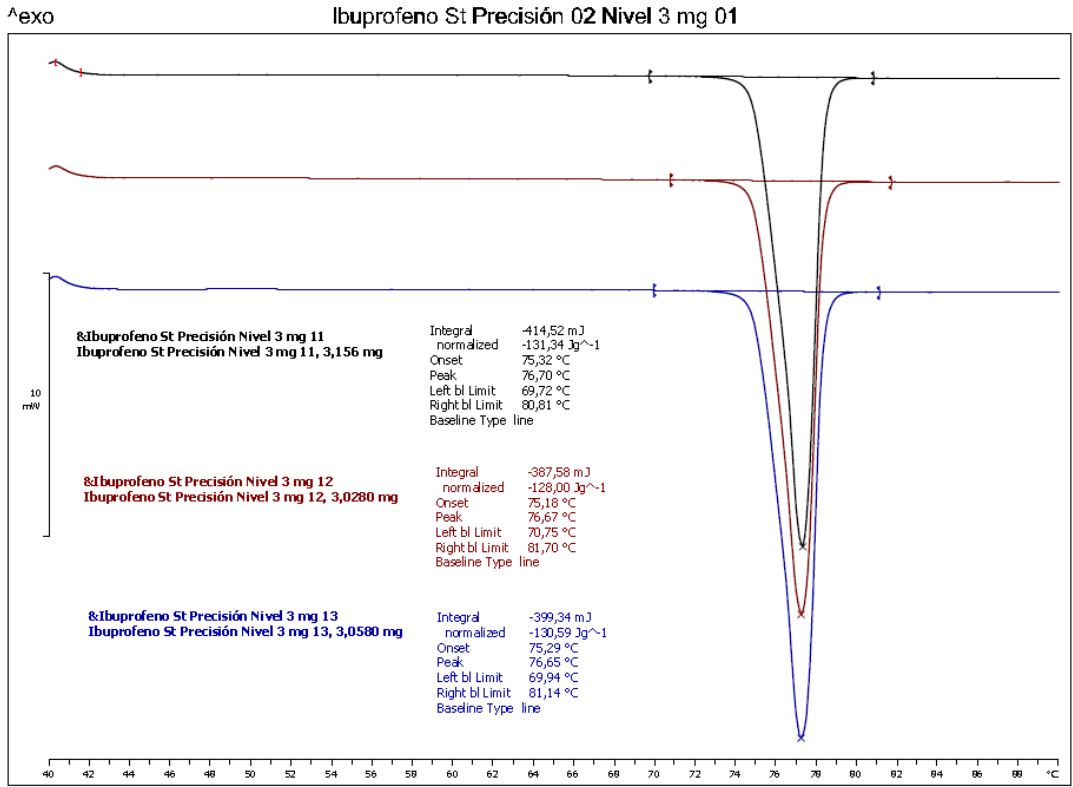


Figura A - 18 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 3 mg, Termogramas del Día 02

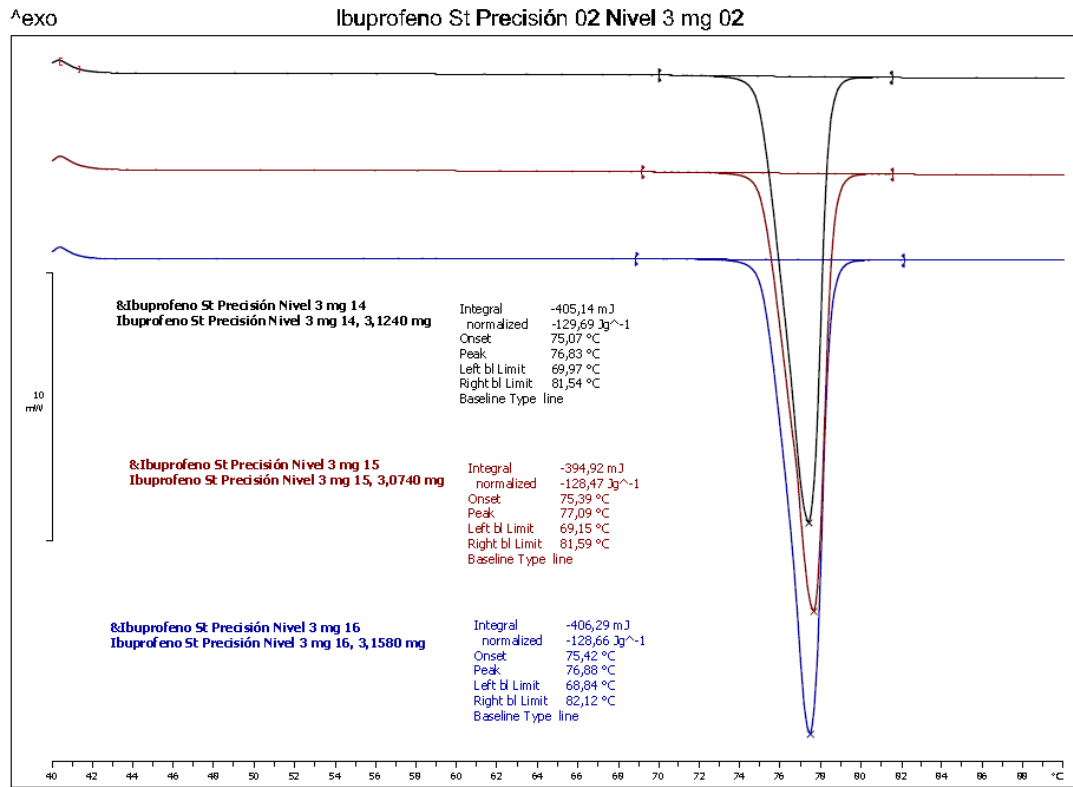


Figura A - 19 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 3 mg, Termogramas del Día 02 (continuación)

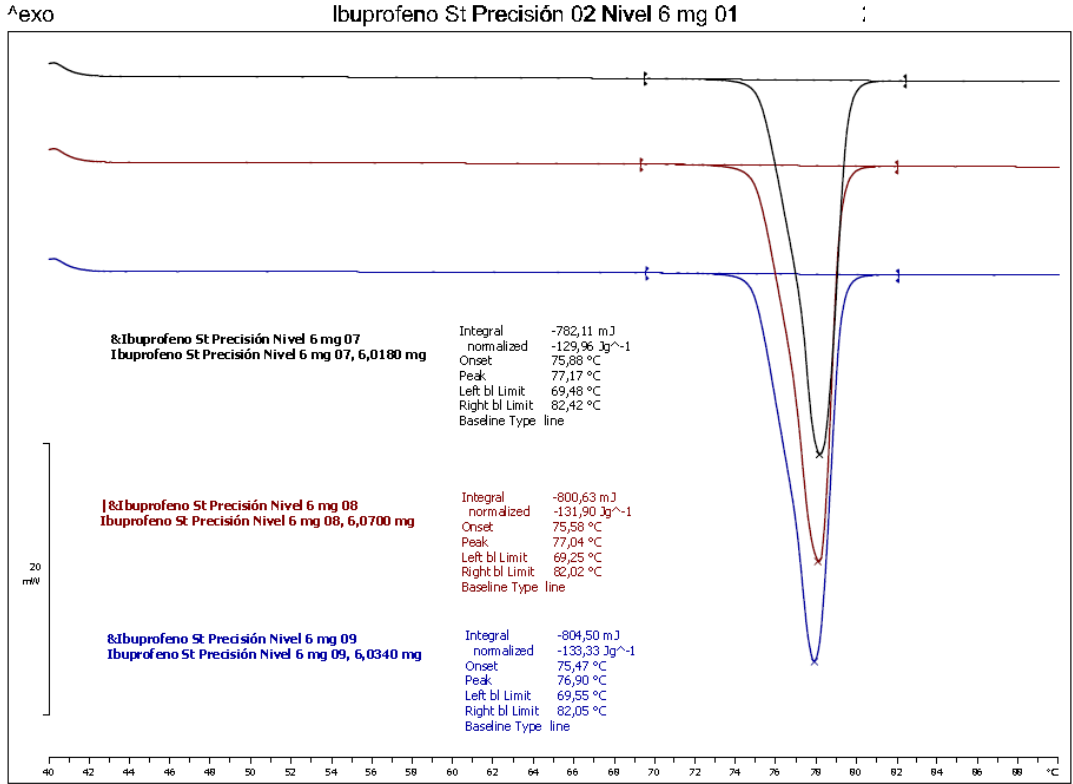


Figura A - 20 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 6 mg, Termogramas del Día 02

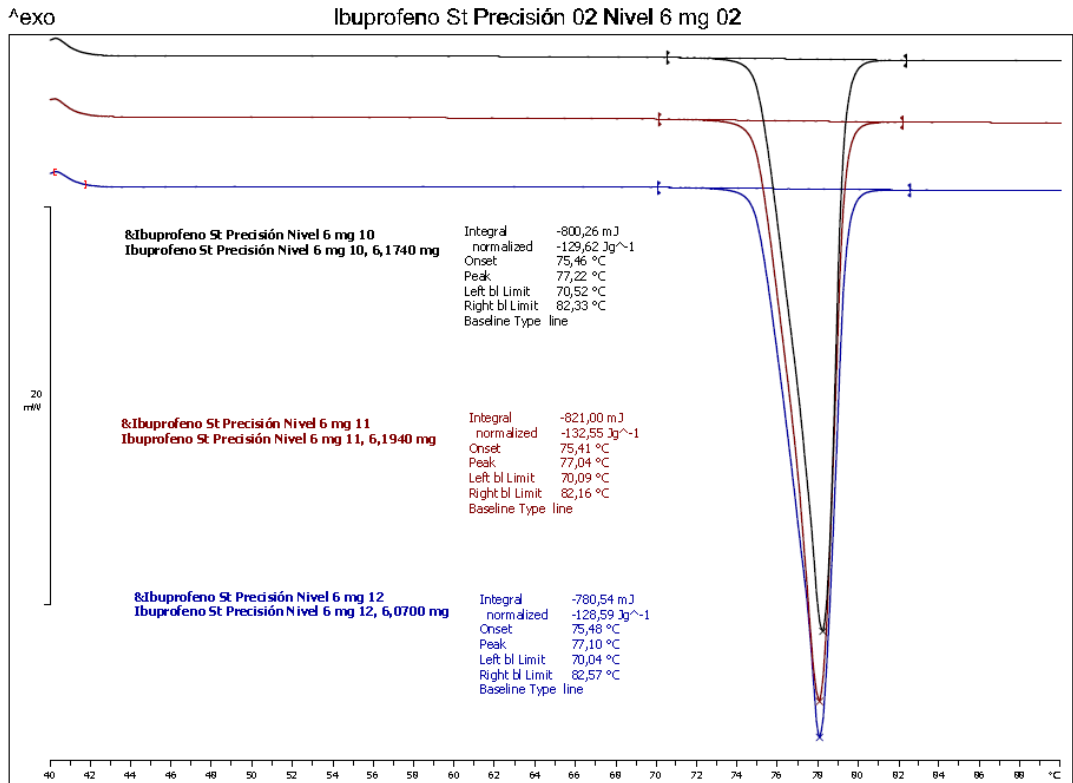


Figura A - 21 Precisión: Repetibilidad del Estándar Nivel 6 mg, Termogramas del Día 02 (continuación)

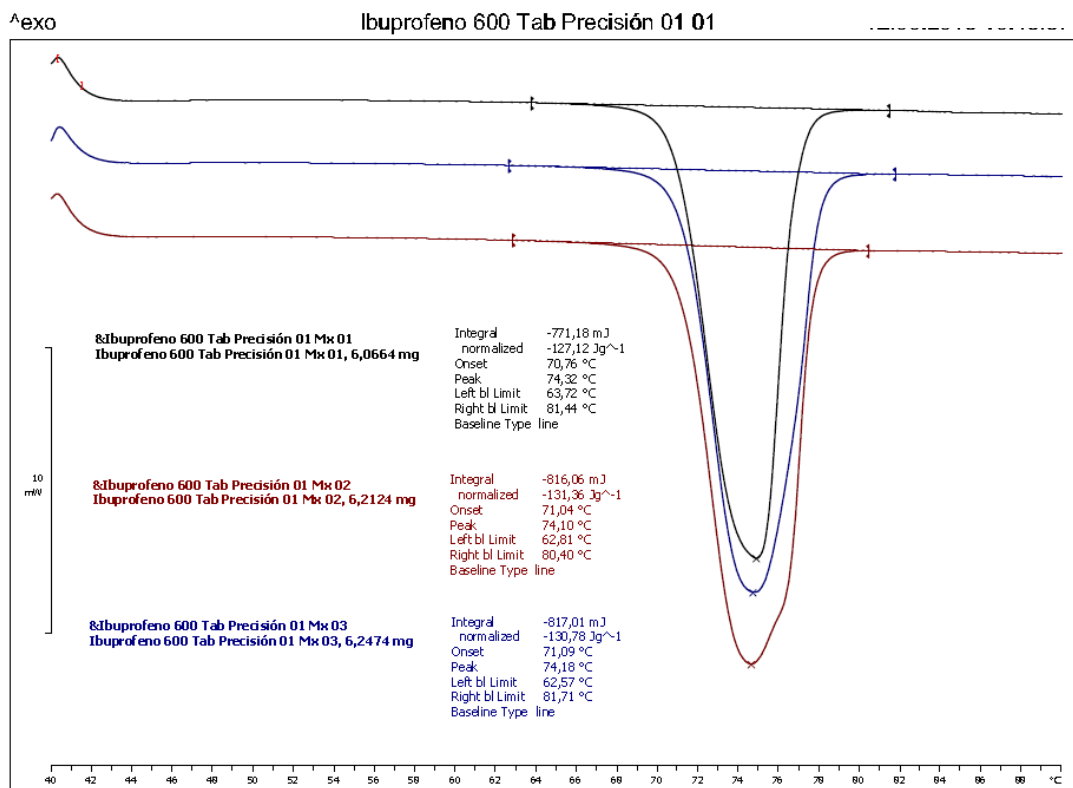


Figura A - 22 Precisión: Repetibilidad de la Muestra, Termogramas del Día 01

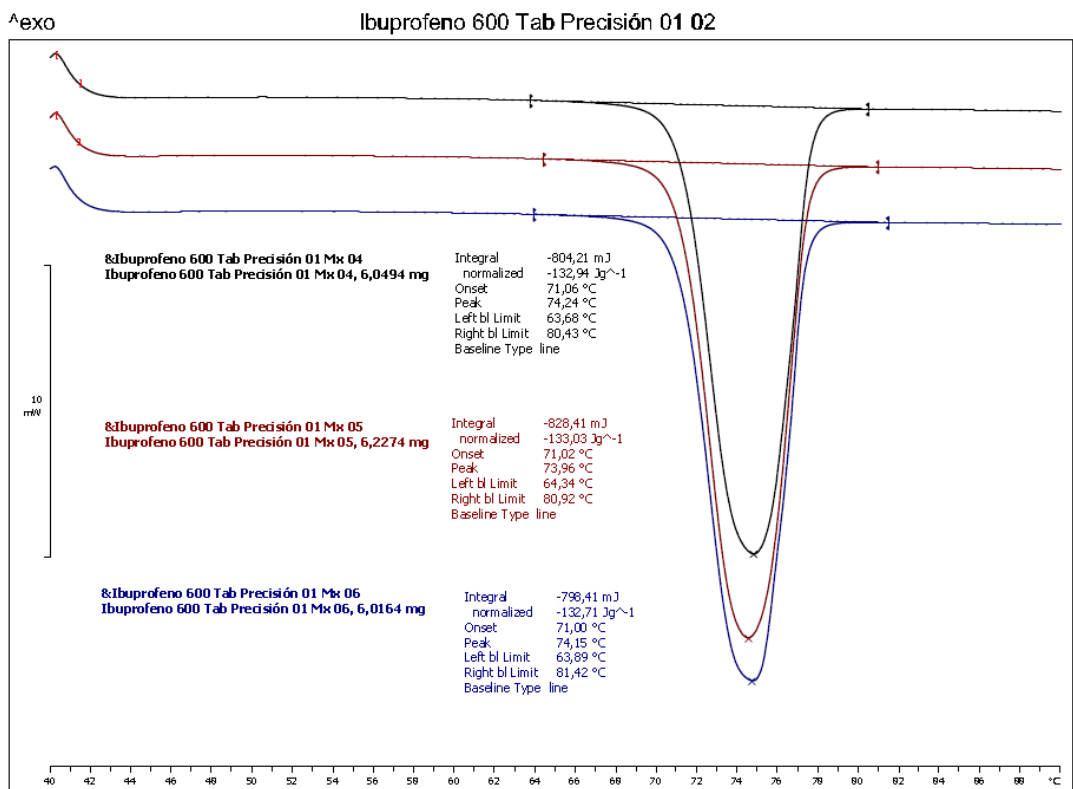


Figura A - 23 Precisión: Repetibilidad de la Muestra, Termogramas del Día 01 (continuación)

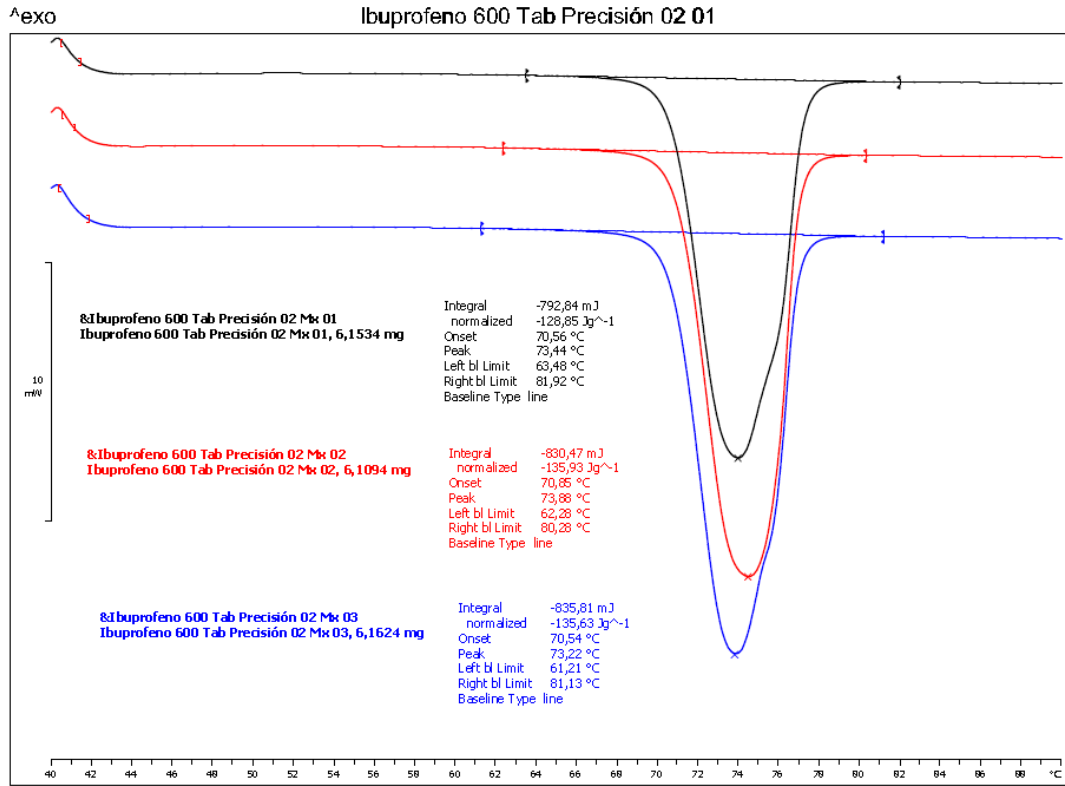


Figura A - 24 Precisión: Repetibilidad de la Muestra, Termogramas del Día 02

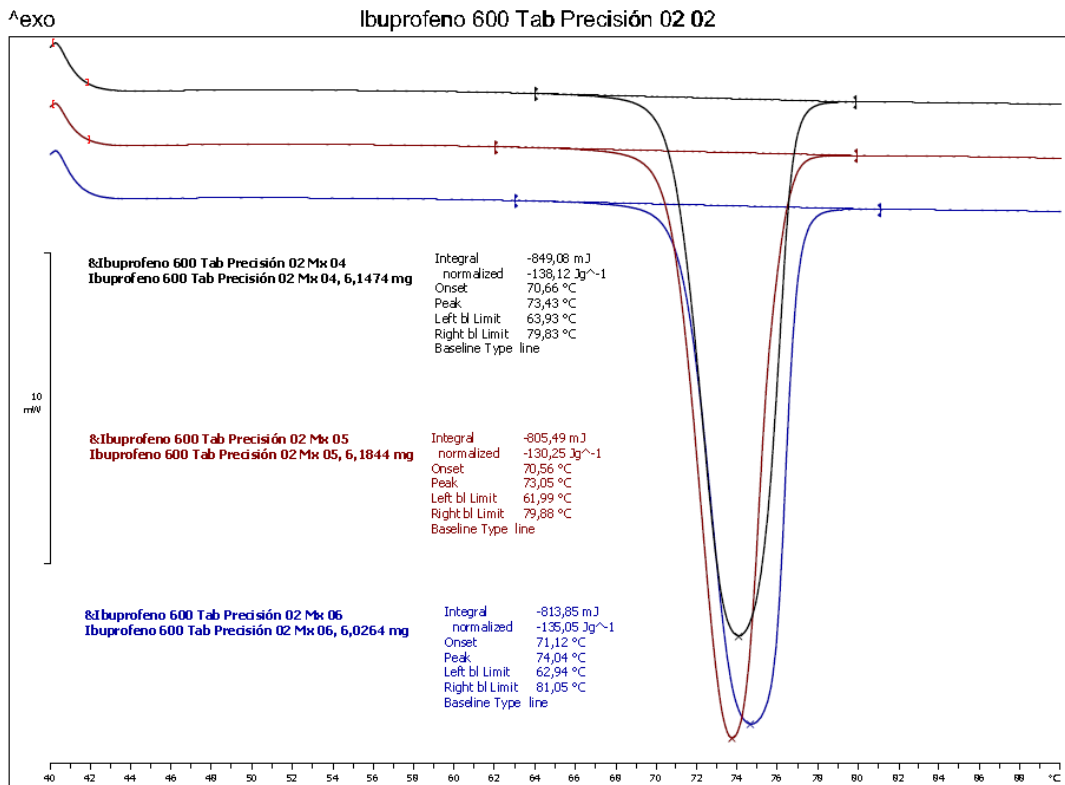


Figura A - 25 Precisión: Repetibilidad de la Muestra, Termogramas del Día 02 (continuación)



## **Anexo 05**

### **Termogramas de Recuperación**

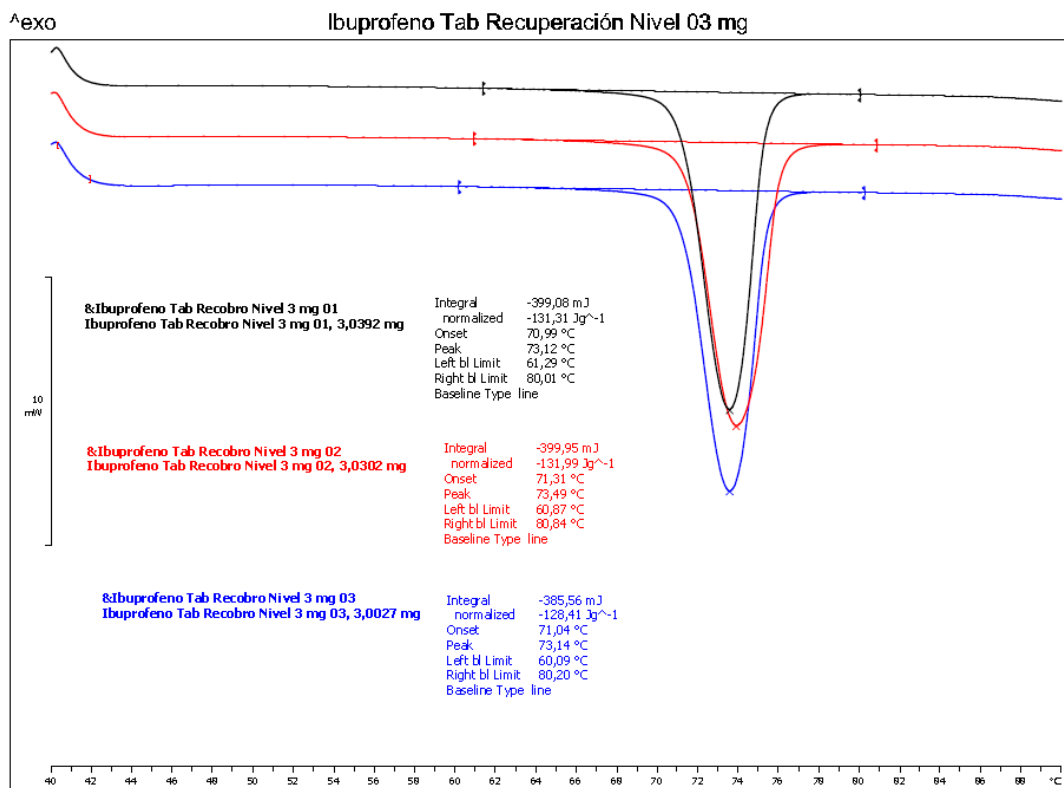


Figura A - 26 Recuperación: Termogramas del Nivel de Fracción de Analito correspondiente a 0,25

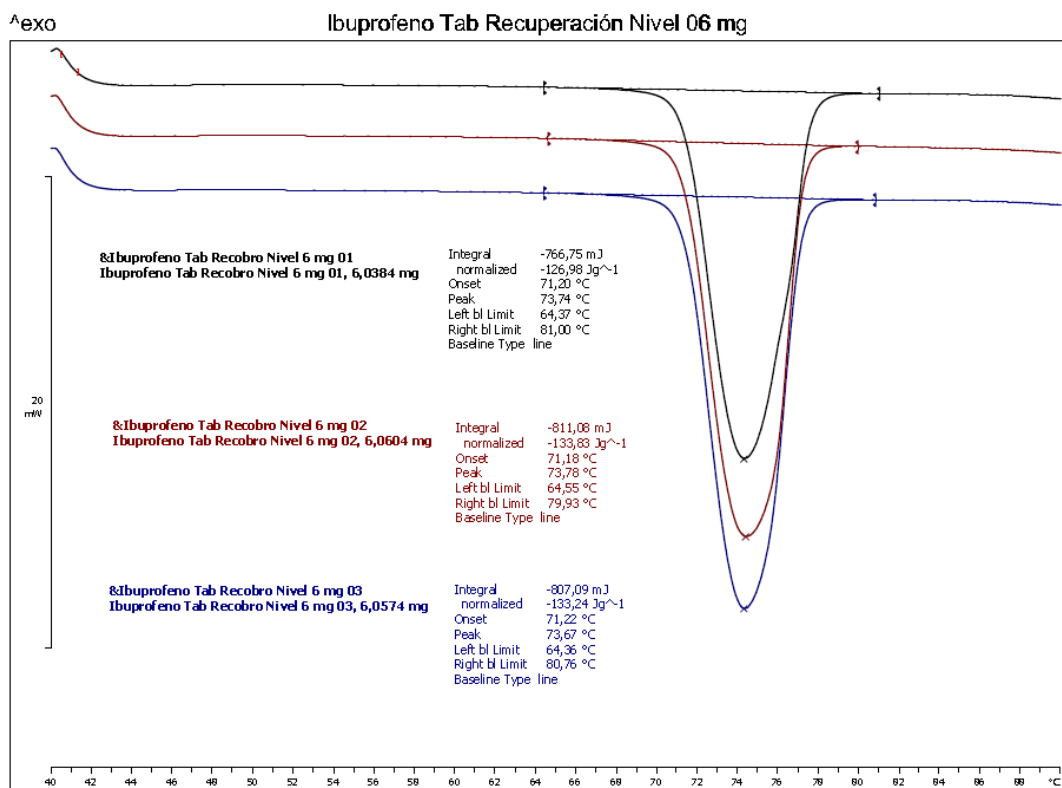


Figura A - 27 Recuperación: Termogramas del Nivel de Fracción de Analito correspondiente a 0,5

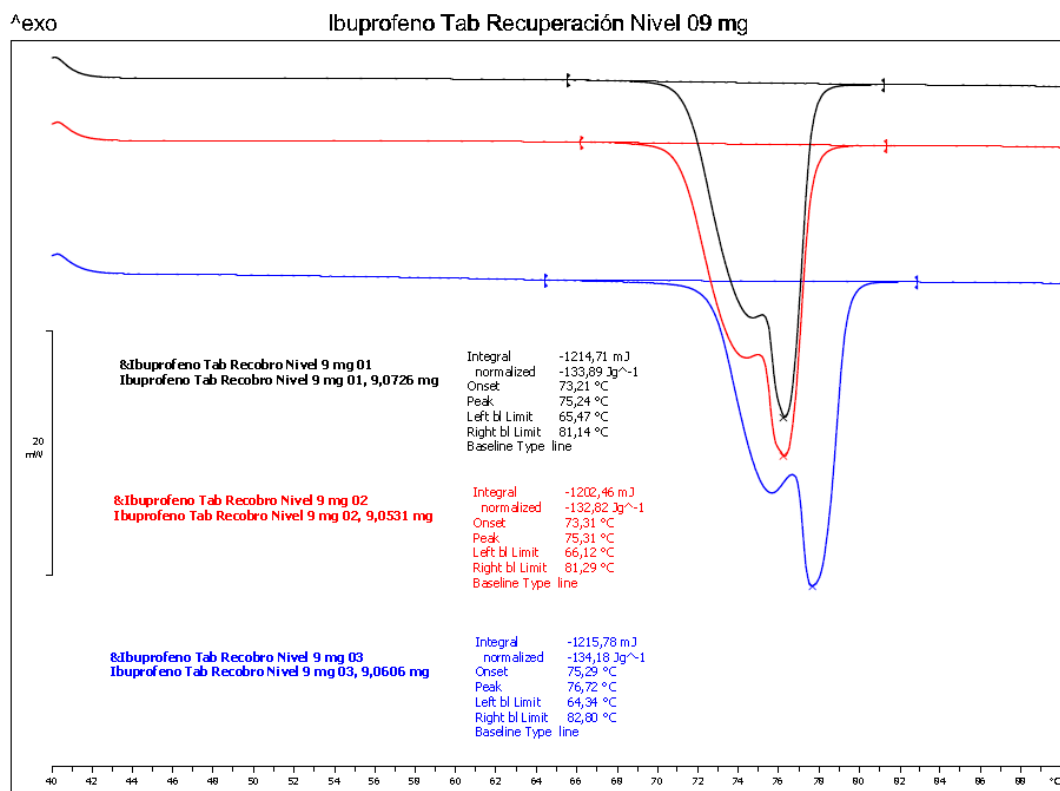


Figura A - 28 Recuperación: Termogramas del Nivel de Fracción de Analito correspondiente a 0,75

## **Anexo 06**

**Termogramas de Comparación de Metodología DSC y Metodología HPLC**

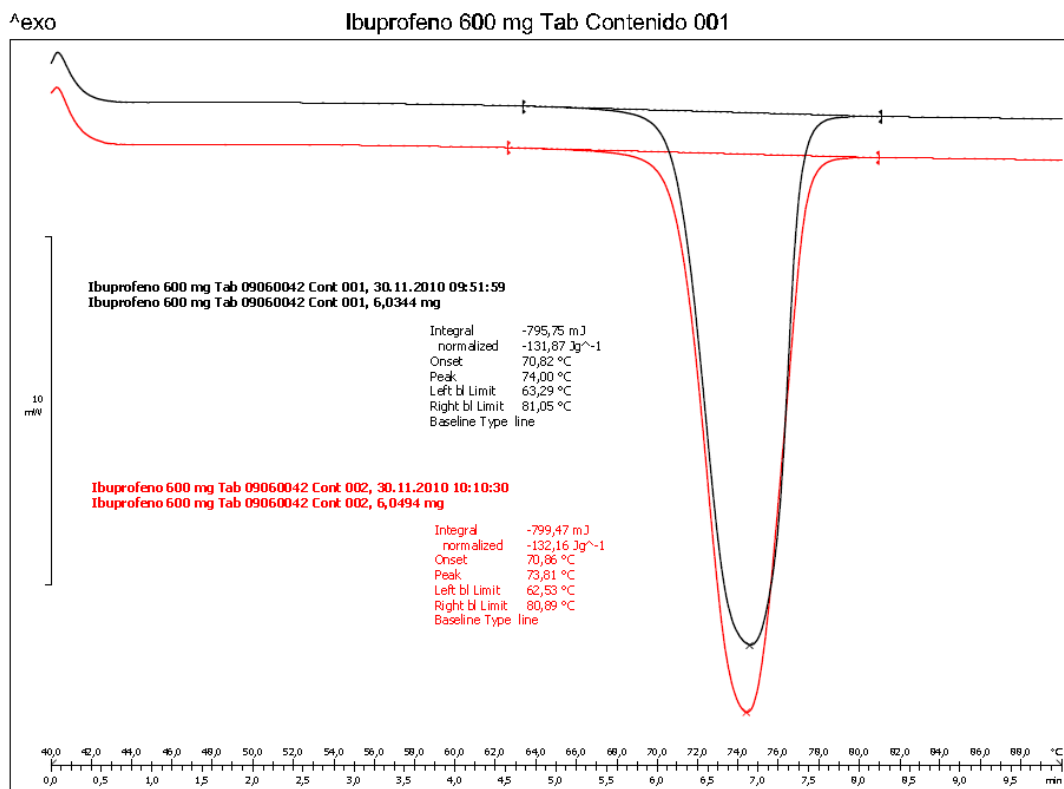


Figura A - 29 Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, Termogramas del Lote 09060042

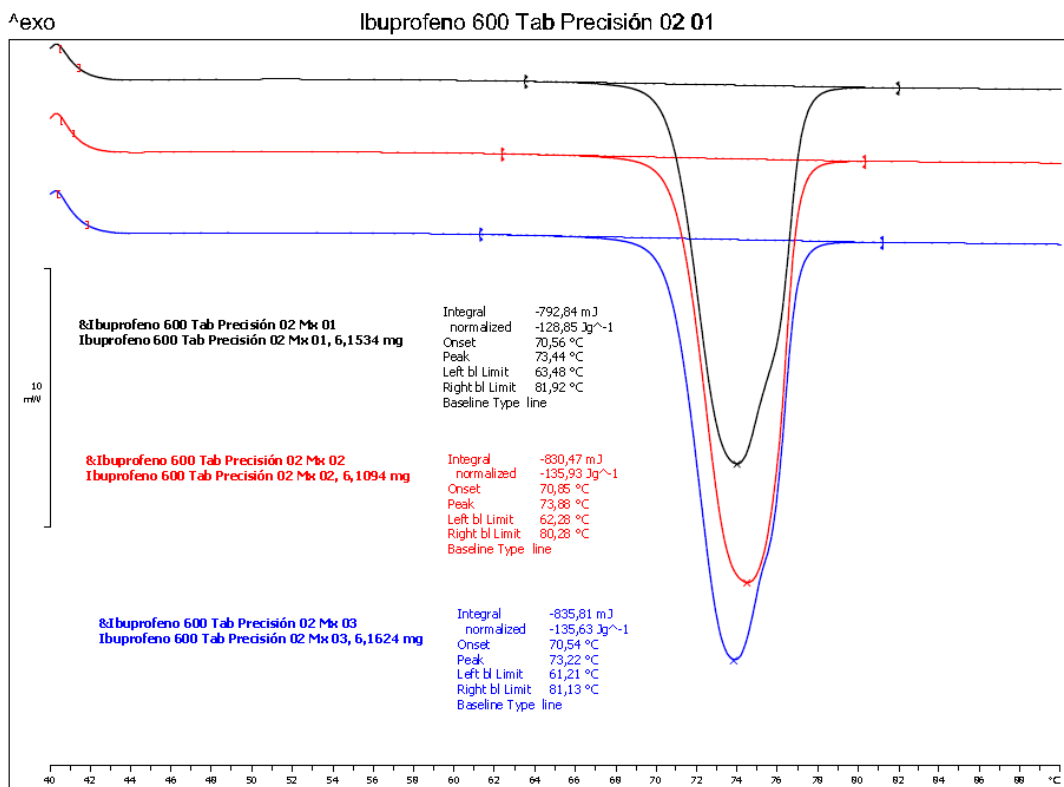


Figura A - 30 Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, Termogramas del Lote 1020202

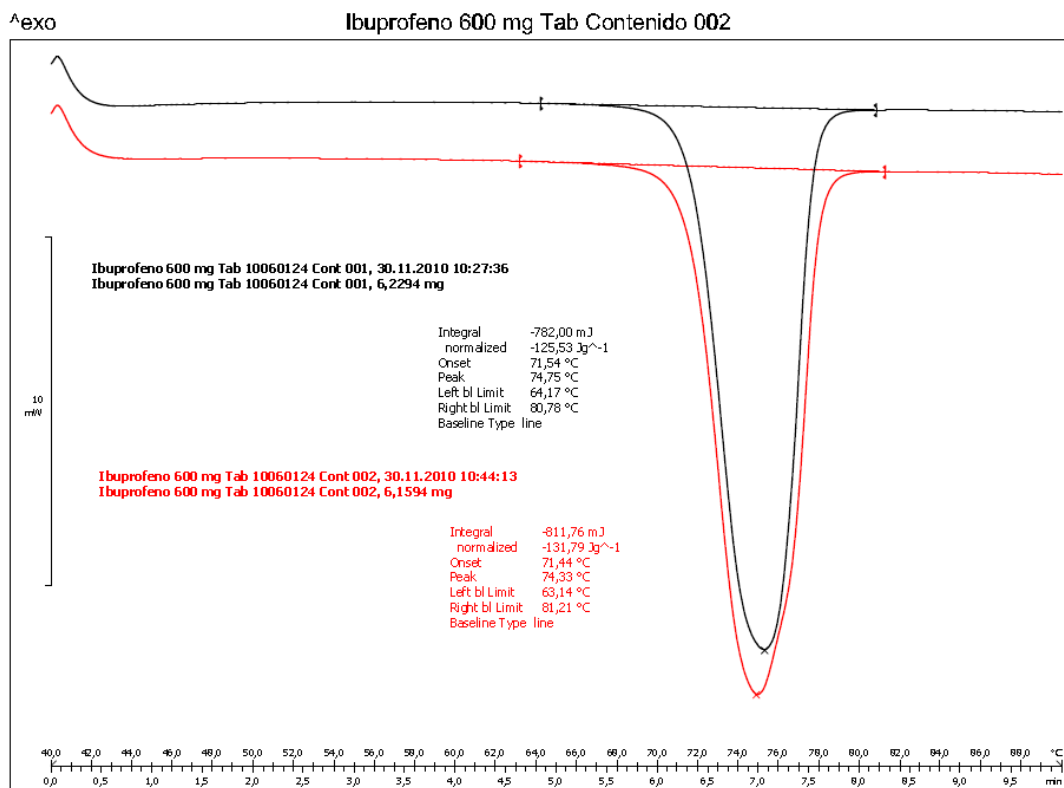


Figura A - 31 Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, Termogramas del Lote 10060124

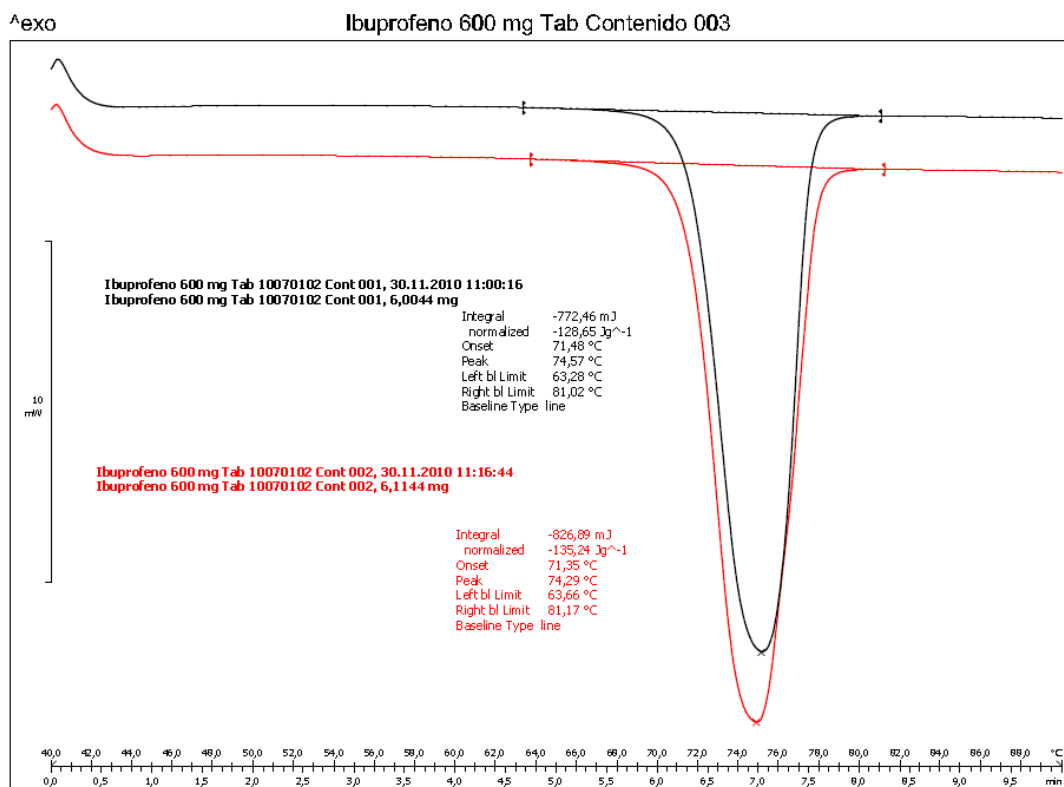


Figura A - 32 Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, Termogramas del Lote 10070102

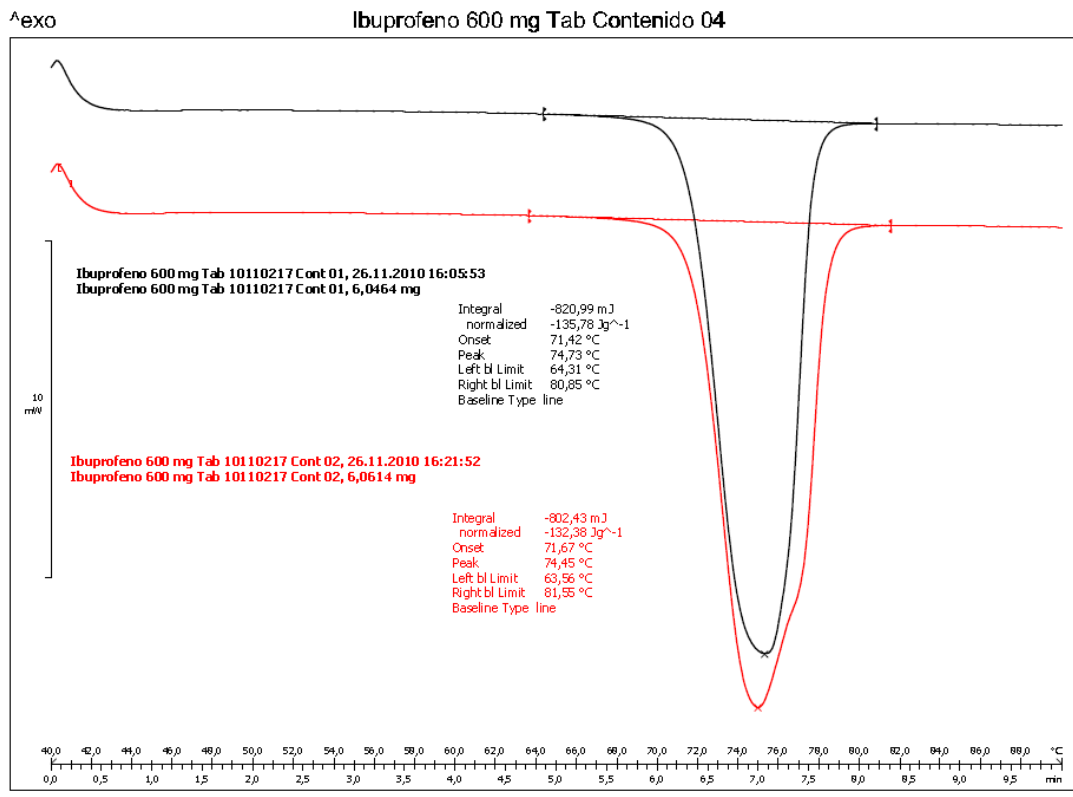


Figura A - 33 Contenido Químico de Ibuprofeno en Tableta a través de DSC, Termogramas del Lote 10110217