

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y**  
**BIOTECNOLOGICAS**  
**PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**



**“VALIDACION DE UN METODO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA  
VISIBLE PARA LA CUANTIFICACION DE AMBROXOL CLORHIDRATO EN  
JARABE Y SU APLICACIÓN EN ENSAYOS DE ESTABILIDAD”**

**TESIS PRESENTADA POR LA BACHILLER:  
BRISSETH CHULLA CANAHUIRE**

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO**

**ASESOR: JOSE A. VILLANUEVA SALAS, Ph. D.**

**AREQUIPA – PERÚ**

**2013**

**DEDICATORIA**

*A mi mamita y amiga, Gertrudis Canahuire  
Choquepata, por haberme apoyado en mis estudios  
e inculcado los valores y virtudes que me va a  
servir de mucho a lo largo de mi vida.*

*Brisseth Chulla Canahuire*



## INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	5
HIPOTESIS	7
OBJETIVO	8
<b>CAPITULO I: MARCO TEORICO</b>	
1 AMBROXOL CLORHIDRATO	
1.1 NOMBRE Y ESTRUCTURA QUIMICA	9
1.2 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS	10
1.3 ACCION FARMACOLOGICA	10
1.4 MECANISMO DE ACCION	10
1.5 FARMACOCINETICA	13
1.6 INDICACIONES Y USOS	14
1.7 CONTRAINDICACIONES	15
1.8 REACCIONES ADVERSAS	15
1.9 INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS	16
1.10 PRESENTACIONES	16
2 ESTABILIDAD	
2.1 DEFINICIONES	
2.1.1 Estudios de Estabilidad	17
2.1.2 Estudios de Estabilidad Acelerados	17
2.1.3 Estudios de Estabilidad a Largo Plazo	17
2.1.4 Periodo de Validez	18
2.1.5 Periodo de Validez Comprobado	18
2.2 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	18
2.3 CAMBIOS SIGNIFICATIVOS EN LOS QUE SE INVALIDA LOS ESTUDIOS DE ESTABILIDAD	19
2.4 PERIODO DE VALIDEZ TENTATIVO	20

2.5 SOLICITUD DE INSCRIPCION EN REGISTRO SANITARIO	20
2.5.1 Periodo de validez Tentativo	20
2.5.2 Periodo de validez Comprobado	21
3 VALIDACION	
3.1 GENERALIDADES	21
3.1.1 Sistema de Calidad	22
3.1.2 Calidad	22
3.1.3 Calidad en la Industria Farmacéutica	22
3.1.4 Garantía de Calidad	23
3.1.5 Buenas Prácticas de Manufactura	23
3.1.6 Buenas Prácticas de Laboratorio	24
3.1.7 Control de Calidad	24
3.1.8 ¿Por qué se debe Validar?	25
3.2 REGLAMENTO PARA EL REGISTRO CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS, DISPOSITIVOS MEDICOS Y PRODUCTOS SANITARIOS	25
3.3 CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO ANALITICO	25
3.3.1 Intervalo	Linealidad e
3.3.2 Precisión	26
3.3.3 Exactitud	26
3.3.4 Selectividad	28
3.3.5 Robustez	28
3.4 PARAMETROS QUE SE DEBEN EVALUAR SEGUN EL ENSAYO	A

VALIDAR		
28		
3.4.1		Categoría
I	29	
3.4.2		Categoría
II	29	
3.4.3		Categoría
III	29	
3.4.4		Categoría
IV	29	

## CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

1			
MATERIALES			
31			
1.1	LUGAR	DE	LA
INVESTIGACION		31	
1.2	UNIDADES		DE
ESTUDIO			
31			
1.2.1	Material		de
Laboratorio			
32			
2			
METODOS			
33			
2.1	PREPARACION PARA EL ANALISIS DEL JARABE DE		
	AMBROXOL		
	CLORHIDRATO		
33			
2.2.	DESCRIPCION DEL METODO DE VALIDACION		33

2.2.1	Preparación y barrido de curva de calibración	33	
2.2.2	Validación del Método		
35			
2.2.2.1	Linealidad		
35			
2.2.2.2	Precisión		
35			
2.2.2.3	Exactitud		
36			
2.2.2.4	Selectividad		
36			
2.2.2.5	Robustez		
37			
2.3	TRATAMIENTO ESTADISTICO DEL METODO DE VALIDACION		38
2.3.1	Linealidad		
38			
2.3.2	Precisión		
41			
2.3.3	Exactitud		
42			
2.3.4	Selectividad		O
44			
2.3.5	Robustez		
44			
3	ENSAYOS DE ESTABILIDAD		
45			
3.1	OBTENCION DE LA MUESTRA		45

3.2 CONDICIONES AMBIENTALES	45
3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA CUANTIFICACION	46
3.4 ANALISIS DE RESULTADOS	48

### **CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION**

1. DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA PARA LA DETERMINACION DE CLORHIDRATO	50
1.1 LINEALIDAD	50
1.2 PRECISION	73
1.2.1 Repetibilidad	73
1.2.2 Intermedia	75
1.3 EXACTITUD	77
1.4 SELECTIVIDAD	79
1.6 ROBUSTEZ	81
2. APLICACION EN ENSAYOS DE ESTABILIDAD DEL JARABE DE CLORHIDRATO	82
2.1 ESTABILIDAD ACELERADA	82
2.2 ESTABILIDAD REAL	82

### **CAPITULO IV**

CONCLUSIONES	86
--------------	----

SUGERENCIAS	87
BIBLIOGRAFIA	88
ANEXOS	93



## RESUMEN

La validación de un método analítico, constituye un instrumento importante para garantizar la calidad del medicamento.

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo primordial de validar el método analítico de cuantificación para Ambroxol Clorhidrato en jarabe por espectrofotometría ultravioleta según la normatividad USP 35, con lo cual se establece una evidencia documentada de que el método analítico cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

Para la validación de este método analítico se usó equipos previamente calibrados, reactivos certificados, agua destilada ultra pura y un estándar de Ambroxol Clorhidrato al 99.33% de pureza; se tomaron en cuenta los parámetros establecidos por la USP 35 para la validación de un método analítico destinado a la cuantificación del principio activo: linealidad, precisión, exactitud, selectividad y robustez. Se obtuvo resultados estadísticos que permitieron afirmar que el método es lineal, preciso, exacto, selectivo y robusto.

El análisis estadístico incluyó cálculos de ecuación de regresión lineal, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, desviación estándar, coeficiente de variación, test de Cochran, test de t de student, análisis de varianzas e intervalos de confianza del 95%.

Una vez que el método se evaluó, se pudo concluir que es válido y que puede utilizarse como un método analítico de cuantificación para el Ambroxol Clorhidrato en jarabe; se procedió a aplicarlo en estudios de estabilidad, llegando a darle al producto un periodo de validez de dos años, siendo este un periodo de validez tentativo por tratarse de un estudio de estabilidad acelerada de 06 meses y un estudio de estabilidad a tiempo real de 06 meses.



**ABSTRACT**

The validation of an analytical method, is an important tool to ensure the quality of the drug.

This work was developed with the primary objective to validate the analytical method of quantification for Ambroxol Hydrochloride syrup ultraviolet spectrophotometry according to USP 35 regulations, thereby establishing documented evidence that the analytical method complies with the requirements for applications analytical previews.

To validate this analytical method was used previously calibrated equipment, reagents certified ultra pure distilled water and a standard Ambroxol Hydrochloride to 99.33% purity, were taken into account the parameters set by the USP 35 for the validation of an analytical method aimed at the quantification of the active: linearity, precision, accuracy, selectivity and robustness. We obtained statistical results that allowed state that the method is linear, accurate, precise, selective and robust.

Statistical analysis included calculation of linear regression equation, correlation coefficient, coefficient of determination, standard deviation, coefficient of variation, Cochran's test, Student's t test, analysis of variance and confidence intervals of 95%.

Once the method was evaluated, it was concluded that it is valid and can be used as an analytical method for the quantification of Ambroxol Hydrochloride syrup, we proceeded to apply in stability studies, coming to give the product a shelf life of two years, this being a period of tentative because it is an accelerated stability study of 06 months and a study of real-time stability of 06 months.

## INTRODUCCION

La industria farmacéutica, al igual que otras industrias, está sometida a las reglas del mercado que impone una exigencia de calidad, las cuales son indispensables para que un producto sea usado por el consumidor; es por ello que el control de calidad cumple un rol importante en la industria, por lo tanto debe de optimizarse para obtener resultados confiables.

La USP, PHARMACOPEA BRITANICA, PHARMACOPEA EUROPEA son fuentes principales empleadas en laboratorios de control de calidad, sin embargo algunas de ellas pueden resultar no útiles para determinados productos farmacéuticos o no existir en las normas debido a esto es que los laboratorios tienen áreas destinadas a la validación de metodologías analíticas propias.

La validación de un procedimiento es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Es por ello que consideramos necesario realizar la validación de un método que garantice que la cuantificación del principio activo ambroxol clorhidrato en jarabe sea confiable y este se aplique a estudios de estabilidad.

La identidad química, las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y otras propiedades de un medicamento pueden cambiar durante el tiempo que transcurre desde su fabricación hasta el momento de su consumo, por lo cual es necesario realizar estudios de estabilidad, en tiempo acelerado y tiempo real, el cual también nos servirá para calcular un tiempo de vida útil tentativo de dos años.

El ambroxol clorhidrato es un fármaco mucolítico potente que se usa como un expectorante y broncosecretolítico. Estimula el transporte de secreción viscosa en los órganos respiratorios y reduce la secreción de estancamiento. Se administra en forma de clorhidrato en dosis diarias de 15-30-120 mg y está disponible comercialmente en forma de jarabes, gránulos, tabletas, en soluciones utilizados en la forma inyectable o para inhalación.

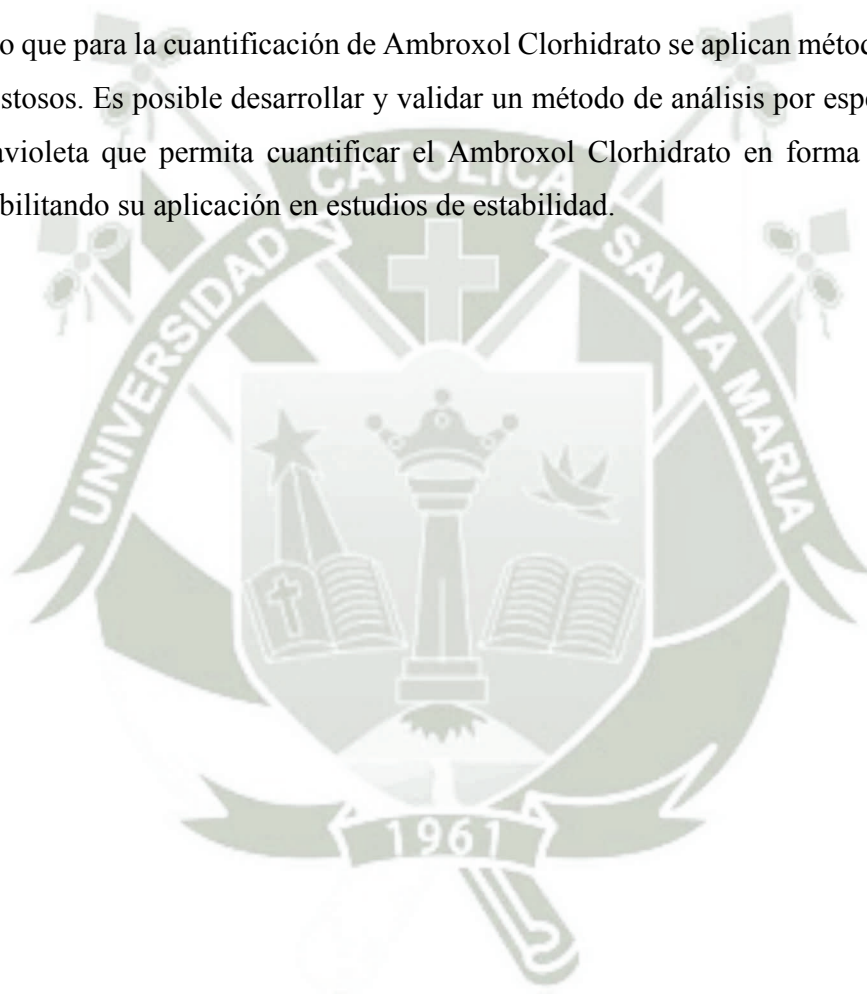
El presente trabajo tiene como propósito desarrollar y validar un método de análisis por espectroscopia ultravioleta para el ambroxol clorhidrato en jarabe, el cual garantizará que los resultados que se obtengan sean plenamente confiables.

Dicha validación se ha realizado analizando los parámetros de Linealidad, Precisión, Exactitud, Selectividad y Robustez.

El informe final de la investigación está estructurado en capítulos. En el primer capítulo se presenta marco teórico que sirvió de sustento a la investigación; el segundo capítulo contiene la descripción de los materiales y métodos, en el tercer capítulo se presentan los resultados y discusión. Finalmente se plantean las conclusiones y sugerencias.

## HIPOTESIS

Dado que para la cuantificación de Ambroxol Clorhidrato se aplican métodos sofisticados y costosos. Es posible desarrollar y validar un método de análisis por espectrofotometría ultravioleta que permita cuantificar el Ambroxol Clorhidrato en forma más accesible, posibilitando su aplicación en estudios de estabilidad.



## OBJETIVOS

- 1.- Desarrollar y validar un método para la determinación de ambroxol clorhidrato por espectrofotometría ultravioleta según la normatividad de la U.S.P
- 2.- Aplicar la técnica validada para la cuantificación de ambroxol clorhidrato en estudios de estabilidad.
- 3.- Establecer de forma preliminar un tiempo de vida de útil.

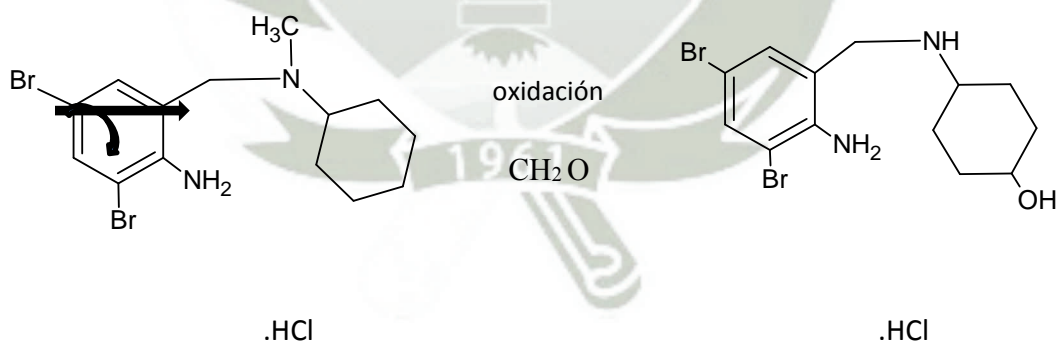
## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

#### 1. AMBROXOL CLORHIDRATO

##### 1.1 NOMBRE Y ESTRUCTURA QUIMICA <sup>4,26,28</sup>

El ambroxol clorhidrato es un metabolito de la bromhexina clorhidrato el cual tiene un anillo cicloalcano que una vez que se oxida este se hidroxila y a la vez se N-desalquila, dando como resultado ambroxol clorhidrato.



La denominación química del ambroxol clorhidrato según la IUPAC es trans-4-(2-amino-3,5-dibromobencilamino)-ciclohexanol, clorhidrato y su peso molecular es 414.56 g/mol.

Según la British Pharmacopea 2013 el ambroxol clorhidrato contiene no menos de 99.0% y no más de 101.0% de  $C_{13}H_{18}N_2Br_2O \cdot HCl$ , calculado con respecto a la sustancia seca.<sup>7</sup>

## 1.2 PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS<sup>7,55</sup>

Aspecto físico: Polvo cristalino, blanco prácticamente inodoro.

Solubilidad: Moderadamente soluble en agua, soluble en metanol e insoluble en cloruro de metileno.

Pérdida por secado: No más de 0.5% de su peso.

## 1.3 ACCION FARMACOLOGICA

El ambroxol, en su forma de clorhidrato, es un fármaco que cae en la categoría de los medicamentos mucolíticos.<sup>1</sup>

Aumenta la secreción de vías respiratorias, potencia la producción de surfactante pulmonar y mejora el aclaramiento mucociliar, como consecuencia: facilita la expectoración, alivia la tos y reduce reagudizaciones de bronquitis crónica y EPOC.<sup>50</sup>

## 1.4 MECANISMO DE ACCION<sup>28,36</sup>

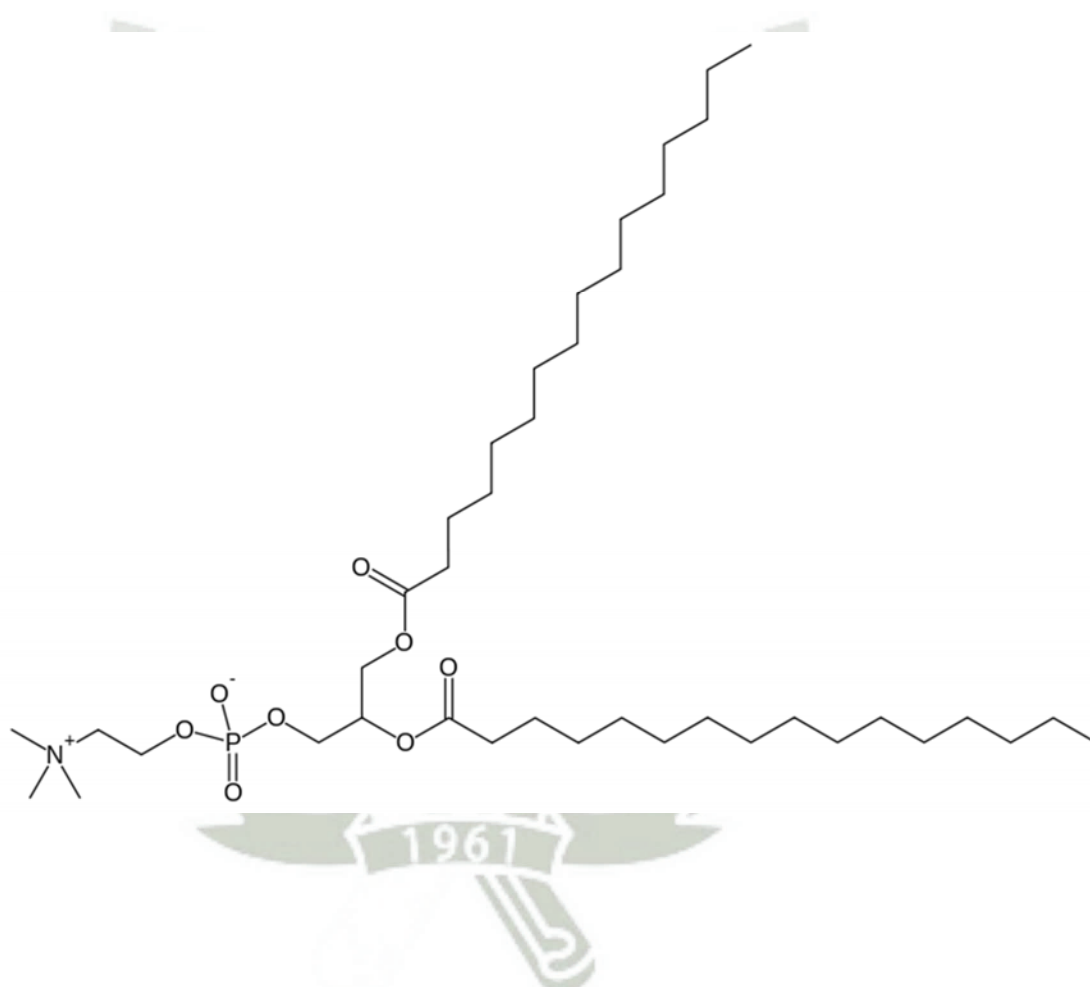
El ambroxol actúa sobre los neumocitos tipo II del epitelio pulmonar estimulando la síntesis y la secreción de la sustancia surfactante.<sup>26</sup>

El surfactante reduce en forma significativa la tensión superficial dentro del alvéolo pulmonar, previniendo el colapso durante la espiración.<sup>26</sup>

El líquido surfactante consiste en un 80% de fosfolípidos, 8% de lípidos neutrales y

12% de proteínas. La clase predominante de fosfolípidos es la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) además de fosfatidilcolina insaturada, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol. De todos éstos, la DPPC, por sí sola, tiene las propiedades de reducir la tensión superficial alveolar, pero requiere de las proteínas de surfactante y otros lípidos para facilitar su adsorción en la interfase aire-líquido.<sup>16</sup>

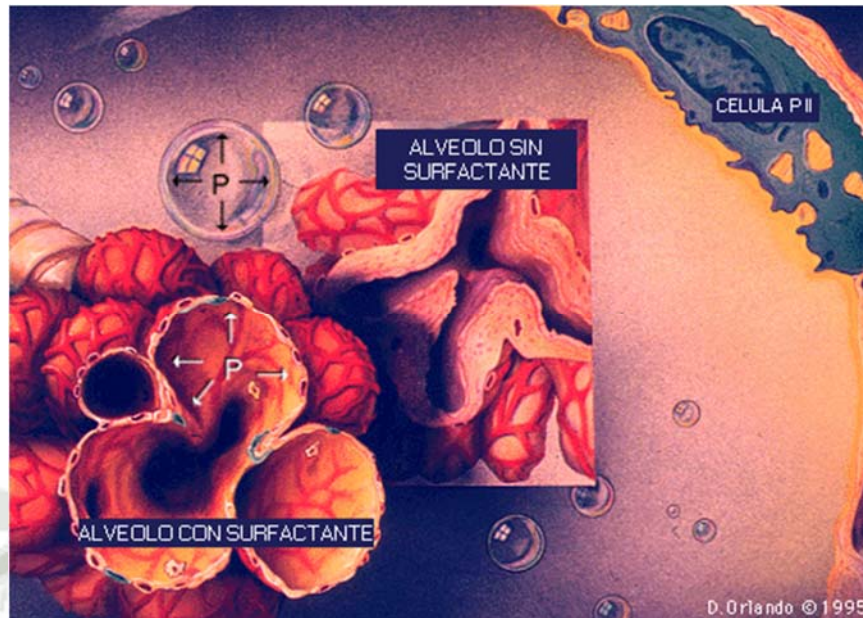
A continuación se muestra la fórmula de dipalmitoilfosfatidilcolina



Las apoproteínas de surfactante son cuatro: SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. SP-A y SP-D son hidrofílicas y SP-B y SP-C son hidrofóbicas. SP-A y SP-D juegan un rol en la defensa contra patógenos inhalados y SP-A además tendría una función regulatoria en la formación de la monocapa que reduce la tensión de superficie. Las proteínas hidrofóbicas son necesarias para mejorar la extensión de los fosfolípidos en los

espacios aéreos. SP-B promueve la adsorción de los fosfolípidos e induce la inserción de ellos dentro de la monocapa. SP-C estimula la inserción de los fosfolípidos y puede incrementar la resistencia del surfactante a la inhibición por proteínas séricas y líquido pulmonar.<sup>46,19</sup>

El surfactante es producido en los neumocitos tipo II del alvéolo. Es ensamblado y almacenado en los cuerpos lamelares y éstos son transportados por exocitosis a la capa líquida del alvéolo y forma la estructura llamada mielina tubular, que es la principal fuente de la monocapa, que permite que los grupos acil-grasos hidrofóbicos de los fosfolípidos se extiendan hacia el aire mientras que las cabezas polares hidrofílicas lo hagan hacia el agua. Esta monocapa de surfactante disminuye la tensión superficial en la interfaz aire-líquido reemplazando el agua en la superficie. Los fosfolípidos desde la monocapa pueden reentrar al neumocito tipo II por endocitosis y formar cuerpos multivesiculares, los que son reciclados por la incorporación rápida a los cuerpos lamelares o degradados en los lisosomas.<sup>46</sup>



**Figura 1:** Se puede observar la distensión que existe en los alveolos con surfactante y sin surfactante.

El ambroxol aumenta el volumen del esputo, disminuye la viscosidad, fluidifica y favorece la expectoración de las secreciones, la permeabilidad de la luz alveolar y bronquial y la penetración de los antibióticos en las secreciones bronquiales. Es bien absorbido en el tracto gastrointestinal.<sup>28</sup>

### 1.5 FARMACOCINETICA

El ambroxol se absorbe completamente tras su administración oral. La concentración máxima en plasma se alcanza en 2½ horas.<sup>28</sup>

El ambroxol actúa intracelularmente promoviendo la producción de un moco normal libera y activa el epitelio ciliado aumentando con frecuencia vibrátil y estimula la

producción de surfactante en alveolos y pequeños bronquiolos formando una película que recubre la pared interna de las vías respiratorias. Reduce la adhesividad del moco.<sup>21</sup>

La concentración plasmática máxima se alcanzan entre 0.5 y 3 horas. Después de la administración oral, el ambroxol se absorbe casi completamente. El  $T_{m\acute{a}x}$  después de una administración oral es de 1-3 horas. La biodisponibilidad absoluta es de 70 a 80%, debido al efecto de primer paso se metaboliza de 20 a 30% de la dosis, durante el cual se forman metabolitos excretados por vía renal (por ejemplo, ácido dibromoatranílico y glucoronidos). La unión a proteínas plasmáticas es de aproximadamente 85% (80-90%). La vida media plasmática terminal es de 7-12 horas. El ambroxol atraviesa la barrera hematoencefálica, placentaria y pasa a la leche materna. La excreción renal es de aproximadamente 90%, principalmente en forma de metabolitos formados en el hígado. Menos del 10% es excretado por vía renal en forma inalterada. Debido a su alta unión a proteínas, gran volumen de distribución y lenta redistribución desde los tejidos hacia la sangre, no se espera eliminación sustancial de ambroxol mediante diálisis o diuresis forzada. En enfermedades hepáticas severas, la depuración de ambroxol se reduce en 20-40%. La depuración renal de ambroxol es de aproximadamente 53 mL/min.<sup>1,36</sup>

## 1.6 INDICACIONES TERAPEUTICAS Y USOS

Indicado en enfermedades agudas y crónicas de las vías respiratorias que van acompañadas de espasmo bronquial; y una alteración patológica en la formación y el transporte de la secreción, en especial bronquitis espásticas, bronquitis enfisematosa y asma bronquial.<sup>50</sup>

Indicado también como expectorante y mucolítico en los procesos en los que se requiere aumentar la fluidez de las secreciones del tracto respiratorio, como sucede en:

- El asma bronquial
- Diferentes tipos de bronquitis aguda

- Bronquitis crónica
- Bronquitis espasmódica
- Asma bronquial
- Bronquiectasia
- Neumonía
- Bronconeumonía
- Rinitis
- Sinusitis
- Atelectasia por obstrucción mucosa
- Traqueostomía
- En el pre y posquirúrgico de pacientes geriátricos

Puede usarse solo (monofármaco) o en combinación con un broncodilatador ,  
antibiótico.<sup>50,36</sup>

### **1.7 CONTRAINDICACIONES <sup>19</sup>**

Hipersensibilidad a los componentes de la fórmula, pacientes con úlcera péptica,  
pacientes con enfermedad ácido péptica, niños menores de 2 años.

Por contener como excipiente sorbitol puede causar molestias de estómago y diarrea.  
No debe utilizarse en paciente con intolerancia hereditaria a la fructosa.<sup>21</sup>

Este medicamento por contener glicerol como excipiente puede ser perjudicial a dosis  
elevadas. Puede provocar dolor de cabeza, molestias de estómago y diarrea.<sup>21</sup>

### **1.8 REACCIONES ADVERSAS**

En casos poco frecuentes se han reportado trastornos gastrointestinales como náusea y  
dolor abdominal; reacciones alérgicas (erupción, edema facial y aumento de la  
temperatura, con escalofríos); sequedad de boca y vías aéreas, hipersalivación,

rinorrea, constipación y disuria. En casos aislados se han reportado síntomas comparables con choque anafiláctico y dermatitis de contacto.<sup>28</sup>

Por lo general este medicamento es muy bien tolerado posee alta confiabilidad, seguridad y leves efectos secundarios .<sup>28,26</sup>

### **1.9 INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS <sup>21</sup>**

La administración de ambroxol con antibióticos (amoxicilina, cefuroxima, macrólidos) durante el tratamiento de infecciones respiratorias puede aumentar la concentración del fármaco en el tejido pulmonar. El uso concomitante con antitusígenos podría provocar la acumulación de secreciones respiratorias por inhibición del reflejo tusígeno.

### **1.10 PRESENTACIONES**

Jarabe de ambroxol clorhidrato de 30mg/5mL para adultos, 15mg/5mL para niños y tabletas de 30mg.

## **2 ESTABILIDAD <sup>44,16</sup>**

Se define estabilidad como la capacidad que tiene un producto de mantener sus especificaciones de calidad establecidas en el envase que lo contiene durante su período de vida útil, almacenado en las condiciones especificadas.

El término “estabilidad” con respecto a la forma farmacéutica de medicamentos, se refiere a la integridad física y química de la unidad de dosificación y cuando corresponda, a la capacidad de la unidad de dosificaciones de mantener la protección contra la contaminación microbiológica. La vida útil de la forma farmacéutica es el lapso de tiempo desde la preparación inicial hasta la fecha de caducidad específica.<sup>44</sup>

Las especificaciones de la monografía en cuanto a identidad, contenido, calidad y pureza se aplican a lo largo de toda la vida útil del producto<sup>44</sup>.

Los parámetros de estabilidad de la forma farmacéutica de un medicamento pueden estar influenciados por condiciones ambientales de almacenamiento (temperatura, luz, aire y humedad), así como también por los componentes del envase.<sup>4</sup>

## **2.1 DEFINICIONES <sup>16</sup>**

### **2.1.1 Estudios de estabilidad**

Ensayos que permiten obtener información para establecer el periodo de vida útil de un producto en su envase original en las condiciones de almacenamiento especificadas.

### **2.1.2 Estudios de estabilidad acelerados**

Estudios diseñados para lograr el incremento de la velocidad de degradación química o física de un producto, mediante condiciones de almacenamiento extremas o exageradas en su envase original, con el propósito de monitorear las reacciones de degradación y predecir el periodo de vida bajo condiciones normales de almacenamiento.

### **2.1.3 Estudios de estabilidad a largo plazo**

Son estudios diseñados de las características físicas, químicas y microbiológicas, bajo condiciones de almacenamiento controladas, durante el periodo de vida útil propuestas del producto, en el envase que se propone circular en el mercado.

### **2.1.4 Período de validez / período de vida útil**

Tiempo durante el cual se espera que un producto permanezca dentro de las especificaciones aprobadas en el Registro Sanitario, si es almacenado bajo las condiciones definidas en su rotulado. El período de vida útil está estrechamente relacionado con las condiciones de almacenamiento señaladas.

### 2.1.5 Período de validez comprobado

Es un período de vida útil establecido mediante datos obtenidos por estudios de estabilidad a largo plazo, hasta por el tiempo indicado en el rotulado del producto. El período de vida útil está sujeto a cambios que pueden ser solicitados por el titular del Registro Sanitario a la Autoridad Sanitaria, a medida que se generen nuevos datos comprobatorios de la estabilidad, hasta por un tiempo máximo de cinco (5) años.

## 2.2 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Condiciones de Almacenamiento: Condiciones específicas a las que deben almacenarse determinados productos y que deben consignarse en su rotulado. Se refiere normalmente a la temperatura, humedad y protección de la luz. Todos los productos deben de incluir características acerca de su almacenamiento, cada una de estas características se especifican en el cuadro N°1 y N°2.

**CUADRO N° 1**

<b>Temperatura Rotulada</b>	<b>Interpretación</b>
Almacénese de -25°C a -15°C	Congelación
Almacénese de 2°C a 8°C	Refrigeración
Almacénese a temperatura no mayor de 30°C	Hasta 15°C a 30°C
Almacénese entre 15°C-30°C	De 15°C a 30°C
Protéjase de la humedad	65% +/- 5% de HR

Fuente: Directiva Técnica de Estabilidad de Medicamentos

**CUADRO N°2**

Factores limitantes	Indicaciones adicionales en el rotulado
Medicamentos que no toleran refrigeración	No refrigerar
Medicamentos que no toleran congelamiento	No congelar
Medicamentos sensibles a la luz	Protéjase de la luz
Medicamentos que no toleran calor excesivo (ej. Supositorios)	Almacenar y transportar a temperaturas no mayor a (...)°C (de acuerdo a los estudios de estabilidad)
Medicamentos higroscópicos	Almacenar en lugar seco

Fuente: Directiva Técnica de Estabilidad de Medicamentos

### 2.3 CAMBIOS SIGNIFICATIVOS QUE INVALIDAN LOS ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Los cambios significativos que invalidan los estudios de estabilidad son los siguientes:

- Pérdida de más de 5% de concentración de principio activo. Otros valores pueden aplicarse a ciertos productos si se justifica por la naturaleza de los principios activos tales como multivitamínicos o algún otro producto sensible a un envejecimiento acelerado.
- Alteraciones del pH fuera del rango especificado.
- Disminución de la velocidad de disolución fuera de límites especificados en la farmacopea que se acoja o en la técnica propia.
- Aumento de concentración de los productos de degradación o sustancias relacionadas más allá de los límites establecidos.
- Alteraciones importantes de la apariencia del producto (Ej.: cambio de color, dureza, precipitaciones, separación de fases, pérdida de la capacidad de redispersión dosis).
- Sobrepasar los límites establecidos para los ensayos microbiológicos, y biológicos cuando corresponda.

## **2.4 PERIODO DE VALIDEZ TENTATIVO <sup>16</sup>**

Cuando los estudios a largo plazo por seis meses y acelerados por seis meses no presentan cambios significativos en las especificaciones químicas o físicas y estabilidad microbiológica evaluadas (acelerados: inicio y final, largo plazo: inicio), se otorga un período de validez de máximo dos (2) años.

En el caso de que el producto sea sensible a la temperatura podrá presentarse únicamente estudios de largo plazo mínimo de un año otorgándose el periodo de validez correspondiente al estudio.

## **2.5 SOLICITUD DE INSCRIPCIÓN EN EL REGISTRO SANITARIO <sup>16</sup>**

### **2.5.1 Período de validez tentativo**

El solicitante debe presentar el reporte de los estudios de estabilidad obtenidos de los seis (6) meses del estudio de estabilidad acelerado y de los primeros seis (06) meses del estudio a largo plazo, en el envase cierre propuesto para circular en el mercado. Con la aprobación del Registro Sanitario se otorga un período de validez tentativo el que debe ser confirmado, o puede ser ampliado, en la etapa post-registro mediante la presentación del estudio correspondiente.

### **2.5.2 Período de validez comprobado:**

El solicitante debe presentar los resultados obtenidos de los estudios a largo plazo por el periodo de vida útil solicitado, en el envase propuesto para circular en el mercado.

Si durante la realización de un Estudio de Estabilidad para un producto con Técnica Analítica Propia, apareciese publicada una monografía de dicho producto en Farmacopeas oficiales, el fabricante podrá incluir las pruebas de la monografía a partir de la entrada en vigencia de dicha monografía, considerándose dicho estudio válido de acuerdo a la norma de farmacopea.

En el caso que se presentaran nuevo Estudio de Estabilidad a 6 meses acelerados y los primeros 6 meses a largo plazo, solo garantizará un periodo máximo de 2 años de vida útil.

## **3 VALIDACION**

### **3.1 GENERALIDADES**

Tanto la Food and Drug Administration (FDA) como la United States Pharmacopeia (USP) tienen vital interés en la validación de métodos de ensayo formal, para asegurarse que dichos métodos son lo que pretenden ser. En una sección titulada *Validación de Procedimientos Farmacopeicos*, la USP describe los parámetros que deben medirse para analizar un procedimiento analítico, pero antes de describir el proceso de validación, vemos necesario establecer y determinar algunos conceptos que permitan explicar la importancia que ella tiene en el control de calidad en la industria química farmacéutica.<sup>5,8</sup>

### **3.1.1 Sistema De Calidad**

Se refiere a las actividades del laboratorio dirigidas a la producción de un trabajo de precisión y productos de alta calidad. Un laboratorio de análisis debe contar como uno de sus propósitos principales la producción de datos analíticos de alta calidad por medio de mediciones analíticas que sean precisas, confiables y adecuadas para tal fin.<sup>2,20</sup>

Dicho propósito puede alcanzarse de una manera eficaz si se cuenta con un sistema planificado y documentado de la calidad de las actividades.

Para alcanzar este nivel de distinción (que el laboratorio lo necesita para poder acreditarse y así poder obtener contratos de análisis) el laboratorio necesita operar bajo un sistema de garantía de calidad que incluye una extensa documentación de sus actividades.<sup>20,3</sup>

### **3.1.2 Calidad**

Se entiende por calidad, en un marco conceptual, el cambio de actitud mental del hombre, que en la industria está representada por los recursos humanos. En el aspecto analítico, el control de calidad comprende: La normalización (normas técnicas) y la metrología (ciencias de la medición).<sup>32,20</sup>

En consecuencia se puede afirmar que la calidad no es una opinión subjetiva, sino una propiedad que posee todo producto, y si se quiere opinar sobre la calidad han de definirse sus características con parámetros cualitativos y cuantitativos.<sup>18</sup>

### **3.1.3 Calidad en la Industria Farmacéutica**

La industria farmacéutica, al igual que en otras industrias, está sometida a las reglas del mercado que impone una exigencia de calidad, sin las que un determinado producto no sería utilizado por los consumidores.<sup>18,23</sup>

En la industria farmacéutica se cuida mucho la calidad ya que cualquier deficiencia puede originar problemas sanitarios, las cuales pueden ser graves, lo que provocaría la inmediata retirada del producto e incluso el cierre del laboratorio del fabricante.<sup>4</sup>

#### **3.1.4 Garantía de Calidad**

Es un conjunto de acciones que monitorean todas las etapas de los procesos productivos para prevenir errores y poder asegurar que cada unidad producida tiene igual calidad que las ensayadas en el laboratorio de control.<sup>20</sup>

Este sistema sustituye al concepto antiguo que suponía que la calidad era competencia únicamente del servicio de control de calidad del laboratorio. El objetivo del sistema de garantía de la calidad es conseguir que todo salga bien desde el principio, con la ayuda de todo el personal del laboratorio que participa en las distintas fases de consecución de un producto farmacéutico.<sup>20</sup>

#### **3.1.5 Buenas Prácticas de Manufactura<sup>32</sup>**

Dentro del concepto de garantía de la calidad, las Buenas Prácticas de Manufactura constituyen el factor que asegura que los productos se fabriquen en forma uniforme y controlada, de acuerdo con las normas de calidad adecuadas al uso que se pretende dar a los productos, y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización. Las reglamentaciones que rigen las BPM tienen por objeto principal disminuir los riesgos inherentes a toda producción farmacéutica que no pueden prevenirse completamente mediante el control definitivo de los productos. Esencialmente, tales riesgos son de dos tipos: contaminación cruzada (en particular, por contaminantes imprevistos) y confusión (causada por la colocación de etiquetas equivocadas en los envases).

Las medidas que abarca las BPM, es muy amplio, abarcando las normas que deben afectar al personal, locales, maquinarias, instalaciones, materias primas, producto terminado, fabricación, control de calidad y documentación.

La normativa establece que todas las operaciones, proceso, métodos o técnicas, deben estar reguladas o escritas y deben ser cumplidas y supervisadas.

### **3.1.6 Buenas Prácticas de Laboratorio<sup>34</sup>**

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) están relacionadas con la organización, procesos y condiciones bajo las que planifican, realizan, controlan, registran e informan los estudios de los laboratorios. Las BPL pretenden promocionar la calidad y validez de los datos de análisis. Es decir, si el trabajo experimental se dirige cumpliendo las BPL, deberá ser posible para un inspector, auditor en un futuro, observar los registros de trabajo y determinar fácilmente, porque, como y por quien se realizó el trabajo, quien llevaba el control, que equipamiento se utilizó, los resultados obtenidos, que problemas aparecieron y como fueron resueltos.

Las legislaciones nacionales, tienen la responsabilidad de establecer la seguridad y eficacia de los fármacos, así como de exigir a los fabricantes la seguridad de los alimentos y sus aditivos.

### **3.1.7 Control de Calidad**

El control de calidad son todos los mecanismos, acciones, herramientas que realizamos para detectar la presencia de errores y proporcionar un producto de calidad. Control de calidad, forma parte de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), en el cual se encuentran inversos: las especificaciones, el muestreo y los análisis, así como también los procedimientos de organización, documentación y autorización. Que aseguren que se lleve a cabo todas más pruebas pertinentes, autorizando el uso de materiales y la expedición de productos para venta, solo si se ha establecido que la calidad de dicho producto es satisfactoria.<sup>20</sup>

La validación del método analítico es la colección de pruebas documentadas de que un procedimiento analítico es apto para su uso provisto. El uso de un procedimiento validado con instrumentos analíticos calificados ofrece la confianza de que el procedimiento generara datos de prueba de calidad aceptable.

### 3.1.8 ¿Por qué se debe Validar?<sup>2</sup>

Cuando un sistema está validado significa que está estable y es así como nos interesa mantenerlo, dado que estas características son esenciales para mantener altos niveles de calidad.

Con la validación se consigue:

- Aseguramiento de la Calidad
- Reducir costos
- Aumentar la productividad
- Cumplir con las regulaciones

## 3.2 REGLAMENTO PARA EL REGISTRO CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS, DISPOSITIVOS MEDICOS Y PRODUCTOS SANITARIOS

Si la técnica analítica del producto terminado difiere o no se encuentre en ninguna de las farmacopeas de referencia, el interesado debe presentar los documentos que acrediten la validación de las técnicas analíticas propias emitidos por el fabricante de la forma farmacéutica, laboratorio que encarga la fabricación u otro laboratorio de control de calidad certificado por la Autoridad Nacional de Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios o por las Autoridades competentes de los países de alta vigilancia sanitaria o de los países con los cuales exista reconocimiento mutuo en Buenas Prácticas de Manufactura o Buenas Prácticas de Laboratorio.<sup>14</sup>

### 3.3 CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO ANALITICO<sup>44</sup>

Las características de desempeño analítico se expresan en función de los siguientes parámetros analíticos:

### 3.3.1 Linealidad e intervalo

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en muestras dentro de un intervalo dado.

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

- Valoración del contenido del principio activo
- Uniformidad de contenido
- Velocidad de disolución
- Cuantificación de impurezas

El Intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles), en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento analítico.

### 3.3.2 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples tomas de muestras de una muestra homogénea.

La precisión habitualmente se expresa como la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.

La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración.

La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio.

La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un periodo corto por el mismo analista con el mismo equipo.

Las variantes a aplicar se modifican según la medida de precisión como se puede observar en el CUADRO N°3

**CUADRO N°3**  
**VARIANTES A APLICAR PARA CADA MEDIDA DE PRECISION**

VARIANTES	REPETIBILIDAD	PRECISION INTERMEDIA	REPRODUCIBILIDAD
Muestra	X	X	X
Laboratorio	=	Puede variar 1 o más de estas condiciones	≠
Equipo	=		≠
Analistas	=		≠
Método	=		≠
Tiempo	=		≠

Fuente: Elaboración Propia

### **3.3.3 Exactitud**

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo.

### **3.3.4 Selectividad**

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca al analito en presencia de los componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos de apoyo. Otras autoridades internacionales de reconocido prestigio (IUPAC, AOAC-I) han preferido el término “selectividad”, reservando “especificidad” para procedimientos que resulten completamente selectivos.

### **3.3.5 Robustez**

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso.

## **3.4 PARAMETROS QUE SE DEBEN EVALUAR SEGUN EL ENSAYO A VALIDAR**

Los procedimientos de las determinaciones farmacopeicas varían desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones de atributos subjetivos. Considerando esta variedad para los ensayos es lógico que diferentes métodos de prueba requieran diferentes esquemas de validación.

Estas categorías se indican a continuación:

### **3.4.1 Categoría I**

Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos, ya sea el principio activo o los excipientes (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

### **3.4.2 Categoría II**

Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Aquí se determina valores límites para control de impurezas.

Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado. Cualquiera de los dos pretende reflejar las características de pureza de la muestra.

### **3.4.3 Categoría III**

Método analítico para determinar las características de desempeño del producto terminado (por ejemplo disolución, liberación del principio activo).

### **3.4.4 .Categoría IV**

Pruebas de identificación se realiza para asegurar la identidad de un analito en una muestra comparando con un estándar de referencia.

En el CUADRO N° 4 se observa que los ensayos para cada categoría, requieren diferentes tipos de análisis: Los ensayos y resultados generales ya están establecidos (por ejemplo: titulación, determinación de agua) y deben ser validados para verificar su exactitud (y ausencia de posibles interferencias) cuando son usados para un producto nuevo o materia prima.

**CUADRO 4**  
**CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO DE LOS PROCEDIMIENTOS**  
**ANALITICOS VARIABLES**

CARACTERISTICA DE DESEMPEÑO ANALITICO	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
		ANALISIS CUANTITA TIVOS	PRUEBAS DE LIMITE		
1. EXACTITUD	SI	SI	*	*	NO
2. PRECISION	SI	SI	NO	SI	NO
3. SELECTIVIDAD	SI	SI	SI	*	SI
4. LIMITE DE DETECCION	NO	NO	SI	*	NO
5. LIMITE DE CUANTIFICACION	NO	SI	NO	*	NO
6. LINEALIDAD	SI	SI	NO	*	NO
7. RANGO	SI	*	*	*	NO

Fuente: United States Pharmacopeia 35

\*Puede requerir, dependiendo de la naturaleza del ensayo

La validez de un método analítico puede ser verificada solamente por estudios de laboratorio. Por lo tanto la documentación completa de tal estudio es un requerimiento básico para determinar si un método es adecuado para para aplicar su determinación. La documentación apropiada debe acompañarse de alguna propuesta para procedimientos o revisión de procedimientos analíticos.

## CAPITULO II

### MATERIAL Y METODOS

#### 1. MATERIALES

##### 1.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó en Laboratorios Portugal en el Departamento de Control de Calidad, ubicada en Miguel Grau 313 C. Colorado Arequipa Perú y en el Parque Industrial Rio Seco.

##### 1.2 UNIDADES DE ESTUDIO

Para la realización del presente trabajo, la unidades de estudio estuvieron conformadas por jarabes de ambroxol clorhidrato de 15mg/5mL, obtenidas del área de fisicoquímico de Laboratorios Portugal cuyos lotes pertenecían al año 2012.

##### 1.2.1 Material De Laboratorio

###### a) Materiales de vidrio

- Fiolas de 100 mL ámbar
- Vaso de precipitados
- Probetas de 100 mL
- Matraces de 100mL
- Matraces
- Pipetas volumétricas de 25 ml

###### b) Equipos y aparatos

- Balanza analítica
- Estufa
- Espectrofotómetro UV Varian Cary 50
- Termohigrómetros

###### c) Otros

- Guantes

- Barbijos
- Cámara fotográfica
- Papel Toalla
- Papel Aluminio
- Espátulas

d) Reactivos

- Agua destilada
- Ácido clorhídrico 1N
- Hidróxido de Sodio 1 N

En la Figura 2 se aprecia el Espectrofotómetro de modelo UV Varian Cary 50, el cual sirvió para realizar la validación y cuantificación de ambroxol clorhidrato en estudios de estabilidad.



**Figura 2:** Espectrofotómetro UV Varian Cary 50

## 2. METODOS

### 2.1. PREPARACION PARA EL ANALISIS DEL JARABE DE AMBROXOL CLORHIDRATO

Recolección: Se adquirieron las muestras de jarabe en el área de fisicoquímico de Laboratorios Portugal y se procedió a trasladarlas al área de validaciones.

### 2.2. DESCRIPCION DEL METODO DE VALIDACION

Se procedió de la siguiente manera:

#### 2.2.1 Preparación y barrido de curva de calibración

Se pesó cuidadosamente 30 mg de Ambroxol Clorhidrato (Estándar de Referencia), en una balanza previamente calibrada se transfirió a un matraz volumétrico de 200 mL ámbar, se disolvió con agua destilada se agitó y se enrasó a volumen con agua destilada, se tomó 25 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió con agua destilada, se homogenizó bien la muestra y se enrasó con agua destilada; a esta solución se le hizo un barrido para determinar la longitud de onda a la cual se leería siendo esta de 308 nm. Luego de

procedió a hacer las diluciones de 80% 90% 100% 110% 120% según el Cuadro N° 5

**CUADRO N° 5**  
**PESOS DEL ESTANDAR DE REFERENCIA PARA CURVA DE CALIBRACION**

Concentración del Estándar de Referencia	Peso del Estándar de Referencia en mg	Concentración del Estándar de Referencia en mg/mL
80%	24.0 mg	0.0300 mg/mL
90%	27.0 mg	0.0338 mg/mL
100%	30.0 mg	0.0375 mg/mL
110%	33.0 mg	0.0413 mg/mL
120%	36.0 mg	0.0450 mg/mL

Fuente: Elaboración Propia

Se rotuló cada fiola según el orden correspondiente mencionado en el cuadro N°5

## 2.2.2 Validación del Método

### 2.2.2.1 Linealidad

Se preparó 3 curvas de calibración correspondientes a 5 concentraciones que cubran el intervalo del analito (80% 90% 100% 110% 120%).

Preparación:

- Se tomó como referencia el peso del estándar al 100% y calculó el peso a diferentes concentraciones que formarían la curva de calibración.

- Se procedió según el procedimiento de preparación del estándar de manera independiente (Según punto 2.2.1)

#### **a) Linealidad del Método**

Se preparó 3 curvas de calibración correspondientes a 5 concentraciones que cubran el intervalo del analito (80% 90% 100% 110% 120%).

Preparación:

Se transfirió una cantidad de jarabe equivalente a 15mg de ambroxol clorhidrato a un matraz volumétrico de 100 mL se disolvió con agua destilada, se agitó y enrasó a volumen con agua destilada, se transfirió 25 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió con agua destilada se homogenizó bien la muestra y se enrasó con agua destilada.

Se leyó la absorbancia en Espectrofotómetro a una longitud de onda a 308 nm usando como blanco agua.

#### **2.2.2.2 Precisión**

Una vez evaluada la linealidad, se procedió a tomar el estándar de referencia correspondiente a la concentración de 0.0375mg/mL.

#### **a) Repetibilidad**

##### **-Repetibilidad del Sistema**

Se preparó una solución estándar (Según punto 2.2.1)

Se leyó 6 veces la absorbancia en Espectrofotómetro a una longitud de onda de 308 nm usando como blanco agua.

##### **-Repetibilidad del Método**

Se preparó 6 muestras de forma independiente, según el método a validar, llegando a una concentración de 0.0375mg/mL, de cada muestra se obtuvieron 3 absorbancias, se trabajó con el promedio.

Se determinó el coeficiente de variación.

#### **b) Precisión Intermedia**

Un analista realizó el análisis de ambroxol clorhidrato en el producto a evaluar. Preparó un estándar y seis muestras de acuerdo a la técnica analítica a validar.

Un segundo analista realizó el análisis de ambroxol clorhidrato en el producto a evaluar. Preparó un estándar y seis muestras de acuerdo a la técnica analítica a validar.

#### **2.2.2.3 Exactitud**

-Preparación del estándar: Se preparó una solución con el estándar de referencia al 100% (Según el punto 2.2.1)

-Preparación de las nueve muestras: Se preparó por triplicado las muestras, con cantidades conocidas del analito que cubran los tres niveles de la curva (80% 100% 120%), se mezcló el analito con el placebo y se procedió a preparar (Según el punto 2.2.1)

Finalmente se obtuvieron 9 muestras con placebo, es decir 3 muestras al 80%, 3 muestras al 100%, 3 muestras al 120%.

Se leyó la absorbancia en Espectrofotómetro a una longitud de onda de 308 nm usando como blanco agua.

#### **2.2.2.4 Selectividad**

##### **a) Interferencia del método**

Muestra 1: Se preparó con el estándar de referencia. (Según punto 2.2.1).

Muestra 2: Se preparó el jarabe de ambroxol según el método a validar.

Muestra 3: Se tomó 5 mL del placebo y se procedió según el método a validar.

Muestra 4: Solución diluyente (agua).

Se leyó todas las muestras en el Espectrofotómetro SCAN.

**b) Prueba de estresamiento**

La muestra se preparó según el método a validar, luego se sometió a las siguientes condiciones

- 1.- Condición Térmica: Se sometió la muestra a una temperatura mayor al del estudio de estabilidad ( $T= 70^{\circ}\text{C}$ )
- 2.- Exposición luz UV: Se sometió la muestra a exposición de la luz UV durante 5 horas.
- 3.- Condición alcalina: Se atacó la muestra con solución de NaOH 1N durante una hora.
- 4.- Condición ácida: Se atacó la muestra con solución de HCl 1N, durante una hora.

Todas las muestras sometidas fueron leídas en el Espectrofotómetro, en la región espectral UV de 200 a 400 nm.

**2.2.2.5 Robustez**

Se preparó el estándar de referencia (Según el punto 2.2.1) y la muestra según el método a validar.

Se evaluó una muestra a condiciones normales con muestra modificando las siguientes condiciones:

- Temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ .
- Tiempo; pasadas 5 horas.

Todas las muestras se leyeron en el espectrofotómetro.

## 2.3 TRATAMIENTO ESTADISTICO DEL METODO DE VALIDACION

Después de haber desarrollado el método analítico para la determinación de ambroxol clorhidrato y para poder establecer la significancia de los resultados; se procedió a realizar el análisis estadístico con el propósito de documentar si los resultados obtenidos son confiables.

### 2.3.1 Linealidad

La linealidad es determinada por la capacidad del método para obtener respuestas de una serie de patrones de concentración conocida dentro del rango de interés proporcionales a la concentración del analito.

El estudio de la linealidad no solo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística con los siguientes métodos:

#### a. Cálculo de la ecuación de la recta, pendiente y ordenada en el origen.

Se parte de una relación simple entre dos variables

$$Y = f(x)$$

Quiere decir que Y es una función o variable dependiente (respuesta, absorbancia) de la variable X (concentración).

Luego se especifica la forma como esas dos variables se relacionan, esta relación se expresa matemáticamente mediante una recta de regresión:

$$y = bx + a$$

Donde:

$x$  = concentración

$y$  = respuesta

$b$  = valor de la pendiente

$a$  = termino independiente

Fórmula para hallar  $a$  y  $b$

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

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Siendo  $a$  y  $b$  los estimadores de la ordenada al origen y pendiente respectivamente,  $n$  el número de mediciones,  $x$  es la concentración e  $y$  el valor medido en el ensayo independiente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado  $p=0.05$ , 95 %.

El coeficiente de correlación ( $r$ ) nos indica el grado de relación entre la variable  $x$  (concentración), y la variable  $y$  (respuesta). Su valor máximo es 1. Si  $r$  es cercano a la unidad significativa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables.

En la práctica  $r$  es generalmente mayor a 0.99 y los valores menores a 0.90 son raros.

La información obtenida mediante el cálculo de  $r$  es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo  $r^2$  coeficiente de determinación el que aporta una mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total de  $y$  explicada por el modelo.

#### **b. Test de linealidad.**

Donde existen varios procedimientos para verificar la linealidad:

-Coeficiente de variación de los factores respuesta ( $f$ ); expresa la relación entre la lectura o respuesta y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente.

Valores del coeficiente de variación, superiores al 5% serían indicativos de una posible falta de linealidad, siendo recomendables valores no superiores al 2%.

$$f = y_i / x_i$$

Procedimiento a seguir:

Calcular  $f$  para cada concentración.

Determinar  $\bar{x}_f$  (promedio de los factores respuesta)  $S_f$  (desviación estándar de los factores respuesta).

Calcular el coeficiente de variación CV (%)

$$CV_{f\%} = \frac{S_f}{\bar{x}_f} * 100$$

-Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente; se trata de comprobar que existe una pendiente significativa distinta de cero mediante una prueba t de Student.

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

$S_b$  se obtiene a partir del cálculo de la variancia residual  $S^2_{y,x}$

La pendiente tiene que ser estadísticamente distinta de cero para un grado de significación  $\alpha$  igual a 0.05

### c. Test de Proporcionalidad

Este test permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero. Habitualmente suele aceptarse que el valor de dicha ordenada sea como máximo el que corresponda a un 1% de la respuesta del analito a valor normal.

Para llevar a cabo este test se recurre como en el caso anterior a una prueba de significación t de student (n-2 grados de libertad,  $\alpha = 0.05$ ):

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a}$$

$S_a$  se obtiene a partir del cálculo de la variancia residual  $S_{y,x}^2$

La ordenada en el origen tiene que ser estadísticamente igual a cero para el grado de significación escogido.

#### d. Análisis de Varianza

Homogeneidad de Varianza

$$G_{exp} = \frac{S_{maxima}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2 + S_5^2}$$

El  $G_{tablas} = (\alpha=0.05, K= 5, n= 3) = 0.68$

$G_{exp} < G_{tablas}$  significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

#### 2.3.2 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea y esta expresada como la desviación estándar, estimada analíticamente por “ $S$ ”, o más comúnmente como la desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde  $n$  es el número de medidas,  $x_i$  es el valor medido del ensayo  $i$  y  $\bar{x}$  el estimador de la medida de la población  $\mu$  calculado como:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$DSR = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

Tanto la desviación estándar y la desviación estándar relativa permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la medida).

La USP indica una DSR del sistema de no más de 2%, leyendo 5 veces una solución estándar, aunque pueden obtenerse en condiciones apropiadas valores inferiores al 1% e incluso menores.

La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre el sistema, evaluando la dispersión de al menos 6 lecturas del estándar. La precisión debe medirse en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones reproducibles (diferente analista, diferente día, diferente instrumento).

### 2.3.3 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un analito de pureza conocida (Estándar de Referencia).

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, esta debe acercarse al 100%.

$$\text{Porcentaje de recuperación (R)} = \frac{X_m}{\mu} * 100$$

Donde:

$X_m$  = valor medido hallado

$\mu$  = valor aceptado como verdadero

Otra manera de calcularse es como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, mediante un test estadístico (t-pareado) para un nivel de confianza del 0.05%.

Si  $t_{exp} < t_{tabla}$ , no existe diferencia significativa entre un método y otro y la exactitud es apropiada.

En el análisis de trazas (microcomponentes), no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas y se consideran habituales valores de recuperación entre el 60% y 80%. Para determinarlo puede utilizarse un ensayo t de student, efectuando varias determinaciones de la muestra de concentración conocida y calculando como:

$$t_{exp} = \frac{|100 - \% R_{prom}| \sqrt{n}}{CV}$$

Siendo  $R_{prom}$  porcentaje de recuperación promedio

n = número de lecturas

Si  $t_{exp} < t_{tabla}$  no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es apropiada.

### 2.3.4 Selectividad o Especificidad

Especificidad es la capacidad de un método analítico para evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios (USP).

Otras autoridades internacionales de reconocido prestigio (IUPAC, AOAC-I) han preferido el término “selectividad”, reservando “especificidad” para procedimientos que resulten completamente selectivos.

Se postulan las posibles rutas de degradación y métodos de ataque y se pasa luego a un ensayo de degradación artificial, por ejemplo:

- Estresamiento ácido, por calentamiento a reflujo con HCl 1N, durante 1 hora.
- Estresamiento luz, por exposición a luz ultravioleta directa durante 5 horas.
- Estresamiento térmico, la muestra en la estufa por 1 hora a 70° C.
- Estresamiento alcalino, por calentamiento a reflujo con NaOH 1N, durante 1 hora.

En muchos casos la determinación de la especificidad no puede seguir modelos tan sistemáticos y dependerá del arte e ingenio del analista.

### 2.3.5 Robustez

Es la medida de la capacidad de no ser afectado por variaciones pequeñas y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso, determinándose así el coeficiente de variación para las muestras y comparar con la muestra a condiciones normales.

### 3 ENSAYOS DE ESTABILIDAD

#### 3.1 OBTENCION DE LA MUESTRA

Los lotes muestreados representaron el proceso de fabricación, para ello se tomó 3 lotes representativos del 10% de un lote industrial, que tengan iguales las siguientes características:

- Fórmula cuali-cuantitativa
- Sistema contenedor-cierre propuesto para su almacenamiento y distribución.
- Empaque primario
- Método de fabricación
- Lugar de fabricación
- Condiciones de fabricación.

#### 3.2 CONDICIONES AMBIENTALES

Una vez que se tenían las muestras, se colocó en la estufa, donde la temperatura y la humedad están controladas, para estabilidad acelerada según el CUADRO N°6.

**CUADRO N° 6**  
**CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO PARA ENSAYOS DE ESTABILIDAD ACELERADA**

	<b>Condiciones de Almacenamiento</b>	<b>Período Mínimo</b>	<b>Frecuencia de Análisis</b>
Temperatura	40°C +/- 2°C	6 meses	0; 3; 6 meses
Humedad Relativa	75% +/- 5%		

Fuente: Elaboración Propia

Las condiciones de almacenamiento para estabilidad real están controladas según el CUADRO N°7.

**CUADRO N° 7**

### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO PARA ENSAYOS DE ESTABILIDAD REAL

	Condiciones de Almacenamiento	Período Mínimo	Frecuencia de Análisis
Temperatura	30°C +/- 2°C	6 meses	0 ; 6 meses
Humedad Relativa	65% +/- 5%		

Fuente: Elaboración Propia

Estas condiciones son de acuerdo de la zona climática IV a los cuales se debe mantener la muestra en estudio.

Durante estos 6 meses se llevó un registro de temperatura y humedad relativa, el cual se realizaba dos veces por día, para los dos tipos de muestras, es decir tanto para las muestras a tiempo real como a tiempo acelerado.

El ensayo de estabilidad acelerada se realizó con una frecuencia de análisis que incluía el inicio, el final y un punto intermedio (0-03-06) según referencia Directiva Técnica de Medicamentos, se tomó como tiempo cero o inicio a la fecha del análisis fisicoquímico del lote industrial.

En el caso de estabilidad real se realizó con una frecuencia de análisis que incluía el inicio y el final a los 06 meses, se tomó como tiempo cero o inicio a la fecha del análisis fisicoquímico del lote industrial.

### 3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA CUANTIFICACION

#### Tiempo: 0

Se escogió al azar las muestras, del lote muestreado representativo, luego se preparó dos muestras y dos estándares para los ensayos de estabilidad acelerada, y estabilidad real; de manera independiente, según el método validado.

Se leyó las soluciones preparadas, esto significa el inicio del análisis, se registra los datos.

#### Tiempo: 03 meses

Transcurridos 03 meses a partir del tiempo 0, se escogió al azahar las muestras que se encontraban en la estufa correspondiente a los ensayos de estabilidad acelerada que se encontraban bajo determinadas condiciones de almacenamiento, se preparó dos muestras y dos estándares de manera independiente; según el método validado.

Se leyó las soluciones preparadas, se registraron los datos.

**Tiempo: 06 meses**

Transcurridos 06 meses a partir del tiempo 0, se escogió al azahar, muestras que se encontraban en cada estufa; tanto de los ensayos de estabilidad acelerada como estabilidad real; que se encontraban bajo determinadas condiciones de almacenamiento, cada una; se prepara dos muestras y dos estándares de manera independiente, para cada tipo de estabilidad, según el método validado.

Se leyó las soluciones preparadas, se registraron los datos.

Se preparó un protocolo de estabilidad, que contenía la siguiente información:

- Nombre del medicamento, forma farmacéutica, presentación y concentración.
- Número de lote del medicamento.
- Descripción del sistema contenedor-cierre.
- Fecha de fabricación.
- Tamaño de lote.
- Fecha de expiración según registro.
- Motivo del estudio de estabilidad.
- Nombre del laboratorio fabricante del medicamento.
- Especificaciones para el análisis.

### 3.4 ANALISIS DE RESULTADOS

Uno de los parámetros críticos dentro de un estudio de estabilidad es la determinación de la concentración del principio activo, es por eso que esta investigación se enfocó básicamente en ello.

Los cambios significativos que invalidan los estudios de estabilidad acelerados son los siguientes:

- Pérdida de más de 5 % de concentración del principio activo. Otros valores pueden aplicarse a ciertos productos si se justifica por la naturaleza de los principios activos tales como multivitamínico.
- Alteraciones de pH fuera del rango especificado.
- Aumento de concentración de los productos de degradación o sustancias relacionadas más allá de los límites establecidos.
- Alteraciones importantes de la apariencia del producto.

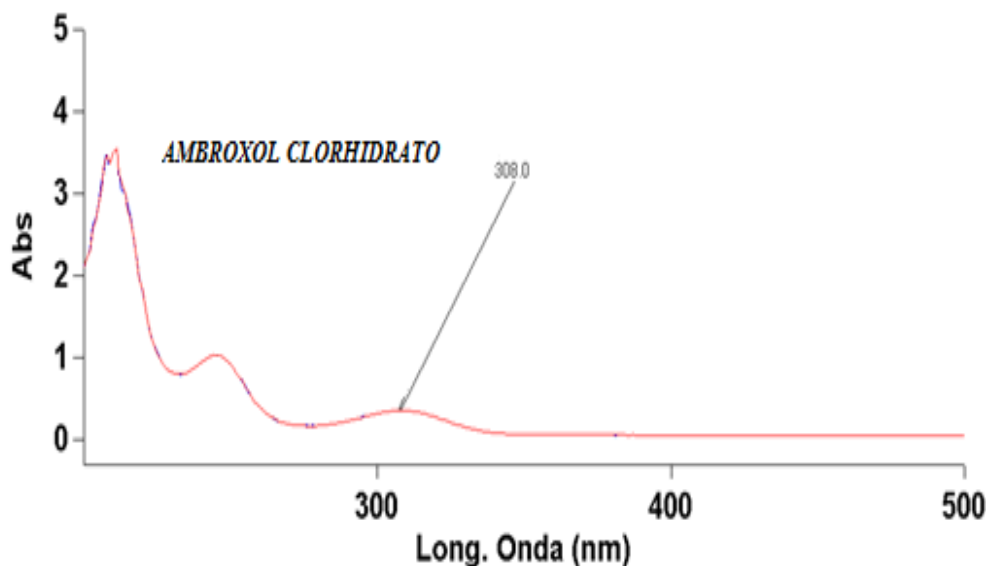


## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSION

Para poder usar el método analítico propuesto en los ensayos de estabilidad acelerada, es necesario inicialmente validar la metodología analítica propuesta, de que de acuerdo a los requisitos solicitados por la farmacopea americana, siendo un ensayo cuantitativo de categoría I, el cual precisa como características de desempeño analítico: exactitud, precisión, especificidad o selectividad, linealidad e intervalo y para fines de seguridad también se realizó robustez.

Inicialmente se determinó la longitud de onda óptima para ambroxol clorhidrato realizando un barrido, el cual se puede observar en la figura N° 3.



**Figura N° 3** Barrido espectrofotométrico de una solución de ambroxol en el cual se obtuvo una longitud de onda de 308 nm

## **1 .DESARROLLO Y VALIDACION DEL METODO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA PARA LA DETERMINACION DE AMBROXOL CLORHIDRATO**

Para el desarrollo y validación del método se tuvieron en cuenta parámetros establecidos por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 35) como son la linealidad, precisión, exactitud, selectividad y la robustez.

### **1.1 LINEALIDAD**

Se realizó la linealidad en el sistema (solución estándar), los datos obtenidos se pueden observar en el CUADRO N°8

**CUADRO N° 8**  
**DETERMINACION DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA**

<b>Preparación 1</b>								
	Peso	Fiola	Pipeta	Fiola	Conc. mg/mL	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
Dilución al 80%	24.04mg	200mL	25mL	100mL	0.0301	0.2186	0.2178	0.2181
Dilución al 90%	27.06mg	200mL	25mL	100mL	0.0338	0.2576	0.2550	0.2520
Dilución al 100%	30.09mg	200mL	25mL	100mL	0.0376	0.2765	0.2769	0.2763
Dilución al 110%	33.10mg	200mL	25mL	100mL	0.0414	0.3063	0.3059	0.3051
Dilución al 120%	36.11mg	200mL	25mL	100mL	0.0451	0.3327	0.3351	0.3331
<b>Preparación 2</b>								
	Peso	Fiola	Pipeta	Fiola	Conc. mg/mL	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
Dilución al 80%	24.05mg	200mL	25mL	100mL	0.0301	0.2179	0.2164	0.2178
Dilución al 90%	27.08mg	200mL	25mL	100mL	0.0339	0.2574	0.2547	0.2522
Dilución al 100%	30.10mg	200mL	25mL	100mL	0.0376	0.2765	0.2770	0.2762
Dilución al 110%	33.11mg	200mL	25mL	100mL	0.0414	0.3074	0.3056	0.3066
Dilución al 120%	36.08mg	200mL	25mL	100mL	0.0451	0.3331	0.3353	0.3349
<b>Preparación 3</b>								
	Peso	Fiola	Pipeta	Fiola	Conc. mg/mL	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
Dilución al 80%	24.04mg	200mL	25mL	100mL	0.0301	0.2187	0.2178	0.218
Dilución al 90%	27.10mg	200mL	25mL	100mL	0.0339	0.2566	0.2546	0.2523
Dilución al 100%	30.11mg	200mL	25mL	100mL	0.0376	0.2771	0.2768	0.2759
Dilución al 110%	33.10mg	200mL	25mL	100mL	0.0414	0.3059	0.3052	0.3045
Dilución al 120%	36.09mg	200mL	25mL	100mL	0.0451	0.3351	0.3358	0.3347

Fuente: Elaboración Propia

La curva de calibración se realizó con tres preparaciones de estándar en 05 puntos, con tres repeticiones de cada uno de ellos, esta para asegurar la correcta medición de las variaciones para cada punto de la recta.

El gráfico de linealidad del sistema se puede observar en la Figura N°4 el cual se construyó usando un modelo lineal, con los datos de las tres preparaciones, resumidas en el CUADRO N°8, para valores de la absorbancia se obtuvo un promedio entre los tres datos arrojados en cada lectura.

En la Figura N°4 se evidencia la linealidad del sistema, que fue construida con la concentración “x” de ambroxol en mg/mL versus “y” que son las absorbancias de ambroxol correspondientes a cada concentración “x”, en la que las absorbancias son dependientes de la concentración.

De esta manera se pudo determinar la respuesta del instrumento; en este caso, es lineal, lo cual nos permitirá predecir concentraciones de un desconocido en base a las absorbancias obtenidas de una dilución del principio activo.

#### **A. Cálculo de la recta de regresión**

Para el caso de una recta, la ecuación toma la siguiente forma:

$$y = bx + a$$

Para hallarse los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b”, fue necesario establecer la recta de regresión a partir de los datos del CUADRO N°8, donde se hallan los resultados obtenidos de la linealidad del método y se elabora la recta de regresión, como se puede observar en la figura N°4

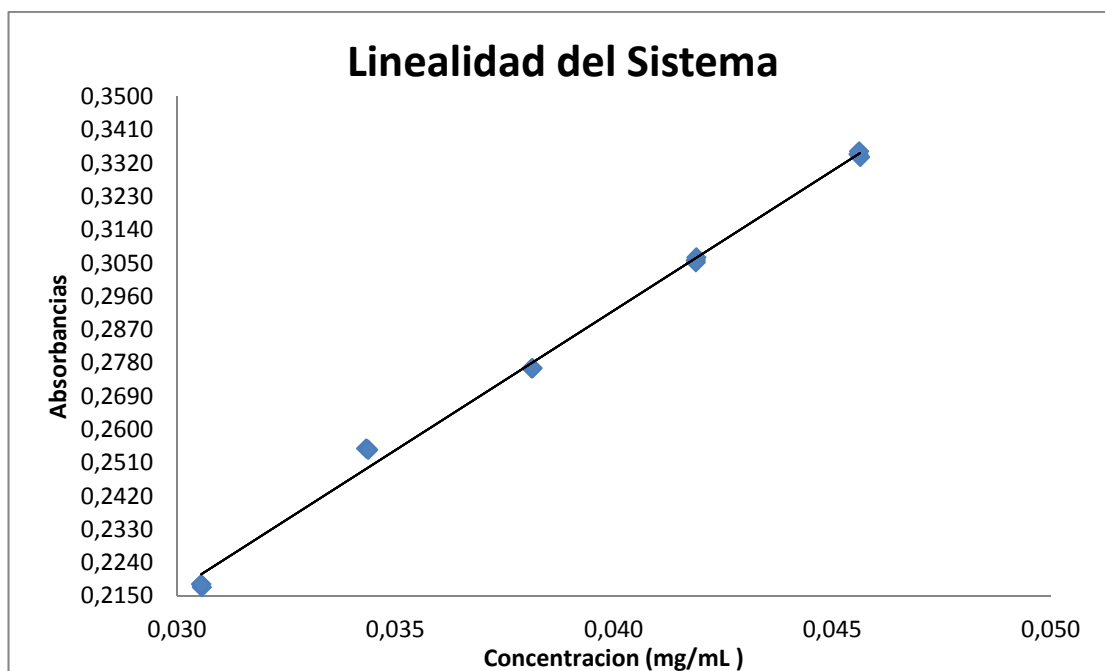


Figura 4: Curva de calibración ajustada para la linealidad del sistema

**CUADRO N°9**  
**DATOS PARA LA EVALUACION ESTADISTICA DE LINEALIDAD**

Concentración Teórica	Muestras	mg/mL (x)	Absorbancia (y)	xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	f(factor respuesta)	Varianza
80%	mp1	0.0301	0.2182	0.0066	0.0009	0.0476	7.2492	0.0002355
	mp2	0.0301	0.2174	0.0065	0.0009	0.0473	7.2226	
	mp3	0.0301	0.2182	0.0066	0.0009	0.0476	7.2492	
90%	mp1	0.0338	0.2549	0.0086	0.0011	0.0650	7.5414	0.0003120
	mp2	0.0339	0.2548	0.0086	0.0011	0.0649	7.5162	
	mp3	0.0339	0.2545	0.0086	0.0011	0.0648	7.5074	
100%	mp1	0.0376	0.2766	0.0104	0.0014	0.0765	7.3564	1.1833x10 <sup>-30</sup>
	mp2	0.0376	0.2766	0.0104	0.0014	0.0765	7.3564	
	mp3	0.0376	0.2766	0.0104	0.0014	0.0765	7.3564	
110%	mp1	0.0414	0.3058	0.0127	0.0017	0.0935	7.3865	0.0002470
	mp2	0.0414	0.3065	0.0127	0.0017	0.0939	7.4034	
	mp3	0.0414	0.3052	0.0126	0.0017	0.0931	7.3720	
120%	mp1	0.0451	0.3336	0.0150	0.0020	0.1113	7.3969	0.0003147
	mp2	0.0451	0.3344	0.0151	0.0020	0.1118	7.4146	
	mp3	0.0451	0.3352	0.0151	0.0020	0.1124	7.4324	
Σ		0.5641	4.1685	0.1600	0.0216	1.1827	103.5117	

Fuente: Elaboración Propia

Después de haberse establecido la recta de regresión, los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b”, fueron hallados con las siguientes formulas, los datos fueron obtenidos CUADRO N° 9

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

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Correspondiendo a valores del intercepto “a” y pendiente “b” los siguientes valores:

a: -0.0067

b: 7.5677

Ecuación de la recta:  $y = 7.5677x - 0.0067$

## B. Interpretación estadística de la regresión lineal

### 1. Cálculo del coeficiente de correlación

Con la finalidad de poder conocer el grado de intensidad de la relación existente entre las variables “x” e “y”, se halla el valor del coeficiente de correlación lineal, mediante la siguiente formula:

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

El coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9975.

Criterio de aceptación > 0.99

## 2. Cálculo del coeficiente de determinación

Indica el grado de ajuste de la ecuación y se halla elevando el coeficiente de correlación al cuadrado

$$r^2$$

El coeficiente de determinación obtenido fue de 0.9951.

Criterio de aceptación  $>0.995$ .

El valor es muy cercano a uno, estableciéndose que el modelo lineal es adecuado para describir la relación que existe entre las variables “x” e “y”. Pudiendo afirmar que el 99.51% de las variaciones se debe a influencia de la variable “x”.

## 3. Test estadístico del coeficiente de correlación

Uno de los mejores indicativos del modelo lineal no es únicamente el coeficiente de correlación “r” sino un test estadístico basado en dos hipótesis, en el que se calcula el  $t_{\text{regresión}}$  (test de regresión) se compara con  $t_{\text{tablas}}$  (test tabulado) con n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza del 95% ( $\alpha :0.05$ ) valor que es encontrado en la tabla de distribución de t de Student.

Hipótesis nula (H0): no existe correlación significativa entre “x” y “y”(r = 0)

Hipótesis alternativa ( H1): “r” no debe ser significativamente diferente de uno ( r  $\neq$  0)

El t regresión encontrado fue de: 51.38 calculado a partir de la siguiente prueba estadística:

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

$t_{\text{tabla}}$  : 2.16 Para 15-2=13 grados de libertad y 95% grado de confianza

$t_r$ : 51.38

$t_r 51.38 > t_{\text{tabla}} 2.16$ , se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, es decir si hay correlación significativa entre las concentraciones y sus absorbancias.

## 4. Test de Linealidad

**a. Límite de confianza de la pendiente “b”**

Este valor se calcula en función de la desviación estándar de la pendiente “b” ( $S_b$ ) se debe hallar primero la varianza del error experimental total (determinación de la varianza de  $x$  sobre  $y$ ) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

$$S_{y,x}^2 = 0.000009$$

A partir de ello se calcula la desviación estándar de la pendiente  $b$  ( $S_b$ ), con la siguiente fórmula

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_b = 0.1471$$

Fórmula para hallar los límites de confianza de la pendiente  $b$

$$b = b \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_b$$

$t_{\text{tabla}}$  = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, bajo las siguientes condiciones:

- $n-2$  grados de libertad,  $n$ : número de muestras
- Grado de confianza del 95%

**Resultado:**

Intervalo de confianza de la pendiente “b”

$$t_{\text{tabla}} : 2.16$$

Límite de confianza superior: 7.8854

Límite de confianza inferior: 7.2500

$b$ : 7.2500 hasta 7.8854

Este intervalo de confianza no incluye 0

### b. Test estadístico de la pendiente “ $b$ ”

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba de  $t$  de student.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ $t_{exp}$ ” y “ $t_{tabla}$ ”

Hipótesis nula ( $H_0$ ) = “ $b$ ” es estadísticamente igual a cero ( $b=0$ )

Hipótesis alternativa ( $H_1$ ) = “ $b$ ” es estadísticamente diferente de cero ( $b \neq 0$ )

Fórmula para hallar el valor de  $t$  experimental “ $t_{exp}$ ”

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

#### Resultado:

$t_{tabla}$  : 2.16 Para  $15-2=13$  grados de libertad y 95% de confianza.

$t_{exp}$ : 50.45

$t_{exp} > t_{tabla}$ , entonces se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y “ $b$ ” es significativamente diferente de cero y se corrobora que el intervalo de confianza no incluye el cero.

### c. Coeficiente de variación de los factores de respuesta ( $f$ )

El factor de respuesta ( $f$ ) expresa la relación entre la lectura o respuesta (absorbancia) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente. Se calcula, mediante la siguiente fórmula:

$$CV_{f\%} = \frac{S_f}{\bar{x}_f} * 100$$

Donde

$S_f$  = desviación estándar de ( $f$ )

$\bar{x}_f$  = promedio de factor respuesta

Resultado:

$$CV_{f\%} = 1.29$$

Coefficiente de variación inferior al 2%, es decir que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 1.29 % de dispersión.

## 5. Test de Proporcionalidad

### a. Límite de confianza del intercepto “a”

Este valor se calcula en función de la desviación estándar del intercepto “a” ( $S_a$ ) con la siguiente formula:

$$S_a = \sqrt{S_b^2 \cdot \frac{\sum x^2}{n}}$$

$S_a = 0.0056$

Fórmula para hallar los límites de confianza del intercepto

$$a = a \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_a$$

$t_{\text{tabla}}$  = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, bajo las siguientes condiciones:

- n-2 grados de libertad, n: número de muestras
- Grado de confianza del 95%

### Resultado:

Intervalo de confianza del intercepto “a”

$$t_{\text{tabla}} : 2.16$$

Límite de Confianza Inferior = -0.0188

Límite de Confianza Superior = 0.0054

$a = -0.0188$  hasta  $0.0054$

Este intervalo de confianza incluye el 0

### **b. Test estadístico del intercepto “a”**

El test de proporcionalidad permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si el intercepto es distinto de cero o igual a cero.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ $t_{exp}$ ” y “ $t_{tabla}$ ”

Hipótesis nula (H0): “a” es estadísticamente igual a cero

Hipótesis alternativa (H1): “a” es estadísticamente diferente de cero

Fórmula para hallar el valor de t experimental “ $t_{exp}$ ”

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a}$$

#### **Resultado:**

$t_{tabla}$  : 2.16 Para  $15-2=13$  grados de libertad y grado de confianza al 95%

$t_{exp}$ : 1.20

$t_{exp} < t_{tabla}$ , entonces se acepta la hipótesis nula (H0), concluyendo que “a” es estadísticamente igual a cero su intervalo de confianza incluye el cero, el valor de “a” es aceptable y se corrobora que el intervalo de confianza incluye 0.

## **6. Análisis de Varianzas**

### **a- Homogeneidad de la varianza**

Para determinar la homogeneidad de varianzas se aplica el test de Cochran ( $G_{exp}$ ), el cual indica si la concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados. Para poder determinar la homogeneidad de las varianzas necesitamos determinar las varianzas de la  $f(y/x)$  para cada

concentración, la cual se halla en el CUADRO N°9, con estos datos se calcula el  $G_{exp}$  el cual se compara con el  $G_{tabla}$ , se planteó dos hipótesis.

**Hipótesis nula (H<sub>0</sub>):** Las varianzas son semejantes

**Hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>):** Las varianzas son diferentes

El  $G_{exp}$  se halló con la siguiente fórmula:

$$G_{exp} = \frac{S_{maxima}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2 + S_5^2}$$

**Resultados:**

$$G_{exp} = 0.28$$

$G_{tabla}$  = Es el valor obtenido en la tabla de homogeneidad de varianzas de Cochran bajo las siguientes condiciones:

- Grado de confianza del 95%

-k (número de grupos) = 5, n (número de réplicas por grupo) = 3

$$G_{tabla} = 0.68$$

$G_{exp} < G_{tablas}$ , se acepta la H<sub>0</sub>; las varianzas son homogéneas, las varianzas de las 3 concentraciones son equivalentes, o lo que es igual, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados y se corrobora que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

Con los datos obtenidos se elaboró el CUADRO N°10, donde están los parámetros calculados resumidos para la determinación de la linealidad del sistema.

## CUADRO N°10

**PARAMETROS CALCULADOS PARA LA DETERMINACION DE LA  
LINEALIDAD DEL SISTEMA**

<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>
Ecuación de la Recta	$y = 7.5677 x - 0.0067$
Coefficiente de Correlación ( $r$ )	0.9975
Coefficiente de Determinación ( $r^2$ )	0.9951
<b>Test de linealidad</b>	
Variación del error experimental total ( $S_{xy}^2$ )	0.000009
Desviación estándar de la pendiente "b" ( $S_b$ )	0.1471
Límites de confianza de la pendiente "b"	$7.2500 < b < 7.8854$
Test estadístico de la pendiente "b" $t_{exp} > t_{tablas}$	$50.45 > 2.16$
Coefficiente de variación de los factores de respuesta ( $f$ )	1.29
<b>Test de proporcionalidad</b>	
Desviación estándar del intercepto "a" ( $S_a$ )	0.0056
Límites de confianza del intercepto "a"	$-0.0188 < a < 0.0054$
Test estadístico del intercepto "a" $t_{exp} < t_{tablas}$	$1.20 < 2.16$
<b>Análisis de varianza</b>	
Homogeneidad de varianza $G_{exp} < G_{tabla}$	$0.28 < 0.68$

Fuente: Elaboración Propia

Luego se procedió a realizar la linealidad del método y se obtuvo los siguientes resultados que se muestran en el CUADRO N°11

**CUADRO N° 11**  
**DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL METODO**

<b>Preparación 1</b>								
	Peso	Fiola	Pipeta	Fiola	Conc. mg/mL	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
Dilución al 80%	12.00mg	100mL	25mL	100mL	0.0300	0.2279	0.2234	0.2256
Dilución al 90%	13.50mg	100mL	25mL	100mL	0.0338	0.2607	0.2621	0.2613
Dilución al 100%	15.00mg	100mL	25mL	100mL	0.0375	0.2823	0.2839	0.2858
Dilución al 110%	16.50mg	100mL	25mL	100mL	0.0413	0.3129	0.3118	0.3121
Dilución al 120%	18.00mg	100mL	25mL	100mL	0.0450	0.3443	0.3467	0.3452
<b>Preparación 2</b>								
	Peso	Fiola	Pipeta	Fiola	Conc. mg/mL	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
Dilución al 80%	12.00mg	100mL	25mL	100mL	0.0300	0.2258	0.2265	0.2249
Dilución al 90%	13.50mg	100mL	25mL	100mL	0.0338	0.2629	0.2616	0.2608
Dilución al 100%	15.00mg	100mL	25mL	100mL	0.0375	0.2822	0.2862	0.2811
Dilución al 110%	16.50mg	100mL	25mL	100mL	0.0413	0.3131	0.3129	0.3137
Dilución al 120%	18.00mg	100mL	25mL	100mL	0.0450	0.3464	0.3456	0.3437
<b>Preparación 3</b>								
	Peso	Fiola	Pipeta	Fiola	Conc. mg/mL	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
Dilución al 80%	12.00mg	100mL	25mL	100mL	0.0300	0.2262	0.2251	0.2248
Dilución al 90%	13.50mg	100mL	25mL	100mL	0.0338	0.2613	0.2605	0.2609
Dilución al 100%	15.00mg	100mL	25mL	100mL	0.0375	0.2825	0.2831	0.2817
Dilución al 110%	16.50mg	100mL	25mL	100mL	0.0413	0.3122	0.3116	0.3112
Dilución al 120%	18.00mg	100mL	25mL	100mL	0.0450	0.3454	0.3474	0.3451

Fuente: Elaboración Propia

La curva de calibración se realizó con tres preparaciones de estándar en 05 puntos, con tres repeticiones de cada una de ellas, y con tres lecturas para cada repetición, en la elaboración del gráfico de linealidad, se trabajó con el promedio de estas tres lecturas en el caso de las absorbancias; esto para asegurar la correcta medición de las variaciones para cada punto de la recta.

El gráfico de linealidad del sistema se puede observar en la Figura N°5 el cual se construyó usando un modelo lineal, con los datos obtenidos de las tres preparaciones que se resumen en el CUADRO N°11, esto con el fin de determinar la respuesta del método; en este caso, es lineal, lo cual nos permitirá predecir concentraciones de un desconocido en base a las absorbancias obtenidas de una dilución del principio activo.

#### A. Cálculo de la recta de regresión

Para el caso de una recta, la ecuación toma la siguiente forma:

$$y = bx + a$$

Para hallarse los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b”, fue necesario establecer la recta de regresión a partir de los datos del CUADRO N°11, donde se hallan los resultados obtenidos de la linealidad del método y se elabora la recta de regresión, como se puede observar en la figura N°5

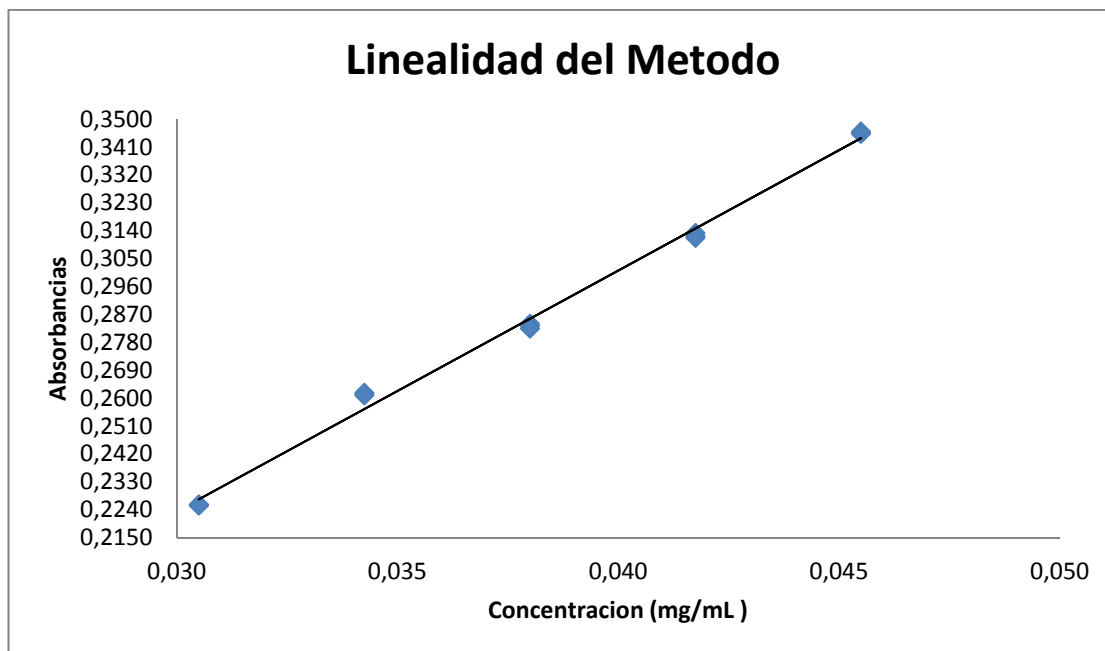


Figura 5: Curva de calibración ajustada para linealidad del método

**CUADRO N°12**  
**DATOS PARA LA EVALUACION ESTADISTICA DE LINEALIDAD**  
**DEL METODO**

Concen tración Teórica	Mu estr as	mg/mL (x)	Absorb ancia (y)	xy	x2	y2	f(factor respuesta)	Varianza
80%	mp1	0.0300	0.2256	0.0068	0.0009	0.0509	7.5200	2.5926x10 <sup>-5</sup>
	mp2	0.0300	0.2257	0.0068	0.0009	0.0509	7.5233	
	mp3	0.0300	0.2254	0.0068	0.0009	0.0508	7.5133	
90%	mp1	0.0338	0.2614	0.0088	0.0011	0.0683	7.7337	0.0001780
	mp2	0.0338	0.2618	0.0088	0.0011	0.0685	7.7456	
	mp3	0.0338	0.2609	0.0088	0.0011	0.0681	7.7189	
100%	mp1	0.0375	0.284	0.0107	0.0014	0.0807	7.5733	0.0004551
	mp2	0.0375	0.2832	0.0106	0.0014	0.0802	7.5520	
	mp3	0.0375	0.2824	0.0106	0.0014	0.0797	7.5307	
110%	mp1	0.0413	0.3123	0.0129	0.0017	0.0975	7.5617	0.0003342
	mp2	0.0413	0.3132	0.0129	0.0017	0.0981	7.5835	
	mp3	0.0413	0.3117	0.0129	0.0017	0.0972	7.5472	
120%	mp1	0.0450	0.3454	0.0155	0.0020	0.1193	7.6756	8.5597x10 <sup>-5</sup>
	mp2	0.0450	0.3452	0.0155	0.0020	0.1192	7.6711	
	mp3	0.0450	0.346	0.0156	0.0020	0.1197	7.6889	
Σ		0.5628	4.2842	0.1640	0.0215	1.2491	106.6189	

Fuente: Elaboración Propia

Después de haberse establecido la recta de regresión, los valores que corresponden al intercepto “a” y pendiente “b” fueron hallados mediante las siguientes fórmulas, usando los datos obtenidos en el CUADRO N°12

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

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

Correspondiendo a valores del intercepto “a” y pendiente “b” los siguientes valores:

a: -0.0055

b: 7.7598

Ecuación de la recta:  $y = 7.7598x - 0.0055$

## B. Interpretación estadística de la regresión lineal

### 1. Cálculo del coeficiente de correlación

Con la finalidad de poder conocer el grado de intensidad de la relación existente entre las variables “x” e “y”, se halla el valor del coeficiente de correlación lineal, mediante la siguiente fórmula:

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

El coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9976.

Criterio de aceptación  $> 0.99$

## 2. Cálculo del coeficiente de determinación

Indica el grado de ajuste de la ecuación y se halla elevando el coeficiente de correlación al cuadrado

$$r^2$$

El coeficiente de determinación obtenido fue de 0.9952.

Criterio de aceptación  $>0.995$ .

El valor es muy cercano a uno, estableciéndose que el modelo lineal es adecuado para describir la relación que existe entre las variables “x” e “y”. Pudiendo afirmar que el 99.52% de las variaciones se debe a influencia de la variable “x”.

## 3. Test estadístico del coeficiente de correlación

Uno de los mejores indicadores del modelo lineal no es únicamente el coeficiente de correlación “r” sino un test estadístico basado en dos hipótesis, en el que se calcula el  $t_{regresión}$  (test de regresión) se compara con  $t_{tablas}$  (test tabulado) con n-2 grados de libertad y un intervalo de confianza del 95% ( $\alpha:0.05$ ) valor que es encontrado en la tabla de distribución de t de Student.

Hipótesis nula (H0): no existe correlación significativa entre “x” y “y” ( $r = 0$ )

Hipótesis alternativa (H1): “r” no debe ser significativamente diferente de uno ( $r \neq 0$ )

El  $t_{regresión}$  encontrado fue de: 52.47 calculado a partir de la siguiente prueba estadística:

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

$t_{tabla}$ : 2.16 Para  $15-2=13$  grados de libertad y 95% grado de confianza

$t_r$ : 52.47

$t_r 52.47 > t_{tabla} 2.16$ , se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, es decir si hay correlación significativa entre las concentraciones y sus absorbancias.

#### 4. Test de Linealidad

##### a. Límite de confianza de la pendiente $b$

Este valor se calcula en función de la desviación estándar de la pendiente " $b$ " ( $S_b$ ) se debe hallar primero la varianza del error experimental total (determinación de la varianza de " $x$ " sobre " $y$ ") cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

$$S_{y,x}^2 = 0.000009$$

A partir de ello se calcula la desviación estándar de la pendiente  $b$  ( $S_b$ ), con la siguiente fórmula:

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_b = 0.1486$$

Fórmula para hallar los límites de confianza de la pendiente " $b$ "

$$b = b \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_b$$

$t_{\text{tabla}}$  = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, bajo las siguientes condiciones:

- $n-2$  grados de libertad,  $n$ : número de muestras
- Grado de confianza del 95%

##### **Resultado:**

Intervalo de confianza de la pendiente " $b$ "

$$t_{\text{tabla}} : 2.16$$

Límite de confianza superior: 8.0816

Límite de confianza inferior: 7.4380

“*b*”: 7.4380 hasta 8.0816

Este intervalo de confianza no incluye 0

### b. Test estadístico de la pendiente “*b*”

Se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba de *t* de student.

Se realiza estableciendo una comparación entre “*t<sub>exp</sub>*” y “*t<sub>tabla</sub>*”

Hipótesis nula (*H<sub>0</sub>*) = “*b*” es estadísticamente igual a cero (*b*=0)

Hipótesis alternativa (*H<sub>1</sub>*) = “*b*” es estadísticamente diferente de cero (*b*≠0)

Fórmula para hallar el valor de *t* experimental “*t<sub>exp</sub>*”

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b}$$

#### Resultado:

*t<sub>tabla</sub>* : 2.16 Para 15-2=13 grados de libertad y 95% de confianza.

*t<sub>exp</sub>*: 52.22

*t<sub>exp</sub>* > *t<sub>tabla</sub>*, entonces se rechaza la hipótesis nula (*H<sub>0</sub>*) y “*b*” es significativamente diferente de cero y se corrobora que el intervalo de confianza no incluye el cero.

### c. Coeficiente de variación de los factores de respuesta (*f*)

El factor de respuesta (*f*) expresa la relación entre la lectura o respuesta (absorbancia) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre si y cercanos al valor de la pendiente.

Se calcula, mediante la siguiente formula:

$$CV_{f\%} = \frac{S_f}{\bar{x}f} * 100$$

Donde

$S_f$  = desviación estándar de ( $f$ )

$\bar{x}_f$  = promedio de factor respuesta

Resultado:

$$CV_f\% = 1.13$$

Coefficiente de variación inferior al 2%, es decir que el conjunto de datos en relación a su media, se encuentran con un grado de 1.13 % de dispersión.

## 5 Test de Proporcionalidad

### a. Límite de confianza del intercepto “ $a$ ”

Este valor se calcula en función de la desviación estándar del intercepto “ $a$ ” ( $S_a$ ) con la siguiente formula:

$$S_a = \sqrt{S_b^2 \cdot \frac{\sum x^2}{n}}$$

$$S_a = 0.0056$$

Fórmula para hallar los límites de confianza del intercepto

$$a = a \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_a$$

$t_{\text{tabla}}$  = Es el valor obtenido en la tabla de distribución de student, bajo las siguientes condiciones:

- $n-2$  grados de libertad,  $n$ : número de muestras
- Grado de confianza del 95%

### Resultado:

Intervalo de confianza del intercepto “ $a$ ”

$$t_{\text{tabla}} : 2.16$$

$$\text{Límite de Confianza Inferior} = -0.0176$$

Límite de Confianza Superior = 0.0066

$a = -0.0176$  hasta 0.0066

Este intervalo, si incluye 0

### b. Test estadístico del intercepto “ $a$ ”

El test de proporcionalidad permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinando si el intercepto es distinto de cero o igual a cero.

Se realiza estableciendo una comparación entre “ $t_{exp}$ ” y “ $t_{tabla}$ ”

Hipótesis nula ( $H_0$ ): “ $a$ ” es estadísticamente igual a cero

Hipótesis alternativa ( $H_1$ ): “ $a$ ” es estadísticamente diferente de cero

Fórmula para hallar el valor de  $t$  experimental “ $t_{exp}$ ”

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a}$$

#### Resultado:

$t_{tabla}$  : 2.16 Para  $15-2=13$  grados de libertad y 95% de confianza

$t_{exp}$ : 0.98

$t_{exp} < t_{tabla}$ , entonces se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ), concluyendo que “ $a$ ” es estadísticamente igual a cero su intervalo de confianza incluye el cero, el valor de “ $a$ ” es aceptable.

## C. Análisis de Varianzas

### a. Homogeneidad de la varianza

Para determinar la homogeneidad de varianzas se aplica el test de Cochran ( $G_{exp}$ ), el cual indica si la concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados. Para poder determinar la homogeneidad de las varianzas necesitamos determinar las varianzas de la  $f(y/x)$  para cada

concentración, la cual se halla en el CUADRO N°10, con estos datos se calcula el  $G_{exp}$  el cual se compara con el  $G_{tabla}$ , se planteó dos hipótesis.

Hipótesis nula ( $H_0$ ): Las varianzas son semejantes

Hipótesis alternativa ( $H_1$ ): Las varianzas son diferentes

El  $G_{exp}$  se halló con la siguiente fórmula:

$$G_{exp} = \frac{S_{maxima}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2 + S_4^2 + S_5^2}$$

Resultados:

$$G_{exp} = 0.42$$

$G_{tabla}$  = Es el valor obtenido en la tabla de homogeneidad de varianzas de Cochran bajo las siguientes condiciones:

- Grado de confianza del 95%

-k (número de grupos) = 5, n (número de réplicas por grupo) = 3

$$G_{tabla} = 0.68$$

$G_{exp} < G_{tablas}$ , se acepta la  $H_0$ ; las varianzas son homogéneas, las varianzas de las 3 concentraciones son equivalentes, o lo que es igual, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados y se corrobora que las varianzas no son estadísticamente diferentes entre sí.

Con los datos obtenidos se elaboró el CUADRO N°13, donde están los parámetros calculados resumidos para la determinación de la linealidad del método.

### CUADRO N° 13

**PARAMETROS CALCULADOS PARA LA DETERMINACION DE LA LINEALIDAD DEL METODO**

<b>Parámetros</b>	<b>Resultados</b>
Ecuación de la Recta	$y = 7.7598x - 0.0055$
Coefficiente de Correlación (r)	0.9976
Coefficiente de Determinación (r <sup>2</sup> )	0.9952
<b>Test de linealidad</b>	
Variación del error experimental total ( $S_{xy}^2$ )	0.000009
Desviación estándar de la pendiente "b" ( $S_b$ )	0.1486
Límites de confianza de la pendiente "b"	$7.4380 < b < 8.0816$
Test estadístico de la pendiente "b" $t_{exp} > t_{tablas}$	$52.22 > 2.16$
Coefficiente de variación de los factores de respuesta (f)	1.13
<b>Test de proporcionalidad</b>	
Desviación estándar del intercepto "a" ( $S_a$ )	0.0056
Límites de confianza del intercepto "a"	$-0.0176 < a < 0.0066$
Test estadístico del intercepto "a" $t_{exp} < t_{tablas}$	$0.98 < 2.16$
<b>Análisis de varianza</b>	
Homogeneidad de varianza $G_{exp} < G_{tabla}$	$0.42 < 0.68$

Fuente: Elaboración Propia

El parámetro de linealidad nos permite asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, sean proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos apreciar que el coeficiente de correlación está muy cercano a la unidad por lo que podemos afirmar que existe una buena correlación entre las variaciones de la concentración del analitos y su respuesta (Absorbancia), el coeficiente de determinación nos indica que existe una buena predictibilidad de la respuesta a distintas concentraciones del analito.

Sin embargo, para que estos resultados tengan validez científica, se procedió a realizar el análisis de varianza, donde se calculó también el valor de  $t_r$  (test estadístico del coeficiente de correlación r), con n-2 grados de libertad y se comparó con el valor t tabulado para un nivel de confianza de 0.05%. En este caso la hipótesis nula es la no correlación entre X e Y. Si el valor observado de  $t_r$  es

mayor de  $t$  de tabla, se rechaza la hipótesis nula, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

-Se usó: valor  $t_{\text{tabla}} = 2.160$ ; para  $n-2$  grados de libertad con una  $p=0.05$

$-t_r$  es mayor que la tabla

Todos estos parámetros demuestran la linealidad del sistema y la linealidad del método empleado para la cuantificación de ambroxol clorhidrato en jarabe.

También se aplicó el test de Cochram, donde pudimos observar que la  $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ , lo que significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir, que el facto concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

El test de proporcionalidad también aporta información adicional sobre el sesgo del método lo cual es muy útil a la hora de evaluar su capacidad para ser empleado en el análisis de trazas.

## 1.2 PRECISIÓN

La precisión se determinó en base a la medida de repetibilidad y precisión intermedia.

### 1.2.1 Repetibilidad

Se halló la repetibilidad del sistema usando una solución con una concentración de estándar conocido (100%), los resultados se resumen en el CUADRO N°14

#### CUADRO N° 14 DETERMINACION DE LA REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

N° de Muestra	CC mg/5 mL teórica	CC mg/5 mL hallada
1	15	15.2246
2	15	15.0289
3	15	14.9811
4	15	14.9902
5	15	14.9788
6	15	15.0073
Promedio		15.0352
DSR %		0.6297

Fuente: Elaboración Propia

De esta manera se evaluó sobre el equipo, realizándose 6 determinaciones con un estándar de 0.0375 mg/mL equivalente al 100% de la concentración prueba (15mg/mL), al analizar los resultados obtenidos se observó que existe un DSR (Desviación Estándar Relativa) de 0.6297%, la cual es inferior a la DSR recomendada por la USP 35 (2%). Por lo tanto se puede afirmar que la repetibilidad para el sistema es el adecuado.

A continuación se determinó la repetibilidad del método, es decir se preparó la muestra al 100% y se obtuvo los resultados que se muestran en el CUADRO N°15

#### **CUADRO N° 15 DETERMINACION DE LA REPETIBILIDAD DEL METODO**

N° de Muestra	CC mg/5 mL teórica	CC mg/5 mL hallada
1	15	14.8757
2	15	15.2235
3	15	15.0564
4	15	15.2182
5	15	15.1515
6	15	14.9726
Promedio		15.0830
DSR %		0.9309

Fuente: Elaboración Propia

Se preparó 6 muestras de manera independiente a una concentración teórica de 15 mg/mL cada muestra fue leída por triplicado y se trabajó con el promedio, obteniéndose así las concentraciones prácticas, el cual arrojó un promedio de 15.0830 y existe un DSR (Desviación Estándar Relativa) de 0.9309%, la cual es inferior a la DSR recomendada por la USP 35 (2%). Por lo tanto se puede afirmar que la repetibilidad para el método es el adecuado.

### 1.2.2 Precisión Intermedia

Para hallar la precisión intermedia el método fue realizado por distintos analistas los cuales tenían una amplia experiencia.

En el CUADRO N°16 se resumen los resultados hallados por el analista 1 y en el CUADRO N°17 los resultados hallados por el analista 2.

## CUADRO N° 16 DETERMINACION DE PRECISION INTERMEDIA

**Analista 1**

N° de Muestra	CC mg/5 mL teórica	CC mg/5 mL hallada
1	15	15.0988
2	15	14.9789
3	15	15.1466
4	15	14.9999
5	15	15.0227
6	15	15.3356
Promedio		15.0971
DSR %		0.8802

Fuente: Elaboración Propia

**CUADRO N° 17  
DETERMINACION DE PRECISION INTERMEDIA**

**Analista 2**

N° de Muestra	CC mg/5 mL teórica	CC mg/5 mL hallada
---------------	--------------------	--------------------

1	15	14.8007
2	15	14.8998
3	15	14.9579
4	15	15.2546
5	15	14.9678
6	15	15.0009
Promedio		14.9803
DSR %		1.0126

Fuente : Elaboración Propia

El %RSD obtenido con los datos de ambos analistas fue de 0.9909.

El método presenta buena Precisión Intermedia para el análisis de ambroxol clorhidrato, debido a que el coeficiente de variación (CV) entre los dos analistas es menor de 2.0%.

Con todos estos resultados se puede afirmar que existe concordancia entre los resultados analíticos individuales al aplicar el procedimiento repetidamente y con diferentes analistas.

### 1.3 EXACTITUD

Para la exactitud se realizó la determinación de absorbancia en la solución estándar y se obtuvo los resultados que se hallan en el CUADRO N°18.

**CUADRO N°18**  
**DETERMINACION DE LA EXACTITUD EN ESTANDAR**

Lecturas de Solución Estándar	Absorbancias
-------------------------------	--------------

1	0.2881
2	0.2945
3	0.2876
4	0.2872
5	0.2914
6	0.2901
Promedio	0.2898
RSD	0.96648

Fuente: Elaboración Propia

Para determinar la exactitud del método se preparó concentraciones conocidas de estándar y se mezcló con el placebo, para poder hallar los mg de analito prácticos y así calcular el porcentaje de recuperación, también se determinó la varianza para realizar la prueba de homogeneidad, como se puede observar en el CUADRO N°19.

**CUADRO N° 19  
DETERMINACION DE LA EXACTITUD DEL METODO**

Porcentaje de analito teórico	mg de analito añadido (P.A)	Absorbancias	mg de analito hallado (D.A.)	Porcentaje de recuperación (%R)	Varianza
Exactitud 80%	24.01	0.2345	12.0637	100.4890	1.2815
	24.10	0.2301	11.8373	98.2352	
	24.10	0.2323	11.9505	99.1745	
Exactitud 100%	30.18	0.2909	14.9652	99.1727	0.2763
	30.09	0.2911	14.9755	99.5377	
	29.95	0.2917	15.0063	100.2091	
Exactitud 120%	36.03	0.3509	18.0518	100.2183	0.2257
	36.09	0.3500	18.0055	99.7812	

	36.10	0.3483	17.9181	99.2691	
	<b>Promedio (<math>R_{prom}</math>)</b>			99.5652	
	<b>Desviación Estándar (S)</b>			0.699	
	<b>Desviación Estándar Relativa (DSR)</b>			0.702	

Fuente : Elaboración Propia

Para la determinación de este parámetro se procedió a la preparación de una solución estándar al 100% al cual se le dio 6 lecturas, se pesó por triplicado cantidades conocidas de analito al 80%,100% y 120% luego se mezclaron con el placebo.

Con los datos hallados se calculó la desviación estándar relativa DSR, la cual fue de 0.702%, este valor es inferior a la DSR teórica límite establecida por la USP.

Se calculó el porcentaje de recuperación de acuerdo al analito mezclado con el placebo y se usó la prueba t de Student para realizar la comparación, arrojando los siguientes datos:

$$t_{exp} = 1.86$$

$$t_{tablas} = 2.31 \quad \text{para } (n - 1) \text{ grados de libertad y } p = 0.05$$

Al ser  $t_{exp} < t_{tablas}$  no existe diferencia significativa entre la recuperación media ( $R_{prom}$ ) y el 100 %, confirmando la buena exactitud del método.

También se realizó la prueba de homogeneidad de la varianza

$$G_{exp} = 0.719$$

$$G_{tabla} = 0.8709$$

$$G_{tabla}(\alpha=0.05;k=3;n=3)$$

Dónde:

k = número de grupos

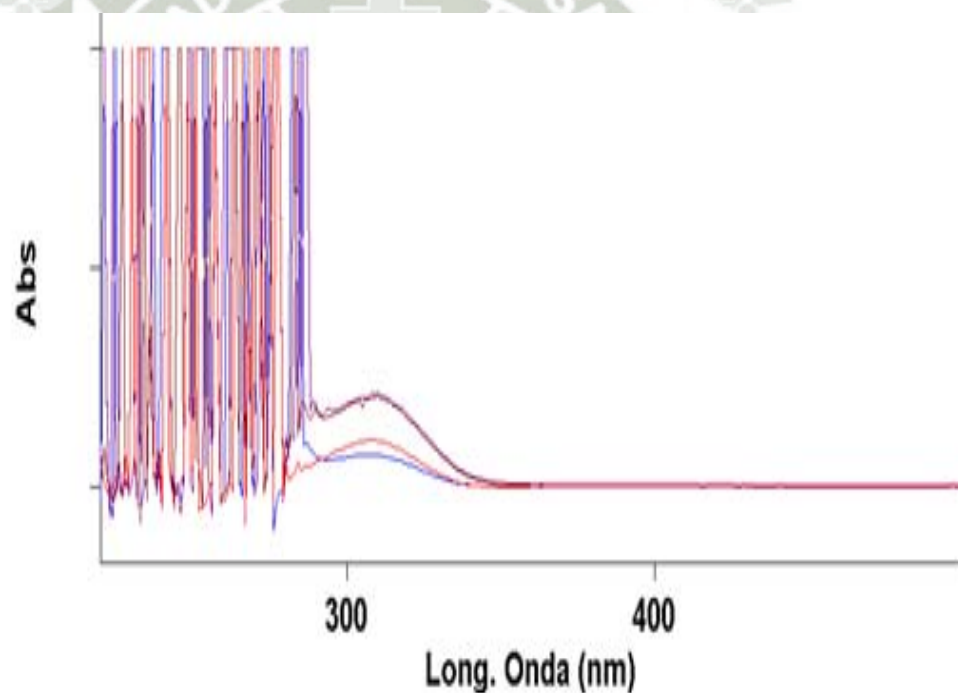
n = número de terminación por grupo

Al ser  $G_{exp} < G_{tabla}$  significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir, que el factor concentración no influye en la variable de los resultados.

#### 1.4 SELECTIVIDAD

Para determinar la selectividad, se procedió a realizar mediante, interferencia del método y degradación.

En la figura N°6 se puede observar la selectividad del método para la solución de ambroxol clorhidrato estándar y ambroxol clorhidrato muestra.



**Figura N°6:** Selectividad del método utilizado para la cuantificación de ambroxol clorhidrato.

Al evaluar el parámetro de selectividad (interferencia del método) se pudo comprobar que al leer, el placebo, la solución diluyente en el equipo, estos no producen señal

definida a la misma longitud de onda que el ambroxol, sin embargo las muestras que contienen: estándar y muestra preparada con el jarabe producen una señal de absorción a una longitud de onda de 308 nm.

Así mismo se evaluó el parámetro de selectividad (degradación) de acuerdo a las condiciones de degradación mencionadas en el CUADRO N° 20

**CUADRO N° 20**  
**DETERMINACION DE SELECTIVIDAD MEDIANTE DEGRADACION**

Estresamiento de Muestras	Condiciones y Tiempo	Concentrac Final (mg/5ml)	% Analito Cuantificado	Porcentaje De Degradación (%)
Condiciones normales	–	15.1467	100.00	0.00
Estresamiento térmico	T= 70°C x t=1hora	13.6823	90.33	9.67
Estresamiento alcalino NaOH 1N	t=1 hora	13.7734	90.93	9.07
Estresamiento ácido HCL 1N	t=1 hora	12.9995	85.82	14.18
Estresamiento luz UV 254nm	t=5horas	12.5683	82.98	17.02

Fuente: Elaboración Propia.

El porcentaje de degradación de todas estas condiciones se evaluó frente a las lecturas emitidas a condiciones normales.

### 1.5 ROBUSTEZ

Para la determinación de robustez, se modificó el tiempo de análisis y la temperatura de trabajo, tanto de la muestra como del estándar, como se muestra en el CUADRO N°21.

**CUADRO N° 21**  
**DETERMINACION DE ROBUSTEZ**

Muestra	Factores Modificados	Condiciones	Absorbancias	Concentración mg/5mL	%Alteración	
Muestra 100 %	-	Normal	0.2979	15.3594	100	100
	Tiempo	5 horas después	0.2921	15.2119	99.04	0.96
	Temperatura	T° amb a 30°C	0.2861	14.9201	97.14	2.86
Estándar 100 %	-	Normal	0.2911	<b>Coefficiente de variación CV %</b>		
	Tiempo	5 horas después	0.2882			
	Temperatura	T° amb a 30°C	0.2878		1.47	

Fuente: Elaboración Propia

Las diferentes muestras analizadas cumplen con el criterio de aceptación de alteración (< 2 %). Por lo que el método cumple con el parámetro de robustez.

## 2. APLICACION EN ENSAYOS DE ESTABILIDAD DEL JARABE DE AMBROXOL CLORHIDRATO

## 2.1 ESTABILIDAD ACELERADA

Se utilizó como método de cuantificación, la técnica analítica validada y se realizó un cuadro resumen con los datos obtenidos. Ver CUADRO N° 22

El producto se evaluó durante 06 meses de estabilidad acelerada, tiempo en el cual no presenta cambios significativos en el aspecto físico, químico ni microbiológico, la determinación organoléptica, pH, cuantitativa y microbiológico están dentro de especificación, pruebas consideradas como críticas de estabilidad.

## 2.2 ESTABILIDAD REAL

Se utilizó como método de cuantificación, la técnica analítica validada y se realizó un cuadro resumen con los datos obtenidos. Ver cuadro N° 23

El producto se evaluó durante 06 meses de estabilidad real, tiempo en el cual no presenta cambios significativos en el aspecto físico, químico y microbiológico, la determinación organoléptica, pH, cuantitativa y microbiológico están dentro de especificación, pruebas consideradas como críticas de estabilidad.

Se realizó el ensayo de estabilidad real, durante solo 06 meses debido a que lo que se está buscando es un período de validez tentativo, el cual pide 06 meses de estabilidad a tiempo acelerado y 06 meses de estabilidad a tiempo real.

CUADRO N° 22  
RESUMEN DE ESTUDIO DE ESTABILIDAD ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADO  
PRODUCTO: AMBROXOL 15 mg/ 5mL

N° / Tipo de Lote	1012162/ Lote Industrial		Fecha de Fabricación	09/06/2012
Fabricante	Laboratorios Portugal S.R.L.		Fecha de Expira	06/2014
Forma Farmacéutica	Jarabe		Periodo del Estudio	06 meses
Tamaño de Lote	3 200 L		Razón del Estudio	Estudio de Seguimiento
Nombre Comercial	Ambroxol 15 mg / 5 mL Jarabe		Condiciones de Almacenamiento	T: 40 ° C +/- 2 ° C H: 75 % +/- 5 % HR
Sistema Envase Cierre	Envase Primario	Frasco De Polietileno De Alta Densidad (PEAD) Blanco x 120mL con Tapa Plifer De Polipropileno P-28 Cierre a Rosca, Blanco Con Láiner Transparente.		
	Envase Secundario	Cartón tipo Foldkote.		
Principio Activo	Ambroxol Clorhidrato		Lote:	JB01K
PRUEBAS EFECTUADAS		ESPECIFICACIONES	RESULTADOS	
Descripción Organoléptica	Solución, translúcida incolora a ligeramente amarillenta con olor y sabor característico.	Solución, translúcida incolora a ligeramente amarillenta con olor y sabor característico.	Mes 00	Mes 03
	De 4.1 a 7.5	De 4.1 a 7.5	6.1	6.0
Determinación de pH	13.5 – 16.5 mg / 5 mL 90.0 % al 110.0 %	13.5 – 16.5 mg / 5 mL 90.0 % al 110.0 %	15.5 mg/5 mL 103.3%	15.2mg/5 mL 101.3%
Determinación Cuantitativa del Principio Activo (UV) Ambroxol Clorhidrato	Máximo 100 UFC/mL Máximo 10 UFC/mL Ausentes en 10mL Ausentes en 1mL Ausentes en 1mL Ausentes en 1mL	Máximo 100 UFC/mL Máximo 10 UFC/mL Ausentes en 10mL Ausentes en 1mL Ausentes en 1mL Ausentes en 1mL	<100 UFC/mL <10 UFC/mL Ausentes en 10mL Ausentes en 1mL Ausentes en 1mL Ausentes en 1mL	<100 UFC/mL < 10 UFC/mL Ausentes en 10mL Ausentes en 1mL Ausentes en 1mL Ausentes en 1mL

Fuente: Elaboración Propia

CUADRO N° 23  
RESUMEN DE ESTUDIO DE ESTABILIDAD ESTUDIO DE ESTABILIDAD REAL  
PRODUCTO: AMBROXOL 15 MG/5ML

N° / Tipo de Lote	1012162/ Lote Industrial		Fecha de Fabricación	09/06/2012
Fabricante	Laboratorios Portugal S.R.L.		Fecha de Expira	06/2014
Forma Farmacéutica	Jarabe		Periodo del Estudio	06 meses
Tamaño de Lote	3 200 L		Razón del Estudio	Estudio de Seguimiento
Nombre Comercial	Ambroxol 15 mg / 5 mL Jarabe		Condiciones de Almacenamiento	T: 30 ° C +/- 2 ° C H: 65 % +/- 5 % HR
Sistema Envase Cierre	Envase Primario	Frasco De Polietileno De Alta Densidad (PEAD) Blanco x 120mL con Tapa Pílder De Polipropileno P-28 Cierre a Rosca, Blanco Con Lainer Transparente.		
	Envase Secundario	Cartón tipo Foldkote.		
Principio Activo	Ambroxol Clorhidrato		Lote:	JB01K
			Norma Técnica	Propia
<b>PRUEBAS EFECTUADAS</b>	<b>ESPECIFICACIONES</b>	<b>RESULTADOS</b>		
		<b>Mes 00</b>	<b>Mes 06</b>	
Descripción Organoléptica	Solución, translúcida incolora a ligeramente amarillenta con olor y sabor característico.	Solución, translúcida incolora a ligeramente amarillenta con olor y sabor característico.	Solución, translúcida incolora a ligeramente amarillenta con olor y sabor característico.	
Determinación de pH	De 4.1 a 7.5	6.2	6.1	
Determinación Cuantitativa del Principio Activo (UV) Ambroxol Clorhidrato	13.5 – 16.5 mg / 5 mL 90.0 % al 110.0 %	15.3 mg/5 mL 102.0%	15.6mg/5 mL 104.0%	
Control Microbiológico	Máximo 100 UFC/mL	<100 UFC/mL	<100 UFC/mL	
Recuento Total de microorganismos aerobios	Máximo 10 UFC/mL	<10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	
Recuento combinado de Hongos filamentosos y Levaduras	Ausentes en 10mL	Ausentes en 10mL	Ausentes en 10mL	
Prueba de microorganismos específicos:	Ausentes en 1mL	Ausentes en 1mL	Ausentes en 1mL	
<i>Salmonella sp</i>	Ausentes en 1mL	Ausentes en 1mL	Ausentes en 1mL	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausentes en 1mL	Ausentes en 1mL	Ausentes en 1mL	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausentes en 1mL	Ausentes en 1mL	Ausentes en 1mL	
<i>Escherichia coli</i>	Ausentes en 1mL	Ausentes en 1mL	Ausentes en 1mL	

Fuente: Elaboración Propia

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES

- 1.- El método desarrollado y validado de acuerdo a la normatividad de la USP cumplió con los criterios de validación. El método desarrollado es sencillo, rápido, selectivo, exacto, preciso, robusto y es un método lineal ( $r: 0.9976$ ) para la determinación de Ambroxol Clorhidrato.
- 2.- El método validado permitió determinar la cuantificación del ambroxol clorhidrato en jarabe, en ensayos de estabilidad acelerada y estabilidad real, en el cual se pudo observar que cursa satisfactoriamente el tiempo el estudio realizado, lo que nos indica que el jarabe evaluado es estable en las siguientes condiciones de almacenamiento: temperatura:  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $40 \pm 2\%$ ; Humedad  $65\% \pm 5\%$  y  $75\% \pm 5\%$  HR.
- 3.- De acuerdo a los ensayos de estabilidad acelerada efectuada en 06 meses y estabilidad real efectuada en 06 meses, se pudo establecer un tiempo de vida útil tentativo de 2 años, según la directiva sanitaria N° 031- Minsa Digemid V.01. Directiva Sanitaria que reglamenta los estudios de estabilidad de medicamentos.

## SUGERENCIAS

Utilizar el método propuesto como herramienta de control de calidad cuando se desee realizar cuantificación de ambroxol clorhidrato en jarabe, en producto terminado y en ensayos de estabilidad.



## BIBLIOGRAFIA

- 1) A. Velazco, P Lorenzo, J.S. Serrano, F A. Trillos. “Velásquez Farmacología” Mc Graw-Hill-Interamericana de España.
- 2) Araoz Cuentas Rubén Ricardo: “Validación de un método por espectroscopia ultravioleta para la determinación de ranitidina clorhidrato en tabletas y su aplicación en ensayos de disolución” ,Arequipa UC.S.M 2008.
- 3) Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria: “Validación de Métodos Analíticos” Marzo 2001,Graficas Gispert, S.A. La Bisbal (Girona)
- 4) Avendaño Lopez, María del Carmen 1997. “Introducción a la Química Farmacéutica” Mc Graw-Hill-Interamericana de España.
- 5) Barcelli Z. Vilma “Validación de métodos analíticos” Merck, Arequipa
- 6) Beers. Mark H. Berkow, Robert 1999 . “El manual Merck” . 10º Edición
- 7) British Pharmacopeia 2012 En : Monograph Development: Methods of analysis ( supplementary chapter III ). Vol 2.
- 8) Cardenas Fernandez, Juan Carlos : “Validación de Técnicas Analíticas en Productos Farmacéuticos y Afines”, Arequipa , Laboratorios Portugal 2012.
- 9) Caro C.F Guía de protocolos de validación de procesos no estériles. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Madrid, 1991
- 10) Carranza Diaz, Susana Paola: “Validación del Método analítico de Cuantificación para clorhidrato de ambroxol jarabe en el Laboratorio de Producción de Medicamentos-LAPROMED-”,Guatemala, Universidad San Carlos de Guatemala, 2010.
- 11)Castillo B. Gonzales., Protocolos de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármaco 2000. Revista Cubana de Fram.
- 12)Castro M.Gascon S, Pujol M, et al. Validación de métodos analíticos A.E.F.I, Sección catalán. Madrid; 1996
- 13)Connors KA. Curso de análisis farmacéutico. Barcelona: Ed. Revert; 1981;195-245

- 14) Decreto Supremo N° 010-97-SA: “Reglamento para el Registro, Control y Vigilancia Sanitaria de Productos Farmacéuticos y Afines, y sus modificatorias”, Lima, 2012.
- 15) Decreto Supremo N° 028-2010-SA que regula algunos alcances de los artículos 10 y 11 de la Ley N° 29459 - Ley de los Productos Farmacéuticos, Dispositivos Médicos y Productos Sanitarios, Lima, 2011.
- 16) DIGEMID Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas “Directiva Técnica de Estabilidad de Medicamentos” Ministerio de Salud, Lima –Perú 2009
- 17) DIGEMID Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas “Formulario Nacional de Medicamentos Esenciales” Ministerio de Salud, Lima – Perú 2005
- 18) Erasan C. Validación de Procesos de Producción. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. 1º edición. Madrid, 1991. Pag.13-41
- 19) G. KATZUNG Bertran, “Farmacología Básica y Clínica-Editorial Reveré S.A. 2001.
- 20) Garrido Malo, Marco Antonio. Pérez Alba, Simón. 1991 “Ciencia y Tecnología: Control de calidad aplicado a la Industria Farmacéutica y al Medicamento” Editorial Grafica, Lima-Perú 10:101-105
- 21) GOODMAN & GILMAN, “Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica”: Editorial Médica Panamericana. Decima Edición 2012.
- 22) HARRIS C , Daniel “ Análisis Químico Cuantitativo” Editorial Reverté S.A. Segunda Edición. Barcelona.2001
- 23) Hellman, J.1981 “Farmacotecnia teórica practica” Editorial Continental S.A.
- 24) Horwitz, Anal. Chem. 54 (1) , 67º, (1982)
- 25) Judith Marilú Castro Barrios “ Estandarización, Validación y comparación del método voltamétrico con el método de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de ketoconazol en tabletas de marca y genérica” , Arequipa U.C.S.M 2008
- 26) Lemus González, Paola María: “Análisis comparativo de estabilidad acelerada y estabilidad a largo plazo de jarabe de ambroxol en dos diferentes concentraciones, adultos y niños”, Guatemala, Universidad San Carlos de Guatemala ,2006.

- 27) Leyva Minaya, Elvis Edisson ; Pérez Cáceres Fernando: “Desarrollo y validación de un método analítica para la cuantificación por HPLC de clenbuterol clorhidrato en solución oral-gotas , y análisis comparativo de productos comercializados en el Perú”, Lima Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2009.
- 28) Litter, Manuel. 1992 “Compendio de farmacología” 4º Edición, El ateneo. Buenos Aires. 20:265-275
- 29) Manrique Nina , Milagros Maria: “ Validación del método analítico para la cuantificación de los analitos clotrimazol, betametasona y Gentamicina en producto Portil B crema”, Arequipa, Laboratorios Portugal 2012.
- 30) Manual de Buenas Practicas de Manufactara de productos farmacéuticos. Ministerio de Salud. DIGEMID. 1999. Pag.19-27
- 31) Marino MA. Rémington: Farmacia Practica, 17 ° Ed; Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires; 1985
- 32) Marletta, Lucas: “Sistema de Calidad y Buenas Prácticas de Manufactura en la Industria Farmacéutica” Noviembre, 2008
- 33) Merck Index 12ava ed. 1996.
- 34) Msc. Salas Arruz , Maria ; Q.F Cárdenas Talavera, Veronica: “Ponencia: Buenas Practicas de Laboratorio”
- 35) Msc.Salas Arruz , Maria: “Ponencia: Validación de Técnicas Analíticas”, Arequipa, Hypatia S.A., 2011
- 36) P.Lorenzo, A. Moreno, “Farmacología Básica y Clínica” ,1992, p.881.
- 37) Pradeau Dominique 1998. “Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos” . Editorial Noriega.Mexico . 1:3, 5:112-132
- 38) Remington. 2003 “Farmacia” 20º Ed. Editorial Medica Panamericana Buenos aires. 30:557, 51:1137-1138
- 39) Rodríguez Hernández, Yaslenis ; Suarez Pérez, Yania; Izquierdo Castro ,Adalberto: “Validación del método por cromatografía liquida de alta resolución para ácido ascórbico en tabletas de producción nacional” Cuba Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. 2009.

- 40) Salas Arruz , Mario: “Ponencia: Metrología en Laboratorio”, Arequipa, Hypatia S.A., 2011
- 41) Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito: “Validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos”, Nueva York, 2010.
- 42) SKOOG DOUGLAS A.; WEST DONALD M.; Fundamento de Química Analítica. Editorial Thompson S.A. 8va edición México 2005.
- 43) SKOOG DOUGLAS. A.;HOLLER, JAMES, NIEMAN TIMOTHYA.: “Principios de análisis instrumental” Editorial McGraw Hill.2000 Interamericana de España, SAV Quinta edición 2001.731
- 44) The United States Pharmacopeia, USP 35 Revision ,United Book Press, Inc.,Baltimore, Maryland, 2011
- 45) Trillo F. Tratado de Farmacia Galénica .Madrid: Luzan; 1993. Pag 103,105-113,115-123,322
- 46) Trounce Jhon. R. Goulf Dinah. 1990 “ Manual de Farmacología Clínica” . 13º Edición. Mac Graw & Hill .México p. 52-53
- 47) USP 30 THE United States Pharmacopeia, NF 25 The National Formulary 2007
- 48) USP 33 The United States Pharmacopeia, NF 28 The National Formulary 2011
- 49) VILA, José L., “Tecnología Farmacéutica”, Editorial Síntesis, S.A, Madrid-España 2001.
- 50) Washington University School of Medicine : “Manual Washington de Terapéutica Médica ”

#### INTERNET

- 51) <http://revistas.labiofamcuba.com/articulo/desarrollo-y-validacion-de-un-metodo-de-analisis-para-la-cuantificacion-del-clorhidrato-de-bromhexina>
- 52) <http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>
- 53) <http://www.indecopi.gob.pe/repositorioaps/0/0/jer/acre01/guiaValidacion.pdf>
- 54) [http://www.prospectos.net/ambroxol\\_cinfa\\_15\\_mg\\_5\\_ml\\_jarabe](http://www.prospectos.net/ambroxol_cinfa_15_mg_5_ml_jarabe)
- 55) <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9922869>





# ANEXOS

**LABORATORIOS PORTUGAL  
CONTROL DIARIO TEMPERATURA Y HUMEDAD AMBIENTAL**

Ubicación : Estabilidad Tiempo Acelerado Mes / Año:

Marca Higrometro : Radio Shack

Código de Termohigrometro: THG-002

Fecha	HORA 1	T° 1 40+/- 2 °C	% HR 1 75+/- 5 %	HORA 2	T° 2 40+/- 2 °C	% HR 2 75+/- 5 %	Responsable	VºBº
01								
02								
03								
04								
05								
06								
07								
08								
09								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31								

**LABORATORIOS PORTUGAL  
CONTROL DIARIO TEMPERATURA Y HUMEDAD AMBIENTAL**

Ubicación : Estabilidad Tiempo Real Mes / Año:

Marca Higrometro : Radio Shack

Código de Termohigrometro: THG-001

Fecha	HORA 1	T° 1 30+/- 2 °C	% HR 1 65+/- 5 %	HORA 2	T° 2 30+/- 2 °C	% HR 2 65+/- 5 %	Responsable	VºBº
01								
02								
03								
04								
05								
06								
07								
08								
09								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31								



**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN**

**LM - 0575 - 2012**

Página 2 de 2

**8.- Resultados**

Valor Nominal ml	Volumen Contenido ml	Desviación ml	Incertidumbre ml
5	4.995	0.005	0.001

**9.- Observaciones**

- Este Certificado de calibración cumple con los requisitos de la norma Metrológica Peruana NTP ISO/IEC 17025:2006, "Requisitos Generales para la competencia de los Laboratorios de Calibración y Ensayo".
- La incertidumbre declarada en el punto 8 del presente documento se refiere a la incertidumbre expandida correspondiente a un factor de cobertura  $k=2$ , para nivel de confianza de aproximadamente el 95%.
- Si, debido al uso del instrumento, no es aconsejable aplicar la corrección de la calibración, se puede aplicar una incertidumbre maximizada, que englobe la máxima desviación en valor absoluto:

$$\pm U = \pm (U_{max} + |e_{max}|)$$



Laboratorios Portugal S.R.L.  
Área de Metrología  
2012-06-02



**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN**

**LM - 0575 - 2012**

Página 1 de 2

**1.- Del Solicitante**

Razón Social : Laboratorios Portugal S.R.L.  
Dirección : Mz. A', Lote 2 Parque Ind. Río Seco, Cerro Colorado - Arequipa.

**2.- Del Instrumento o Equipo a ensayar**

Equipo a ensayar :	Pipeta de un solo trazo	Capacidad Nominal :	5 ml
Fabricante :	Witeg	División de Escala (d) :	NA
Modelo :	No indica	Clase :	AS
N° de Serie :	No indica	Temp. de Referencia :	20 °C
Identificación :	P2-36	Tipo :	In
Procedencia :	Alemania	Tiempo de Descarga (EX) :	5 Seg
		Tiempo de Espera (EX) :	NA

**3.- Del Ensayo**

Fecha del Ensayo : 2012-06-02  
Lugar del Ensayo : Laboratorio de Volúmen - Area de Metrología - Laboratorios Portugal

**4.- Método y Procedimiento de calibración**

Para la calibración se ha empleado el método gravimétrico, descrito en el procedimiento **MET - 004** "Calibración de material volumetrico de vidrio".

**5.- Declaración de Patrones y Trazabilidad Metrológica**

	Equipo / Instrumento	Código	Certificado	Trazabilidad
1	Balanza	BLM-002	B-490-2012	SNM - INDECOPI
2	Termómetro	TTM-001	T-675-2012	SNM - INDECOPI
3	Termómetro	TTM-002	T-674-2012	SNM - INDECOPI
4	Barotermohigrómetro	BTH-001	LT-0001-2012	NIST - USA
5	Barotermohigrómetro	BTH-001	LFP-660-2012	CENAM - MÉXICO

**6.- Condiciones Ambientales**

Temperatura : 19.7 °C  
Humedad Relativa : 36.5 % RH  
Presión Atmosférica : 760.7 mbar

**7.- Aclaraciones**

- Los resultados del presente certificados son válidos para el momento y condiciones en los que se realizaron los ensayos correspondientes.
- El presente certificado solo puede ser difundido completamente y sin modificaciones. La reproducción parcial y/o modificaciones requieren la autorización expresa del Área de Metrología de Laboratorios Portugal S.R.L.
- La incertidumbre se ha determinado siguiendo la Guía para la expresión de la Incertidumbre en la Medición GUM.

Sello



Aseguramiento de la Calidad

Director Técnico  
Laboratorios Portugal S.R.L.



Q.F. V. Manuela Alvarado Carbajal  
C.Q.F.P. 01689

Jefe de Metrología



César A. Prado Arenas

P.I. Río Seco Mza. A' Lote 2 - Cerro Colorado - Arequipa Telf. (054) 316031  
Calle Miguel Grau N° 313 - Cerro Colorado - Arequipa - Perú

www.laboratoriosportugal.com

**SN° 001454**



**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN**

**LM - 0570 - 2012**

Página 1 de 2

**1.- Del Solicitante**

Razón Social : Laboratorios Portugal S.R.L.  
Dirección : Mz. A', Lote 2 Parque Ind. Río Seco, Cerro Colorado - Arequipa.

**2.- Del Instrumento o Equipo a ensayar**

Equipo a ensayar :	Pipeta de un solo trazo	Capacidad Nominal :	25 ml
Fabricante :	Witeg	División de Escala (d) :	NA
Modelo :	No indica	Clase :	AS
N° de Serie :	No indica	Temp. de Referencia :	20 °C
Identificación :	P2-35	Tipo :	In
Procedencia :	Alemania	Tiempo de Descarga (EX) :	15 Seg
		Tiempo de Espera (EX) :	NA

**3.- Del Ensayo**

Fecha del Ensayo : 2012-06-02  
Lugar del Ensayo : Laboratorio de Volúmen - Area de Metrología - Laboratorios Portugal

**4.- Método y Procedimiento de calibración**

Para la calibración se ha empleado el método gravimétrico, descrito en el procedimiento **MET - 004** "Calibración de material volumetrico de vidrio".

**5.- Declaración de Patrones y Trazabilidad Metrológica**

	Equipo / Instrumento	Código	Certificado	Trazabilidad
1	Balanza	BLM-002	B-490-2012	SNM - INDECOPI
2	Termómetro	TTM-001	T-675-2012	SNM - INDECOPI
3	Termómetro	TTM-002	T-674-2012	SNM - INDECOPI
4	Barotermohigrómetro	BTH-001	LT-0001-2012	NIST - USA
5	Barotermohigrómetro	BTH-001	LFP-660-2012	CENAM - MÉXICO

**6.- Condiciones Ambientales**

Temperatura :	19.4	°C
Humedad Relativa :	36.5	% RH
Presión Atmosférica :	760.7	mbar

**7.- Aclaraciones**

- Los resultados del presente certificados son válidos para el momento y condiciones en los que se realizaron los ensayos correspondientes.
- El presente certificado solo puede ser difundido completamente y sin modificaciones. La reproducción parcial y/o modificaciones requieren la autorización expresa del Área de Metrología de Laboratorios Portugal S.R.L.
- La incertidumbre se ha determinado siguiendo la Guía para la expresión de la Incertidumbre en la Medición GUM.

Sello	Director Técnico Laboratorios Portugal S.R.L.	Jefe de Metrología
-------	--	--------------------





Aseguramiento de la Calidad

Q.F. V. Manuela Alvarado Carbajal  
C.Q.F.P. 01689

César A. Prado Arenas



**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN**

**LM - 0570 - 2012**

Página 2 de 2

**8.- Resultados**

Valor Nominal ml	Volumen Contenido ml	Desviación ml	Incertidumbre ml
25	24.995	0.005	0.001

**9.- Observaciones**

- Este Certificado de calibración cumple con los requisitos de la norma Metrológica Peruana NTP ISO/IEC 17025:2006, "Requisitos Generales para la competencia de los Laboratorios de Calibración y Ensayo".
- La incertidumbre declarada en el punto 8 del presente documento se refiere a la incertidumbre expandida correspondiente a un factor de cobertura  $k=2$ , para nivel de confianza de aproximadamente el 95%.
- Si, debido al uso del instrumento, no es aconsejable aplicar la corrección de la calibración, se puede aplicar una incertidumbre maximizada, que englobe la máxima desviación en valor absoluto:

$$\pm U = \pm (U_{max} + |e_{max}|)$$



Laboratorios Portugal S.R.L.  
Área de Metrología  
2012-06-02



**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN**

**LM - 0549 - 2012**

Página 1 de 2

**1.- Del Solicitante**

Razón Social : Laboratorios Portugal S.R.L.  
Dirección : Mz. A', Lote 2 Parque Ind. Río Seco, Cerro Colorado - Arequipa.

**2.- Del Instrumento o Equipo a ensayar**

Equipo a ensayar : Matraz de un solo trazo      Capacidad Nominal : 100 ml  
Fabricante : Fortuna      División de Escala (d) : NA  
Modelo : No indica      Clase : A  
N° de Serie : No indica      Temp. de Referencia : 20 °C  
Identificación : F100-96      Tipo : In  
Procedencia : Alemania      Tiempo de Descarga (EX) : NA  
Tiempo de Espera (EX) : NA

**3.- Del Ensayo**

Fecha del Ensayo : 2012-06-01  
Lugar del Ensayo : Laboratorio de Volúmen - Area de Metrología - Laboratorios Portugal

**4.- Método y Procedimiento de calibración**

Para la calibración se ha empleado el método gravimétrico, descrito en el procedimiento **MET - 004 "Calibración de material volumetrico de vidrio"**.

**5.- Declaración de Patrones y Trazabilidad Metrológica**

	Equipo / Instrumento	Código	Certificado	Trazabilidad
1	Balanza	BLM-002	B-490-2012	SNM - INDECOPI
2	Termómetro	TTM-001	T-675-2012	SNM - INDECOPI
3	Termómetro	TTM-002	T-674-2012	SNM - INDECOPI
4	Barotermohigrómetro	BTH-001	LT-0001-2012	NIST - USA
5	Barotermohigrómetro	BTH-001	LFP-660-2012	CENAM - MÉXICO

**6.- Condiciones Ambientales**

Temperatura : 19.6 °C  
Humedad Relativa : 36.8 % RH  
Presión Atmosférica : 761.7 mbar

**7.- Aclaraciones**

- Los resultados del presente certificados son válidos para el momento y condiciones en los que se realizaron los ensayos correspondientes.
- El presente certificado solo puede ser difundido completamente y sin modificaciones. La reproducción parcial y/o modificaciones requieren la autorización expresa del Área de Metrología de Laboratorios Portugal S.R.L.
- La incertidumbre se ha determinado siguiendo la Guía para la expresión de la Incertidumbre en la Medición GUM.

Sello



Aseguramiento de la Calidad

Director Técnico  
Laboratorios Portugal S.R.L.



Q.F. V. Manuela Alvarado Carbajal  
C.Q.F.P. 01689

Jefe de Metrología



César A. Prado Arenas



**CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN**

LM - 0549 - 2012

Página 2 de 2

**8.- Resultados**

Valor Nominal ml	Volumen Contenido ml	Desviación ml	Incertidumbre ml
100	99.981	-0.019	0.009


**9.- Observaciones**

- Este Certificado de calibración cumple con los requisitos de la norma Metrológica Peruana NTP ISO/IEC 17025:2006, "Requisitos Generales para la competencia de los Laboratorios de Calibración y Ensayo".
- La incertidumbre declarada en el punto 8 del presente documento se refiere a la incertidumbre expandida correspondiente a un factor de cobertura  $k=2$ , para nivel de confianza de aproximadamente el 95%.
- Si, debido al uso del instrumento, no es aconsejable aplicar la corrección de la calibración, se puede aplicar una incertidumbre maximizada, que englobe la máxima desviación en valor absoluto:

$$\pm U = \pm (U_{max} + |e_{max}|)$$



Laboratorios Portugal S.R.L.  
Area de Metrología  
Area de metrología  
2012-06-01

	FOR/CC - 043 LP	Referencia : CFQ 001
<b>REGISTRO DE FACTORIZACION DE SOLUCIONES VOLUMETRICAS</b>		

**NOMBRE:** Hidroxido de Sodio 1N

**Lote:** ...2012005678 **Factorización (...X..)** **Refactorización (.....)**

**Fecha de Factorizacion:**01/06/2012

**Patrón Primario:** Biftalato de Potasio

**Lote :**B-4

**FÓRMULA:**

$$\frac{P_w}{G_{titulante} + P_{equivalente}}$$

Donde:


$P_w$  = Peso del patrón primario

$G_{titulante}$  = Gasto del titulante

$P_{equivalente}$  = 0.20422

DATOS				RESULTADOS
No	Pesos	Gasto Blanco	Gasto Titulante	F
1	5.0077 gr	-	24.50 mL	0.9959
2	5.0078 gr	-	24.45 mL	0.9979
3	5.0055 gr	-	24.50 mL	0.9954
Promedio				0.9964
%DSR				0.13

**Analista:**Felix R.

	FOR/CC - 043 LP	Referencia : CFQ 001
<b>REGISTRO DE FACTORIZACION DE SOLUCIONES VOLUMETRICAS</b>		

**NOMBRE:** ACIDO CLORHIDRICO 1N

**Lote:** ...2012005665 **Factorización (...X..)** **Refactorización (.....)**

**Fecha de Factorización:** 31/05/2012

**Patrón Primario:** Trometamina

**Lote :** T-2

**FÓRMULA:**

$$\frac{P_w}{G_{\text{titulante}} + P_{\text{equivalente}}}$$

Donde:

$P_w$  = Peso del patrón primario

$G_{\text{titulante}}$  = Gasto del titulante

$P_{\text{equivalente}}$  = 121.14

DATOS				RESULTADOS
No	Pesos	Gasto Blanco	Gasto Titulante	F
1	2500.2 mg	-	20.40 mL	1.0113
2	2500.2mg	-	20.50 mL	1.0065
3	2502.1	-	20.45 mL	1.0089
			Promedio	1.0089
			%DSR	0.24

**Analista:** Alicia U.