



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**APLICACIÓN DEL QbD PARA LA DETERMINACIÓN  
SIMULTANEA DE METRONIDAZOL Y MICONAZOL NITRATO  
POR RP- HPLC –UV/VIS EN UNA EMULSIÓN**

**Trabajo de Titulación**

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar el grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: CLAUDIA VANESSA DÍAZ MINIGUANO**

**DIRECTOR: BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA, MSc.**

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, Claudia Vanessa Díaz Miniguano

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliografía el documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, CLAUDIA VANESSA DÍAZ MINIGUANO, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 28 de marzo de 2022.



---

**Claudia Vanessa Díaz Miniguano**

**C.C: 180501971-6**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; tipo: Trabajo Experimental, **APLICACIÓN DEL QbD PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTANEA DE METRONIDAZOL Y MICONAZOL NITRATO POR RP- HPLC –UV/VIS EN UNA EMULSIÓN**, realizado por la señorita: **CLAUDIA VANESSA DÍAZ MINIGUANO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

BQF. Byron Stalin Rojas Oviedo MSc.  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



2022-03-28

BQF. Diego Renato Vinuesa Tapia MSc.  
**DIRECTOR DEL TRABAJO  
DE TITULACIÓN**



2022-03-28

Dra. Margarita del Carmen Cárdenas Badillo MSc.  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



2022-03-28

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis en primer lugar a Dios por darme salud y vida. A mis padres Luis Díaz y Teresa Miniguano que son un pilar fundamental en mi vida, gracias por su apoyo, por cada consejo y palabra de aliento para nunca rendirme y cumplir con mis objetivos, los amo mucho.

*Vanessa*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser parte de esta etapa de mi vida por brindarme el conocimiento. Al laboratorio Neofármaco del Ecuador por abrirme las puertas y depositado su confianza para poder realizar mi trabajo de titulación mi más profundo agradecimiento. Al Dr. Carlitos Pazmiño por ser una guía y compartir sus conocimientos, gracias por su apoyo, ayuda y paciencia. A todas las personas que han formado parte de este proceso Adrián, Jairo, María José, Clarita, Selena gracias por siempre estar ahí conmigo ayudándome y disfrutando de la vida. Finalmente a Vinicio mi ángel que me cuida desde el cielo siempre te tengo presente, todo esto lo hago por ti.

*Vanessa*

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUCCIÓN.....	1

## CAPÍTULO I

<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Principios activos.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1. <i>Metronidazol</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1.1. <i>Nombre, fórmula y peso molecular</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1.2. <i>Apariencia</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1.3. <i>Propiedades físicas y químicas</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1.4. <i>Mecanismo de acción</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1.5. <i>Farmacocinética</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1.6. <i>Usos terapéuticos</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.2. <i>Miconazol nitrato</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.2.1. <i>Nombre, fórmula y peso molecular</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.2.2. <i>Apariencia</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.2.3. <i>Propiedades físicas y Químicas</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.2.4. <i>Mecanismo de acción</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.2.5. <i>Farmacocinética</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.2.6. <i>Usos terapéuticos</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. Excipientes.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1. <i>Propilparabeno</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1.1. <i>Nombre, fórmula y peso molecular</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1.2. <i>Apariencia, color y olor</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1.3. <i>Propiedades físicas y químicas</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2. <i>Metilparabeno</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2.1. <i>Nombre, fórmula y peso molecular</i>.....</b>	<b>10</b>

1.2.2.2.	<i>Apariencia, color y olor</i> .....	10
1.2.2.3.	<i>Propiedades físicas y químicas</i> .....	11
1.2.3.	<b>Propilenglicol</b> .....	11
1.2.3.1.	<i>Nombre, fórmula y peso molecular</i> .....	11
1.2.3.2.	<i>Apariencia, color y olor</i> .....	12
1.2.3.3.	<i>Propiedades físicas y químicas</i> .....	12
1.2.4.	<b>Metilcelulosa</b> .....	12
1.2.4.1.	<i>Nombre, fórmula y peso molecular</i> .....	13
1.2.4.2.	<i>Apariencia, color, olor</i> .....	13
1.2.4.3.	<i>Propiedades físicas y químicas</i> .....	13
1.2.5.	<b>Span 80</b> .....	13
1.2.5.1.	<i>Nombre, fórmula y peso molecular</i> .....	13
1.2.5.2.	<i>Apariencia color y olor</i> .....	14
1.2.5.3.	<i>Propiedades físicas y químicas</i> .....	14
1.2.6.	<b>Aceite de vaselina</b> .....	15
1.2.6.1.	<i>Apariencia</i> .....	15
1.2.6.2.	<i>Propiedades físicas</i> .....	15
1.2.7.	<b>Vaselina blanca</b> .....	15
1.2.7.1.	<i>Apariencia, olor y color</i> .....	15
1.2.7.2.	<i>Propiedades físicas y químicas</i> .....	15
1.2.8.	<b>Alcohol cetosteárico</b> .....	16
1.2.8.1.	<i>Nombre, fórmula y peso molecular</i> .....	16
1.2.8.2.	<i>Apariencia, color y olor</i> .....	16
1.2.8.3.	<i>Propiedades físicas</i> .....	16
1.2.9.	<b>Tween 80</b> .....	16
1.2.9.1.	<i>Nombre, fórmula y peso molecular</i> .....	17
1.2.9.2.	<i>Apariencia, olor y color</i> .....	17
1.2.9.3.	<i>Propiedades físicas y químicas</i> .....	17
1.2.10.	<b>Polawax</b> .....	18
1.2.10.1.	<i>Apariencia, olor y color</i> .....	18
1.2.10.2.	<i>Propiedades físicas</i> .....	18
1.3.	<b>Emulsiones</b> .....	18
1.3.1.	<b>Tipos de emulsiones</b> .....	19
1.3.2.	<b>Teorías de las emulsiones</b> .....	19
1.3.3.	<b>Clasificación de los emulsionantes</b> .....	20
1.3.3.1.	<i>Agentes tensioactivos</i> .....	20

1.3.3.2.	<i>Coloides hidrofílicos</i> .....	20
1.3.3.3.	<i>Partículas sólidas finamente divididas</i> .....	20
1.3.4.	<b><i>Estabilidad de las emulsiones</i></b> .....	21
1.3.5.	<b><i>La escala de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB)</i></b> .....	22
1.3.5.1.	<i>Cálculo para el HLB</i> .....	23
1.4.	<b>Métodos analíticos</b> .....	24
1.4.1.	<i>Clasificación de métodos analíticos</i> .....	24
1.4.2.	<b><i>Quality by design (QbD) ICH Q8</i></b> .....	25
1.5.	<b>Analytical Quality by design (AQbD)</b> .....	25
1.5.1.	<b><i>Etapas del AQbD</i></b> .....	25
1.5.1.1.	<i>ATP (perfil analítico del objetivo)</i> .....	25
1.5.1.2.	<i>CQA (atributos críticos de calidad) y evaluación inicial de riesgos</i> .....	26
1.5.1.3.	<i>DoE: Diseño de experimentos (optimización y desarrollo de métodos)</i> .....	27
1.5.1.4.	<i>MODR (Región de diseño operable del método)</i> .....	27
1.5.1.5.	<i>Estrategia de control</i> .....	27
1.5.1.6.	<i>Validación del método AQbD</i> .....	27
1.5.1.7.	<i>Monitoreo continuo del método (CMM) y mejora continua</i> .....	28
1.5.2.	<b><i>OFAT versus AQbD en el desarrollo de métodos analíticos</i></b> .....	28
1.5.3.	<b><i>Ventajas del QbD</i></b> .....	28
1.6.	<b>Cromatografía</b> .....	28
1.6.1.	<b><i>Clasificación de la cromatografía</i></b> .....	29
1.6.2.	<b><i>Cromatografía líquida de alta eficiencia</i></b> .....	29
1.6.3.	<b><i>Parámetros cromatográficos</i></b> .....	30
1.6.3.1.	<i>Número de platos teóricos (N)</i> .....	30
1.6.3.2.	<i>Resolución (RS)</i> .....	30
1.6.3.3.	<i>Tiempo de retención (tR)</i> .....	30
1.6.3.4.	<i>Factor de asimetría</i> .....	30
1.6.3.5.	<i>Factor de capacidad (K ')</i> .....	31
1.6.4.	<b><i>Ecuación de Van Deemter</i></b> .....	31
1.6.5.	<b><i>Equipo</i></b> .....	33
1.6.6.	<b><i>Modos de elución en HPLC</i></b> .....	35
1.7.	<b>Diseño de superficie de respuesta</b> .....	36
1.7.1.	<b><i>Diseño de Draper- Lin</i></b> .....	36
1.7.2.	<b><i>Diseños ortogonales</i></b> .....	37
1.8.	<b>Selectividad</b> .....	37

## CAPÍTULO II

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	38
<b>2.1.</b>	<b>Equipos, materiales y reactivos</b> .....	38
2.1.1.	<i>Materiales</i> .....	38
2.1.2.	<i>Equipos</i> .....	38
2.1.3.	<i>Reactivos</i> .....	39
2.1.4.	<i>Estándares de referencia</i> .....	40
<b>2.2.</b>	<b>Planteamiento de las etapas de la Calidad analítica por diseño (AQbD)</b> .....	40
2.2.1.	<i>Definición del Analytical Target Profile (ATP)</i> .....	40
2.2.2.	<i>Definición de los atributos de calidad y atributos críticos de calidad (CQA)</i> .....	40
2.2.3.	<i>Evaluación de riesgo inicial</i> .....	40
2.2.4.	<i>Desarrollo del método analítico</i> .....	42
2.2.4.1.	<i>Desarrollo empírico inicial</i> .....	42
2.2.4.2.	<i>Desarrollo del DoE (Diseño del experimento)</i> .....	42
2.2.5.	<i>MODR (Región de diseño operable del método)</i> .....	44
2.2.6.	<i>Selección de puntos de trabajo</i> .....	61
2.2.7.	<i>Estrategia de control</i> .....	61
<b>2.3.</b>	<b>Preparación de soluciones</b> .....	44
<b>2.4.</b>	<b>Preparación de los estándares</b> .....	45
<b>2.5.</b>	<b>Ensayo de selectividad</b> .....	46
2.5.1.	<i>Estudio de los parabenos</i> .....	48

## CAPÍTULO III

<b>3.</b>	<b>MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	49
<b>3.1.</b>	<b>Planteamiento de las etapas de la calidad analítica por diseño (AQbD)</b> .....	49
3.1.1.	<i>Analytical Target Profile (ATP)</i> .....	49
3.1.2.	<i>Definición de los atributos críticos de calidad (CQA)</i> .....	51
3.1.3.	<i>Evaluación de riesgo inicial</i> .....	52
3.1.4.	<i>Desarrollo del método analítico</i> .....	59
3.1.4.1.	<i>Desarrollo empírico inicial</i> .....	59
3.1.4.2.	<i>Desarrollo del DoE (Diseño del experimento)</i> .....	60
3.1.5.	<i>MODR (Región de diseño operable del método)</i> .....	74
3.1.6.	<i>Selección de puntos de trabajo</i> .....	93
3.1.7.	<i>Estrategia de control</i> .....	95

<b>3.1.8.</b>	<b><i>Ensayo de Selectividad</i></b> .....	95
<b>3.1.8.1.</b>	<b><i>Estudio de los parabenos</i></b> .....	97
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	99
	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	100
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b>	Solubilidad del metanol en varios solventes a 25 °C.....	5
<b>Tabla 2-1:</b>	Solubilidad del metilparabeno en varios solventes a 25 °C.....	11
<b>Tabla 3-1:</b>	HLB de algunos componentes.....	23
<b>Tabla 1-2:</b>	Materiales usados .....	38
<b>Tabla 2-2:</b>	Equipos utilizados en el desarrollo del método analítico .....	38
<b>Tabla 3-2:</b>	Reactivos utilizados en el desarrollo del método analítico.....	39
<b>Tabla 4-2:</b>	Estándares primarios utilizados en el método analítico.....	40
<b>Tabla 5-2:</b>	Parámetros evaluados en la matriz de modos y efectos de falla (FMEA) .....	41
<b>Tabla 6-2:</b>	Categorización del Riesgo .....	42
<b>Tabla 7-2:</b>	Factores experimentales .....	42
<b>Tabla 8-2:</b>	Variable respuesta .....	43
<b>Tabla 9-2:</b>	Corridas del diseño experimental .....	43
<b>Tabla 10-2:</b>	Concentración de estándares .....	45
<b>Tabla 11-2:</b>	Peso y concentraciones de los excipientes para el ensayo de selectividad.....	45
<b>Tabla 12-2:</b>	Pesos y concentraciones para el ensayo de selectividad.....	47
<b>Tabla 13-2:</b>	Concentración de los estándares (Parabenos).....	48
<b>Tabla 1-3:</b>	ATP para el desarrollo del método analítico .....	48
<b>Tabla 2-3:</b>	Atributos críticos de calidad para el desarrollo del método analítico.....	49
<b>Tabla 3-3:</b>	Matriz de riesgo de modos y efectos de falla de los parámetros críticos.....	51
<b>Tabla 4-3:</b>	Parámetros iniciales para el desarrollo del método analítico.....	53
<b>Tabla 5-3:</b>	ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para N .....	60
<b>Tabla 6-3:</b>	Condiciones óptimas para maximizar el número de platos de teóricos .....	75
<b>Tabla 7-3:</b>	ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para T .....	77
<b>Tabla 8-3:</b>	Condiciones óptimas para minimizar la asimetría.....	78
<b>Tabla 9-3:</b>	ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para RS .....	80
<b>Tabla 10-3:</b>	Condiciones óptimas para maximizar la resolución .....	81
<b>Tabla 11-3:</b>	ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para el TR final .....	82
<b>Tabla 12-3:</b>	Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención final .....	83
<b>Tabla 13-3:</b>	ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para N.....	84
<b>Tabla 14-3:</b>	Condiciones óptimas para maximizar el número de platos teóricos.....	85
<b>Tabla 15-3:</b>	ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para T .....	86
<b>Tabla 16-3:</b>	Condiciones óptimas para minimizar la asimetría.....	88
<b>Tabla 17-3:</b>	ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para el TR final .....	89

<b>Tabla 18-3:</b> Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención final .....	90
<b>Tabla 19-3:</b> Selección de los puntos de trabajo para el desarrollo del método .....	91
<b>Tabla 20-3:</b> Resultados del ensayo de Selectividad .....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b>	Estructura del metronidazol .....	4
<b>Figura 2-1:</b>	Espectro Ultravioleta del Metronidazol .....	5
<b>Figura 3-1:</b>	Estructura del miconazol.....	6
<b>Figura 4-1:</b>	Espectro Ultravioleta del nitrato de miconazol.....	7
<b>Figura 5-1:</b>	Estructura del propilparabeno .....	7
<b>Figura 6-1:</b>	Espectro Ultravioleta del propilparabeno .....	8
<b>Figura 7-1:</b>	Estructura del metilparabeno .....	9
<b>Figura 8-1:</b>	Espectro Ultravioleta del metilparabeno.....	10
<b>Figura 9-1:</b>	Estructura del propilenglicol.....	10
<b>Figura 10-1:</b>	Espectro infrarrojo del propilenglicol.....	11
<b>Figura 11-1:</b>	Estructura de la metilcelulosa .....	12
<b>Figura 12-1:</b>	Estructura química Span 80 .....	13
<b>Figura 13-1:</b>	Espectro IR del Span 80.....	14
<b>Figura 14-1:</b>	Estructura del alcohol cetosteárico .....	14
<b>Figura 15-1:</b>	Estructura del Tween 80 .....	16
<b>Figura 16-1:</b>	Espectro UV/vis del Tween 80 .....	17
<b>Figura 17-1:</b>	Tipos de emulsiones.....	19
<b>Figura 18-1:</b>	Estructura de un agente emulsificante .....	21
<b>Figura 19-1:</b>	Mecanismos que conducen al agrietamiento de la emulsión de aceite en agua ...	22
<b>Figura 20-1:</b>	Escala de equilibrio hidrófilo- lipófilo (HLB) .....	23
<b>Figura 21-1:</b>	Herramientas AQBd y ciclo de vida. ....	26
<b>Figura 22-1:</b>	El término de A es el efecto de muchas trayectorias .....	32
<b>Figura 23-1:</b>	El término B, Difusión molecular .....	32
<b>Figura 24-1:</b>	Comprobación experimental de la ecuación de Van Deemter .....	33
<b>Figura 25-1:</b>	Partes del equipo HPLC.....	34
<b>Figura 26-1:</b>	Detector de red de diodos .....	35

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-2:</b>	Preparación del placebo.....	46
<b>Gráfico 2-2:</b>	Preparación del placebo cargado .....	46
<b>Gráfico 1-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 35 °C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm .....	60
<b>Gráfico 2-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 35 °C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm .....	61
<b>Gráfico 3-3:</b>	Cromatogramas “a” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 0C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	61
<b>Gráfico 4-3:</b>	Cromatogramas “b” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 0C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	62
<b>Gráfico 5-3:</b>	Cromatogramas “c” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 0C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	62
<b>Gráfico 6-3:</b>	Cromatogramas “d” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 0C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	62
<b>Gráfico 7-3:</b>	Cromatogramas “e” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 0C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	63
<b>Gráfico 8-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 35 °C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm .....	63
<b>Gráfico 9-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,5 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	63
<b>Gráfico 10-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 49 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.....	64
<b>Gráfico 11-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 3,7) a 220 nm.....	64
<b>Gráfico 12-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 45 0C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm .....	65
<b>Gráfico 13-3:</b>	Cromatogramas “a” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	65
<b>Gráfico 14-3:</b>	Cromatogramas “b” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	66
<b>Gráfico 15-3:</b>	Cromatogramas “c” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	66

<b>Gráfico 16-3:</b>	Cromatogramas “d” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	67
<b>Gráfico 17-3:</b>	Cromatogramas “e” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	67
<b>Gráfico 18-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (94:6 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.....	68
<b>Gráfico 19-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 45 0C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm .....	68
<b>Gráfico 20-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 45 0C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm .....	69
<b>Gráfico 21-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 30 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.....	69
<b>Gráfico 22-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 35 °C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm .....	70
<b>Gráfico 23-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2) a 220 nm.....	70
<b>Gráfico 24-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 45 °C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm .....	71
<b>Gráfico 25-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 45 0C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm .....	71
<b>Gráfico 26-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (57:43 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.....	72
<b>Gráfico 27-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 35 0C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm .....	72
<b>Gráfico 28-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 35 0C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm .....	73
<b>Gráfico 29-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 45 0C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm .....	73
<b>Gráfico 30-3:</b>	Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,4 mL/min, temperatura 40 0C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm .....	74
<b>Gráfico 31-3:</b>	Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia para el número de platos teóricos.....	75
<b>Gráfico 32-3:</b>	Gráfica de los Efectos Principales para el número de platos teóricos sobre los factores evaluados .....	76
<b>Gráfico 33-3:</b>	Malla de superficie de respuesta para el número de platos teóricos .....	77
<b>Gráfico 34-3:</b>	Diagrama de Pareto estandarizado de factores de influencia para asimetría.....	78

<b>Gráfico 35-3:</b>	Gráfica de los efectos rincipales para la asimetría sobre factores evaluados. ...	79
<b>Gráfico 36-3:</b>	Malla de la superficie de respuesta para la asimetría .....	80
<b>Gráfico 37-3:</b>	Diagrama de Pareto estandarizado de factores de influencia para la resolución	82
<b>Gráfico 38-3:</b>	Gráfica de los efectos principales para la resolución sobre factores evaluados.	82
<b>Gráfico 39-3:</b>	Malla de la superficie de respuesta para la resolución .....	83
<b>Gráfico 40-3:</b>	Gráfica de los Efectos Principales para el número de platos teóricos sobre los factores evaluados .....	84
<b>Gráfico 41-3:</b>	Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia para el tiempo de retención final.....	85
<b>Gráfico 42-3:</b>	Malla de la superficie de respuesta para el tiempo de retención final .....	86
<b>Gráfico 43-3:</b>	Diagrama de Pareto Estandarizado de factores de influencia en platos teóricos	87
<b>Gráfico 44-3:</b>	Gráfica de efectos principales para el número de platos teóricos.....	87
<b>Gráfico 45-3:</b>	Malla de la superficie de respuesta para el número de platos teóricos .....	88
<b>Gráfico 46-3:</b>	Diagrama de Pareto estandarizado de factores de influencia para la asimetría.	90
<b>Gráfico 47-3:</b>	Gráfica de los efectos principales para la asimetría sobre factores evaluados. .	90
<b>Gráfico 48-3:</b>	Malla de la superficie de respuesta para la asimetría .....	91
<b>Gráfico 49-3:</b>	Diagrama de Pareto estandarizado de factores de influencia para resolución...	92
<b>Gráfico 50-3:</b>	Gráfica de efectos principales para el tiempo de retención final .....	92
<b>Gráfico 51-3:</b>	Malla de la superficie de respuesta para el tiempo de retención final .....	94
<b>Gráfico 52-3:</b>	Cromatograma del método analítico inicial .....	95
<b>Gráfico 53-3:</b>	Cromatograma del método analítico final .....	96
<b>Gráfico 54-3:</b>	Cromatograma Selectividad del Sistema.....	96
<b>Gráfico 55-3:</b>	Cromatograma Selectividad del Placebo Cargado .....	97
<b>Gráfico 56-3:</b>	Cromatogramas del metilparabeno y propilparabeno.....	98

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A:** CALCULO DEL HLB PARA DETERMINAR EL SIGNO DE LA EMULSIÓN

**ANEXO B:** DESARROLLO DEL DOE

**ANEXO C:** ENSAYO DE SELECTIVIDAD

**ANEXO D:** CROMATOGRAMAS REFERENTES AL ENSAYO DE SELECTIVIDAD

**ANEXO E:** CROMATOGRAMAS DE LOS COMPONENTES INDIVIDUALES DE LA EMULSIÓN

**ANEXO F:** ESTÁNDARES EN EL DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

**ANEXO G:** EQUIPO HPLC UV/VIS- PDA

**ANEXO H:** EVIDENCIAS FOTOGRÁFICOS DEL MÉTODO ANALÍTICO

## RESUMEN

El objetivo del trabajo de investigación fue desarrollar un método analítico para determinar simultáneamente metronidazol y miconazol nitrato en una emulsión farmacéutica, el método se desarrolló utilizando el enfoque en la calidad analítica. Inicialmente, se determinó el perfil analítico, los atributos críticos de calidad (CQA), con la medición del número de platos teóricos (N), asimetría (T), resolución (Rs) y tiempo de retención (TR). Posteriormente, se identificaron los parámetros críticos del proceso mediante una matriz de riesgo inicial, la fase estacionaria, porcentaje de orgánico, flujo, temperatura y pH de la fase móvil. Se evaluaron mediante un diseño experimental, se seleccionó un diseño reducido de Draper-y-Lin, dando un total de 30 ensayos. La región de diseño operable del método (MODR) se determinó mediante los gráficos de Pareto, efectos principales, superficie respuesta y posterior análisis de varianza (ANOVA). Finalmente, se estableció las condiciones óptimas de trabajo con un método óptimo con flujo de 1,0 mL, 45 grados Celsius, proporción de la fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8), detectados a 220 nm, en una fase estacionaria LiChrospher C18 (5µm;150-4 mm). En el método desarrollado se evaluó su selectividad acorde a la Asociación española de farmacéuticos, se prepararon muestras mediante las técnicas de placebo y placebo cargado. Luego, a través del % de discrepancia y la prueba t de Student se valoró la selectividad del método optimizado. El dato de discrepancia fue de 0,795% para el miconazol nitrato y 0,668% para el metronidazol y con un valor de *p mayor igual que* 0,05 se demostró que no existe diferencia significativa entre muestras. En conclusión, el método desarrollado y optimizado mantuvo los atributos críticos planteados en el espacio de diseño evaluado. Se recomienda continuar con la etapa de validación del método analítico según lo determina la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica.

**Palabras clave:** <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <CROMATOGRAFÍA>, <MÉTODO ANALÍTICO>, <METRONIDAZOL>, <MICONAZOL NITRATO>. <EMULSIÓN>.



0783-DBRA-UTP-2022

## ABSTRACT

The main objective of this research study was to develop an analytical method to determine metronidazole and miconazole nitrate simultaneously in a pharmaceutical emulsion. The method was developed focusing on analytical quality. Initially, the analytical profile was determined, critical quality attributes (CQA), with the measurement of the number of theoretical plates (N), asymmetry (T), resolution (Rs), and retention time (RT). Subsequently, the critical parameters of the process were identified through an initial risk matrix, the stationary phase, and percentage of the organic, flow, temperature, and pH of the mobile phase. They were evaluated using an experimental design, a reduced Draper-and-Lin design was selected, giving a total of 30 trials. The method operable design region (MODR) was determined using Pareto charts, main effects, response surface, and subsequent analysis of variance (ANOVA). Finally, optimal working conditions were established with an optimal method with a flow of 1.0 mL, 45 degrees Celsius, mobile phase ratio (75:25 Buffer: Methanol pH 2.8), detected at 220 nm, in a LiChrospher C18 stationary phase (5µm; 150-4mm). In the developed method, it was evaluated selectivity according to the Spanish Association of Pharmacists, samples were prepared using the placebo and loaded by placebo techniques. Then, the % discrepancy and the Student's T-test were used to assess the selectivity of the optimized method. The discrepancy of the data was 0.795% for miconazole nitrate and 0.668% for metronidazole and with a higher p-value equal to 0.05, it was shown that there is no significant difference between samples. In conclusion, the developed and optimized method maintained the critical attributes raised in the space of evaluated design. It is recommended to continue with the validation stage of the analytical method according to what is determined by the Pharmacopoeia of the United States of America.

**Keywords:** <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <CHROMATOGRAPHY>, <ANALYTICAL METHOD>, <METRONIDAZOLE>, <NITRATE OF MICONAZOLE>, <EMULSION>.



Evelyn Carolina Macias Silva

0603239070

## INTRODUCCIÓN

La elaboración de productos farmacéuticos requiere de los más altos estándares de calidad por lo cual, las farmacéuticas son reconocidas como una de las más exigentes, considerando la criticidad de los productos que elabora. No obstante, pese a, todos los controles que se realiza en la elaboración de un medicamento, frecuentemente se reportan eventos que afectan la calidad del fármaco (Saleme et al, 2013, p. 191).

El desarrollo y la fabricación de un medicamento engloba varios procesos farmacéuticos que deben ser controlados para tener un producto de calidad. Entre los procesos más críticos que se deben controlar los métodos analíticos cobran protagonismo, ya que ejercen un papel importante durante el ciclo de vida del medicamento (Tome et al. 2019, p. 1784).

Los métodos analíticos tradicionales frecuentemente se realizaban mediante un sistema de prueba y error, es decir variando un factor a la vez (OFAT), lo que generaba un alto costo para la industria farmacéutica, dado que originaban un número elevado de experimentos, además el método tenía un alto riesgo de falla (Parr y Schmidt 2018, p. 7).

Actualmente existen métodos sistemáticos, los cuales emplean programas estadísticos y un software como herramienta para el desarrollo de un método analítico, la cual se conoce como Calidad analítica por diseño (AQbD) que es una prolongación de Quality by Design (QbD) (Tome et al. 2019).

El metronidazol (MTZ) y miconazol nitrato (MN), son dos principios activos derivados de los nitroimidazoles, que se emplean generalmente como antibacterianos, amebicidas, antiprotozoarios y en infecciones fúngicas (Sahoo y Jain 2016, p. 1).

Hoy por hoy, existen en el mercado varias formas farmacéuticas que contienen la mezcla de estos principios activos, para la terapia de una gran variedad de infecciones vaginales provocadas por distintos tipos de organismos (Akay et al. 2002, p. 13).

Por este motivo, para la separación de los analitos presentes en una muestra, el empleo de técnicas cromatográficas, como la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), se emplea frecuentemente ya que, resulta ser un método sensible, específico reproducible, y apto para el desarrollo de métodos (Tome et al. 2019, p. 1784).

En la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) no existe ningún método oficial para la determinación simultánea de metronidazol y miconazol nitrato, por este motivo se considerado la necesidad de desarrollar un método analítico único para la determinación de estos principios activos en una emulsión.

En el Ecuador la evaluación de la calidad de los medicamentos farmacéuticos y su comercialización está regida por la Agencia de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), la cual se apoya en la normativa de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), guiados

en el Informe No. 32 de la OMS que a su vez, tiene relación con organismos internacionales como la FDA, la OMS, ICH, Farmacopea Europea y Americana (Daste 2015, p. 4).

En este contexto, el Laboratorio Neofármaco Cia. Ltda, se ve en la necesidad de desarrollar un método analítico para la determinación simultánea de metronidazol y miconazol nitrato en una emulsión, mediante la utilización de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) en fase reversa, aplicando el QbD (Quality by Design), el cual incluye el desarrollo del perfil analítico del objetivo (ATP), selección de los atributos críticos (CQA), identificación de los parámetros críticos del proceso (CCP), mediante una evaluación de riesgo inicial, definición de la región de diseño operable del método (MODR) y selección de puntos de trabajo lo cual, contribuirá al desarrollo de un método óptimo con resultados dentro de las especificaciones y adecuado para su propósito durante todo el ciclo de vida del método reduciendo así costos en la industria farmacéutica.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Aplicar el QbD para la determinación simultánea de metronidazol y miconazol nitrato por RP-HPLC –UV/Vis en una emulsión.

### **Objetivos específicos**

- Desarrollar un método analítico, utilizando la directriz ICH Q8 para la separación de metronidazol y miconazol nitrato presentes en una emulsión.
- Identificar los parámetros críticos del proceso (CCP) que afectan de manera directa al método analítico.
- Determinar el grado de selectividad del método analítico desarrollado.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

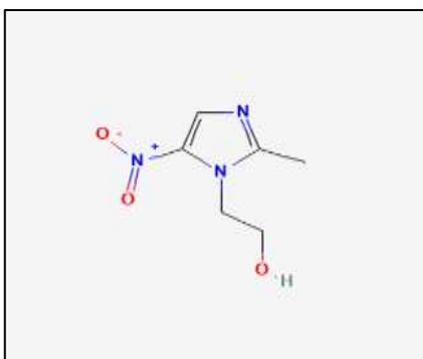
#### 1.1. Principios activos

##### 1.1.1. Metronidazol

El metronidazol (MTZ), es un compuesto que pertenece a la clase de los nitroimidazoles, ampliamente utilizado en la cura de diversas infecciones provocadas por diferentes tipos de microorganismos, ya que presenta actividad contra bacterias anaerobias y protozoos (PubChem 2004a).

##### 1.1.1.1. Nombre, fórmula y peso molecular

Su fórmula química es  $C_6H_9N_3O_3$  1- (2-hidroxietil) -2-metil -5- nitroimidazol tiene un peso molecular de 171,16 (Brittain 2020, p. 329).



**Figura 1-1.** Estructura del metronidazol

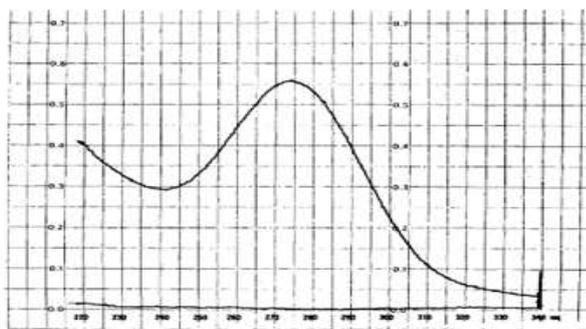
Fuente: (PubChem 2004a).

##### 1.1.1.2. Apariencia

El metronidazol exhibe un color blanco a amarillo pálido, es inodoro y cristalino (Brittain 2020, p. 329).

##### 1.1.1.3. Propiedades físicas y químicas

- Espectro Ultravioleta: Expone una absorción máxima de 274 nm aproximadamente, usando ácido sulfúrico 0,1 N y metanol como disolvente (Brittain 2020, p. 329).



**Figura 2-1.** Espectro Ultravioleta del Metronidazol

Fuente: (Brittain 2020, p. 333).

- Actividad óptica: Este compuesto no presenta actividad óptica.
- Punto de fusión: 159 a 163 °C.
- Punto de ebullición: 405,4.
- Solubilidad: El metronidazol presentan solubilidad en varios solventes que se exponen a continuación. (Brittain 2020, p. 332).

**Tabla 1-1:** Solubilidad del metanol en varios solventes a 25 °C

Solvente	Solubilidad, mg/MI
Agua	10,5
Metanol	32,5
Etanol	15,5
Cloroformo	3,8
Heptano	menor a 0,01

Fuente: (Brittain 2020, p. 332).

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

- pKa: El metronidazol es una base débil que presenta un pKa de 2,38
- LogP: -0.02
- Donantes de enlaces de hidrogeno: 1
- Aceptores de enlaces de hidrógeno: 4
- pH en una solución acuosa saturada es de 5,8 (PubChem 2004a).

#### 1.1.1.4. Mecanismo de acción

Su mecanismo de acción antibacteriano y antiprotozoario consiste en la destrucción del ADN al ingresar a la célula mediante difusión pasiva, en donde es químicamente reducido por proteínas del metabolismo de algunos parásitos y bacterias anaerobias, la reducción del grupo nitro del

MTZ rompe la estructura del ADN lo cual se traduce en muerte celular ya que, existe una inhibición de ácidos nucleicos lo que genera compuestos dañinos para la célula. (Vicente y Pérez-Trallero 2010, p. 527).

#### 1.1.1.5. Farmacocinética

El MTZ es administrado por vía oral, intravenosa, tópica, vaginal y rectal, se absorbe perfectamente por vía oral ya que, alcanza una biodisponibilidad del 90%, en supositorios del 60-80%, y por vía vaginal del 20% (Vicente y Pérez-Trallero 2010, p. 526).

Se distribuye por todos los tejidos y líquidos, y es capaz de atravesar la placenta y la barrera hematoencefálica, se metaboliza en el hígado (30 al 60%), y es eliminado por vía renal, con una excreción del 20% por la orina y del 6-15% por las heces (Vicente y Pérez-Trallero 2010, p. 526).

#### 1.1.1.6. Usos terapéuticos

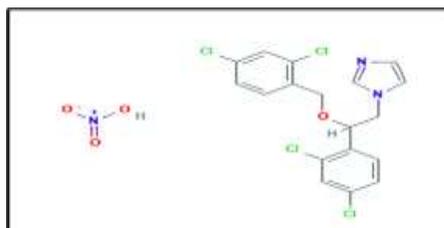
El metronidazol es activo contra todas las bacterias anaerobias causantes de casi todas las infecciones, en combinación con otros antibióticos se administra en el tratamiento de abscesos cerebrales de procedencia sinusal, dental, pulmonar. Además de ser utilizado en endocarditis infecciosas causada por bacterias anaerobias (Vicente y Pérez-Trallero 2010, p. 527).

### 1.1.2. Miconazol nitrato

El nitrato de miconazol es un derivado del imidazol que se encuentra en forma de sal de nitrato de miconazol, y es administrado en el tratamiento de infecciones por *Candida* (PubChem 2004b).

#### 1.1.2.1. Nombre, fórmula y peso molecular

Su fórmula química es  $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O_3$ .  $HNO_3$  1H-Imidazol,1-[2-(2,4- diclorofenil)-2-[(2,4- diclorofenil)metoxi]etil] y tiene un peso molecular de 479,14 (Al-Badr 2005, p. 5).



**Figura 3-1.** Estructura del miconazol

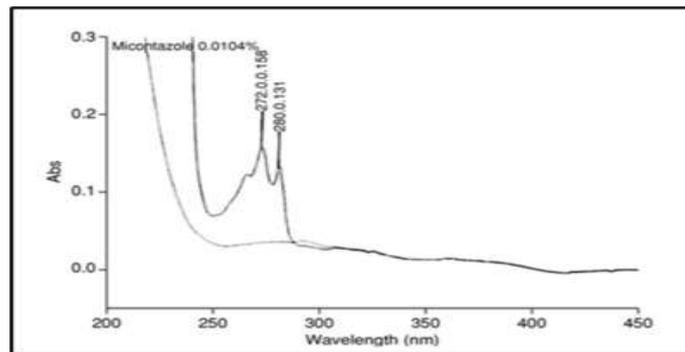
Fuente: (PubChem 2004b).

### 1.1.2.2. Apariencia

El nitrato de miconazol es un polvo que presenta un color blanco o casi blanco (Al-Badr 2005, p. 5).

### 1.1.2.3. Propiedades físicas y Químicas

- Espectro Ultravioleta: El miconazol nitrato presenta una absorción máxima a 264, 272 y 280 nm en metanol (0,0104%) (Al-Badr 2005, p. 10).



**Figura 4-1.** Espectro Ultravioleta del nitrato de miconazol

Fuente: (Al-Badr 2005, p. 11).

- Actividad óptica: (+) Forma nitrato  $\alpha_D^{20} + 59^\circ$  (metanol) (-) Forma nitrato  $\alpha_D^{20} - 58^\circ$  (metanol) (Al-Badr 2005, p. 8).
- Punto de fusión: 170- 185 °C.
- Solubilidad: Es muy soluble en dimetilsulfóxido; soluble en dimetilformamida parcialmente soluble en metanol; escasamente soluble en alcohol, cloroformo y propilenglicol; muy poco soluble en agua y alcohol isopropílico; insoluble en éter (Farmacopea Argentina 2003, p. 654).
- pKa: Es una base débil que presenta un pKa de 6.7
- LogP: 5,86
- Donantes de enlaces de hidrogeno: 1
- Aceptores de enlaces de hidrógeno: 5

### 1.1.2.4. Mecanismo de acción

Consiste en la inhibición de la enzima 14- alfa-lanosterol demetilasa, enzima primordial en la biosíntesis de ergosterol ya que, al no producirse este compuesto se almacena en el tegumento celular esteroides 14-alfa- metilados, que son tóxicos para la célula (De Zan 2011, p. 58).

#### 1.1.2.5. Farmacocinética

El nitrato de miconazol se administra generalmente por vía tópica y se absorbe muy poco en los tejidos sistémica, alcanza un volumen de distribución de 10911 L cuando se administra mediante crema vaginal, se fusiona a la albúmina y se metaboliza en el hígado, pero, no genera metabolitos activos y es eliminado por la orina y las heces (Drugbank 2005).

#### 1.1.2.6. Usos terapéuticos

El miconazol nitrato se encuentra disponible en cremas, supositorios, geles y tabletas, está indicado en el tratamiento de la candidiasis orofaríngea en adultos, en infecciones vaginales producidas por hongos, y para el alivio de la picazón e irritabilidad que estas generan, también es utilizado en el tratamiento de la dermatofitosis del pie (Drugbank 2005).

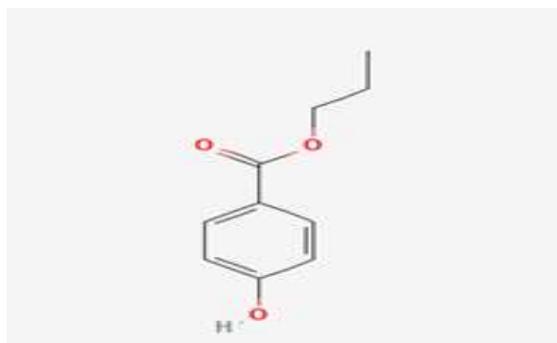
### 1.2. Excipientes

#### 1.2.1. Propilparabeno

La función del propilparabeno es actuar como conservante puesto que, actúa como agente antifúngico y antimicrobiano es utilizado en la industria farmacéutica, en la manufactura de cosméticos que contienen agua, como, por ejemplo, cremas, lociones, champús y artículos de baño. Es un éster de benzoato, un miembro de fenoles y un parabeno (Drugbank 2005).

##### 1.2.1.1. Nombre, fórmula y peso molecular

Su fórmula es  $C_{10}H_{12}O_3$ , 4-hidroxi benzoato de propilo y presenta un peso molecular de 180,20



**Figura 5-1.** Estructura del propilparabeno

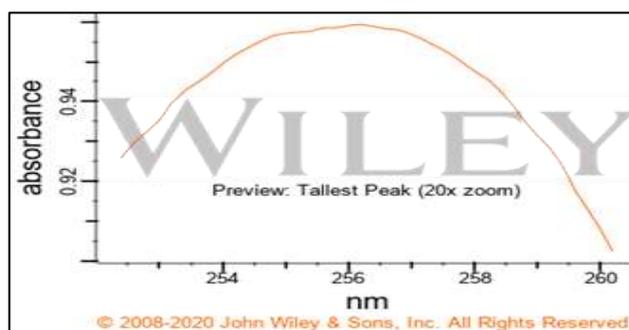
Fuente: (National Center for Biotechnology Information 2021c).

### 1.2.1.2. Apariencia, color y olor

Exhibe un olor aromático inodoro o leve, tiene la apariencia de cristales o polvo blanco (National Center for Biotechnology Information 2021c).

### 1.2.1.3. Propiedades físicas y químicas

Espectro Ultravioleta: Absorción máxima en alcohol 257 nm



**Figura 6-1.** Espectro Ultravioleta del propilparabeno

Fuente: (National Center for Biotechnology Information 2021c).

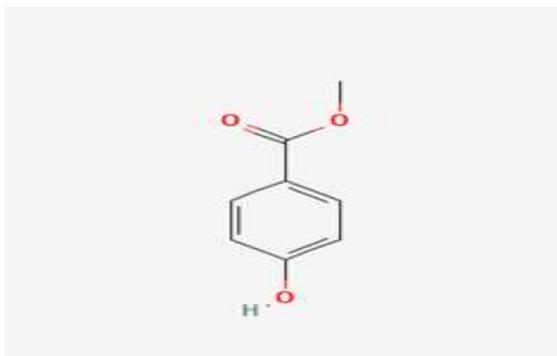
- Punto de fusión: 95-98 ° C
- Punto de ebullición: 271 ° F
- Solubilidad: Levemente soluble en agua caliente, en etanol y éter etílico es soluble; ligeramente soluble en cloroformo.
- pKa: 8,5
- LogP: 3,04
- Donantes de enlaces de hidrogeno: 1
- Aceptores de enlaces de hidrógeno: 3
- pH: Levemente ácido 6.5-7.0 (National Center for Biotechnology Information 2021c).

### 1.2.2. Metilparabeno

El metilparabeno es un conservante empleado en la industria farmacéutica, alimentaria y en cosmética, presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana y como agente antifúngico, es efectivo a un rango variable de pH. Se utiliza en la preparación de formulaciones farmacéuticas, oftálmicas, en suspensiones y soluciones, etc. (Oporta, Oporta y Rodriguez 2009).

### 1.2.2.1. Nombre, fórmula y peso molecular

Su fórmula molecular es  $C_8H_8O_3$  4-hidroxibenzoato de metilo, y presenta un peso molecular de 152.15 (National Center for Biotechnology Information 2021d).



**Figura 7-1.** Estructura del metilparabeno

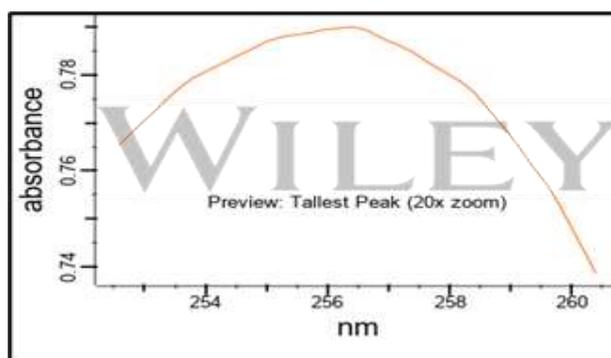
**Fuente:** (National Center for Biotechnology Information 2021d).

### 1.2.2.2. Apariencia, color y olor

Forma de agujas blancas, inodoros e incoloros.

### 1.2.2.3. Propiedades físicas y químicas

- Espectro ultravioleta: Absorción máxima en alcohol como solvente 258 nm.



**Figura 8-1.** Espectro Ultravioleta del metilparabeno

**Fuente:** (National Center for Biotechnology Information 2021d).

- Punto de fusión: 131,0 ° C
- Punto de ebullición: 270,5 ° C
- Solubilidad: Presenta solubilidad en varios solventes que se mencionan a continuación:

**Tabla 2-1:** Solubilidad del metilparabeno en varios solventes a 25 °C

<i>Solvente</i>	<i>g / 100g a 25 ° C</i>
<i>Agua</i>	2.50X10 + 3 mg / L
Metanol	59
Etanol	52
Propilenglicol	22
Aceite de cacahuete	0,5
Acetona	64
Benceno	0,7
Éter	23
Tetracloruro de carbono	0,1

**Fuente:** (National Center for Biotechnology Information 2021d).

**Realizado por:** Díaz, Claudia, 2022.

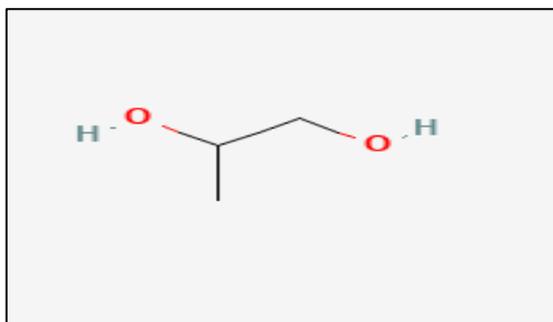
- pKa: 8,4
- LogP: 1,96
- Donantes de enlaces de hidrogeno: 1
- Aceptores de enlaces de hidrógeno: 3 (National Center for Biotechnology Information 2021d).

### **1.2.3. Propilenglicol**

Actúa como cosolvente, ya que ayuda a disolver los insumos o ingredientes activos, tiene la facultad de absorber agua y conservar la humedad de algunos medicamentos (National Center for Biotechnology Information 2021a).

#### **1.2.3.1. Nombre, fórmula y peso molecular**

El propano-1,2-diol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> tiene un peso molecular de 76,09.



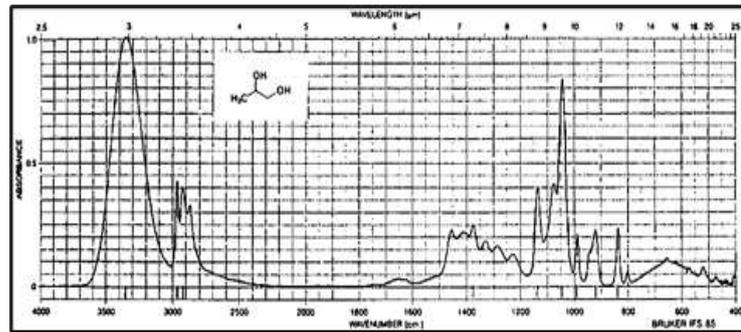
**Figura 9-1.** Estructura del propilenglicol

**Fuente:** (National Center for Biotechnology Information 2021a).

### 1.2.3.2. Apariencia, color y olor

Es un fluido límpido y espeso no presenta olor ni color, tiene la capacidad de absorber la humedad (National Center for Biotechnology Information 2021a).

### 1.2.3.3. Propiedades físicas y químicas



**Figura 10-1.** Espectro infrarrojo del propilenglicol

**Fuente:** (FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación 1997).

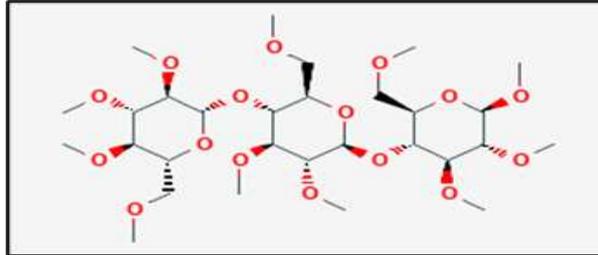
- Punto de fusión: -76 ° F
- Punto de ebullición: 370,8 ° F a 760 mm Hg
- Solubilidad: Soluble en agua, metanol, acetona y benceno
- pKa: 14,9
- LogP: -0,92
- Donantes de enlaces de hidrógeno: 2
- Aceptores de enlaces de hidrógeno: 2 (National Center for Biotechnology Information 2021a).

### 1.2.4. Metilcelulosa

Es un excipiente muy variable que a concentraciones bajas se utiliza en varias formulaciones tanto sólidas, líquidas y semisólidas, posee múltiples propiedades como reológicas, formador de películas, poder adhesivo. Es utilizado como agente espesante en el acondicionamiento de suspensiones, cremas y lociones ya que incrementa su viscosidad al disolverse (Tapia y Sapag-hagar 1995, p. 41).

#### 1.2.4.1. Nombre, fórmula y peso molecular

La metilcelulosa  $C_{29}H_{54}O_{16}$ , está formada por (1->4) – beta-D-glucano cuyo, peso molecular es 658,7 (National Center for Biotechnology Information 2021b).



**Figura 11-1.** Estructura de la metilcelulosa

**Fuente:** (National Center for Biotechnology Information 2021b).

#### 1.2.4.2. Apariencia, color, olor

La metilcelulosa es un polvo blanco es forma de gránulos, inodoro e insípido.

#### 1.2.4.3. Propiedades físicas y químicas

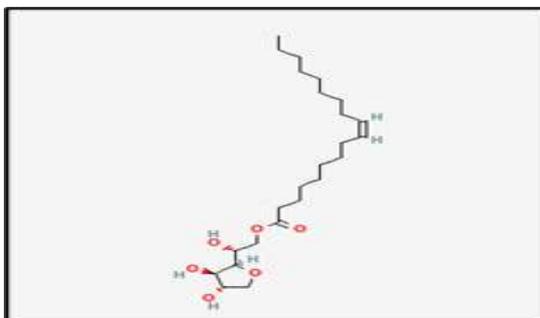
- Punto de fusión: 482 ° F a 572 ° F
- Solubilidad: Soluble en agua fría y ácido acético glacial, insoluble en agua caliente, etanol, cloroformo y éter.
- Donantes de enlaces de hidrogeno: 0
- Aceptores de enlaces de hidrógeno: 16
- pH: Presenta un pH entre 5,0 y 8,0 (National Center for Biotechnology Information 2021b).

#### 1.2.5. *Span 80*

El Span 80 también conocido como monooleato de sorbitán es un emulsionante de tipo no iónico, es un surfactante que ayuda a mantener el equilibrio de las emulsiones disminuyendo la tensión superficial (Godoy, Salinas y Velasco 2004).

### 1.2.5.1. Nombre, fórmula y peso molecular

El sorbitán, mono- (9Z) -9-octadecenoato, su fórmula química es  $C_{24}H_{44}O_6$  y tiene un peso molecular de 428,6 (National Center for Biotechnology Information 2021e).



**Figura 12-1.** Estructura química Span 80

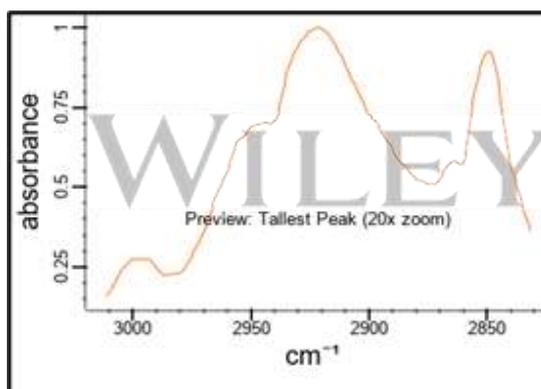
Fuente: (National Center for Biotechnology Information 2021e).

### 1.2.5.2. Apariencia color y olor

Es un líquido de color ámbar.

### 1.2.5.3. Propiedades físicas y químicas

Se realizó el espectro infrarrojo presentado a continuación:



**Figura 13-1.** Espectro IR del Span 80

Fuente: (National Center for Biotechnology Information 2021e).

- Solubilidad: Se dispersa fácilmente en agua y es soluble en la mayoría de los aceites minerales y vegetales, levemente soluble en éter e insoluble en acetona.
- Donantes de enlaces de hidrogeno: 3

- Aceptores de enlaces de hidrógeno: 6 (National Center for Biotechnology Information 2021e).

### ***1.2.6. Aceite de vaselina***

El aceite de vaselina es un subproducto de la destilación del petróleo, en el argot popular también se lo conoce como aceite mineral, está constituido por alcanos de 15 a 40 carbonos y una parafina cíclica. Se utiliza como agente emoliente y oclusivo en formas farmacéuticas tópicas (Enríquez 2017, p. 12).

#### *1.2.6.1. Apariencia*

Líquido untoso, transparente y no presenta color.

#### *1.2.6.2. Propiedades físicas*

- Solubilidad: Levemente soluble en etanol, insoluble en agua y presenta miscibilidad en hidrocarburos.
- Densidad: 0,827 – 0,905 g/ml.
- Índice de refracción: 1,4756 – 1,4800.
- Viscosidad: De 120 -230 mPa·s a una temperatura de 20 °C
- Punto de ebullición: 310 °C (Drugbank 2015).

### ***1.2.7. Vaselina blanca***

Es utilizada como material base y para ajustar la consistencia, es tomada en cuenta como un componente activo en preparaciones farmacéuticas ya que, posee un carácter lipófilo. También se emplea como vehículo y base para sistemas hidrófilos que engloban emulsionantes. Cuenta con capacidad lubricante y protege de la humedad a las lociones, ungüentos, cremas ,etc. (Paraffin Oils 2005).

#### *1.2.7.1. Apariencia, olor y color*

Es una masa sólida, blanca y translúcida no presenta olor y es insípida (Paraffin Oils 2005).

### 1.2.7.2. Propiedades físicas y químicas

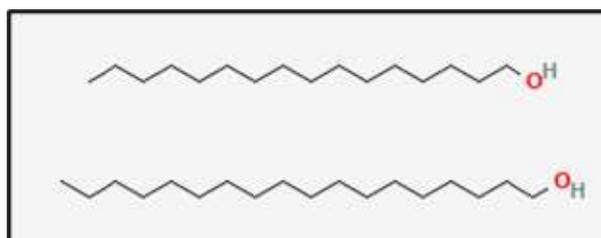
- Solubilidad: Es insoluble en agua y alcohol
- Punto de fusión: 44 y 56 °C (Paraffin Oils 2005).

### 1.2.8. Alcohol cetoestearílico

Presenta un alcohol cetílico y alcohol estearílico, se aprovecha en la industria farmacéutica como agente emulsionante, opacificante, emoliente y aumenta la viscosidad de las formulaciones farmacéuticas tópicas, además de ser un agente potenciador de espuma. Forma emulsiones de tipo (o/w) (Smolinske 2018).

#### 1.2.8.1. Nombre, fórmula y peso molecular

El  $C_{34}H_{72}O_2$ , hexadecan-1-ol; octadecan-1-ol, cuyo peso molecular es 512,9 (PubChem 2021b).



**Figura 14-1.** Estructura del alcohol cetoestearílico

Fuente: (PubChem 2021b).

#### 1.2.8.2. Apariencia, color y olor

Es un sólido de coloración blanca, ceroso y con un olor a jabón.

#### 1.2.8.3. Propiedades físicas

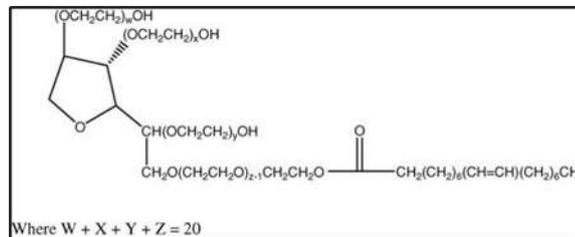
- Punto de fusión: 127 ° F
- Punto de ebullición: 480 ° F a 760 mm Hg
- Donantes de enlaces de hidrógeno: 2
- Aceptores de enlaces de hidrógeno: 2 (PubChem 2021b).

### 1.2.9. Tween 80

El tween 80 o polisorbato 80, es una sustancia formada a partir de un éster de ácido graso de sorbitán y óxido de etileno pertenece al grupo de los tensoactivos no iónicos hidrófilos, actúa como agente emulgente y suspensor, se utiliza en el apresto de emulsiones de tipo (o/w). Tiene propiedades protectoras y emolientes. Por esta razón, se utiliza en la formulación de cremas, pomadas, supositorios y en suspensiones orales. (Acofarma 2013).

#### 1.2.9.1. Nombre, fórmula y peso molecular

El mono oleato polioxietilen (20)sorbitano,  $C_{64}H_{124}O_{26}$  tiene un peso molecular de 1309,7



**Figura 15-1.** Estructura del Tween 80

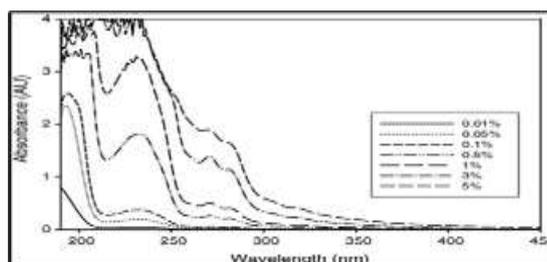
Fuente: (Peter Wuelfing et al. 2006, p. 776).

#### 1.2.9.2. Apariencia, olor y color

Es un líquido untoso de color amarillo a ámbar presenta un color leve y de sabor amargo.

#### 1.2.9.3. Propiedades físicas y químicas

- Espectro Ultravioleta: Presenta una absorbancia de 200 a 300 nm en soluciones relevantes (Peter Wuelfing et al. 2006, p. 775).



**Figura 16-1.** Espectro UV/vis del Tween 80

Fuente: (Peter Wuelfing et al. 2006, p. 776).

- Punto de inflamación: más de 230 ° F
- Solubilidad: Exhibe solubilidad en agua, tolueno, acetato de etilo, metanol y etanol, prácticamente insoluble en aceite mineral y éter de petróleo.
- pH: Entre 6 y 8 en solución acuosa.
- Donantes de enlaces de hidrógeno: 3
- Aceptores de enlaces de hidrógeno: 10 (PubChem 2021a).

#### ***1.2.10. Polawax***

El polawax está formado por alcohol cetearílico y polisorbato 60, actúa como una cera autoemulsionante de tipo no iónica, empleada tanto en los laboratorios farmacéuticos y cosméticos. En la producción de emulsiones favorece la hidratación y ayuda a la liberación gradual del principio activo además, de mantener estable la emulsión durante su periodo de vida útil dado que, conserva la emulsión fluida y cremosa sin agregar un co-emulsionante (Dermocosmetic Institute).

##### *1.2.10.1. Apariencia, olor y color*

El polawax exhibe un olor neutro y tiene una apariencia de gránulos cerosos de color blanco a amarillo claro (Dermocosmetic Institute).

##### *1.2.10.2. Propiedades físicas*

- Punto de fusión: 53°C en 3% de agua
- pH: 5,5 a 7,0
- Punto de inflamación: mayor a 100 °C (Dermocosmetic Institute).

### **1.3. Emulsiones**

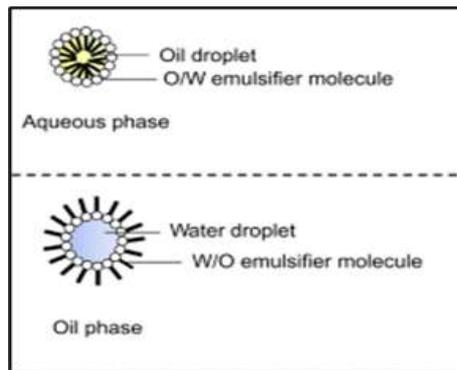
Las emulsiones son sistemas heterodispersos líquidos que constan de dos fases inmiscibles (una acuosa y otra oleosa), una se dispersa en manera de glóbulos sobre la fase líquida, para que la emulsión se estabilice se necesita de un emulsionante.

La gota de la fase interna o discontinua tiene un diámetro de 0,1 a 10 µM aproximadamente (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 202).

### 1.3.1. Tipos de emulsiones

Las emulsiones constan de una fase líquida polar y otra relativamente no polar, éstas se clasifican generalmente en:

- Emulsión aceite en agua (o/w); Fase oleosa se dispersa en forma de glóbulos entre una fase acuosa externa (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 202).
- Emulsión de agua en aceite (w/o); Cuando la fase interna en forma de gotículas se dispersa en la fase oleosa continua (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 202).



**Figura 17-1.** Tipos de emulsiones

Fuente: (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 202).

Las emulsiones también se pueden clasificar según el modo de administración

- Emulsiones orales; aceite en agua
- Emulsiones tópicas; pueden ser en o/w o w/o, está última es la más utilizada actualmente.
- Emulsiones parenterales; empleadas para la nutrición parenteral central (NPT) son emulsiones de aceite en agua.
- Emulsiones rectales, por ejemplo, enema (Pharmapproach.com 2020).

### 1.3.2. Teorías de las emulsiones

Existen varias teorías para exponer la estabilidad de las emulsiones entre las más importantes son:

- La teoría de la tensión superficial; menciona que el uso de los emulsionantes disminuye la tensión interfacial de los dos líquidos inmiscibles generando así una miscibilidad de las fases (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 203).
- La teoría de la cuña orientada; alude a la creación de una capa alrededor de las gotas dispersas en la emulsión (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 203).
- La teoría de la película interfacial; menciona que entre las fases de aceite y agua se encuentra ubicado el emulsionante formando una película que al momento de ser adsorbido alrededor de la

superficie de las gotículas de la fase discontinua previene la coalescencia (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 203).

### ***1.3.3. Clasificación de los emulsionantes***

Los emulsionantes constituyen el componente principal de las emulsiones, dado que, ayudan a mantener la estabilidad de estas manteniendo las características fisicoquímicas de la emulsión. Actúan disminuyendo la tensión superficial de las gotículas ya que, se ubican en la interfase de los líquidos (Godoy, Salinas y Velasco 2004, p. 29).

#### ***1.3.3.1. Agentes tensioactivos***

Actúan formando una película al ser adsorbidos en la interfaz aceite agua, reduciendo así la tensión interfacial (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 204).

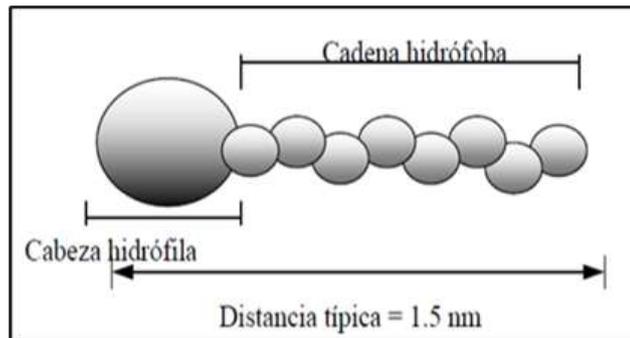
- Aniónicos: Se distingue por ionizarse en soluciones acuosas ya que, disponen un grupo polar que adquiere una carga negativa. (Godoy, Salinas y Velasco 2004, p. 29).
- Catiónicos: Poseen un grupo polar hidrofílico que consigue una carga positiva al ionizarse en un ambiente acuoso. (Godoy, Salinas y Velasco 2004, p. 29).
- No iónicos: Son los más utilizados en la industria ya que, son muy estables en vista de, que no poseen grupos polares cargados, la parte no polar está formada por una cadena de hidrocarburos no saturados. Se utilizan en emulsiones de aceite en agua. (Almodovar y Hernández 2013, p. 22).

#### ***1.3.3.2. Coloides hidrofílicos***

Forman una película alrededor de las gotículas dispersas de una emulsión de aceite en agua (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 204).

#### ***1.3.3.3. Partículas sólidas finamente divididas***

Actúan adhiriéndose alrededor de glóbulos dispersos (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 204).



**Figura 18-1.** Estructura de un agente emulsificante  
**Fuente:**.(Almodovar y Hernández 2013, p. 20).

#### 1.3.4. Estabilidad de las emulsiones

La emulsión es estable cuando no existe agregación entre las gotículas y las fases se encuentran separadas manteniendo la apariencia el olor y el color de la emulsión (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 204).

La inestabilidad de las emulsiones está regida por diferentes mecanismos:

Floculación: este fenómeno se divide en dos clases agregación por sedimentación y agregación por movimiento browniano.

- Agregación por sedimentación; las gotículas de alta densidad se dirigen al fondo de la emulsión lo que da como resultado una agregación (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 204).
- Agregación browniana; las gotas de la emulsión se encuentran en diferentes tamaños lo que conlleva que las gotas grandes que se mueven más rápido choquen con las gotas pequeñas causando la agregación de gotitas (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 204).

Cremado: es un fenómeno que radica en la densidad de las fases de la emulsión, por ejemplo, si la fase interna es menos densa que la fase externa se produce una cremación ascendente que es el caso de las emulsiones de aceite en agua, por el contrario, si la fase dispersa tiene una densidad mayor que la fase dispersante existe una cremación descendente este fenómeno se da en las emulsiones de agua en aceite (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 205).

Para explicar de una mejor manera este mecanismo se utiliza la ley de Stokes la cual, se emplea para conocer la velocidad de sedimentación de las gotículas aceptando que existe un estado continuo, velocidad homogénea y no existe interacción entre ellas (Torres 2009, p. 18).

$$v = \frac{2(\rho_1 - \rho_2)2g a^2}{9n_0} \quad (1)$$

Donde;

$v$ = Velocidad de sedimentación

$a^2$ = Radio de la esfera

$n_0$ = Viscosidad

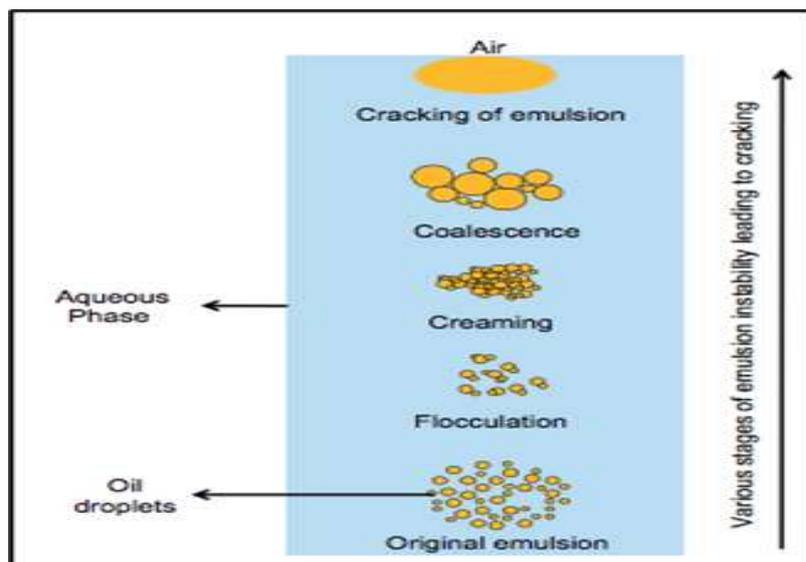
$\rho$ =Densidad del glóbulo

El signo de la ecuación se determinará mediante el sentido en se que se mueva la partícula y el valor de sus densidades, por ejemplo:

V= negativo < 0; Las gotículas van a subir generando una emulsión (o/w)

V= positivo > 0; Las gotículas tienden a descender generando una emulsión (w/o) (Torres 2009, p. 19).

Coalescencia: Este fenómeno es un proceso irreversible ya que, existe una ruptura de la película del emulsionante que rodea a los glóbulos provocando así, que las gotitas de aceite tiendan a fusionarse (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 205).

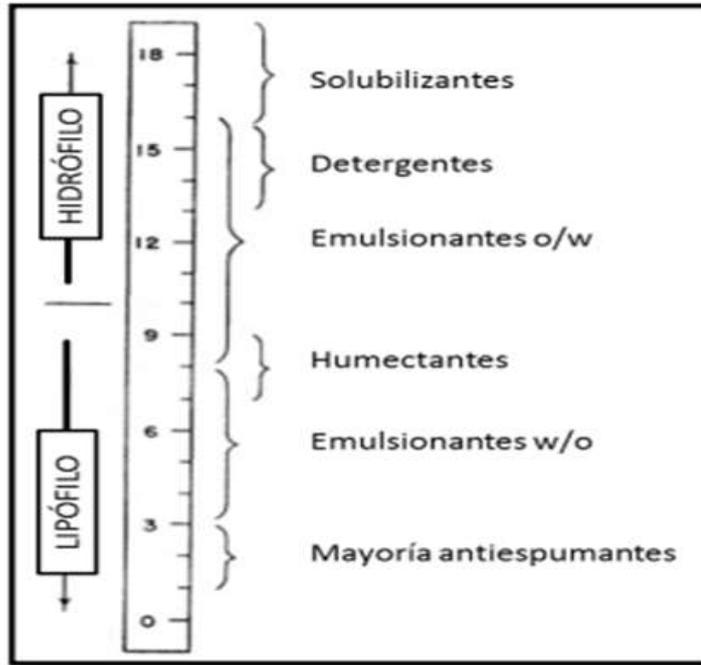


**Figura 19-1.** Mecanismos que conducen al agrietamiento de la emulsión

Fuente: (Dash, Singh y Tolman 2014, p. 204).

### 1.3.5. La escala de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB)

En el año de 1949, Griffin observó una conexión entre la condición del surfactante y sus características como agente tensoactivo y emulsificante, el balance hidrofílico- lipófilo consiste en asignar un número de HLB a los emulsificantes en base a los valores relativos a la estabilidad de una emulsión. El balance del tamaño y la fuerza de los grupos polares y los no polares hace posible el sistema HLB el cual se mide mediante una escala arbitraria de 0 a 20 (Almodovar y Hernández 2013, p. 24).



**Figura 20-1.** Escala de equilibrio hidrófilo- lipófilo (HLB)

Fuente: (Usiña 2017, p. 16).

Un HLB alto refleja que el emulsificante tiene propiedades polares por lo contrario, un HLB bajo señala que el surfactante presenta características no polares (Usiña 2017, p. 16).

### 1.3.5.1. Cálculo para el HLB

Para determinar el signo de la emulsión se calcula el HLB requerido, que es una peculiaridad de las grasas y no dependen de los surfactantes utilizados en la emulsión; se emplea la siguiente fórmula:

$$HLB_{req} = x1 HLB1 + xx HLBx \quad (2)$$

**Donde:**

x1: tanto por ciento de la masa del tensoactivo con HLB1

xx: tanto por ciento de la masa del tensoactivo con HLBx

Mediante esta fórmula se puede calcular de manera experimental el HLB requerido para los aceites y los surfactantes.

**Tabla 3-1:** HLB de algunos componentes

Componente	HLB
Span 80	4,3
Tween 80	15
Alcohol esteárico	15

Aceite de vaselina	12
Ácido oleico	1
Methocel	10,5
Propilenglicol	11,6
Trioleato de sorbitano	1,8
Monoestearato de glicerina	3,8
Goma arábica	8,0
Ácido linóleo	16
Lanolina anhidrica	12
Parafina cera	10
Emulgin B1	15
Polawax	14,9
Palmitato de cetilo	10

Fuente: (Almodovar y Hernández 2013, p. 27).

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

#### 1.4. Métodos analíticos

Se determina como un sin número de fases y procedimientos los cuales se adaptan al momento de realizar un estudio que, debe obedecer con ciertos parámetros y especificaciones (Zumbado 2021, p. 11).

El desarrollo de métodos analíticos consta de las subsiguientes fases:

- Determinación de los analitos
- Selección del método
- Acondicionamiento de la muestra
- Determinación de las condiciones óptimas (Zumbado 2021, p. 12).

##### 1.4.1. Clasificación de métodos analíticos

Un método analítico se puede clasificar mediante varios parámetros como:

En función de su estado regulatorio:

- Métodos farmacopéicos: Son aquellos métodos que están en la farmacopea debido, que han sido debidamente analizados y satisfacen las especificaciones de calidad (Vázquez 2008, p. 3).
- Métodos no farmacopéicos: Estos métodos no se localizan en las farmacopeas y deben ser correctamente validados conforme a la normativa (Vázquez 2008, p. 3).

En función de su aplicación:

- Métodos para producto a granel
- Métodos para producto terminado
- Métodos para materia prima (Vázquez 2008, p. 3).

#### **1.4.2. *Quality by design (QbD) ICH Q8***

Según Joseph Juran, quien acuñó por primera vez el término de QbD menciona que “Las características del producto y las tasas de falla se determinan en gran medida en la planificación de la calidad”, es decir, que para que un producto o proceso sea de calidad debe plantearse desde un inicio y no probarse en él (Parr y Schmidt 2018, p. 8).

Las farmacéuticas, son consideradas una de las más rigurosas ya que, debe suministrar medicamentos con suficiente calidad, eficacia y seguridad, por este motivo, debe plasmar en sus productos estándares de calidad (Saleme, Julio y Claudia Elizabeth Mora Huertas 2013, p. 191).

En virtud de ello, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), en el año 2004, incluyó la idea de Calidad por Diseño (QbD), cuya finalidad es agregar la calidad en el producto farmacéutico mediante el desarrollo científico para el diseño de nuevos fármacos (Tome et al. 2019, p. 1785).

En 2005, la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), aprobó el QbD en su directriz ICH Q8 (R2) la cual la define como “un enfoque sistemático para el desarrollo que comienza con objetivos predefinidos y enfatiza la comprensión del producto y proceso basado en ciencia sólida y riesgo de calidad” (Tome et al. 2019, p. 1785).

No obstante, en la directriz ICH Q8, no se menciona concretamente sobre el desarrollo de métodos analíticos más bien, plantea un enfoque del QbD en el desarrollo de productos farmacéuticos, no obstante, esto puede verse como una sugerencia para aplicar el QbD en el desarrollo y validación de métodos analíticos (Tome et al. 2019, p. 1785).

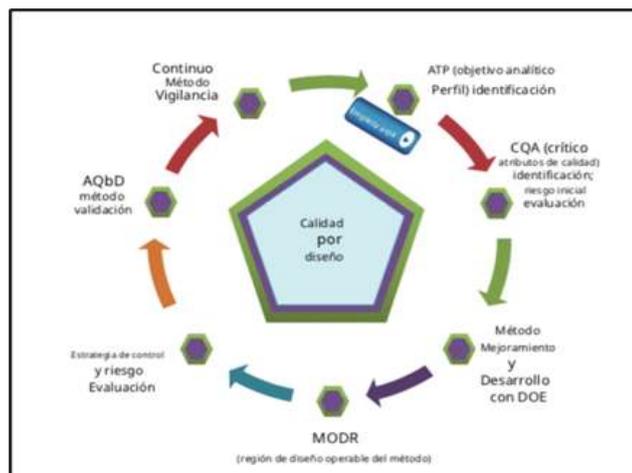
En el año 2015, la FDA difundió una nueva guía para la validación de métodos y procedimientos, empero, solo menciona recomendaciones sobre el desarrollo de métodos analíticos, nos dice que cuando se desarrolla un método analítico se debe elegir un enfoque sistemático, utilizando una evaluación inicial de riesgo y diseño de experimentos (DoE) (Tome et al. 2019, p. 1785).

Todas estas recomendaciones hicieron que la industria farmacéutica y la colectividad estudiada utilizaran el Analytical Quality by Design (AQbD) que es una extensión del QbD para el desarrollo de métodos analíticos (Tome et al. 2019, p. 1785).

#### **1.5. *Analytical Quality by design (AQbD)***

El desarrollo de métodos analíticos mediante la herramienta del AQbD (Calidad analítica por diseño), genera métodos robustos, eficaces y económicos, ya que este enfoque vigila todas las etapas durante el lapso de vida del método analítico (Tome et al. 2019, p. 1785).

El AQbD tiene diferentes herramientas como el perfil del objetivo analítico (ATP), atributos críticos de calidad (CQA), evaluación de riesgo inicial, DoE, MODR, proceso de validación y mejora continua (Raman, Mallu y Bapatu 2015, p. 1).



**Figura 21-1.** Herramientas AQbD y ciclo de vida.

Fuente: (Raman, Mallu y Bapatu 2015, p. 2).

### 1.5.1. Etapas del AQbD

#### 1.5.1.1. ATP (perfil analítico del objetivo)

El ATP, determina el objetivo del método analítico, además de definir cuáles son los requisitos del método, este se debe implementar antes de desarrollar el método analítico, y su enfoque debe ser la finalidad el método y no la técnica analítica. (Parr y Schmidt 2018, p. 4).

El perfil analítico del objetivo para métodos analíticos es el siguiente:

- Selección de los analitos
- Decisión de la técnica, tal como; HPLC, cromatografía iónica, HPLC quirál, etc.
- Selección de los requisitos del método (Raman, Mallu y Bapatu 2015, p. 2).

#### 1.5.1.2. CQA (atributos críticos de calidad) y evaluación inicial de riesgos

- CQA (atributos críticos de calidad); son rasgos físicos y químicos que presentan un límite establecido, asegurando así, la eficacia del producto farmacéutico, en los métodos analíticos las variables de respuestas como la resolución, la asimetría, etc. Constituyen parte de los CQA (Orlandini, Pinzauti y Furlanetto 2013, p. 2).
- Evaluación de riesgo inicial: es un recurso que ayuda a reconocer los parámetros críticos del proceso (CPP), eliminado así el riesgo que generan estos parámetros y como consecuencia genera confianza en el método analítico desarrollado. Las herramientas más utilizadas son diagramas de Ishikawa y matriz de análisis de modo y falla (Orlandini, Pinzauti y Furlanetto 2013, p. 3).

#### *1.5.1.3. DoE: Diseño de experimentos (optimización y desarrollo de métodos)*

El DoE, se realiza mediante herramientas estadísticas el cual, ayuda a confirmar las variables críticas del método, esta herramienta nos proporciona información sobre los rangos óptimos para las variables, y genera una región robusta para los atributos críticos (Raman, Mallu y Bapatu 2015, p. 4).

#### *1.5.1.4. MODR (Región de diseño operable del método)*

El MODR, también llamado espacio de diseño, donde se acata con los prerequisites del método y consiste en una combinación de variables, proporcionando un método adecuado para su aplicación (Orlandini, Pinzauti y Furlanetto 2013, p. 4).

#### *1.5.1.5. Estrategia de control*

Una estrategia de control (CS), avala que el producto o método diseñado sea de calidad por consiguiente, se debe controlar las variables de entrada para que el método cumpla con los objetivos planteados y la idoneidad del sistema; se alcanza a fijar por medio, de los datos estadísticos realizados en las etapas del DoE o MODR (Raman, Mallu y Bapatu 2015, p. 5).

#### *1.5.1.6. Validación del método AqBD*

Se cimienta, en el DoE y MODR para efectuar el procedimiento de validación sin necesidad de realizar revalidación cuando existe algún cambio en el API, los puntos que constan en el proceso conforme, a la ICH son incertidumbre de medición, estrategia de control y mejora continua, así como información sobre interacciones que pueda existir entre los analítos o excipientes que aparezcan en la muestra. Al aplicar este enfoque se reducen los recursos económicos sin arriesgar la calidad del método (Raman, Mallu y Bapatu 2015, p. 6).

#### *1.5.1.7. Monitoreo continuo del método (CMM) y mejora continua*

La CMM, es el paso final del AqBD, se realiza en el período de comercialización y consiste en la reciprocidad de conocimientos logrados durante las etapas del desarrollo del método analítico como evaluación de riesgo, estudios estadísticos, ATP, CQA y estrategia de control (Raman, Mallu y Bapatu 2015, p. 6).

### **1.5.2. OFAT versus AQbD en el desarrollo de métodos analíticos**

El desarrollo de métodos analíticos desde el punto de vista tradicional utilizando OFAT (un factor a la vez), al presente están teniendo fallas más constantes visto que, solo un parámetro se modifica hasta obtener una respuesta óptima mientras que los otros parámetros son constantes lo que implica altos costos para la industria debido a que, genera un alto número de experimentos. Además, se necesita un protocolo de revalidación después del traspaso del método (Peraman, Bhadraya y Reddy 2015, p. 7).

Un enfoque más sistemático es el AQbD ya que, examina una comprensión científica por completo en sus etapas comenzando con la calidad de la manufactura, selección del método, aplicación de un DoE utilizando métodos estadísticos y por último una región operable. El empleo del AQbD se aconseja en el desarrollo de métodos analíticos para alcanzar agilidad regulatoria obtener un método más robusto y beneficioso (Peraman, Bhadraya y Reddy 2015, p. 8).

### **1.5.3. Ventajas del QbD**

- El producto desarrollado y ante todo, la estabilidad del paciente es la prioridad.
- Existe un entendimiento científico del método y del proceso desarrollado
- Identifica los parámetros críticos del proceso mediante una evaluación de riesgo sustentada en la ciencia.
- El método desarrollo asegura que sea robusto.
- La industria se beneficia de manera comercial.
- Acorta las brechas con la FDA agilizando la aprobación (Sangshetti et al. 2017, p. 3415).

## **1.6. Cromatografía**

La cromatografía es un método que se fundamenta en la disociación de una muestra que se distribuye en dos fases (una móvil y otra estacionaria). La condición de la fase estacionaria puede ser sólida o un líquido absorbido sobre un sólido o un gel y la naturaleza de la fase móvil puede ser líquida, gaseosa o un fluido supercrítico. Los mecanismos de separación de la muestra se pueden clasificar en adsorción, distribución de masa (partición) o intercambio iónico o también pueden basarse según las propiedades fisicoquímicas de las partículas (USP 2021).

### **1.6.1. Clasificación de la cromatografía**

Va a depender de la inclinación de las moléculas con la fase móvil y estacionaria, así tenemos:

- Cromatografía de adsorción: radica en el retenimiento de los solutos en la fase estacionaria, debido a las fuerzas de tipo Van der Waals (Corzo 2019, p. 18).
- Cromatografía de intercambio iónico: se emplea cuando existe moléculas que se ionizan; la fase estacionaria con carga electrostáticas, retiene contraiones móviles (Corzo 2019, p. 19).
- Cromatografía de exclusión: consiste en la detención de las moléculas en dependencia de su tamaño y geometría y la fase estacionaria está constituida por un material poroso (Corzo 2019, p. 19).
- Cromatografía de reparto: las moléculas se reparten entre la fase móvil y estacionaria en dependencia de sus solubilidades (Corzo 2019, p. 20).

Acorde con la polaridad de la fase estacionaria tenemos:

- Fase reversa: Consta de una fase estacionaria la cual, es apolar y esta formada por partículas de silicagel en cambio, la fase móvil es polar y migra por medio, de la fase estacionaria; los solventes que se aprovechan van de los más polares a los menos polares. Los analitos más polares eluyen más rápido y los menos polares quedan retenidos por más tiempo ya que, son más afines a la fase estacionaria (Yúfera 2012, p. 1228).

Se pueden modificar dos factores claves para lograr una buena optimización: el pH de la fase móvil para cambiar la disociación de los silanoles que se localizan en la sílica, y la combinación de la fase móvil para obtener tiempos de elución adecuados (Mayolo, Martínez y Rito 2012, p. 422).

- Par ion: Se emplea cuando los analitos son ionizables, los iones que se hallan en la mezcla se pueden separar gracias a la agregación de contraiones lipofílicos (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 11).
- Fase normal: Es lo contrario de la fase en reversa ya que , aquí se emplea una fase móvil apolar mientras que la fase estacionaria es polar; los solventes mayormente adoptados son hexano, cloruro de metileno, cloroformo, éter dietílico y la combinación de estos (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 11).

### ***1.6.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC de High Performance Liquid Chromatography)***

La HPLC, es un método cromatográfico que se destina para la determinación y la separación de las moléculas que se atinan en una mezcla, este método manifiesta tres componentes; una fase móvil, una fase estacionaria (inmiscibles entre sí) y la muestra que se va a analizar. Se fundamenta en que la fase móvil (líquida) transporta el analito por medio de la fase estacionaria (sólida) (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 8).

La separación y la retención de los analitos, va a depender de las cualidades físicas y químicas que presente la composición de solventes y su interacción con la fase móvil y estacionaria. De igual manera, los componentes que presenten más afinidad con la fase sólida tendrán tiempos de

retención más largos mientras que, los componentes que no presenten esta afinidad tendrán tiempos de elución más cortos (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 8).

### **1.6.3. Parámetros cromatográficos**

#### *1.6.3.1. Número de platos teóricos (N)*

Determina la eficacia de la columna en donde la muestra analizada alcanza una armonía entre la fase móvil y la fase estacionaria por ello, mientras más placas teóricas exista en la columna mejor será la separación de los picos (CHROMacademy 2014b, p. 13).

Se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$N = 16\left(\frac{tR}{W}\right)^2 \quad (3)$$

Donde:

tR: tiempo de retención

W: se logra extrapolando los lados del pico hasta el pie de su base (USP 2021).

#### *1.6.3.2. Resolución (RS)*

La resolución se define como la división entre dos bandas contiguas dividida entre el ancho promedio de las bandas (Universidad de Alicante 2006, p. 2.7).

#### *1.6.3.3. Tiempo de retención (tR)*

Este parámetro cromatográfico se fundamenta en el tiempo que acontece a partir, de la introducción de la muestra hasta la aparición de la respuesta máxima del analito (USP 2021).

#### *1.6.3.4. Factor de asimetría*

También conocido como factor de cola es una medida generada por el analito y se calcula de la siguiente manera  $AS = W_{0,05}/2f$ ; donde  $W_{0,05}$  es el 5% de la elevación de un pico y  $f$  es el espacio entre el pico máximo hasta su orilla inicial, midiendo la distancia en cualquier punto donde este el 5% de la altura de un pico (USP 2021).

Un pico ideal que presente simetría tendrá un factor de cola igual a 1.0 mientras que, valores superiores a la unidad exhibirán picos con cola (AEFI 2001, p. 110).

#### 1.6.3.5. Factor de capacidad ( $K'$ )

Mide la retención del analito en la fase estacionaria y es equivalente al tiempo de retención de una molécula retenida y una que no eluye (CHROMacademy 2014b, p. 5).

#### 1.6.4. Ecuación de Van Deemter

Propuesta en 1950, explica las interacciones, factores que conducen al ensanchamiento de la banda y está enlazada con el plato teórico y por ende, con la eficiencia de la columna (Barquero 2004, p. 1).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (4)$$

Donde;

A: Difusión turbulenta

B: difusión longitudinal

C: transferencia de la materia entre la fase móvil y la fase estacionaria

$u$ : flujo

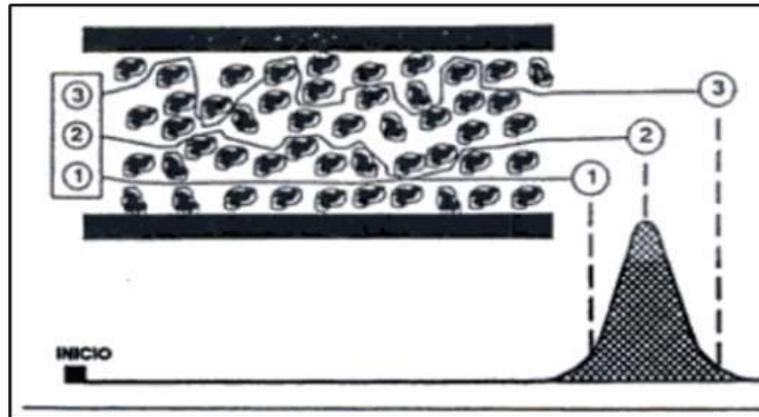
- Difusión turbulenta

Este término está asociado con el caudal de la fase móvil, el tamaño, la forma y la regularidad del átomo da como consecuencia que algunas moléculas tomen diferentes trayectos al pasar por la columna, algunas moléculas encontraran distancias más cortas mientras que otras viajaran largas distancias de manera aleatoria. El valor de A es autónomo es decir, no va a depender de la fase móvil (Ayora 2010, p. 6).

$$A = 2\lambda dp$$

Donde;  $\lambda$ , está sujeta a la particularidad de la columna (dimensiones, geometría, empaquetamiento) y  $dp$ , corresponde a las partículas que forma la columna específicamente su diámetro medio (Legaz et al. 2011, p. 9).

Por tanto, mientras menor sea el flujo el ensanche del pico es menor ya que, el analito recorrerá varios caminos, de igual forma el tamaño de la partícula al ser mayor aumenta la difusión de las moléculas a través de la columna (Barquero 2004, p. 2).



**Figura 22-1.** El término de A es el efecto de muchas trayectorias

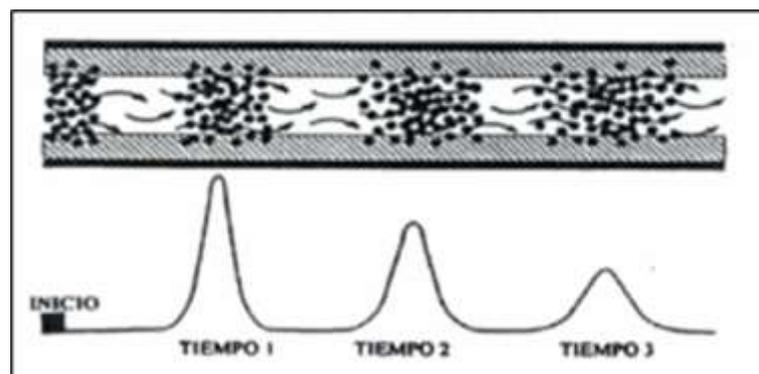
Fuente: (Barquero 2004, p. 2).

- Difusión longitudinal

Los analitos recorren por la columna desde la zona más concentrada hacia las regiones más diluidas en dirección paralela al flujo de la fase móvil, este término es inversamente proporcional a  $u$ , por tal razón, mientras menor es el flujo, la difusión longitudinal es mayor e incrementa el ensanchamiento del pico, por lo contrario; si el analito interacciona menos tiempo con la fase estacionaria la difusión longitudinal será menor (Barquero 2004, p. 4).

$$B = 2\gamma D_m$$

Donde;  $\gamma$  corresponde al factor de impedimento y está sujeta a los atributos de la fase estacionaria y  $D_m$  es el coeficiente de difusión del analito a través de la fase móvil, incrementa con la temperatura y el descenso de la viscosidad (Barquero 2004, p. 4).



**Figura 23-1.** El término B, Difusión molecular

Fuente: (Barquero 2004, p. 4).

- Transferencia de masas

El trascurso de las moléculas para alcanzar el equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria es muy lento, de manera que, una columna cromatográfica siempre trabaja lejana al equilibrio. Por lo tanto, tenemos la cesión de la masa en la fase estacionaria y la líquida: (Barquero 2004, p. 5).

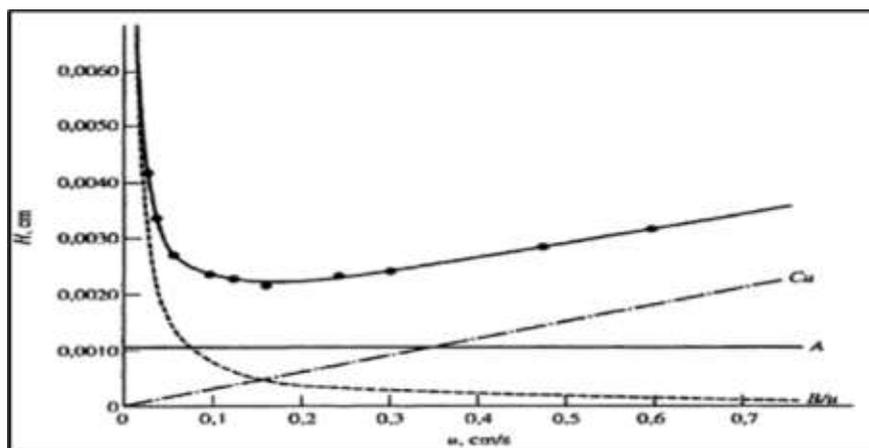
$C_s = \frac{df^2}{D_s}$ ;  $df$  corresponde a la densidad de la película y  $D_s$  es el factor de difusión del soluto mediante la columna (Legaz et al. 2011, p. 9).

Al tener una película gruesa el analito recorrerá mayor tiempo en la columna, mientras si el coeficiente de difusión es menor las moléculas irán más lentamente a la interfase donde se dará el traslado de masa en conclusión, si la velocidad de transferencia de masa disminuye aumenta  $H$  (Barquero 2004, p. 5).

$C_m = \frac{dp^2}{D_m}$ ;  $dp$  representa el calibre de la partícula y  $D_m$  el coeficiente de difusión del analito por la fase líquida (Legaz et al. 2011, p. 9).

Con un diámetro mayor de partícula los analitos deberán transitar un camino más extenso y al tener un  $D_m$  menor la traslación de masas será más lenta (Barquero 2004, p. 5).

La siguiente figura simboliza la ecuación de Van Deemter y como influyen los términos  $A, B$  y  $C$  en el ensanchamiento del pico como se puede observar que en las dos curvas coexiste un valor óptimo donde el valor de  $H$  es mínimo y la eficiencia de la columna aumenta (Legaz et al. 2011, p. 10).

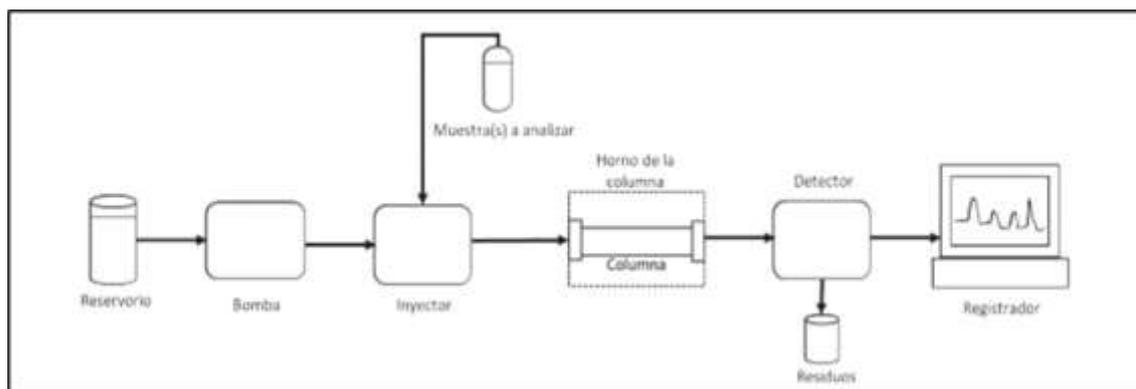


**Figura 24-1.** Comprobación experimental de la ecuación de Van Deemter

Fuente: (Barquero 2004, p. 10).

### 1.6.5. Equipo

El equipo de HPLC consta generalmente de cinco partes: reservorio, bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador las que se explican a continuación:



**Figura 25-1.** Partes del equipo HPLC

**Fuente:** (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 9).

- Reservorio

Los reservorios son recipientes que generalmente son de vidrio y se halla la fase móvil y otros solventes dependiendo del análisis, la fase móvil debe ser filtrada para evitar partículas no deseadas (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 9).

- La bomba

Su función es absorber desde los reservorios los solventes y hacer circular por todo el sistema con una velocidad constante, la presión de la bomba va a depender de factores (tipo de la columna, tiempo, fase móvil, etc.) pero, habitualmente no supera los 6000 psi (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 9).

- El inyector

Existen de dos tipos: automático y manual, este último inyecta la muestra de una forma más exacta y precisa (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 9).

- El horno

El horno de la columna es importante ya que, de este depende la retención y selectividad del analito por este motivo, el horno tiene la función de conservar la temperatura constante de la columna. Por otra parte, una columna cromatográfica está elaborada de ciertos materiales como por ejemplo, de acero inoxidable y posee una longitud que va desde los 50 a 300 mm consigna un relleno y capacidad de partícula de 3 a 10  $\mu\text{m}$  (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 9).

- El detector

Acepta la variabilidad en los efluentes de la fase estacionaria y los convierte en señales eléctricas que luego, son transmitidas hacia el registrador (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 9).

El detector UV-Visible es el más utilizado en el HPLC ya que, cumple con una cadena de normas por lo que, se considera como un "detector ideal", es: (CHROMacademy 2014a, p. 9).

- Sensible

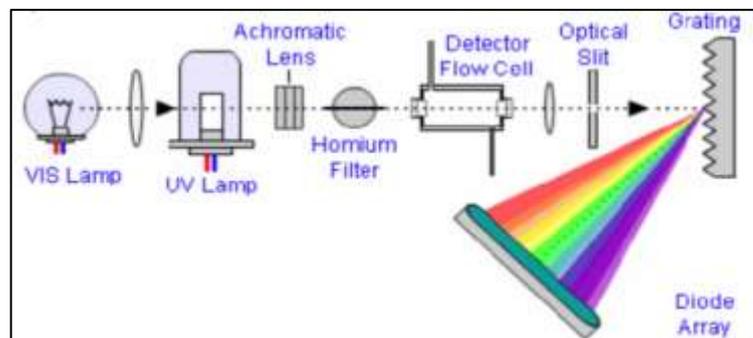
- Extenso rango lineal

- No se perturba por las variaciones de la temperatura

- Selectivo y conveniente cuando se realiza elución en gradiente (CHROMacademy 2014a, p. 9).
- Detectores UV - Detectores de matriz de diodos

El detector de red de diodos puede trabajar detectando a una sola longitud de onda o varias por lo cual, es capaz de analizar la pureza del pico ya que, adquiere y guarda los espectros. Comienza con la adquisición de la radiación por medio, de la celda de flujo las lámparas de tungsteno y deuterio emiten radiación de 190 a 850 nm, la radiación es emitida en longitudes de onda de luz particulares y cada fotodiodo capta una banda y crea un espectro completo (CHROMacademy 2014a, p. 18).

Los diodos miden diferentes rangos de amplitudes de onda, una matriz consta de 1000 diodos o más, los cromatogramas obtenidos se pueden observar separando los datos obtenidos de cualquiera de las longitudes de onda recopiladas. Además, se puede mostrar un espectro desde cualquier punto dentro del cromatograma (CHROMacademy 2014a, p. 18).



**Figura 26-1.** Detector de red de diodos

Fuente: (CHROMacademy 2014a, p. 18).

Ventajas de una matriz de diodos:

- Obtiene y guarda los espectros para su posterior reconocimiento en bibliotecas.
- Ayuda a extraer picos complicados ya que, permite la detección en longitudes de ondas específicas.
- Faculta determinar si el pico obtenido es puro o no debido a que, al detectar dos longitudes de ondas se puede calcular la conexión de absorbancia y si está no es constante significa que el pico registrado no es puro (CHROMacademy 2014a, p. 19).
- El registrador

Recoge y procesa todas las señales recibidas y las expresa en un cromatograma para que el analista proceda a su análisis (Suarez Ospina y Morales Hernández 2018, p. 9).

### **1.6.6. Modos de elución en HPLC**

- Isocrático: esta modalidad se caracteriza porque la fase móvil ya sea una mezcla de solventes o un solvente puro, permanece constante durante todo el análisis (Alfonso-Méndez 2008, p. 51).
- Gradiente: El porcentaje de la fase móvil se modifica durante el transcurso de la separación de forma continua o escalonada. Se emplea cuando la polaridad de los componentes empleados es amplia, incrementando la eficacia, es decir, a medida que se da la dispersión la potencia de la fase móvil crece por ende, los compuestos que son retenidos en la columna serán eluidos (Alfonso-Méndez 2008, p. 51).

### **1.7. Diseño de superficie de respuesta**

El diseño de superficie de respuesta es un método que consta de técnicas avanzadas que ayudan a optimizar y comprender la respuesta después de haber establecido los factores que afectan el diseño empleando diseños de cribado o factoriales (Soporte de Minitab 2019).

Este prototipo de diseño permite representar de mejor manera la curvatura en la respuesta lo cual, resulta útil porque, permite:

- Comprender una región de superficie de respuesta y como las variables afectan la respuesta al variar.
- Encontrar los niveles de los factores que nos permiten optimizar una respuesta.
- Elegir cuales son las condiciones óptimas donde el método cumpla con las especificaciones planteadas (Soporte de Minitab 2019).

#### **1.7.1. Diseño de Draper- Lin**

Es un tipo de diseño que toma como base un diseño factorial fraccionado o un Plackett-Burman, este último se utiliza cuando el número de variables estudiadas están por encima de tres y únicamente evalúa sus efectos principales, sin embargo, el diseño de Draper- Lin se complementa con la incorporación de puntos axiales y centrales, el valor de  $\alpha$  es el mismo de los diseños centrales compuestos. El Draper- Lin se utilizará cuando el número de factores es muy grande ya que, se obtendrá un modelo de Segundo orden completo que permitirá calcular los intervalos cuadráticos (términos de interacción) y así, obtener mayor información sobre el método (StatPoint 2006, p. 12).

### ***1.7.2. Diseños ortogonales***

Un diseño es ortogonal cuando la interacción de un factor no depende del resultado de cualquier otro factor es decir, los efectos de todos los factores se deben equilibrar (sumar cero) para garantizar la ortogonalidad del diseño (Minitab 2019).

### **1.8. Selectividad**

La selectividad es uno de los factores de la validación y debe ser efectuado al inicio del método para distinguir al analito de los demás elementos de la muestra, por tal motivo, se define a la selectividad como la facultad del método para poder evaluar de manera indudable el analito en existencia de los demás componentes como excipientes, impurezas o productos de degradación. Se debe mostrar, que el método desarrollado es apto para detectar de forma exacta el analito para ello, se debe comparar los resultados de las muestras con los resultados de las muestras que contienen una combinación de sustancias. Cuando existe más de un analito en una muestra deben ser valorados por separado para asegurar que no haya interferencia en la muestra (Gonzales, Cabrera y Bermejo 2015, p, 21).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo se describe el proceso de desarrollo del método analítico para la determinación simultánea de metronidazol y miconazol nitrato aplicando la herramienta del Quality by design (QbD), con enfoque en el método analítico Analytical Quality by design (AQbD). Para empezar, se definió el perfil analítico del objetivo, luego se identificó los atributos críticos de calidad. Posteriormente, se determinó los parámetros críticos del proceso que tienen un efecto en los atributos críticos de calidad. Para ello, se utilizó una matriz de Análisis de Modo y Efecto de Fallos (FMEA). Finalmente, se desarrolló el DoE mediante la utilización de herramientas estadísticas para determinar las condiciones ideales de operación en HPLC generando un método óptimo.

#### 2.1. Equipos, materiales y reactivos

##### 2.1.1. Materiales

**Tabla 1-2:** Materiales utilizados

<b>Materiales</b>	<b>Volumen</b>	<b>CLASE</b>	<b>Proveedor</b>
Balón de aforo	50mL, 25mL, 10mL	A	Glassco
Probeta	1000mL, 100mL, 500mL	A	Glassco
Pesa muestra de vidrio	N/A	A	Glassco
Pipeta graduada	5mL	A	Glassco
Espátula	N/A	N/A	N/A

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

##### 2.1.2. Equipos

**Tabla 2-2:** Equipos utilizados en el desarrollo del método analítico

<b>Equipo/Instrumento</b>	<b>Marca / Lugar de origen</b>	<b>Modelo</b>	<b>Equipo Calificado</b>	<b>Fecha de la última calibración</b>
Balanza analítica	Sartorius/ Alemania	BP2105	Cumple	Enero 2021
Pipeta electrónica	Brand/ Italia	HandyStep	Cumple	Mayo 2021
Agitador ultrasónico	VWR Scientific Products /China	75T	N/A	N/A

Sorbona		WEMA Laboreinrichtungen/ Alemania	-----	Cumple	N/A
Conductímetro		Mettler Toledo/Suiza	Conductivit y S230	Cumple	Enero 2021
pH- metro		Mettler Toledo/Suiza	SevenEasy pH	Cumple	Enero 2021
Agitador electromagnético AREX		VELP/ Italia	F20510413	Cumple	N/A
HPLC (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia)	Unidad Bomba	ECOM/ República Checa	EC P2010H	Cumple	Junio 2021
	Autosampler (Automuestreador)		L-3320	Cumple	Junio 2021
	Horno- Columana		ECO208	Cumple	Junio 2021
	Detector UV/VIS PDA		Detector UV/VIS PDA	Cumple	Junio 2021

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

### 2.1.3. Reactivos

**Tabla 3-2:** Reactivos utilizados en el desarrollo del método analítico

	MARCA	LOTE	F. EXPIRACIÓN	LUGAR DE ORIGEN
Acetonitrilo Grado HPLC	Fisher Chemical	203062	30-May-2025	Estados Unidos
Metanol Grado HPLC	Fisher Chemical	206202	31-Dic-2025	Estados Unidos
Ácido Orto fosfórico 85%	Merck	203062	31-Oct-2021	Alemania
Trietilamina Grado HPLC	Merck	55901552915	31-Dic-2023	Alemania
Agua Purificada T I Grado HPLC	NEOFÁRMACO	N/A	N/A	.....

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

#### 2.1.4. Estándares de referencia

**Tabla 4-2:** Estándares primarios utilizados en el método analítico

	<b>LOTE</b>	<b>PUREZA</b>	<b>PROVEEDOR</b>	<b>F. EXPIRACIÓN</b>
Metronidazol	LRACO264	99.97%	Espectrocrom	31-Dic-2023
Miconazol Nitrato	LRAC3325	99.9%	Espectrocrom	30-Sep-2023
Propilparabeno	LRAB2246	98.8%	Espectrocrom	31-Dic-2021
Metilparabeno	LRAB7793	99,93%	Espectrocrom	31-Dic-2022

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

## 2.2. Planteamiento de las etapas de la Calidad analítica por diseño (AQbD)

### 2.2.1. Definición del Analytical Target Profile (ATP)

En el Perfil Analítico del Objetivo, se definió los objetivos de desarrollo relacionados con los exigencias del método analítico, en general los elementos del ATP que se llevaron a cabo fueron los siguientes: forma farmacéutica, atributos de calidad del producto, de los principios activos y del método así como la selección de analitos, selección de la técnica y selección de los requisitos del método cada uno con sus respectivos objetivos y justificación los cuales, se detallan de mejor manera en la tabla (1-3) en donde, se enumera los procedimientos del ATP que se llevaron a cabo para el análisis cromatográfico del MTZ y MN.

### 2.2.2. Definición de los atributos de calidad y atributos críticos de calidad (CQA)

Los atributos de calidad se asociaron a los elementos del ATP, se realizó mediante una matriz donde se definieron los atributos de calidad de los principios activos (pka, log, pH, etc.), del método (parámetros cromatográficos) y del producto (requerimientos técnicos), los cuales se les asignó un objetivo y se determinó si sería un CQA mediante una justificación. Para este método el número de platos teóricos (N), la asimetría (T), resolución (Rs) y tiempo de retención final (TR final) se identificaron como CQA que tienen el potencial de verse afectados en el desarrollo del método analítico.

### 2.2.3. Evaluación de riesgo inicial

La identidad de los parámetros críticos del proceso que afectan el método analítico y que poseen un impacto sobre los CQA se realizó mediante una matriz de modos y efectos de falla (FMEA), donde se estimó la severidad (S) del modo de fallo, la probabilidad (O) de que acontezca y si esta

probabilidad es fácilmente detectable (D), finalmente se estableció las mitigaciones para controlar a tiempo aquello que puede salir mal.

El grado de puntuación utilizada para la S, O, D fue de 2 a 8 siendo estas muy altas, altas, moderadas y bajas, luego a cada parámetro encontrado se calculó el número de prioridad de riesgo (RPN) para eso, se multiplicó las tres puntuaciones, es decir  $RPN = S * O * D$ .

Para determinar la categorización del Riesgo Tabla (9-2) se escogió un número de RPN de manera arbitraria mayor a 250 para calificarlo como un riesgo crítico que son los que afecta el método de manera significativa y que serán evaluados posteriormente,  $RPN > 70 < 250$  se consideró como un riesgo mayor que de igual forma afectan al método significativamente y  $RPN < 70$ , se calificó como un riesgo menor, ya que estos parámetros pueden ser fácilmente controlados y no afectan al método, sin embargo, no se deben descuidar.

A continuación, se observa los parámetros evaluados en la matriz de riesgo con su respectiva puntuación:

**Tabla 5-2:** Parámetros evaluados en la matriz de modos y efectos de falla (FMEA)

<b>OCURRENCIA</b>	<b>O</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Extremadamente Baja	2	Altamente improbable de que ocurra
Baja	4	Improbable de que ocurra
Moderada	6	Probable de que ocurra
Alta	8	Altamente probable de que ocurra
<b>DETECTABILIDAD</b>	<b>D</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Alta	2	Alta probabilidad de controlar los defectos
Moderado	4	El defecto se puede controlar y posiblemente no afecte al método.
Bajo	6	El defecto resulta difícil de controlar.
Inexistente	8	El defecto no se puede controlar casi seguro que afecte al método.
<b>SEVERIDAD</b>	<b>S</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
Baja	2	El fallo origina un pequeño inconveniente en el método, es fácilmente subsanable.
Moderada	4	Posible impacto, impacto moderado en el rendimiento del método
Alta	6	Impactó alto en el rendimiento del método.
Muy Alta	8	Impactó muy crítico afecta gravemente el método.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

**Tabla 6-2:** Categorización del Riesgo

	CRÍTICA	Si el valor de RPN > 250
	MAYOR	Si el valor de RPN > 70 < 250
	MENOR	Si el valor de RPN < 70

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

#### 2.2.4. Desarrollo del método analítico

##### 2.2.4.1. Desarrollo empírico inicial

Al no existir métodos analíticos oficiales para la determinación simultánea de MTZ (metronidazol) Y MN (miconazol nitrato), el punto de partida inicial para el desarrollo del método se basó en las propiedades físicas y químicas de las moléculas (atributos de calidad), que se describieron de mejor manera en el marco teórico.

##### 2.2.4.2. Desarrollo del DoE (Diseño del experimento)

Para el desarrollo del diseño se utilizó el software Statgraphics, el diseño elegido fue un diseño Compuesto reducido de Draper-y-Lin, los factores considerados fueron flujo, temperatura, pH de la fase móvil, % de orgánico y tipo de fase estacionara que tendrán un efecto sobre el Número de platos teóricos, Asimetría (T), Resolución (Rs) y Tiempo de retención (TR final), además el diseño fue de un solo bloque y aleatorio.

Los factores experimentales y la variable respuesta analizadas se describen a continuación:

**Tabla 7-2:** Factores experimentales

Factor	Unidades	Tipo	Función	Niveles		Respuestas
				Bajo	Alto	
Flujo	mL/min	Continuo	Controlable	0,7	1,3	Número de platos teóricos Simetría Resolución Tiempo de retención final
Temperatura	Celsius	Continuo	Controlable	35 °C	45 °C	
pH de la fase móvil	-	Continuo	Controlable	2,3	3,3	
% de B	%	Continuo	Controlable	15%	35%	
Fase estacionaria	-	Continuo	Controlable	C8	C18	

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

**Tabla 8-2:** Variable respuesta

Respuestas	Unidades
Número de platos teóricos	-
Simetría	-
Resolución	-
Tiempo de retención final	min

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

Luego, se introdujo en el programa los cinco factores y las variables respuestas y se aplicó el diseño que consta de cinco factores (pH de la fase móvil, Temperatura, Flujo, %Orgánico, Fase estacionaria) y cada factor estudiado tiene dos niveles uno alto y otro bajo, dando como resultado un total de 30 ensayos las cuales fueron aleatorizados.

**Tabla 9-2:** Corridas del diseño experimental

Corridas	Bloque	Flujo	Temperatura	pH	% de la fase móvil	Fase estacionaria
1	1	0,7	35	2,3	35	8
2	1	1,3	35	3,3	35	8
3	1	1	40	2,8	25	8
4	1	1,3	35	2,3	15	18
5	1	1,55836	40	2,8	25	18
6	1	1	49,306	2,8	25	8
7	1	1	40	3,7306	25	18
8	1	1,3	45	3,3	15	8
9	1	1	40	2,8	25	8
10	1	1	40	2,8	25	18
11	1	1	40	2,8	6,3879	8
12	1	1	40	2,8	25	18
13	1	0,7	45	2,3	35	18
14	1	1,3	45	2,3	35	18
15	1	1	40	2,8	25	8
16	1	1	40	2,8	25	18
17	1	1	30,694	2,8	25	8
18	1	0,7	35	2,3	15	8
19	1	1	40	2,8	25	8
20	1	1	40	1,8694	25	18
21	1	0,7	45	3,3	35	8
22	1	1,3	45	2,3	15	8
23	1	1	40	2,8	43,6121	8
24	1	0,7	35	3,3	15	18
25	1	1	40	2,8	25	18
26	1	1,3	35	3,3	35	18

27	1	1	40	2,8	25	8
28	1	0,7	45	3,3	15	18
29	1	0,441637	40	2,8	25	18
30	1	1	40	2,8	25	18

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

### 2.2.5. MODR (Región de diseño operable del método)

La selección del MODR, se realizó mediante las gráficas que nos proporcionó el software Statgraphics, los diagramas que se analizaron fueron los gráficos de Pareto, efectos principales y el gráfico de superficie respuesta, que representan el impacto de los factores sobre cada una de las variables respuesta.

### 2.2.6. Selección de puntos de trabajo

La selección del método óptimo se realizó dentro del espacio de diseño en vista de que, la única condición es que el punto que se elija este dentro del MODR, se observaron todos los gráficos en especial el de superficie respuesta y se seleccionó el punto en que los CQA cumplan con los objetivos del método.

Luego, se procedió a inyectar un estándar combinado de metronidazol y miconazol nitrato con los parámetros elegidos en el gráfico de superficie respuesta.

### 2.2.7. Estrategia de control

La estrategia de control del método analítico se basó en los estudios de los parámetros críticos del proceso (PCC), los cuales se consideraron como riesgos críticos para el cumplimiento de los CQA, mediante la matriz de riesgo inicial. Con la ayuda de la tabla ANOVA y el gráfico de superficie respuesta se determinó los factores que afectan de manera significativa el desarrollo del método por ende, se deben mantener fijos.

## 2.3. Preparación de soluciones

- Agua Purificada (Grado HPLC)

Este tipo de agua se obtuvo del equipo de agua purificada para análisis, posteriormente se midió la conductividad la cual debe ser menor a 0.5  $\mu\text{S/m}$ . Luego, se procedió a medir el pH el cual debe ser menor a 7. Finalmente se filtró con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se sonicó por 15 minutos, y se colocó en la línea del equipo.

- Buffer Fosfato

Se preparó un Buffer Fosfato a diferente pH, en un litro de agua se colocó 2,8 mL de Trietilamina, se midió el pH y se ajustó con ácido orto fosfórico, finalmente se agitó por 10 minutos y se filtró con una membrana de 0.22  $\mu$ m.

- Fase móvil

Se tomó 300 mL de Buffer + 100 mL de Metanol (75% Buffer: 25% Metanol), y se agitó.

## 2.4. Preparación de los estándares

**Tabla 10-2:** Concentración de estándares

<i>Estándares</i>	<i>Concentración (mg/mL)</i>
Metronidazol	0,15
Miconazol Nitrato	0,04

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

- Metronidazol

Se pesó en una balanza analítica 150 mg  $\pm$  0,1 mg de metronidazol, luego se colocó en un balón volumétrico de 50 mL, se añadió 10mL de acetonitrilo, se homogenizó bien y se aforó con la fase móvil. Luego, se tomó una alícuota de 1.25 mL y se colocó en un balón volumétrico de 25 mL se aforó con fase móvil. Finalmente colocamos en un vial con un filtro jeringa de 0.22  $\mu$ m de PVDF.

- Miconazol Nitrato

Se pesó en una balanza analítica 100 mg  $\pm$  0,1 mg y se colocó en un balón volumétrico de 50 mL, se añadió 10mL de acetonitrilo y se sonico por 20 minutos, posteriormente se aforo con fase móvil. Luego, se tomó una alícuota de 0,5 mL en un balón volumétrico de 25 mL y se aforo con fase móvil. Se colocó en un vial con filtro jeringa de 0.22  $\mu$ m de PVDF.

- Estándar Combinado

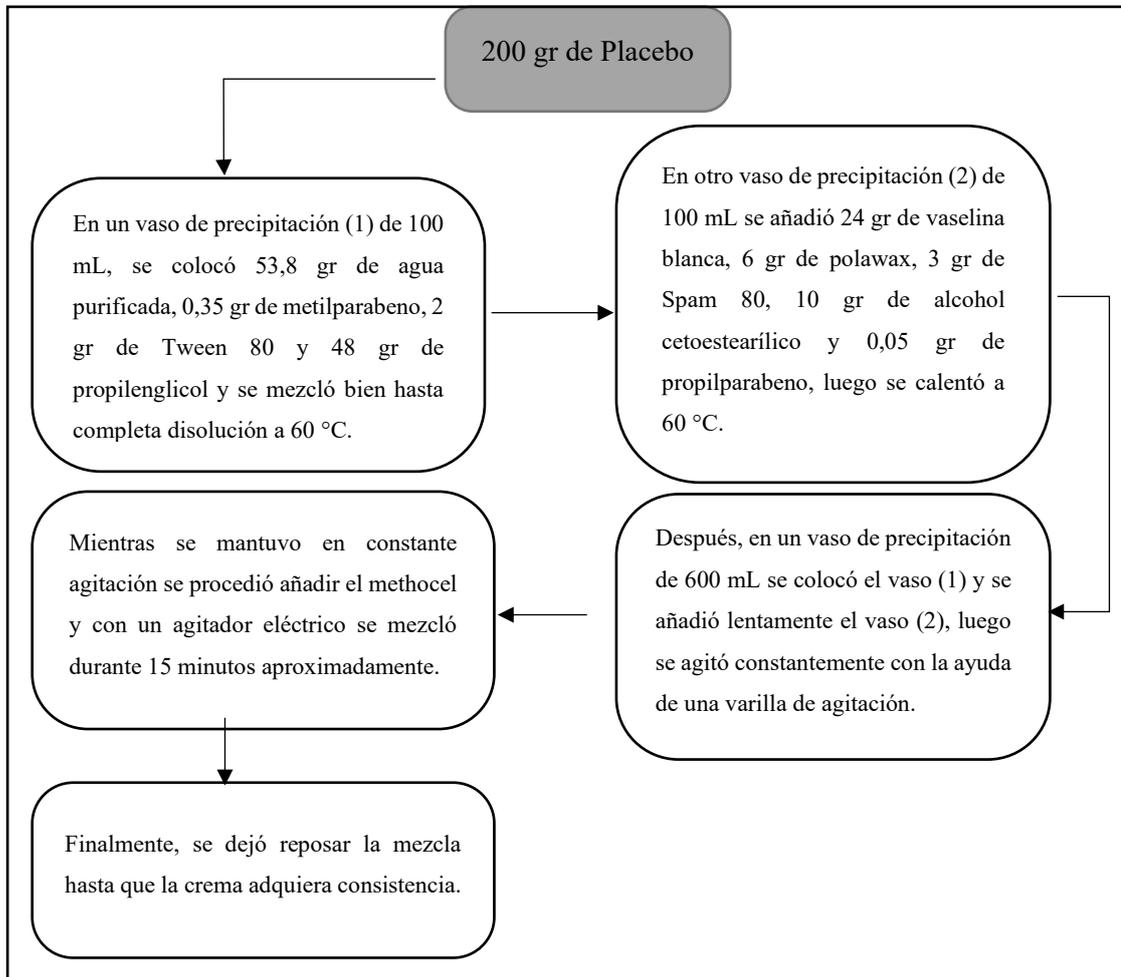
En un balón volumétrico de 25 mL, se colocó una alícuota de 1.25 mL del estándar de metronidazol, luego se agregó una alícuota de 0,5 mL, del estándar de miconazol nitrato y se aforo con fase móvil. Finalmente, se colocó en un vial con filtro jeringa de 0.22  $\mu$ m de PVDF.

## 2.5. Ensayo de selectividad

El ensayo de selectividad fue evaluado aplicando el criterio de discrepancia entre la respuesta del estándar y placebo cargado, posteriormente se realizó el t de Student para muestras independientes y para ello, se procedió a preparar las siguientes soluciones:

- Placebo

Se pesó cada una de las cantidades necesarias para la formulación que se declaran en la fórmula maestra GYNECOTIN® CREMA VAGINAL, exceptuando los principios activos, se preparó 200 gr de placebo.

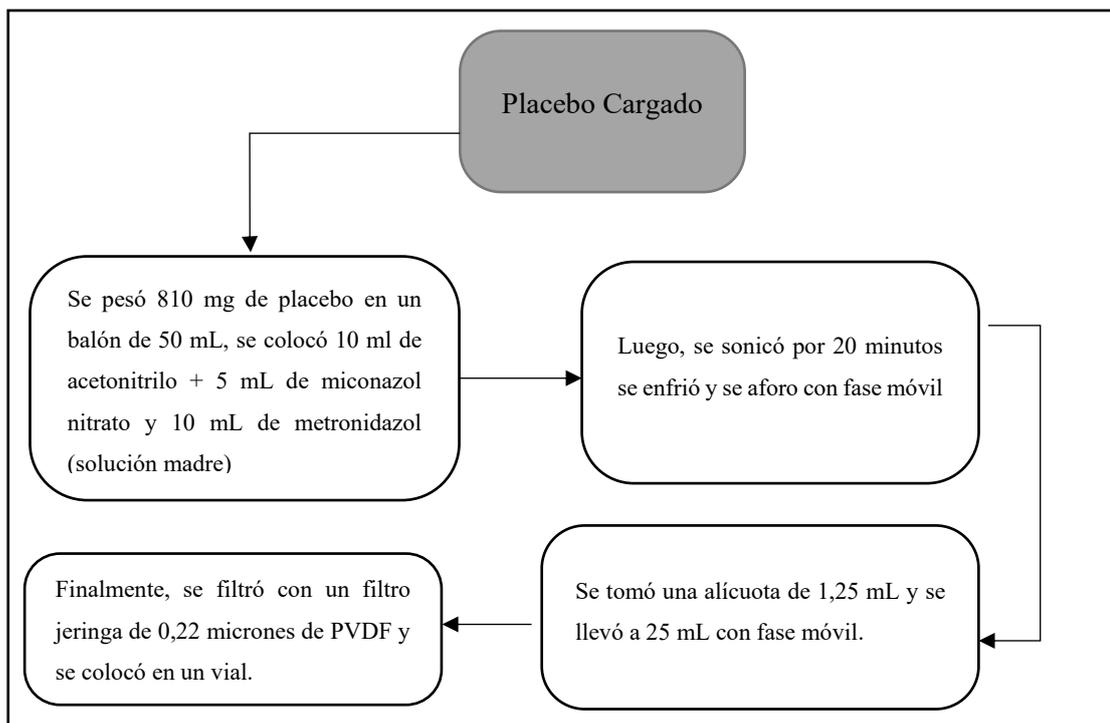


**Gráfico 1-2.** Preparación del placebo

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

- **Placebo cargado**

El placebo cargado se preparó mediante las soluciones madres de los estándares de referencia y el placebo.



**Gráfico 2-1.** Preparación del placebo cargado

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

- Excipientes

Se pesó en una balanza analítica cada uno de los excipientes que forman la emulsión, se colocó en un balón de aforo de 50 mL y se aforo con fase móvil, luego se tomó una alícuota de 1,25 mL en un balón de aforo de 25 mL y se aforo con fase móvil. Finalmente, se inyectó en un vial con filtro jeringa de 0.22 um de PVDF.

**Tabla 11-2:** Peso y concentraciones de los excipientes para el ensayo de selectividad

Excipientes	Peso	C (mg/mL)
Metochel	4 mg	0,004
Propilparabeno	0,25 mg	0,00025
Metilparabeno	1,75 mg	0,00175
Span 80	15 mg	0,015
Tween 80	10 mg	0,010
Polawax	30 mg	0,030
Propilenglicol	240 mg	0,240
Alcohol cetosteárico	50 mg	0,050

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

A continuación, se detalla en la siguiente tabla los pesos y las concentraciones de las soluciones preparadas para el ensayo de la selectividad

**Tabla 12-2:** Pesos y concentraciones para el ensayo de selectividad

Ensayo	Pesos	C (mg/mL)	Nº de inyecciones
Estándar	Metronidazol + Miconazol Nitrato + Medio de disolución	Metronidazol 0.15 Miconazol 0.04	Inyectar por sextuplicado
Placebo cargado	Metronidazol + Miconazol Nitrato + Medio de disolución+ Placebo	Metronidazol 0.15 Miconazol 0.04	Inyectar por sextuplicado
Placebo	Excipientes + Medio de disolución	-----	Inyectar por sextuplicado

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

### 2.5.1. Estudio de los parabenos

En el ensayo de selectividad también se llevó a cabo el estudio de los parabenos donde se inyectó estándares de metilparabeno y propilparabeno durante 180 minutos en forma isocrática para determinar los tiempos de elución.

**Tabla 13-2:** Concentración de los estándares (Parabenos)

Estándares	Concentración (mg/mL)
Metilparabeno	1,75 mg/mL
Propilparabeno	0,25 mg/mL

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

- Metilparabeno

En una balanza analítica se pesó 100 mg  $\pm$  0,1 mg de metilparabeno y se colocó en un balón volumétrico de 25mL, se aforo con agua purificada tipo I. Luego, se tomó una alícuota de 7,29 mL en un balón volumétrico de 10 mL y se aforo con fase móvil después, se tomó una alícuota de 6 mL en un balón volumétrico de 10 mL y se aforo con fase móvil

- Propilparabeno

En una balanza analítica se pesó 100 mg  $\pm$  0,1 mg de propilparabeno y se colocó en un balón volumétrico de 100mL, se aforo metanol. Luego, se tomó una alícuota de 6,25 mL en un balón volumétrico de 25 mL y se aforo con fase móvil. Finalmente, se colocó en un vial con filtro jeringa de 0.22  $\mu$ m de PVDF.

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1. Planteamiento de las etapas de la calidad analítica por diseño (AQbD)

##### 3.1.1. Analytical Target Profile (ATP)

El Perfil Analítico del Objetivo involucra todas las características de calidad del método objetivo que se mencionan a continuación:

**Tabla 1-3:** ATP para el desarrollo del método analítico

<i>Elementos del ATP</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Justificación</i>
Metronidazol Miconazol Nitrato	Principios activos	Desarrollo de método analítico para la determinación de los analitos en la forma farmacéutica.
Forma Farmacéutica	Emulsión	Principios activos cumplen con la eficacia durante la administración asociados a la forma farmacéutica.
Atributos de calidad del Producto	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pH</li> <li>- Extensibilidad</li> <li>- Termorresistencia</li> <li>- Observación microscópica</li> <li>- Estabilidad</li> <li>- Control de sellado</li> <li>- Variación de peso</li> <li>- Valoración</li> <li>- Análisis microbiológico</li> </ul>	Cumplir con todos los requerimientos de calidad, para el cumplimiento de las especificaciones.
Atributos de calidad de los principios activos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pKa</li> <li>- Solubilidad</li> <li>- Peso molecular</li> <li>- Punto de fusión</li> <li>- Donantes de enlaces de hidrógeno</li> <li>- Aceptores de enlaces de hidrógeno</li> <li>- LogP</li> <li>- Longitud de onda</li> </ul>	Conocer las propiedades físicas y químicas de los analitos para garantizar una técnica apropiada donde los analitos de interés sean, fácilmente detectados.

Tipo de método	Fase reversa	La selección de la técnica va a depender de la naturaleza de los principios activos, al ser el MTZ y el MN hidrofóbicos, la fase reversa proporcionara una mejor retención de las moléculas.
Atributos de calidad del método (Parámetros cromatográficos)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Asimetría</li> <li>- Resolución</li> <li>- Tiempo de retención</li> <li>- Número de platos teóricos</li> </ul>	Los parámetros cromatográficos deben estar dentro del límite para garantizar el desarrollo de un método óptimo.
Requisitos del instrumento	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Detector HPLC –UV/VIS PDA</li> <li>- Horno de columna</li> <li>- Bomba cuaternaria con automuestreador automático.</li> </ul>	El sistema de HPLC acoplado a un detector de diodos permite medir ocho longitudes de onda en un rango de 200 a 800 nm.
Requisitos del método	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pH de la fase móvil</li> <li>- Temperatura</li> <li>- % de la fase orgánica</li> <li>-Tipo de columna</li> <li>- Flujo</li> <li>- Modos de elución</li> </ul>	Determinar puntos de trabajos donde los factores cumplan con los CQA planteados.
Naturaleza de la muestra	Líquida	Se debe preparar con fase móvil acuosa para su adecuada migración por la fase estacionaria.
Preparación del estándar	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dilución</li> <li>- Pesaje</li> <li>- Mezcla con solventes</li> </ul>	La preparación de los estándares se realiza pesando los analitos, luego se realiza las diluciones finalmente, se afora con la mezcla de solventes.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

Según, la tabla anterior en el presente estudio se pretende desarrollar un método analítico óptimo mediante HPLC que sea capaz de detectar de manera simultánea el metronidazol y miconazol nitrato en una emulsión, la elección de la técnica dependió de la naturaleza de los principios activos al ser el MTZ y el MN bases débiles tienen la capacidad de aceptar H<sup>+</sup> por lo que la fase en reversa proporcionó una mejor retención de las moléculas, la elección de los requisitos del método dentro del espacio de diseño facilitara, que se cumplan con los CQA planteados.

### 3.1.2. Definición de los atributos críticos de calidad (CQA)

**Tabla 2-3:** Atributos críticos de calidad para el desarrollo del método analítico

<i>Atributos de calidad</i>	<i>Objetivo</i>	<i>¿Es esto un CQA?</i>	<i>Justificación</i>
Forma Farmacéutica	Emulsión	No	La forma farmacéutica no está directamente relacionada con la eficacia de los principios activos, pero representa una afectación en el tratamiento de la muestra y el sentido de la emulsión.
pH	Cumplir con los requerimientos técnicos acorde al preparado farmacéutico del producto.	No	Estos ensayos son pruebas de rutina cotidianas que se efectúan al producto para este tipo de forma farmacéutica, pero no afectan directamente el desarrollo del método analítico, sin embargo, que se encuentren dentro del límite de las especificaciones asegura la eficacia del producto.
Extensibilidad		No	
Termorresistencia		No	
Observación microscópica		No	
Estabilidad		No	
Control de sellado		No	
Variación de peso		No	
Valoración		No	
Análisis microbiológico		No	
pKa	Conocer las propiedades físicas y químicas de los analitos	No*	Son atributos de calidad, pero no críticos porque no dependen de ningún factor para su desempeño ya que, son valores constantes, sin embargo, deben ser estudiadas para conocer el comportamiento de las moléculas para determinar las condiciones del proceso.
Solubilidad		No*	
Peso molecular		No*	
Punto de fusión		No*	
Donantes de enlaces de hidrógeno		No*	
Aceptores de enlaces de hidrógeno		No*	
LogP		No*	

Longitud de onda		No*	
Asimetría	Bajo	Si	La asimetría debe ser baja para que el pico sea simétrico y no haya factor de coleo.
Resolución	Elevado	Si	Se considera uno de los parámetros más críticos ya que, si los analitos no se encuentran separados no existirá una alta eficiencia del método.
Tiempo de retención final	Bajo	Si	El tiempo de retención debe ser bajo para alcanzar una buena resolución.
Número de platos teóricos	Elevado	Si	El número de platos teóricos mide la eficiencia del método mientras más elevado sea el número de platos teóricos mayor será la eficiencia del método.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

\* Resulta poco probable que estas variables afecten de manera directa al método analítico ya que, son valores constantes, sin embargo, se evaluarán dentro de la matriz de riesgos ya que, forman parte de los elementos del ATP.

En la tabla 2-3 se puede observar cómo se clasificó los atributos de calidad en atributos críticos de calidad, mediante un objetivo y la justificación correspondiente se determinó que la asimetría, resolución, tiempo de retención final y número de platos teóricos son CQA los cuales tendrán un impacto sobre el método ya que, son variables claves que deben estar dentro de un rango para asegurar un método óptimo.

Por ejemplo, si no existe un número de platos teóricos elevado la eficiencia del método no será la adecuada de igual manera al tener una resolución baja los analitos no tendrán una buena separación.

Por otro lado, la forma farmacéutica al tratarse de una emulsión de o/w es decir, tiene mayor cantidad de agua, el tratamiento de la muestra se debe realizar con fase móvil acuosa para impedir la formación de coaservatos.

Según (Martín, 2017, p. 11 ) la coacervación o separación de fases consiste en la separación de dos fases líquidas de manera reversible que sucede en un medio coloidal.

### 3.1.3. Evaluación de riesgo inicial

A continuación se presenta la evaluación del riesgo inicial de modos y los efectos de falla de los parámetros críticos:

**Tabla 3-3:** Matriz de riesgo de modos y efectos de falla de los parámetros críticos del proceso

<i>Modos de fallo ¿Qué puede salir mal?</i>	<i>Efectos del fallo CQA</i>	<i>Consecuencia</i>	<i>S</i>	<i>O</i>	<i>D</i>	<i>RPN (S*O*D)</i>	<i>Tipo de Riesgo</i>	<i>Mitigaciones</i>
Variación de la columna de C18- C8	Tiempo de retención  Resolución  Asimetría  Número de platos teóricos	Afecta a la resolución debido a que, existe una inadecuada separación de los compuestos coelución.	6	6	4	144	Mayor	Utilizar una columna altamente hidrófoba y realizar una revisión bibliográfica sobre las propiedades físico- química de los tipos de columna y la naturaleza de los analitos.
Variabilidad en la longitud de la columna de 125 mm – 150 mm	Tiempo de retención  Resolución  Asimetría  Número de platos teóricos	En la asimetría ya que, existe un ensanchamiento de los picos, además de tener una inadecuada separación.	2	4	4	32	Menor	Usar una columna de mayor longitud para obtener picos más estrechos.
Aumento en el diámetro de la partícula	Tiempo de retención  Resolución  Asimetría  Número de platos teóricos	Un aumento en el diámetro de la partícula afectaría a la resolución, por ende, existiría ensanchamiento de los picos cromatográficos y una disminución de los platos teóricos.	4	4	4	64	Menor	A menor diámetro de partículas disminuye el ensanchamiento del pico y la altura del plato teórico.

Aumento del % de orgánico de la fase móvil	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Tiene un efecto sobre el tiempo de retención debido al cambio de polaridad. Además, de causar una resolución inadecuada obteniendo cromatogramas que no son óptimos	8	8	6	384	Crítica	Modificar el porcentaje de orgánico hasta obtener valores aceptables de resolución y asimetría.
Aumento del flujo	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Un aumento del caudal causa un tiempo de retención más corto por ende la forma del pico no es la adecuada.	6	6	4	144	Mayor	Proporcionar un flujo constante y cambiar las condiciones para obtener una buena resolución y un tiempo de análisis adecuado.
Variación de los valores de la temperatura	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Un aumento de la temperatura afectaría al tiempo de retención, ya que, este sería menor, sin embargo, los cromatogramas no son óptimos	6	6	2	72	Mayor	Disminuir la temperatura para asegurar la eficiencia y facilidad de control, además, tener presente la evaporación de los solventes.
Variación en las condiciones de trabajo de isocrático a gradiente	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Elución deficiente de los componentes de la muestra, por ende, la resolución no sería la adecuada.	2	2	2	8	Menor	Trabajar en condiciones isocráticas para obtener buena separación entre los picos y evitar desgaste prematuro de la columna.

Preparación de la fase móvil a pH bajo	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Efecto sobre la asimetría y el tiempo de retención, debido a que las moléculas estarán en su forma ionizada causando tiempos de retención bajos.	8	6	6	286	Crítica	Aumentar el pH para obtener compuestos no ionizables, aumenta el tiempo de retención y picos cromatográficos aceptables
Cambio en la longitud de onda	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	No detecta los analitos a la longitud de onda escogida, por ende, el número de platos teóricos se vería afectado de igual forma los demás parámetros cromatográficos.	2	4	2	16	Menor	Escoger una longitud de onda donde la absorción de los analitos sea la adecuada.
Volumen de inyección > 20 ul	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	No permite que los analitos salgan en el espectro. Por sobresaturación de los diodos y como consecuencia la asimetría se vería afectada causando un factor de coe alto.	2	2	2	8	Menor	Elegir un volumen de inyección adecuado para evitar la sobrecarga máxima y una forma de pico inadecuada.
Muestra no disuelta	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Los principios activos no son detectados por el equipo	4	6	2	48	Menor	Utilizar un solvente donde la muestra sea fácilmente soluble.

Cambio de vial de (claro, ámbar)	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Degradación de los analitos al entrar en contacto con la luz	2	2	2	8	Menor	Si los analitos se degradan fácilmente al estar en contacto con la luz utilizar un vial color ámbar.
Concentración de la muestra elevada.	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	La asimetría ya que puede aparecer una forma de pico frontal debido a una alta concentración de la muestra, además la columna se sobrecarga.	4	4	2	32	Menor	Trabajar a concentraciones bajas para obtener picos óptimos y evitar dañar la columna.
Error en el proceso de dilución	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Los picos no son detectados o su forma no es óptima debido que no se llegó a la concentración estimada. Por ende, la asimetría es el factor que se ve afectado y la eficiencia.	6	4	2	48	Menor	Tomar las alícuotas correctas y realizar los cálculos correctos hasta llegar a la concentración deseada.
Falta de agitación de la fase móvil	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Separación de la fase móvil lo cual causa una forma de pico deficiente obteniendo un valor de asimetría mayor.	2	2	2	8	Menor	Agitar la fase móvil con un agitador magnético.

Tiempo de desgasificación insuficiente menor a 15 minutos	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Aumento de la presión del equipo debido a las burbujas	2	2	2	8	Menor	Desgasificar la fase móvil con la ayuda del sonicador durante 15 minutos.
Falta de filtración de las soluciones	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Partículas de polvo y suspendidas en las soluciones (impurezas).	2	2	2	8	Menor	Utilizar un equipo de filtración al vacío con una membrana para evitar que el equipo se tape.
El modificador orgánico escogido es polar	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	El modificador orgánico es polar y repele a los analitos a la fase estacionaria por ende el tiempo de retención es largo.	4	2	4	32	Menor	Elegir un solvente miscible en agua, menos polar y que no reaccione con la fase estacionaria ni con la muestra.
Exceder la temperatura del punto de fusión de las moléculas	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Las moléculas y los disolventes podrían evaporarse por lo que, el número de platos teóricos se vería afectado por consiguiente los demás parámetros cromatográficos no cumplirían con su objetivo.	4	2	2	18	Menor	No exceder los máximos del punto de fusión para no disminuir la eficacia y daño en la fase estacionaria.

Columna con menor capacidad de enlaces de hidrógeno	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	Menor tiempo de retención de las moléculas por parte de la fase estacionaria lo que provoca una resolución deficiente entre los analitos.	2	2	2	8	Menor	Ocupar una columna con alta capacidad de donación de enlaces de hidrógenos, debido a que las moléculas son bases débiles para que exista una mejor retención de los analitos.
LogP	Tiempo de retención Resolución Asimetría Número de platos teóricos	El tiempo de retención de las moléculas se ve afectado debido a la hidrofobicidad de los analitos.	2	2	2	8	Menor	Conocer el coeficiente de partición de las moléculas para determinar su afinidad por la fase estacionaria y su tiempo de retención.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

Como se puede observar en la matriz de riesgo, se identificaron los PCC (Parámetros Críticos del Proceso) que afectan a los CQA: Fase estacionaria, % de orgánico, flujo, temperatura de la columna y pH de la fase móvil, considerándose como riesgo crítico al % de orgánico y pH de la fase móvil.

El % de orgánico es crítico debido, a que es difícil de controlar, ya que se debe ir variando hasta obtener un cromatograma óptimo, además, en combinación de la temperatura, flujo y pH de la fase móvil resulta más difícil su monitorización, si al variar el % de orgánico los tiempos de retención son muy bajos o altos la separación de los analitos se ve afectada. Según (CHROMacademy 2014b, p. 8) “Un aumento en el porcentaje del orgánico en la fase móvil tiene un efecto profundo sobre la retención del analito debido al cambio de polaridad de la fase móvil“. Otro parámetro crítico es el pH de la fase móvil ya que, tiene un efecto significativo sobre el rendimiento del método debido a que tienen un efecto sobre el tiempo de retención y la asimetría, este debe ir de la mano con el pKa de los analitos al aumentar el pH este no se ioniza y la forma del pico mejora, sin embargo, un aumento elevado del pH puede dañar la columna cromatográfica. Similar a lo CHROMacademy (2014b, p. 18) menciona que una variación en el

pH de solo 0,1 unidades puede provocar un cambio sustancial en la selectividad entre los picos , además los cambios en el pH de la fase móvil deben realizarse con cuidado puesto que, no todas las columnas de HPLC basadas en sílice soportan extremos de pH.

El flujo se puede controlar fácilmente con la ayuda de la bomba, sin embargo, en combinación con el % de orgánico, y la temperatura de la columna se considera como un riesgo mayor. Además según la ecuación de Van Deenter existe parámetros experimentales que causan el ensanchamiento de los picos al trabajar a un valor de flujo óptimo el ensanchamiento del pico es menor ya que, el analito recorriera varios caminos.

Por último, la temperatura de la columna y el tipo de fase estacionaria también se ha considerado como un riesgo mayor ya que afectan el método en términos de resolución y eficiencia.

Los demás parámetros se han categorizado como riesgo menor es decir no van afectar al método y son más fáciles de controlar pero, de igual manera no se deben olvidar como por ejemplo, el solvente de la muestra ya que, el MTZ y el MN al no ser solubles en todos los solventes orgánicos un cambio en el solvente afectaría su solubilidad y por ende, el desarrollo del método se vería afectado.

En conclusión, los CPP con una puntuación baja se eliminaron de los estudios posteriores por considerarse como riesgo menor y los factores con un RPN alto se evaluaron a continuación por medio de un software estadístico.

#### **3.1.4. Desarrollo del método analítico**

##### *3.1.4.1. Desarrollo empírico inicial*

El desarrollo empírico inicial comenzó con una revisión bibliográfica de los atributos de calidad de las moléculas, la hidrofobicidad de las moléculas se determinó mediante el Log de P el metronidazol presenta un valor de Log P -0,02 y el miconazol nitrato de 5,86, la solubilidad de las moléculas también ayudan a determinar la retención de las moléculas por parte de la fase estacionaria cuanto menos soluble en agua son las moléculas existe una mayor retención tanto el MTZ y el MN son muy poco solubles en agua.

Como podemos observar en el marco teórico tanto el MTZ y MN son bases débiles ya que aceptan H<sup>+</sup>, al ser bases débiles al subir el pH de la fase móvil se encontraran en su forma no ionizada por lo que tienen tiempos de retención más largos por ser más afines a la fase estacionaria esto se debe a la interacción con especies de silanol que existen en la superficie de sílice, para corregir la forma del pico y que las moléculas fluyan más rápido se utiliza una base de sacrificio en este caso se ocupó el TEA (trietilamina) para asegurar que la superficie de sílice este completamente desactivada y las moléculas fluyan más rápido.

La regla del 2 pH ayuda a determinar el grado de ionización de las moléculas ya que, el pKa de las moléculas y el pH de la fase móvil van de la mano al ser el pH mayor que el pKa las moléculas estarán en su forma no ionizada y el tiempo de retención aumenta en este caso el pH de la fase móvil al ser de 2,8 y el pKa del metronidazol es de 2,38 la molécula se encontrara en su forma no ionizada, en comparación con el miconazol nitrato al tener un pKa alto de 6,7 no se encontrara totalmente no ionizado por ende, su tiempo de retención disminuye.

Al ser las moléculas bases débiles capaces de aceptar H<sup>+</sup>, la columna de elección es la C18 ya que, presenta una alta capacidad de donación de enlaces de hidrógeno y existen mayor retención de las moléculas no ionizadas.

Por ende, las condiciones iniciales elegidas son las siguientes:

**Tabla 4-3:** Parámetros iniciales para el desarrollo del método analítico

Fase estacionaria	Columna Purospher C18 (5um;150-4,6 mm)
Flujo	1 ml/min
Detector	220 nm
Volumen de inyección	20 ul
Temperatura	45 °C
Tiempo	6 min
Composición de la fase móvil	Buffer H <sub>3</sub> P0 <sub>4</sub> pH 2,8 (Buffer: Metanol) 75: 25

**Realizado por:** Díaz, Claudia, 2022.

#### 3.1.4.2. Desarrollo del DoE (Diseño del experimento)

Después de realizar el análisis de riesgo se llevó a cabo un diseño compuesto reducido de Draper-y-Lin, para evaluar los parámetros críticos con un RPN alto (% de orgánico, pH de la fase móvil, fase estacionaria, temperatura y flujo) que tendrán un efecto sobre las variables respuesta con la ayuda del software STAT GRAPHICS se creó el diseño experimental dando como resultado un total de 30 ensayos que se describen a continuación:

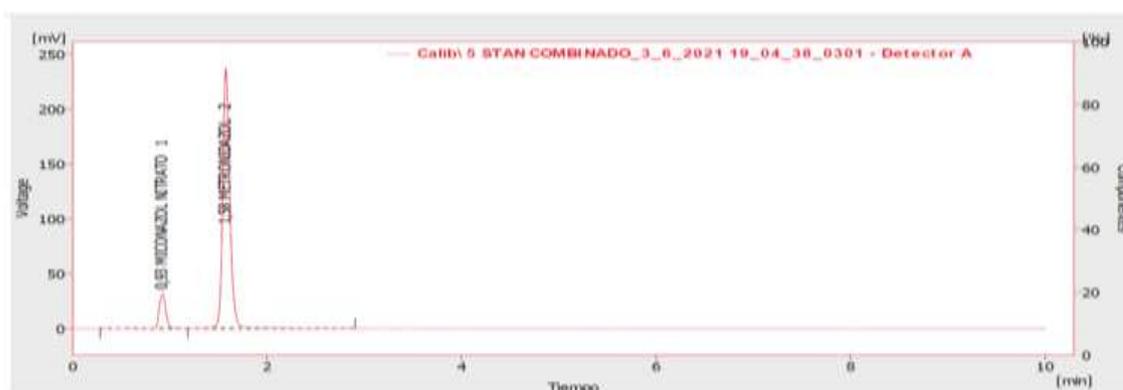


**Gráfico 1-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 35 °C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 2,3).

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 1-3 se observa el cromatograma de MTZ y MN obtenido a esas condiciones con un tiempo de retención de 2,79 y 1,72 para el metronidazol y miconazol nitrato respectivamente, los picos no presentan una buena resolución y son asimétricos, además de presentar coleo estos se pueden deber al pH de la fase móvil que al ser bajo en comparación con su pka las moléculas no se encuentran en su forma no ionizada. Según (CHROMacademy 2014, p. 17) los picos simétricos tienen un valor de  $As = 1,0 - 1,05$  y los picos que presentan un valor de  $As = 2$ , son considerados como inaceptables, los picos asimétricos exhiben problemas en la resolución y cuantificación.

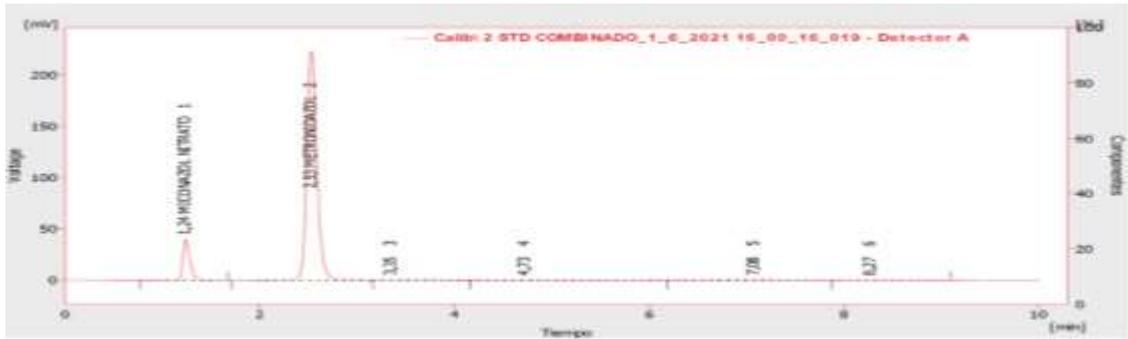
Ensayo 2:



Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

**Gráfico 2-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 35 °C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm, con una LiChrospher C8

En el gráfico 2-3 se encuentra el cromatograma del MTZ y MN con un tiempo de retención de 0,925 para el miconazol nitrato y 1,575 para el metronidazol como, se puede observar, aunque los tiempos de retención son bajos la resolución no es una buena, además, no existe una buena eficiencia de los picos esto se debe al flujo al ser alto la eficiencia de los picos disminuye. Ensayo 3, 4, 5, 6, 7:



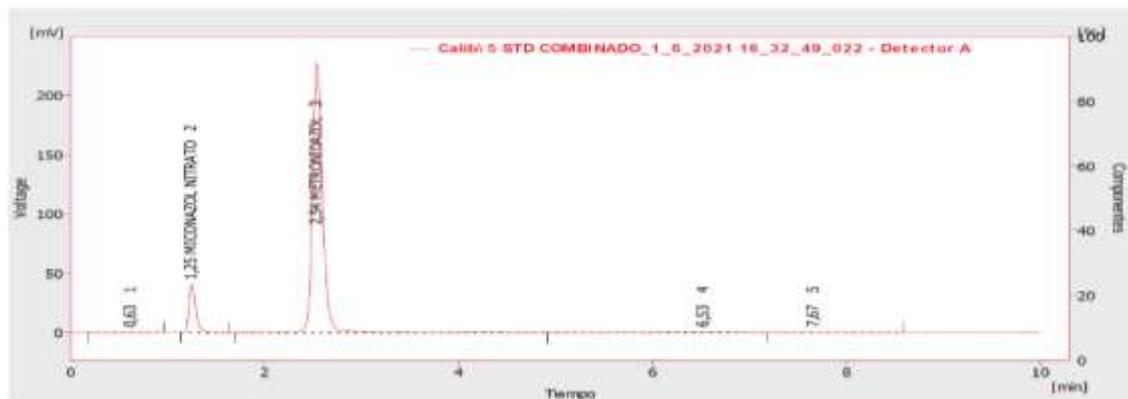
**Gráfico 3-3.** Cromatograma “a” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.



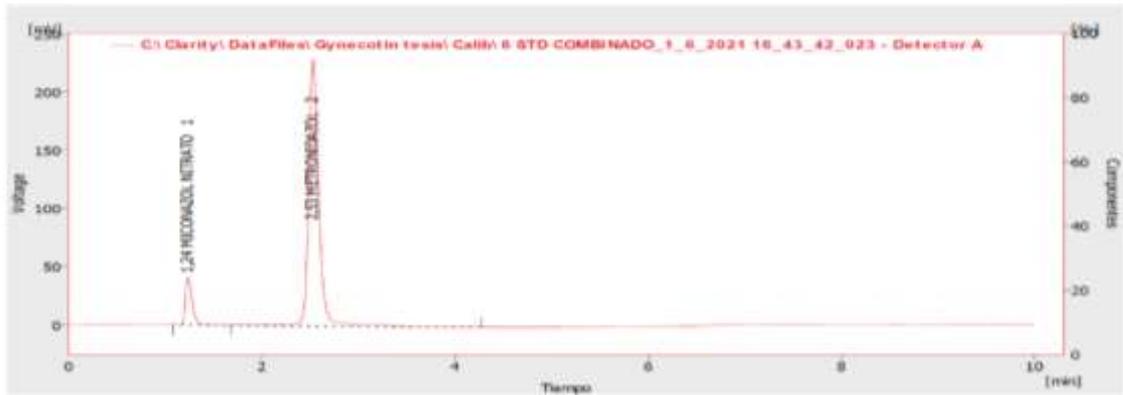
**Gráfico 4-3.** Cromatograma “b” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.



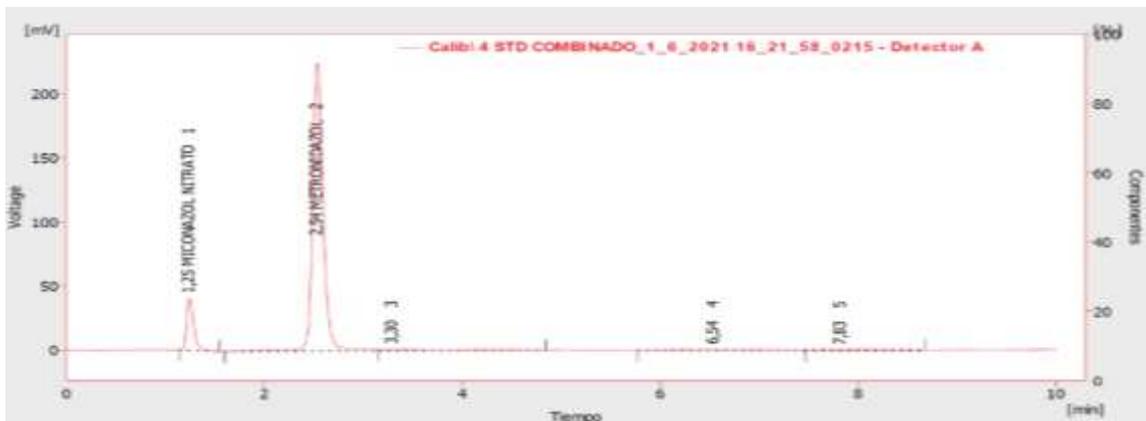
**Gráfico 5-3.** Cromatograma “c” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.



**Gráfico 6-3.** Cromatograma “d” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 0C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.

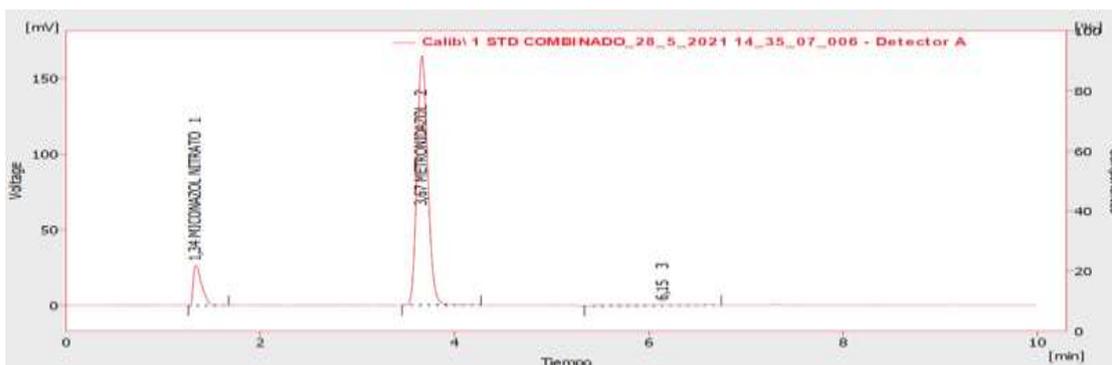
Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.



**Gráfico 7-3.** Cromatograma “e” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 0C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En los gráficos presentados anteriormente se puede observar cómo los cromatogramas de (a-e) presentan las mismas condiciones cromatográficas y tienen un tiempo de retención de 1,24 y 2,53 para el miconazol nitrato y metronidazol respectivamente, el pico del MN presenta coleo y un valor de  $A_s = 1,8$  que no es aceptable de igual forma el cromatograma (e) se observa que el pico del MTZ presenta coleo, esto se puede deber al pH de la fase móvil. Según Martínez et al. 2015, p. 141) la selección adecuada del pH de la fase móvil ayudará a determinar la ionización de los analitos como consecuencia, se obtendrá picos simétricos, estrechos y puntiagudos en el proceso cromatográfico. Ensayo 8:



**Gráfico 8-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 35 °C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 4-3 se puede observar cómo los tiempos de retención aumentan en especial para el metronidazol que presenta un tiempo de retención de 3,66 por ende la resolución aumenta, esto se debe al porcentaje del metanol en la fase móvil al ser bajo hace que el analito interaccione mayor tiempo en la fase estacionaria y los tiempos de retención sean largos, de igual forma el pico del MN presenta una  $A_s = 2,86$  la cual no es aceptable ya que, el pico presenta coleo. Similar a lo (Martínez et al. 2015 , p. 141) menciona que existe una estrecha relación entre el tiempo de retención o elución de los analitos con la composición de la fase móvil como consecuencia del efecto de la polaridad. Ensayo 9:

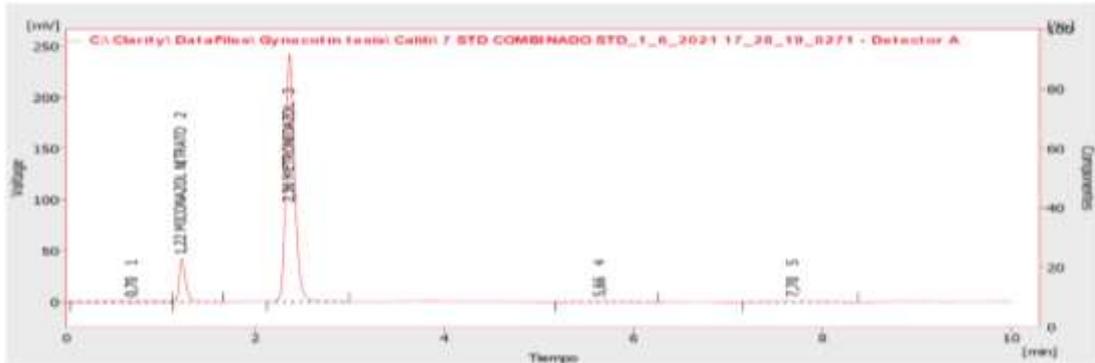


**Gráfico 9-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,5 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 9-3 correspondiente al cromatograma del MTZ y MN observamos que los tiempos de retención de las moléculas son bajos debido a que se trabaja con flujo y temperatura alta además la resolución y el número de platos teóricos mejoran. Similar a lo que (Martínez et al. 2015, p. 142) menciona que a elevadas temperaturas aumenta la tasa de transferencia del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil por ende, la eficacia, la resolución y separación cromatográfica

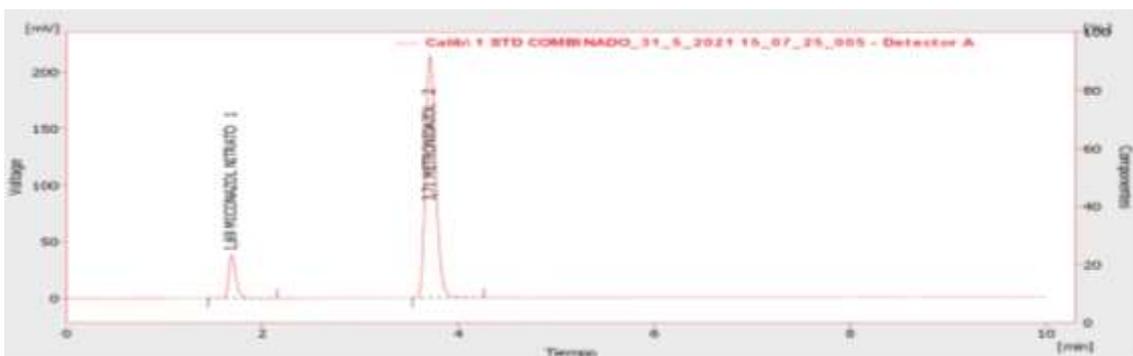
aumenta. Por este motivo, al trabajar con flujos de fase móvil ligeramente mayores que con los que se trabajaría a temperatura ambiente, permite disminuir el tiempo de retención sin perder eficacia. Ensayo 10:



**Gráfico 10-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 49 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 10-3 se observa el cromatograma del MTZ y MN obtenidos a un tiempo de retención de 2,36 para el miconazol nitrato y 1,22 para el metronidazol, la resolución entre los picos aumenta como consecuencia de la disminución del tiempo de retención, esto se debe por un aumento de la temperatura como ya se mencionó anteriormente a elevadas temperaturas  $> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  la transferencia del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil aumenta, (Harris 2007, p. 717) menciona que a temperaturas altas el pH de la fase móvil debe ser bajo menor a 6 para retardar la disolución de la fase estacionaria de sílice. Ensayo 11:

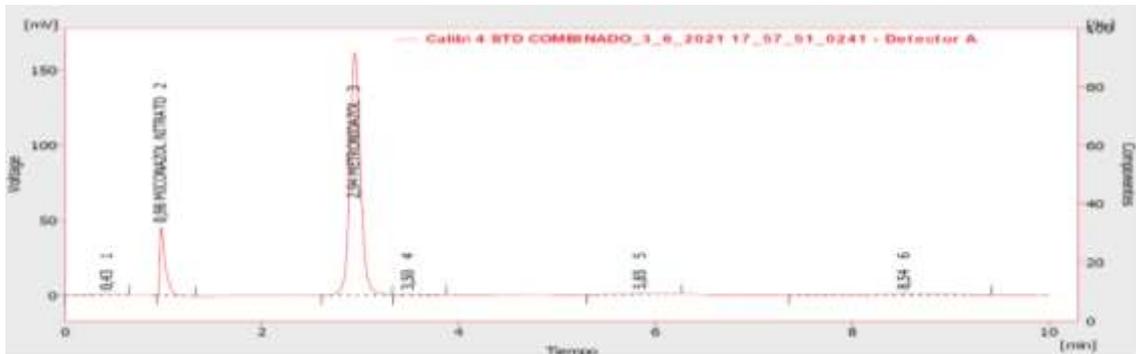


**Gráfico 11-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 3,7) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

El gráfico 11-3 corresponde al cromatograma de MTZ y MN con tiempos de retención de 3,71 y 1,68 tanto como para el metronidazol y miconazol nitrato respectivamente, se puede observar un

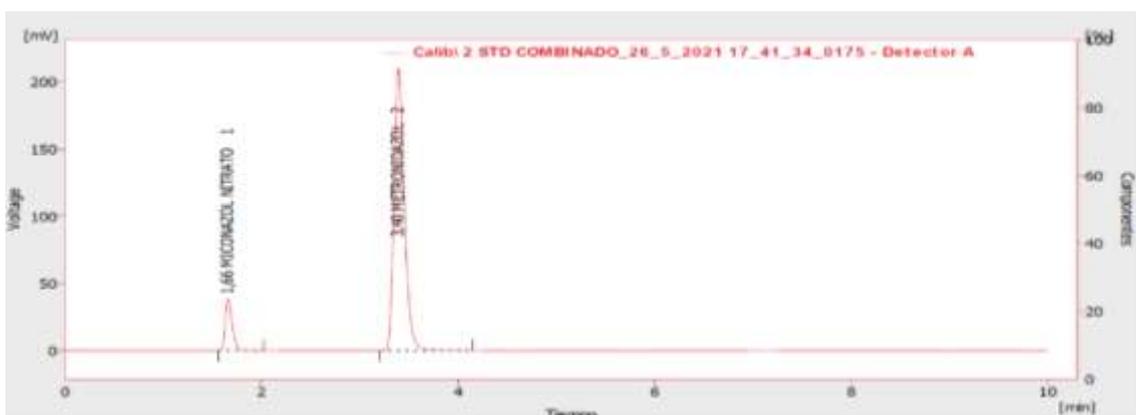
tiempo de retención bajo y una resolución entre los picos buena además, la asimetría de los picos es aceptable esto se debe a que se trabajó a una temperatura y pH altos, modificar el pH a tan solo 0,1 unidades puede afectar en la separación cromatográfica por este motivo, la variación de pH se debe realizar con cuidado. Ensayo 12



**Gráfico 12-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 45 0C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm.

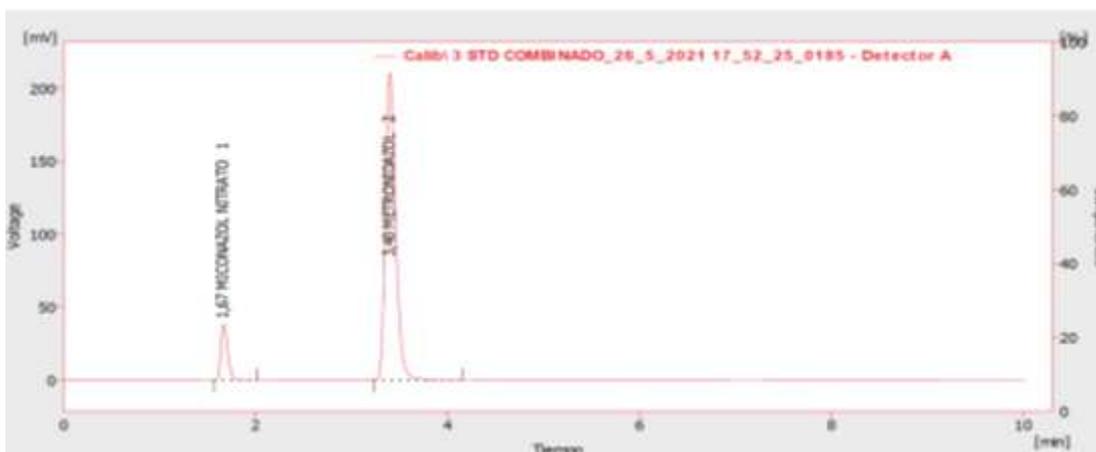
Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 12-3 se puede observar cómo los tiempos de retención son bajos 0,97 para el MN y 2,94 para el MTZ al presentar TR bajos la resolución entre los picos aumenta, sin embargo, el pico del miconazol nitrato presenta coleo con un valor de  $As = 4,025$  que representa un pico pobre esto se debe a las condiciones de trabajo al ser altas; (temperatura, caudal y pH) los analitos fluyen más rápido, además la columna C8 hace que los analitos tengan tiempos de retención bajos. Ensayo 13, 14, 15, 16,17:



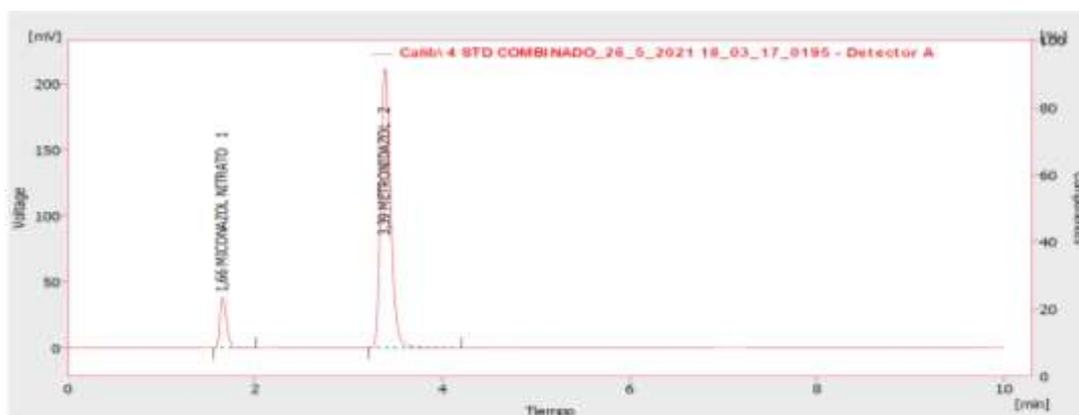
**Gráfico 13-3.** Cromatograma “a” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.



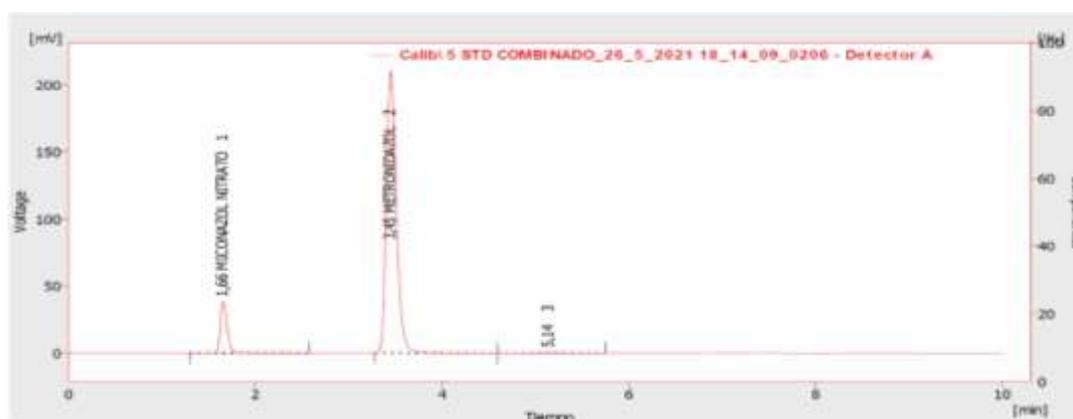
**Gráfico 14-3.** Cromatograma “b” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.



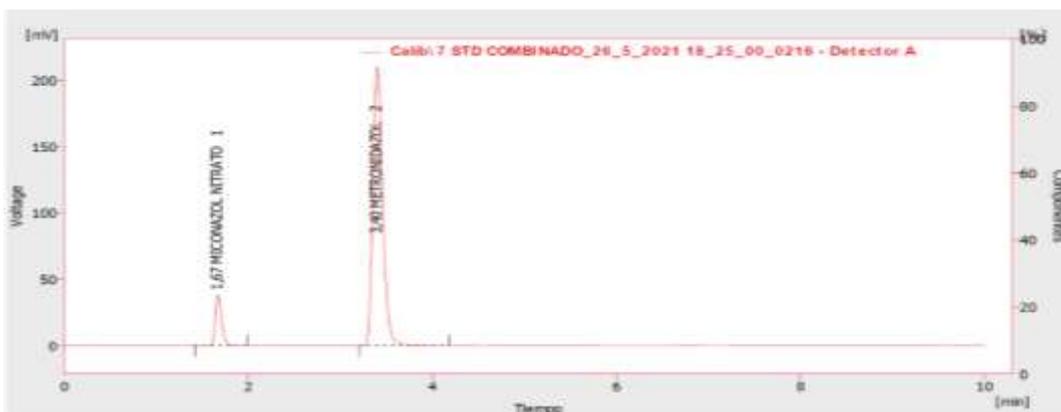
**Gráfico 15-3.** Cromatograma “c” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.



**Gráfico 16-3.** Cromatograma “d” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm

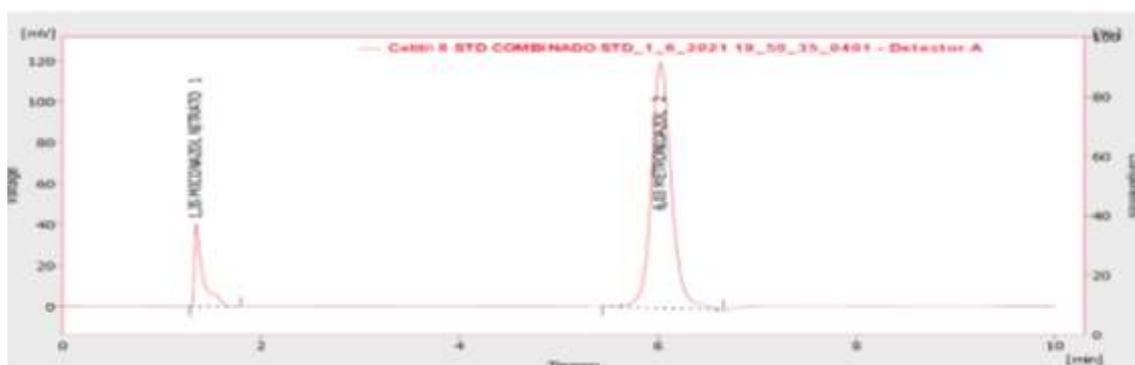
Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.



**Gráfico 17-3.** Cromatograma “e” de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico anteriores se presentaron los cromatogramas en las mismas condiciones de trabajo cuyos tiempos de retención son similares y se puede observar una buena resolución entre los picos, al comparar estos cromatogramas con el gráfico 3-3 que presenta las mismas condiciones cromatográficas se puede observar cómo difieren en el tiempo de retención esto se debe al tipo de columna utilizada. Al trabajar con una columna C8 los tiempos de retención son bajos en este caso 1,24 y 2,53 para el MN y MTZ respectivamente y con la columna C18 los tiempos de retención aumentaron 1,67 y 3, 40 para el MN y MTZ. Similar a lo que (De la Mata 2012, p . 3 ) menciona que las columnas de tipo C18 otorgan excelente retención y resolución.

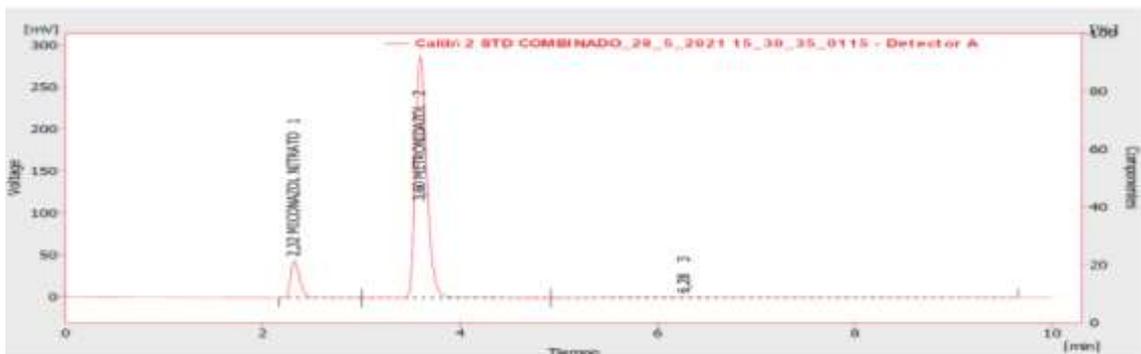


**Gráfico 18-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (94:6 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 18-3 se observa el cromatograma del metronidazol y miconazol nitrato con un tiempo de retención de 1,35 para el MN y 6,03 para el MTZ la separación entre los picos es alta y el pico del miconazol nitrato es asimétrico y presenta coleo de igual forma el pico del

metronidazol esto ocurre porque el porcentaje del orgánico es bajo como consecuencia los analitos no eluyen provoca valores de As pobres en este caso la As= 7 para el MN. Ensayo 19:



**Gráfico 19-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 45 °C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 19-3 se puede ver el cromatograma del MTZ y MN con un tiempo de retención de 2,32 para el miconazol nitrato y 3,60 para el metronidazol los tiempos de retención son largos en especial para el MN debido al flujo al ser bajo los tiempos de retención disminuyen y al utilizar una columna C18 la interacción de las moléculas con la fase estacionaria aumenta de igual forma la resolución entre los picos disminuye como consecuencia del aumento del tiempo de retención. Ensayo 20:

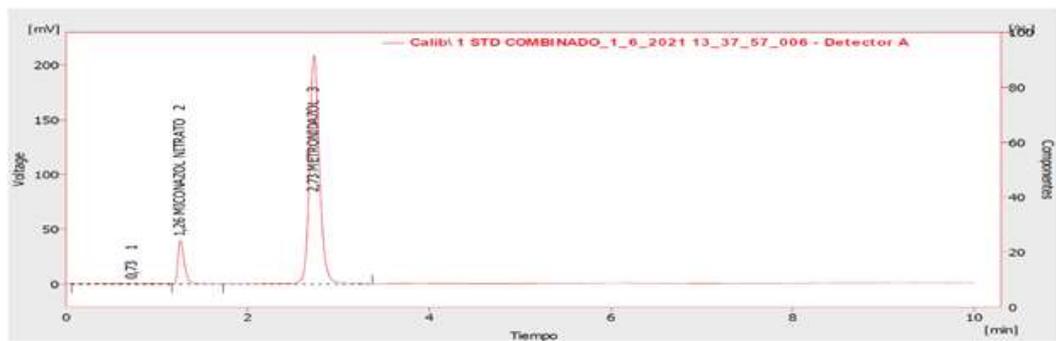


**Gráfico 20-3:** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 45 0C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

El gráfico 20-3 correspondiente al cromatograma del MTZ y MN presentó tiempos de retención de 1,25 y 1,94 para el miconazol nitrato y metronidazol respectivamente, se observa que los tiempos de elución disminuyen debido a que, el flujo, la temperatura y el porcentaje de orgánico es alto por ende, los analitos saldrán más rápido pero, la resolución entre los picos y la asimetría no será buena, de igual forma al trabajar con un pH de 2,3 que está por debajo del pKa de las

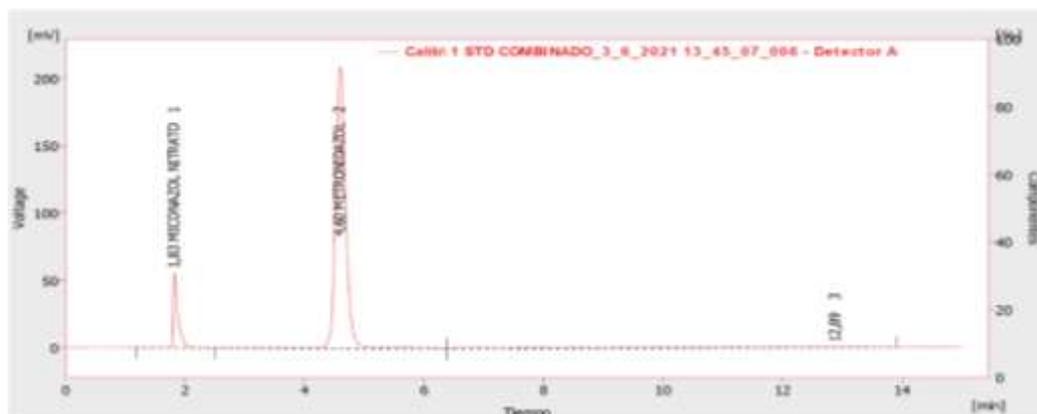
moléculas los analitos interacción menos tiempo con la fase estacionaria por este motivo, salen más rápido. Ensayo 21:



**Gráfico 21-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 30 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm.

**Realizado por:** Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 21-3 correspondiente al cromatograma del MTZ y MN con tiempos de retención de 1,26 y 2,73 para el miconazol nitrato y metronidazol respectivamente, se puede observar cómo los tiempos de retención disminuyen, sin embargo, la asimetría de los picos no es buena en especial el del miconazol nitrato que presenta una  $As = 1,8$  y el metronidazol de  $As = 1,3$  debido a que se encuentra en su forma ionizada lo que da lugar a picos asimétricos y puntiagudos. Similar a lo que (AEFI 2001, p. 110) menciona que un pico será simétrico si presenta un factor de cola de 1.0 en cambio, los valores superiores a la unidad presentaran coleo y una forma de pico inaceptable. Ensayo 22:

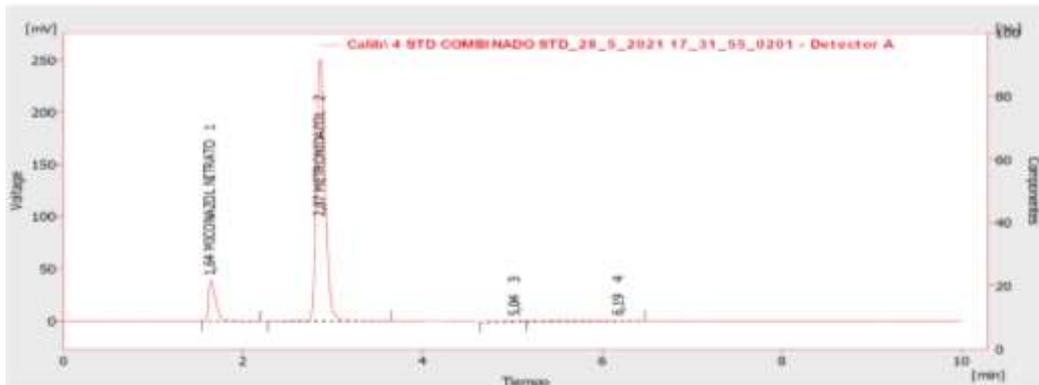


**Gráfico 22-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 35 °C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm.

**Realizado por:** Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 22-3 correspondiente al cromatograma de MTZ y MN se puede observar cómo existe coleo con el pico del miconazol nitrato presentando una asimetría de  $As = 4,07$  de igual forma el

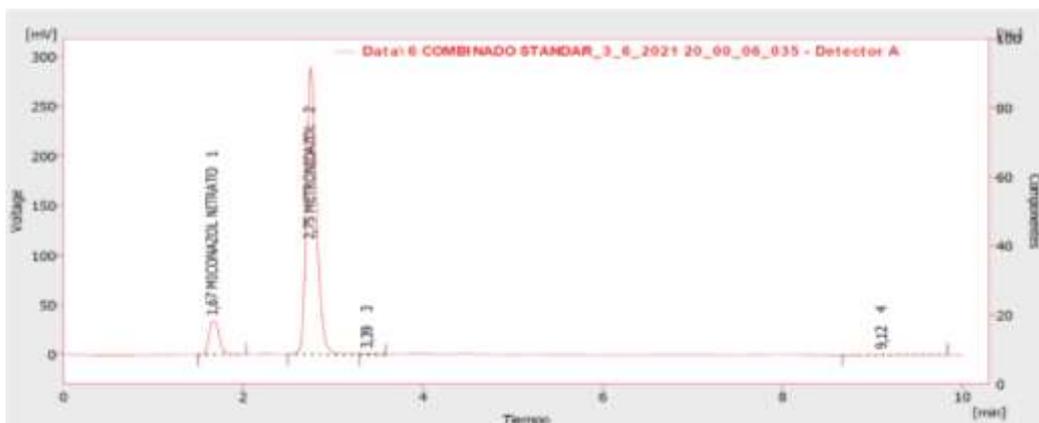
pico del metronidazol tardo mucho tiempo en eluir ya que, se trabajó con un % de orgánico y caudal bajo. Ensayo 23:



**Gráfico 23-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 23-3 correspondiente al cromatograma de MTZ y MN se puede observar cómo los tiempos de retención disminuyen sin embargo, los picos de los compuestos son asimétricos, el pico del miconazol nitrato presenta coleo con un valor de  $A_s = 2,8$  como se mencionó anteriormente el pH de la fase móvil juega un papel importante en la apariencia de los picos al trabajar con un pH menor al pK de los analitos estos se encontraran en su forma ionizada como consecuencia interaccionan menos con la fase estacionaria dando picos con coleo. Ensayo 24:

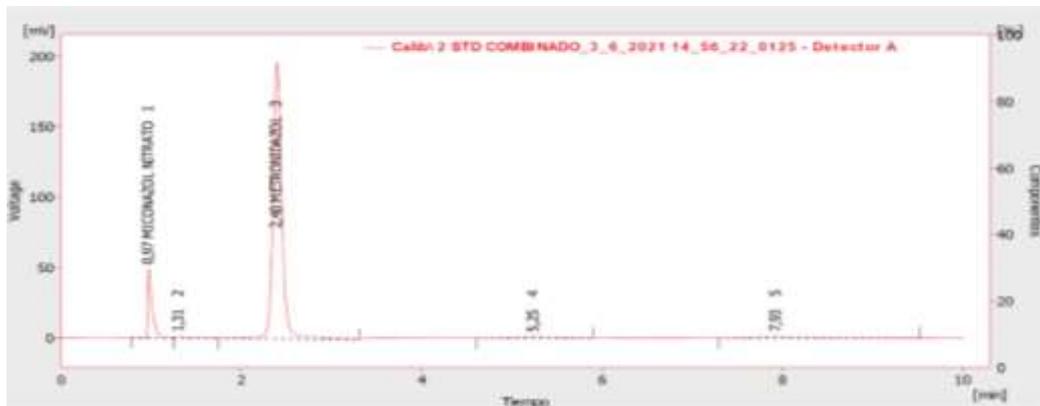


**Gráfico 24-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 45 °C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 24-3 podemos observar cómo los tiempos de retención disminuyen, no obstante, los picos presentan asimetría esto se debe a la temperatura al ser alta hace que los analitos eluyan más rápido de igual forma con un 35% de B no se separó adecuadamente los picos, además, el uso de

la columna C8 hace que los analitos interacción menos tiempos con la fase estacionaria por ende los tiempos de retención disminuyen. Ensayo 25:



**Gráfico 25-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 45 0C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 2,3) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 24-3 correspondiente al cromatograma del MTZ y MN con tiempos de retención de 0,97 para el miconazol nitrato y 2,40 para el metronidazol se observó cómo los tiempos de retención disminuyen como consecuencia la resolución entre los picos aumenta sin embargo, los picos presentaron coleo y la asimetría no fue buena esto se debe, a las condiciones de trabajo al trabajar a una temperatura de 45 °C y a flujo de 1,3 la transferencia del principio activo entre la fase móvil y la fase estacionaria disminuye de igual forma el pH de la fase móvil jugo un papel importante en la apariencia de los picos y el uso de una columna C8 también contribuyó en la retención de los analitos. Ensayo 26:

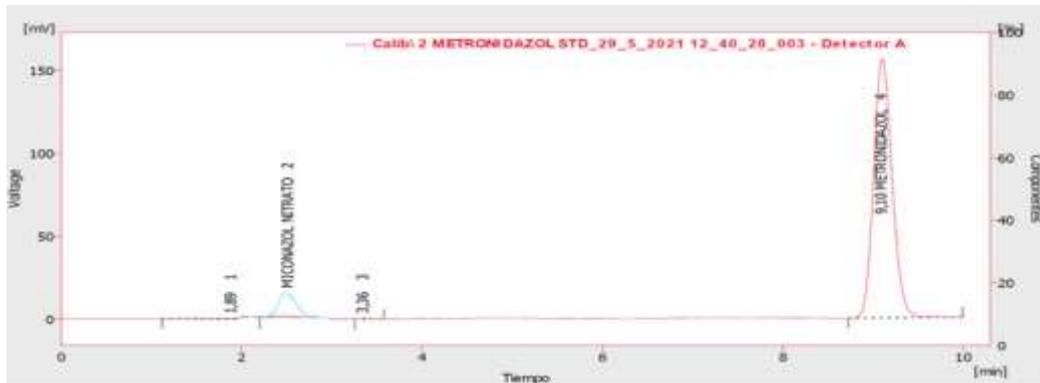


**Gráfico 26-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1 mL/min, temperatura 40 °C, fase móvil (57:43 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 26-3 se observa como los tiempos de retención disminuyen, sin embargo, la separación entre los picos no es buena al operar con un 43% de B, los analitos eluyen más rápido

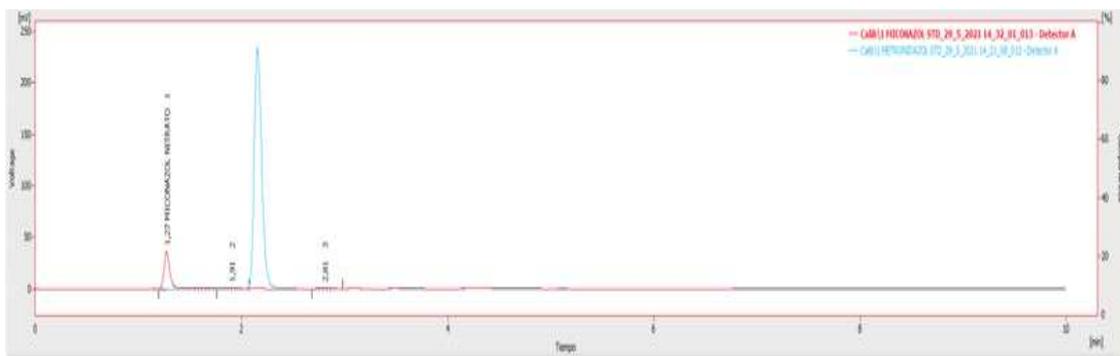
y en combinación con la temperatura alta y una columna C8 la transferencia de los compuestos entre la fase móvil y la fase estacionaria es más rápida por ende, los tiempos de retención disminuyen y la eficacia de los picos también se ve afectada. Ensayo 27:



**Gráfico 27-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 35 °C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 27-3 correspondiente al cromatograma del metronidazol y miconazol nitrato con un tiempo de retención de 2,46 para el MN y 9,10 para el MTZ se observa como los tiempos de retención son largos, el pico del miconazol nitrato es asimétrico y ancho en comparación con el metronidazol que presenta una buena asimetría  $A_s = 1,1$  sin embargo, la separación entre los picos no es buena al trabajar con un flujo, temperatura y % de orgánico bajo y una columna C18 los analitos interacción más tiempo con la fase estacionaria aumentando los tiempos de retención. Ensayo 28:

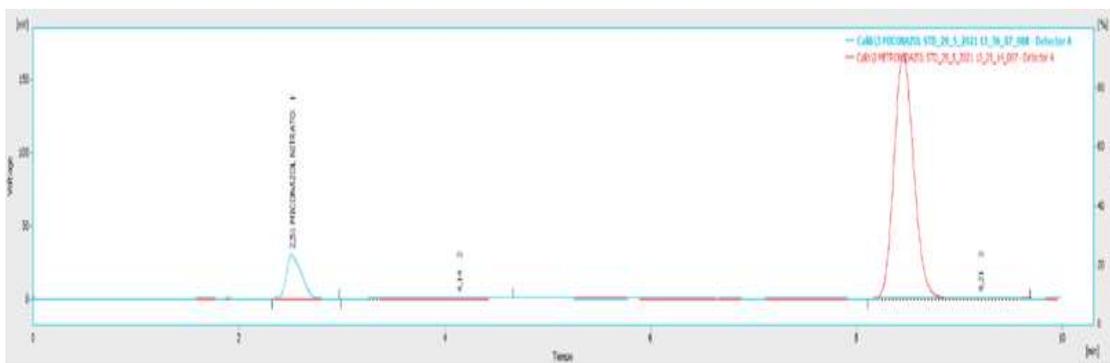


**Gráfico 28-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 1,3 mL/min, temperatura 35 0C, fase móvil (65:35 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm

Realizado por: Díaz Claudia, 2021

En el gráfico 28-3 correspondiente al cromatograma del MTZ y MN se observa como los tiempos de retención disminuyen como resultado de trabajar con un flujo de 1,3 y 35% de B, el paso de

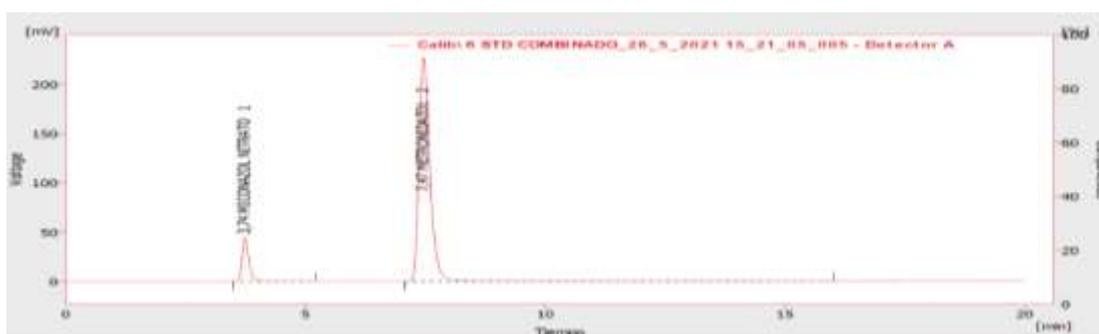
los analitos entre la fase móvil y la estacionaria es rápida pero, la separación entre los picos no es buena y presentan coleo como se mencionó anteriormente un cambio de pH a tan solo 0,1 unidades puede afectar en la separación cromatográfica por este motivo, la variación de pH se debe realizar con cuidado. Ensayo 29:



**Gráfico 29-3.** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,7 mL/min, temperatura 45 0C, fase móvil (85:15 Buffer: Metanol pH 3,3) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 29-3 correspondiente al cromatograma del metronidazol y miconazol nitrato con un tiempo de retención de 8,16 para el MTZ y 2,45 para el MN se observa como los tiempos de retención son largos afectando la separación entre los picos y su forma ya que presentan coleo y son anchos esto se debe al flujo y el % de B al ser bajos y con una columna C18 los analitos persisten más tiempo en la fase estacionaria por ende los tiempos de retención son largos de igual forma el pH de la fase móvil juega un papel importante ya que, un cambio brusco afecta significativamente la forma de los picos. Ensayo 30:



**Gráfico 30-3:** Cromatograma de MTZ y MN a flujo de 0,4 mL/min, temperatura 40 0C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8) a 220 nm

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 30-3 se observa como un flujo de 0,4 mL/min y un 25% de B afecta en la retención de los analitos y su forma y con la combinación de una columna de tipo C18 la transferencia de

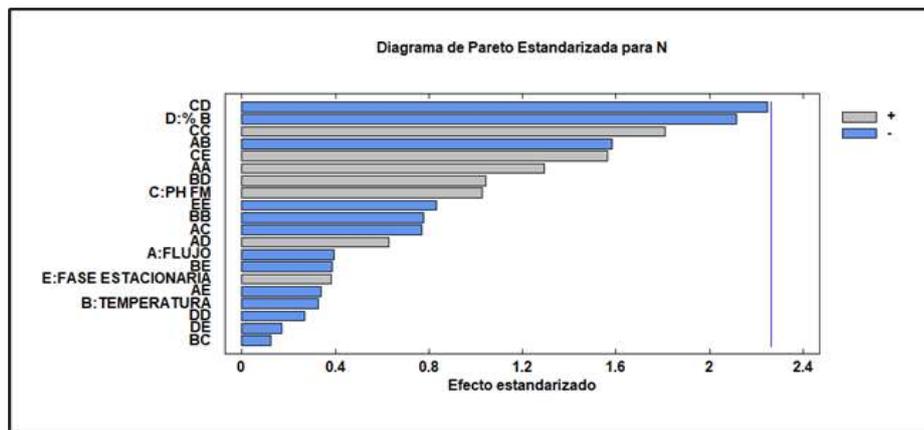
los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil disminuye generando tiempos de retención largos.

### 3.1.5. MODR (Región de diseño operable del método)

Utilizando el programa STATGRAPHICS se realizó un diseño compuesto reducido de Draper-y-Lin para el metronidazol y miconazol nitrato donde se evaluaron los factores (Flujo, Temperatura, pH de la fase móvil, % de B y fase estacionaria) que tendrá un impacto sobre las variables respuesta (Número de platos teóricos, simetría, resolución y tiempo de retención), el espacio de diseño se evaluó mediante los gráficos que nos proporciona el programa los cuales se describen a continuación:

#### Metronidazol (MTZ)

- Número de platos teóricos (N)



**Gráfico 31-3.** Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia para el número de platos teóricos

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 31-3 podemos observar el diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos con anterioridad se puede decir que ningún factor influye significativamente de manera positiva o negativa sobre el número de platos teóricos. Sin embargo, la combinación del pH de la fase móvil y el % de orgánico se acerca a la línea con una influencia negativa sobre el número de platos teóricos.

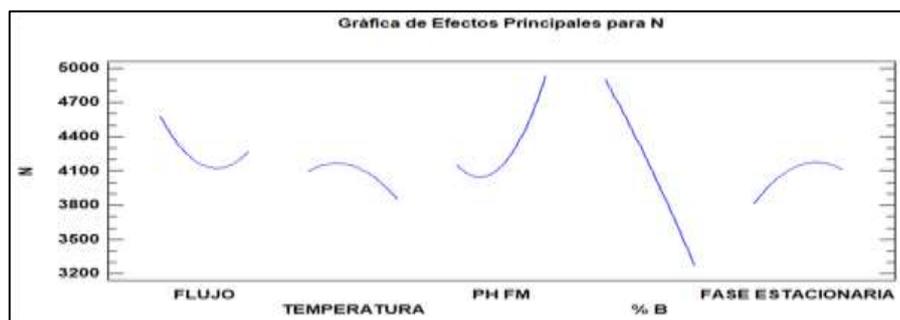
**Tabla 5-3:** ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para N

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: FLUJO	178931.	1	178931.	0.15	0.7034

B: TEMPERATURA	123242.	1	123242.	0.11	0.7517
C:PH FM	1.21984E6	1	1.21984E6	1.05	0.3315
D: % B	5.18904E6	1	5.18904E6	4.48	0.0634
E: FASE ESTACIONARIA	170403.	1	170403.	0.15	0.7102
AA	1.94132E6	1	1.94132E6	1.68	0.2276
AB	2.90493E6	1	2.90493E6	2.51	0.1477
AC	685593.	1	685593.	0.59	0.4613
AD	457320.	1	457320.	0.39	0.5453
AE	132652.	1	132652.	0.11	0.7428
BB	697720.	1	697720.	0.60	0.4575
BC	17164.0	1	17164.0	0.01	0.9058
BD	1.25716E6	1	1.25716E6	1.09	0.3246
BE	171209.	1	171209.	0.15	0.7095
CC	3.7933E6	1	3.7933E6	3.28	0.1037
CD	5.86072E6	1	5.86072E6	5.06	0.0510
CE	2.82994E6	1	2.82994E6	2.44	0.1524
DD	83796.0	1	83796.0	0.07	0.7940
DE	33627.1	1	33627.1	0.03	0.8685
EE	800600.	1	800600.	0.69	0.4272
Error total	1.04212E7	9	1.15792E6		
Total (corr.)	7.88669E7	29			

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En la tabla (5-3) se observa el análisis de la Varianza para el número de platos teóricos, la cual nos demuestra que, en este caso, ningún factor tiene un valor-P menor a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0% es decir, que una variación o un cambio de estos factores y sus combinaciones no afecta directamente en la variable respuesta evaluada en este caso el número de platos teóricos.

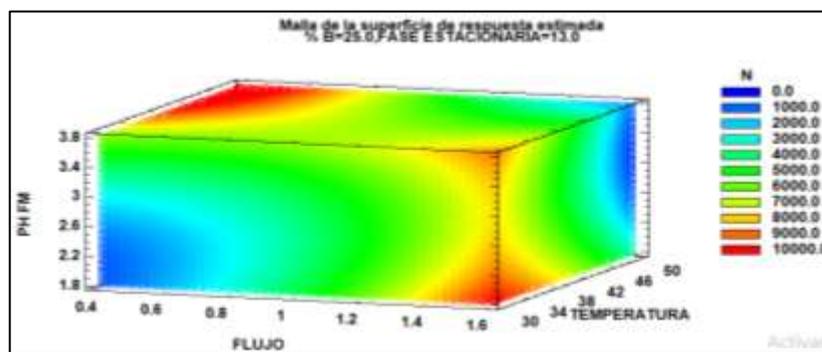


**Gráfico 32-3.** Gráfica de los efectos principales para el número de platos teóricos sobre los factores evaluados.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 32-3 de los efectos principales se puede observar cómo los factores evaluados (flujo, temperatura, pH de la fase móvil, % de B y fase estacionaria) influyen sobre el número de platos teóricos. Para el flujo y el pH de la fase móvil se ve claramente como la curva disminuye hasta llegar a un punto mínimo de 4100 y luego tiende a subir, lo que significa que al aumentar el flujo y el pH de la fase móvil el número de platos teóricos va a aumentar. Al elevar la temperatura el valor de N sube hasta llegar a su punto máximo y luego, tiende a disminuir. Para el % de B la pendiente es negativa, lo que significa que al aumentar el % de orgánico el valor N va a disminuir afectando así al método. Finalmente, al cambiar de fase estacionaria el número de platos teóricos aumenta hasta llegar a un punto máximo de 4200 platos teóricos, sin embargo, luego tiende a disminuir, reduciendo así el número de platos teóricos.

- Optimización de N



**Gráfico 33-3.** Malla de superficie de respuesta para el número de platos teóricos

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

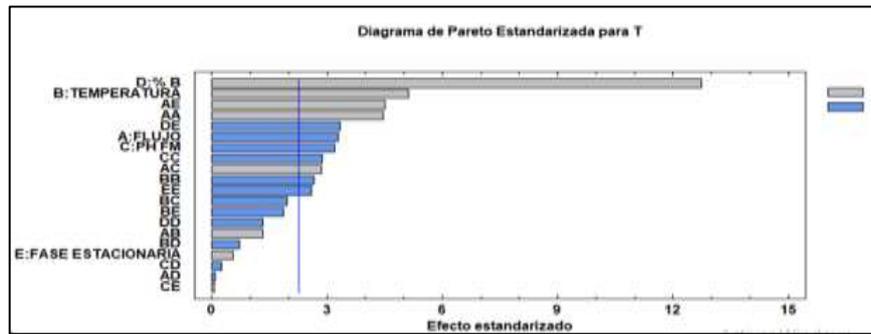
**Tabla 6-3:** Condiciones óptimas para maximizar el número de platos de teóricos

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
FLUJO	0,441637	1,55836	0,608059
TEMPERATURA	30.694	49.306	32,2032
PH FM	1,8694	3,7306	3,7306
% B	6,3879	43,6121	6,3879
FASE ESTACIONARIA	3,69395	22.306	22.306

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En la tabla 6-3 se observa la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza el número de platos teóricos sobre la región indicada en este caso, el valor óptimo de flujo es de 0,6 mL/min, temperatura 32,20 °C, pH de la fase móvil 3,7, porcentaje de B 6,38% y fase estacionaria C18. De igual forma en el gráfico se logra observar los puntos donde el número de platos teóricos aumenta, las zonas calientes de color rojo son las óptimas y las zonas frías son las que disminuyen el número de platos teóricos dando un pico de metronidazol deficiente.

- Asimetría (T)



**Gráfico 34-3.** Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia para la asimetría

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 34-3 se observa el Diagrama de Pareto para la asimetría que según su principio nos menciona que unos pocos vitales (el 20%) genera la mayor parte de los efectos (80%), en este caso los factores que superan la línea vertical tienen un efecto estadísticamente significativo ya sea, de manera positiva o negativa sobre la variable respuesta, siendo el de mayor influencia el % de B que se lo considera como un valor fijo. De igual manera, la temperatura y la interacción del flujo con la fase estacionaria (AE) afectan de manera positiva sobre el rendimiento del método. Finalmente, la combinación del % de orgánico y la fase estacionaria (DE), el flujo y pH de la fase móvil influyen de manera negativa sobre la asimetría. En conclusión, los factores y sus interacciones mencionados anteriormente van a tener un efecto significativo sobre el valor de T por ello, una variación de estos, causaría que la forma del pico del metronidazol sea asimétrica con un factor de coe alto.

**Tabla 7-3:** ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para T

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: FLUJO	0.00643705	1	0.00643705	10.87	0.0093
B: TEMPERATURA	0.0155396	1	0.0155396	26.24	0.0006
C:PH FM	0.00606766	1	0.00606766	10.24	0.0108
D: % B	0.0960332	1	0.0960332	162.14	0.0000
E: FASE ESTACIONARIA	0.000172608	1	0.000172608	0.29	0.6024
AA	0.0118024	1	0.0118024	19.93	0.0016
AB	0.00103643	1	0.00103643	1.75	0.2185
AC	0.00475657	1	0.00475657	8.03	0.0196
AD	0.00000395325	1	0.00000395325	0.01	0.9367
AE	0.0120517	1	0.0120517	20.35	0.0015
BB	0.00420001	1	0.00420001	7.09	0.0259

BC	0.00227039	1	0.00227039	3.83	0.0819
BD	0.000303967	1	0.000303967	0.51	0.4919
BE	0.0020423	1	0.0020423	3.45	0.0963
CC	0.00486689	1	0.00486689	8.22	0.0186
CD	0.0000342163	1	0.0000342163	0.06	0.8154
CE	0.00000278885	1	0.00000278885	0.00	0.9468
DD	0.00103953	1	0.00103953	1.76	0.2179
DE	0.0066034	1	0.0066034	11.15	0.0087
EE	0.00392922	1	0.00392922	6.63	0.0299
Error total	0.00533041	9	0.000592268		
Total (corr.)	0.390851	29			

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En la tabla 7-3 se puede comprobar mediante los resultados del análisis de varianza la significancia de los efectos mencionados en el Diagrama de Pareto, como se puede observar en la tabla ANOVA 11 efectos y sus interacciones tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.



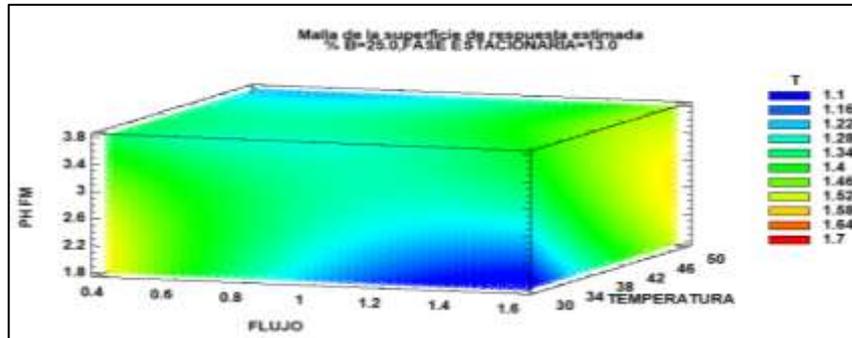
**Gráfico 35-3.** Gráfica de los Efectos Principales para la asimetría sobre los factores evaluados.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 35-3 de los efectos principales para la asimetría, se observa en el eje X los factores estudiados (flujo, temperatura, pH de la fase móvil, % de B y fase estacionaria) y como estos van a afectar el valor de T a medida que van bajando o subiendo de nivel. Para el flujo al aumentar este, el valor de la asimetría empieza a disminuir hasta llegar a un punto mínimo donde es constante, es decir, se obtendrá un pico simétrico si el factor tiene un nivel alto, de igual manera, al aumentar el pH de la fase móvil este se encuentra en su punto máximo y luego tiende a disminuir. Para la fase estacionaria al cambiar de columna el valor de T incrementa hasta llegar a su punto máximo donde empieza a descender. Finalmente, el % de orgánico presenta una pendiente positiva, el cual indica que es un factor que influye en la respuesta, es decir, a mayor % de orgánico superior será la asimetría. Para la temperatura al aumentar hasta su nivel alto la

variable respuesta aumentara. En resumen, el flujo, el pH de la fase móvil y la fase estacionaria serán factores claves para obtener picos simétricos y sin coleo.

- Optimización T



**Gráfico 36-3.** Malla de la superficie de respuesta para la asimetría

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

**Tabla 8-3:** Condiciones óptimas para minimizar la asimetría

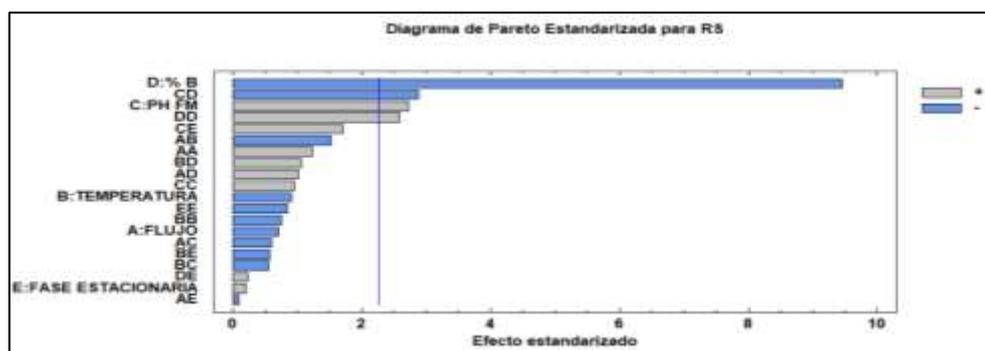
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
FLUJO	0.441637	1,55836	1,55836
TEMPERATURA	30.694	49.306	31,4897
PH FM	1,8694	3,7306	2,42521
% B	6,3879	43,6121	6,3879
FASE ESTACIONARIA	3,69395	22.306	3,69782

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

Esta tabla 8-3 se observa la combinación de los niveles de los factores, la cual minimiza T sobre la región indicada, en el caso de la variable flujo el valor óptimo es de 1,55 mL/min, 3,48 °C de temperatura, pH de la fase móvil 2,4, proporción de la fase móvil (94:6 Buffer: Metanol) y fase estacionaria C8.

Además, en el gráfico podemos observar las zonas donde el método es óptimo (cima y zonas frías) para este caso, la asimetría tiene un valor de 1.1 que son las zonas frías donde el pico de metronidazol será simétrico, las zonas calientes de color rojo serán las zonas donde el valor de la asimetría será mayor. El porcentaje de B y la fase estacionaria no aparecen en la gráfica por lo que se consideran como valores fijos.

- Resolución (RS)



**Gráfico 37-3.** Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia para la resolución

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 37-3 se observa el Diagrama de Pareto Estandarizado para la resolución, donde el porcentaje de orgánico se lo precisa como un factor fijo ya que, supera el límite marcado considerándolo como estadísticamente significativo, es decir un cambio en este va influir de manera negativa sobre la variable respuesta evaluada, de la misma manera la interacción del pH de la fase móvil y el porcentaje de orgánico (CD), van influir de manera negativa sobre la resolución y el pH de la fase móvil va a tener un efecto positivo sobre la RS. En conclusión, los factores y sus interacciones mencionados anteriormente, al tener una variación en el rango de estudio van a afectar en la resolución del metronidazol.

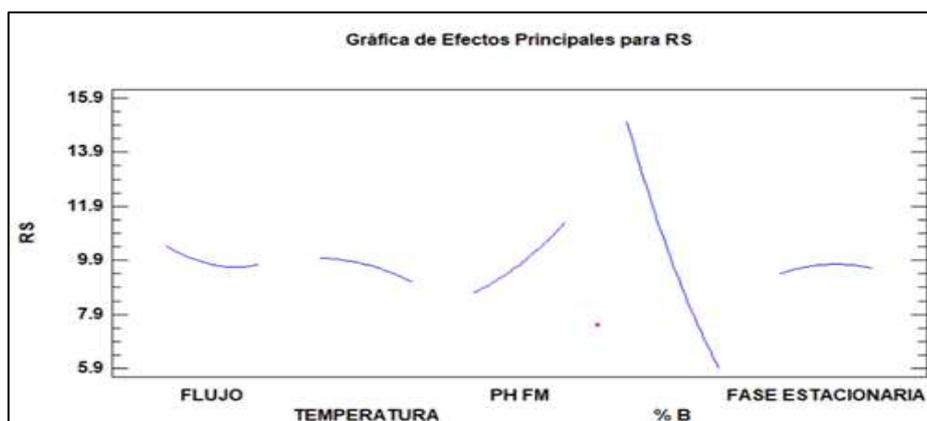
**Tabla 9-3:** ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para RS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: FLUJO	0.928177	1	0.928177	0.51	0.4928
B: TEMPERATURA	1,52036	1	1,52036	0.84	0.3840
C:PH FM	13,4333	1	13,4333	7.40	0.0236
D: % B	162.446	1	162.446	89.46	0.0000
E: FASE ESTACIONARIA	0.0672951	1	0.0672951	0.04	0.8516
AA	2,75649	1	2,75649	1.52	0.2491
AB	4,20377	1	4,20377	2.32	0.1625
AC	0.656834	1	0.656834	0.36	0.5624
AD	1,88304	1	1,88304	1.04	0.3351
AE	0.0171473	1	0.0171473	0.01	0.9247
BB	1,03897	1	1,03897	0.57	0.4687
BC	0.542291	1	0.542291	0.30	0.5980
BD	2,01984	1	2,01984	1.11	0.3191
BE	0.577691	1	0.577691	0.32	0.5865
CC	1,67329	1	1,67329	0.92	0.3622
CD	15,0199	1	15,0199	8.27	0.0183

CE	5,30847	1	5,30847	2.92	0.1215
DD	12	1	12,1674	6.70	0.0293
DE	0.098741	1	0.098741	0.05	0.8208
EE	1,32312	1	1,32312	0.73	0.4155
Error total	16,3428	9	1,81587		
Total (corr.)	573.006	29			

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En la tabla (9-3) de ANOVA se puede observar la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. Para este caso, cuatro factores presentan un valor-P menor que 0.05 demostrando así que son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95.0%. Es decir, el pH de la fase móvil, el % de B y las interacciones (CD) y (DD) afectaran sobre el rendimiento del método en este caso tendrá un efecto sobre la resolución provocando que la separación entre los componentes de la muestra no sea buena.

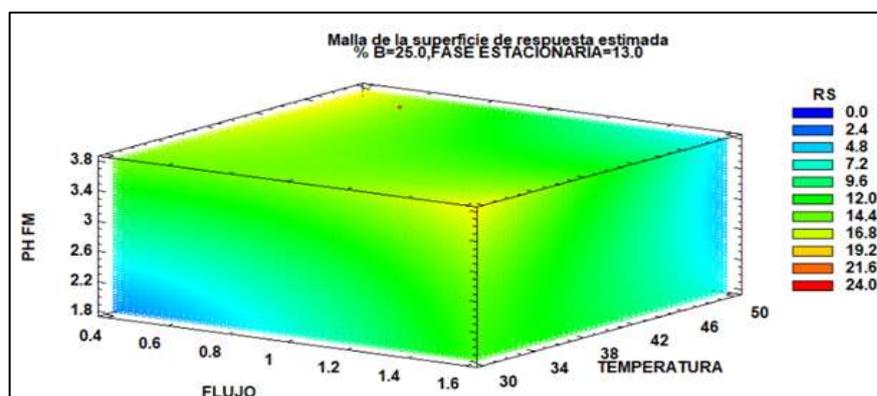


**Gráfico 38-3.** Gráfica de los Efectos Principales para la resolución sobre los factores evaluados

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 38-3 de los efectos principales para la resolución se puede observar cómo los factores evaluados afectan la variable de estudio al subir o bajar de nivel. La curva del pH de la fase móvil es positiva ya que, se obtiene una resolución mejor si sube de nivel, por el contrario, el flujo, la temperatura y el % de orgánico presentan una curva negativa lo cual, indica que al aumentar estos factores la separación entre los picos no es buena. Finalmente, al cambiar de fase estacionaria la resolución aumenta hasta llegar a su punto máximo donde luego, tiende a descender.

- Optimización RS



**Gráfico 39-3.** Malla de la superficie de respuesta para la resolución

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

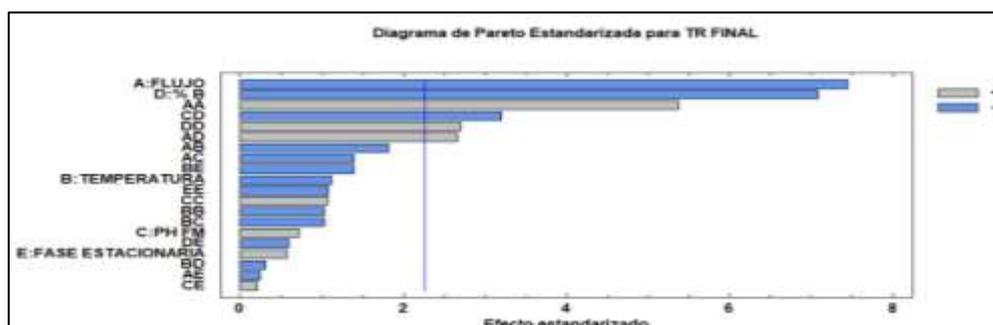
**Tabla 10-3:** Condiciones óptimas para maximizar la resolución

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
FLUJO	0,441637	1,55836	0,441637
TEMPERATURA	30.694	49.306	33,6884
PH FM	1,8694	3,7306	3,7306
% B	6,3879	43,6121	6,60013
FASE ESTACIONARIA	3,69395	22.306	18,8177

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En la tabla 10-3 se puede observar la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza la resolución para obtener un pico de metronidazol con una resolución mejor el valor óptimo del flujo es de 0,44 mL/min, 33,68 °C de temperatura, pH de la fase móvil en una proporción (94:6 Buffer: Metanol) y fase estacionaria C18. Por otra parte, en el gráfico (31-3) se puede tasar los puntos donde el método es óptimo, siendo las zonas calientes el punto donde se obtendrá una resolución mejor y las zonas frías con una resolución menor.

- Tiempo de retención (TR)



**Gráfico 40-3.** Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia para retención final.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

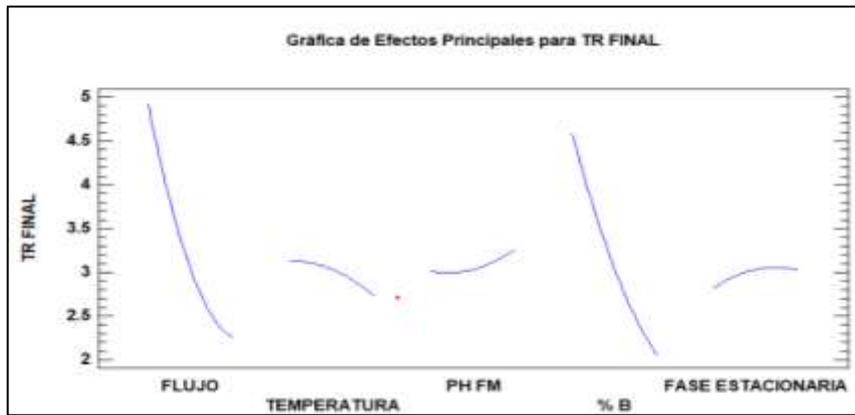
En el gráfico 40-3 se observa el Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención, siendo el de mayor influencia el flujo y el % de B ya que, superan la línea vertical teniendo un efecto negativo sobre la variable respuesta. Las interacciones flujo (AA), pH de la fase móvil y % B (CD), % de orgánico (DD) y flujo con % de B (AD) tendrán un efecto positivo y negativo respectivamente. Es decir, los factores e interacciones que superan la línea vertical mantendrán un efecto significativo al variar o cambiar en el intervalo de estudio por lo que, se considerarán como valores fijos.

**Tabla 11-3:** ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para el TR final

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: FLUJO	13,8366	1	13,8366	55.36	0.0000
B: TEMPERATURA	0.311294	1	0.311294	1.25	0.2933
C: PH FM	0.128484	1	0.128484	0.51	0.4916
D: % B	12,5352	1	12,5352	50.15	0.0001
E: FASE ESTACIONARIA	0.080569	1	0.080569	0.32	0.5841
AA	7,22788	1	7,22788	28.92	0.0004
AB	0.829013	1	0.829013	3.32	0.1019
AC	0.486303	1	0.486303	1.95	0.1965
AD	1,78064	1	1,78064	7.12	0.0257
AE	0.0154494	1	0.0154494	0.06	0.8092
BB	0.266655	1	0.266655	1.07	0.3286
BC	0.262286	1	0.262286	1.05	0.3324
BD	0.0228628	1	0.0228628	0.09	0.7692
BE	0.484387	1	0.484387	1.94	0.1973
CC	0.287648	1	0.287648	1.15	0.3113
CD	2,57042	1	2,57042	10.28	0.0107
CE	0.0100959	1	0.0100959	0.04	0.8452
DD	1,81992	1	1,81992	7.28	0.0245
DE	0.0887528	1	0.0887528	0.36	0.5659
EE	0.289039	1	0.289039	1.16	0.3102
Error total	2,24957	9	0.249952		
Total (corr.)	100.799	29			

**Realizado por:** Díaz, Claudia, 2022.

En la tabla 11-3 se puede comprobar mediante el análisis de varianza como los factores mencionados en el Diagrama de Pareto tienen significancia estadística. En este caso, 6 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo tanto, una variación o cambio en estos y sus combinaciones tendrán un efecto sobre la variable respuesta dando picos con un tiempo de retención alto afectando la calidad de separación entre los analitos.

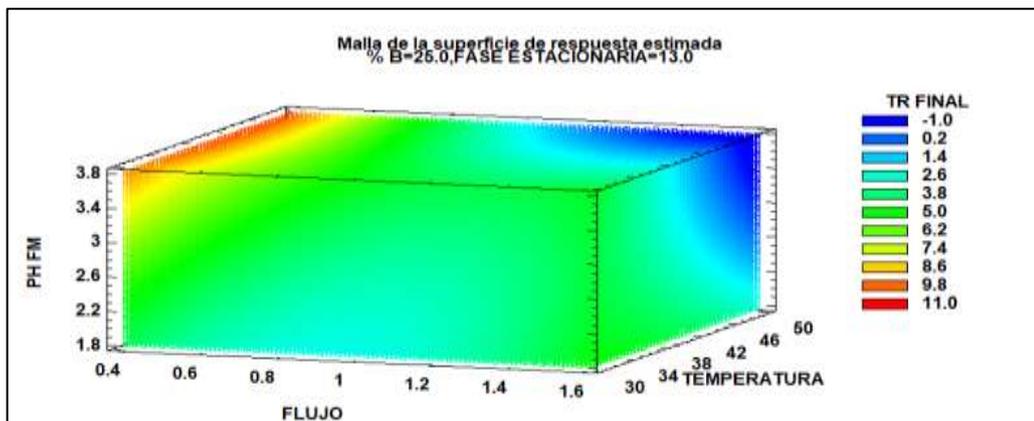


**Gráfico 41-3.** Gráfica de los Efectos Principales para el tiempo de retención final sobre los factores evaluados.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 40-3 que corresponde a los Efectos Principales para el tiempo de retención, se observa en el eje de las abscisas los factores evaluados y como tienen un efecto sobre la variable respuesta cuando pasan de un nivel bajo a un nivel alto. El flujo, la temperatura y el porcentaje de orgánico presentan una curva negativa, es decir, al aumentar estos factores el tiempo de retención disminuye. Para el pH de la fase móvil pasa lo contrario al aumentar este, el valor del TR incrementa y finalmente, al cambiar de fase estacionaria el tiempo de retención aumenta hasta llegar a su punto máximo donde tiende a disminuir.

- Optimización TR final



**Gráfico 42-3.** Malla de la superficie de respuesta para el tiempo de retención final

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

**Tabla 12-3:** Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención final

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
FLUJO	0,441637	1,55836	1,55836
TEMPERATURA	30.694	49.306	49.306

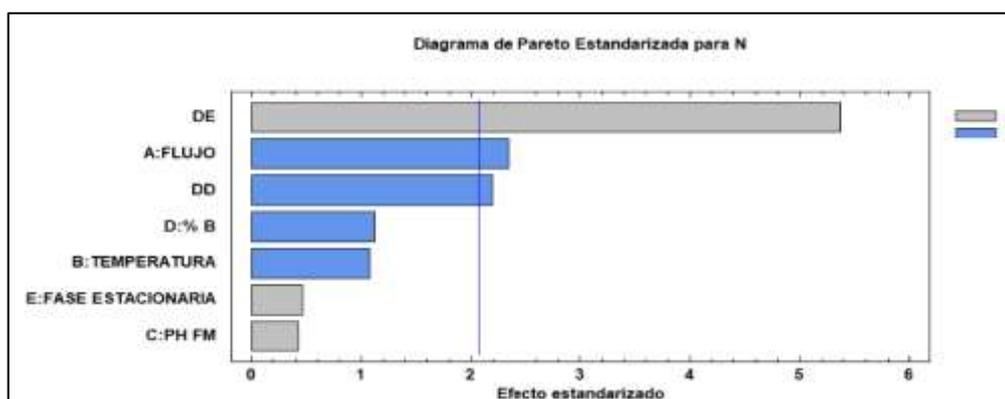
PH FM	1,8694	3,7306	3,71788
% B	6,3879	43,6121	25,4772
FASE ESTACIONARIA	3,69395	22.306	5,76533

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

Esta tabla 12-3 se muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual minimiza el tiempo de retención final, en el caso de la variable flujo el valor óptimo es de 1,55 mL/min, 49,30 °C de temperatura, pH de la fase móvil 3,7, proporción de la fase móvil (75:25 Buffer: Metanol) y fase estacionaria C8. Además, en el gráfico (34-3) podemos observar las zonas donde el método es óptimo (cima y zonas frías), las zonas frías donde el pico de metronidazol tendrá un tiempo de retención bajo, es decir, se obtendrá buenas separaciones entre los picos y las zonas calientes de color rojo serán las zonas donde el tiempo de retención será mayor. El porcentaje de B y la fase estacionaria no aparecen en la gráfica por lo que se consideran como valores fijos.

*Miconazol Nitrato (MN)*

- Número de platos teóricos (N)



**Gráfico 43-3.** Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia para el número de platos teóricos

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

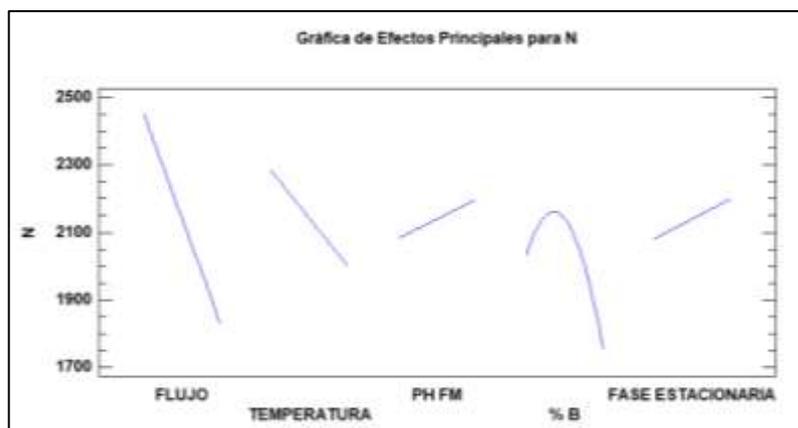
En el gráfico 43-3 se observa el Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos, en donde la combinación de orgánico y fase estacionaria (DE), tienen mayor influencia sobre el valor de N por lo que, se considera un valor fijo ya que, un cambio o una variación en este, afectaría de manera positiva sobre la variable respuesta evaluada. El flujo y la interacción (DD) también superan el límite marcado como estadísticamente significativo teniendo una influencia negativa. Para evidenciar la significancia de este factor y las interacciones se analizará la tabla ANOVA.

**Tabla 13-3:** ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para N

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: FLUJO	1.65918E6	1	1.65918E6	5.49	0.0286
B: TEMPERATURA	347800.	1	347800.	1.15	0.2950
C: PH FM	55776.6	1	55776.6	0.18	0.6717
D: % B	379597.	1	379597.	1.26	0.2745
E: FASE ESTACIONARIA	65501.4	1	65501.4	0.22	0.6461
DD	1.45421E6	1	1.45421E6	4.81	0.0391
DE	8.70632E6	1	8.70632E6	28.81	0.0000
Error total	6.64887E6	22	302221.		
Total (corr.)	1.7943E7	29			

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En la tabla 13-3 se puede verificar mediante los resultados del análisis de varianza como el flujo y las interacciones (DD) y (DE) tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Por lo tanto, al modificar o cambiar éstos en el rango de estudio, tendrán un efecto significativo sobre el rendimiento del método afectando la eficiencia y contribuyendo al ensanchamiento del pico.



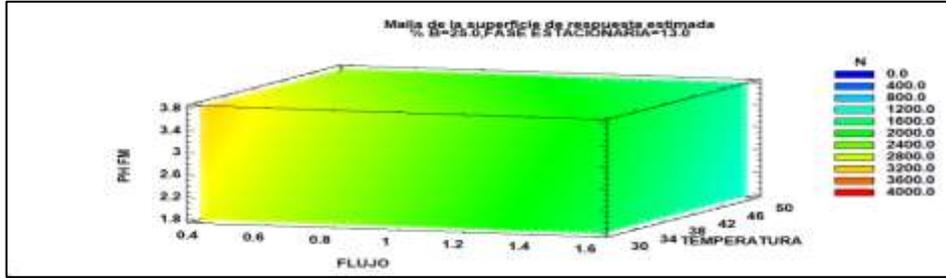
**Gráfico 44-3.** Gráfica de los efectos principales para el número de platos teóricos sobre los factores evaluados.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 44-3 de los efectos principales se puede observar cómo los factores evaluados (flujo, temperatura, pH de la fase móvil, % de B y fase estacionaria) influyen sobre el número de platos teóricos. La pendiente de la recta del pH de la fase móvil y la fase estacionaria es positiva, es decir, el número de platos teóricos aumenta cuando estos factores suben de nivel. Para el flujo y temperatura sucede lo contrario, la pendiente de la recta es negativa lo cual, indica que estos factores influyen en la variable respuesta cuando a mayor flujo y temperatura la cantidad de platos

teóricos disminuye. Finalmente, el % de B al aumentar su valor, aumenta el número de platos teóricos, hasta llegar a su punto máximo donde tiende a disminuir.

- Optimización N



**Gráfico 45-3.** Malla de la superficie de respuesta para el número de platos teóricos

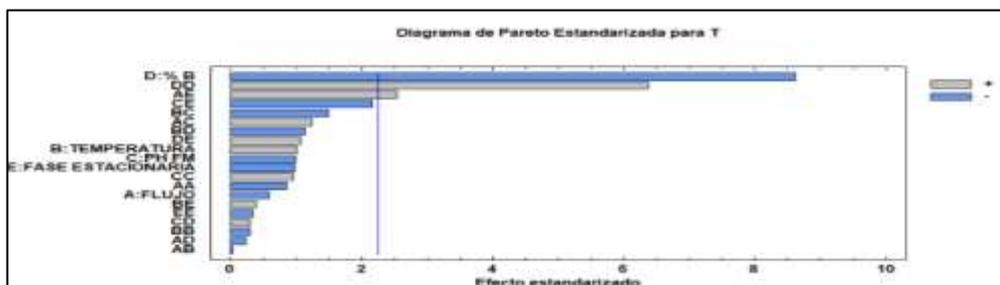
Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

**Tabla 14-3:** Condiciones óptimas para maximizar el número de platos teóricos

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
FLUJO	0,441637	1,55836	0.441637
TEMPERATURA	30.694	49,306	38,8042
PH FM	1,8694	3,7306	1,97038
% B	6,3879	43,6121	6,63763
FASE ESTACIONARIA	3,69395	22.306	3,69395

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

Esta tabla 14-3 muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza N sobre la región indicada, el valor óptimo de flujo es de 0,4 mL/min, temperatura 38,80 °C, pH de la fase móvil 1,9, fase móvil en una proporción (94:6 Buffer: Metanol) y fase estacionaria C8. En el gráfico 44-3 se logra observar los puntos donde el método es óptimo cima y zonas frías para obtener, un pico de miconazol nitrato eficiente con mayor número de platos teóricos.



**Gráfico 46-3.** Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 46-3 se observa el Diagrama de Pareto para la asimetría, donde los factores evaluados y sus interacciones influyen de manera positiva o negativa sobre la variable respuesta. El % de B es el de mayor influencia y se le describe como un valor fijo ya que, supera el límite marcado siendo, estadísticamente significativo. Las interacciones (DD) y (AE), afectan de manera positiva sobre el rendimiento del método. Además, la combinación del pH y la fase estacionaria (CE), está muy cercano a la línea con una influencia negativa.

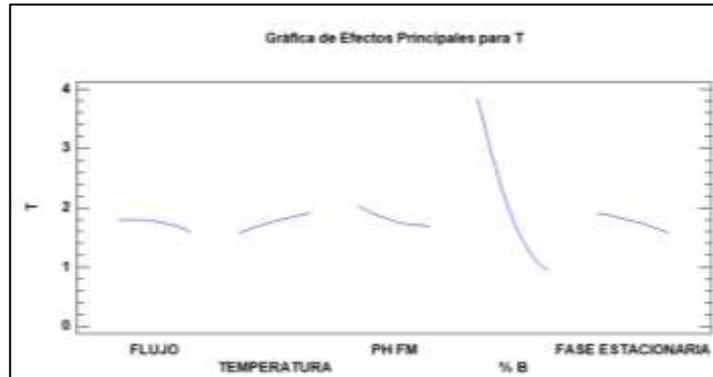
**Tabla 15-3:** ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para T

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: FLUJO	0.0751428	1	0.0751428	0.34	0.5764
B: TEMPERATURA	0.229376	1	0.229376	1.03	0.3376
C: PH FM	0.222868	1	0.222868	1.00	0.3442
D: % B	16,6374	1	16,6374	74.40	0.0000
E: FASE ESTACIONARIA	0.213783	1	0.213783	0.96	0.3538
AA	0.16366	1	0.16366	0.73	0.4145
AB	0.0000624914	1	0.0000624914	0.00	0.9870
AC	0.346146	1	0.346146	1.55	0.2449
AD	0.011947	1	0.011947	0.05	0.8224
AE	1,44609	1	1,44609	6.47	0.0316
BB	0.018368	1	0.018368	0.08	0.7809
BC	0.497235	1	0.497235	2.22	0.1701
BD	0.28609	1	0.28609	1.28	0.2873
BE	0.0322469	1	0.0322469	0.14	0.7129
CC	0.198644	1	0.198644	0.89	0.3706
CD	0.0190774	1	0.0190774	0.09	0.7769
CE	1,04101	1	1,04101	4.66	0.0593
DD	9,10199	1	9,10199	40.70	0.0001
DE	0.253626	1	0.253626	1.13	0.3146
EE	0.0245765	1	0.0245765	0.11	0.7478
Error total	2,01267	9	0.22363		
Total (corr.)	42,1605	29			

**Realizado por:** Díaz, Claudia, 2022.

En la tabla (15-3) se puede comprobar mediante los resultados del análisis de varianza como los factores y sus interacciones mencionados en el Diagrama de Pareto tienen significancia sobre la variable evaluada, por lo tanto, 3 efectos (% de B, DD, AE) tienen un valor-P menor que 0.05,

indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%, una variación de estos, causaría que la forma del pico del miconazol nitrato sea asimétrica con un factor de coe alto.

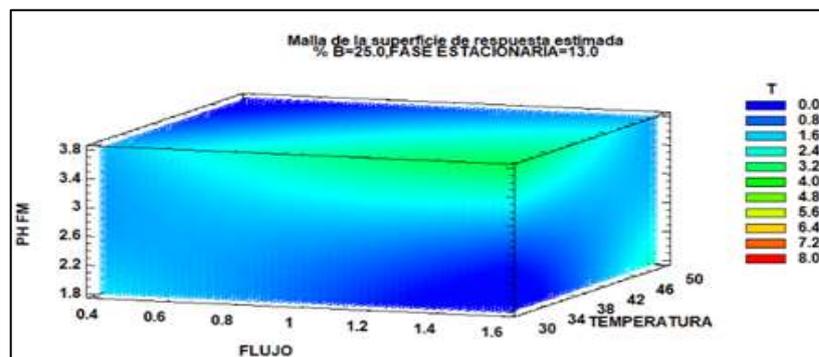


**Gráfico 47-3.** Gráfica de los Efectos Principales para la asimetría sobre los factores evaluados.

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 47-3 de los efectos principales para la asimetría se observa en el eje de las X los factores (flujo, temperatura, pH, % B y fase estacionaria) y como estos evolucionan al subir o bajar de nivel. Al aumentar el flujo, pH de la fase móvil, % de B y fase estacionaria, se obtendrá un pico simétrico si estos factores están en un nivel bajo. Para la temperatura sucede, lo contrario a mayor temperatura aumentará la asimetría obteniendo una forma de pico deficiente.

- Optimización T



**Gráfico 48-3.** Malla de la superficie de respuesta para la asimetría

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

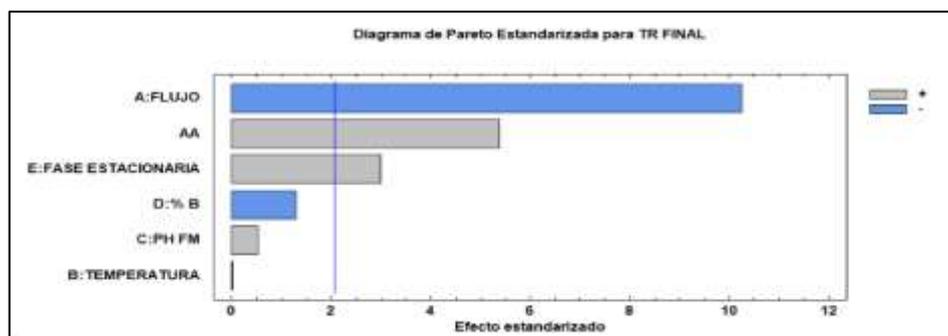
**Tabla 16-3:** Condiciones óptimas para minimizar la asimetría

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
FLUJO	0,441637	1,55836	0.485987
TEMPERATURA	30.694	49,306	32,3877

PH FM	1,8694	3,7306	3,7306
% B	6,3879	43,6121	25.982
FASE ESTACIONARIA	3,69395	22.306	22.306

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

Esta tabla 16-3 se observa la combinación de los niveles de los factores, la cual minimiza T sobre la región indicada, en el caso de la variable flujo el valor óptimo es de 0,48 mL/min, 32,38 °C de temperatura, pH de la fase móvil 3,7, proporción de la fase móvil (75:25 Buffer: Metanol) y fase estacionaria C18. Además, en el gráfico (40-3) podemos observar las zonas donde el método es óptimo (cima y zonas frías), de color azul se observa las zonas frías donde el valor de la asimetría será mejor y las zonas calientes donde el valor de T aumenta. El porcentaje de B y la fase estacionaria no aparecen en la gráfica por lo que se consideran como valores fijos con un % de orgánico de 25 y fase estacionaria C18. Tiempo de retención



**Gráfico 49-3.** Diagrama de Pareto Estandarizado de los factores de influencia para la resolución

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 49-3 se observa el diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención, siendo el flujo el factor de mayor influencia ya que, supera el límite considerándose estadísticamente significativo. La interacción (AA) y la fase estacionaria afectara de manera positiva sobre la variable respuesta evaluada. Por lo tanto, una variación en estos factores en el rango de estudio actuara directamente sobre el tiempo de retención.

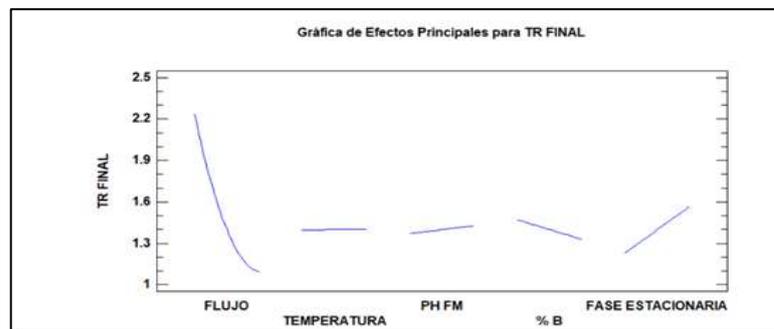
**Tabla 17-3:** ANOVA de los resultados del análisis de Varianza para el TR final

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: FLUJO	6,15709	1	6,15709	105.09	0.0000
B: TEMPERATURA	0.00000146973	1	0.00000146973	0.00	0.9960
C:PH FM	0.0160836	1	0.0160836	0.27	0.6053
D: % B	0.09539	1	0.09539	1.63	0.2147

E: ESTACIONARIA	FASE	0.524081	1	0.524081	8.95	0.0065
AA		1,69325	1	1,69325	28.90	0.0000
Error total		1,3475	23	0.0585871		
Total (corr.)		9,83343	29			

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

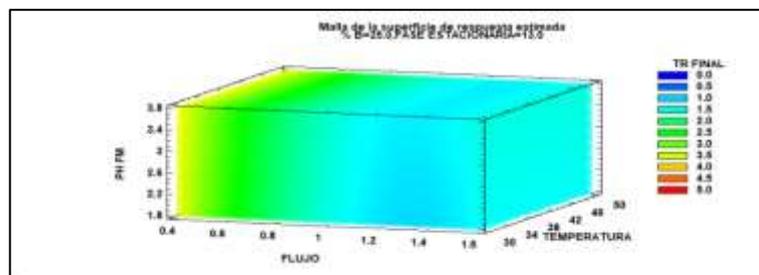
En la tabla 17-3 se puede observar como el flujo, fase estacionaria y la interacción AA, afectan de manera significativa sobre el tiempo de retención ya que, presentan un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con nivel de confianza del 95.0%.



**Gráfico 50-3.** Gráfica de los Efectos Principales para el tiempo de retención final sobre los factores evaluados

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En el gráfico 50-3 de los Efectos Principales para el tiempo de retención, se puede ver como al aumentar el flujo y % de B, el tiempo de retención disminuye, por lo contrario, sucede con la fase estacionaria que presenta una pendiente positiva, es decir, a mayor fase estacionaria C18 mayor será el tiempo de retención. Finalmente, los factores temperatura y pH de la fase móvil presentan una pendiente casi horizontal por lo que, se consideran, como factores que no afectan de manera significativa sobre la variable respuesta evaluada. Optimizar TR final



**Gráfico 51-3.** Malla de la superficie de respuesta para el tiempo de retención final

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

**Tabla 18-3:** Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención final

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
FLUJO	0,441637	1,55836	1,3018
TEMPERATURA	30.694	49,306	30,8846
PH FM	1,8694	3,7306	1,8694
% B	6,3879	43,6121	43,6121
FASE ESTACIONARIA	3,69395	22.306	3,69457

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En la tabla (18-3) se observa las condiciones óptimas donde el tiempo de retención disminuye, con un flujo de 1,30 mL/min, temperatura 30,88 °C, pH de la fase móvil 1,8 porcentaje de la fase móvil 43% y fase estacionaria C8. De igual manera, en el gráfico (43-3) de superficie respuesta se puede ver las zonas óptimas donde disminuye la variable evaluada. Las zonas frías de color azul son las condiciones idóneas, mientras que las zonas calientes es la región donde el tiempo de retención aumenta.

### 3.1.6. Selección de puntos de trabajo

A través, del análisis de superficie respuesta se estableció que existen dos condiciones óptimas de puntos de trabajo la inicial y la final las cuales se analizan a continuación:

**Tabla 19-3:** Selección de los puntos de trabajo para el desarrollo del método

Condiciones de operación	Parámetros iniciales para el desarrollo del método analítico	Parámetros finales elegidos para el desarrollo del método analítico
Fase estacionaria	Columna Purospher C18 (5µm;150-4,6 mm)	Columna Purospher C18 (5µm;150-4,6 mm)
Flujo	1 ml/min	1.3 ml/min
Detector	220 nm	220 nm
Volumen de inyección	20 ul	20 ul
Temperatura	45 °C	38 °C
Tiempo	6 minutos	10 minutos
Composición de la fase móvil	Buffer H <sub>3</sub> P0 <sub>4</sub> pH 2,8 (Buffer: Metanol) 75: 25	Buffer H <sub>3</sub> P0 <sub>4</sub> pH 3,7 (Buffer: Metanol) 85: 15

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

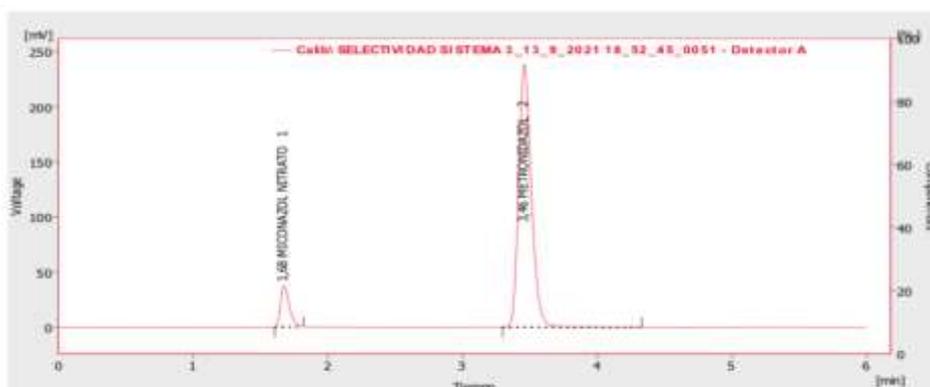
En la tabla 19-3 se observa los parámetros finales seleccionados a través del análisis de superficie respuesta los cuales se encuentran dentro del MODR con un flujo de 1,3 mL/min; temperatura 38 °C; pH de la fase móvil 3,7; proporción de la fase móvil (85:15 Buffer: Metanol) a 220 nm, con una con Purospher C18.

El pico del miconazol nitrato y metronidazol con un tiempo de retención de 1,41 y 5,00 min presentaron una buena resolución, el valor de  $As= 1,2$  del MTZ indica que el pico es simétrico y no presenta factor de coleo, sin embargo, el MN presentó una asimetría de  $As= 2,6$  indicando una forma de pico inaceptable, además, los dos analitos presentaron una buena eficiencia. No obstante, al trabajar con un pH de 3,7 se debe tener cuidado ya que, al ser un punto crítico un cambio brusco puede afectar la separación entre los picos y dañar la columna.

Al comparar las condiciones de trabajo iniciales con las finales, se puede observar que el desarrollo empírico inicial los tiempos de retención de los analitos son menores ya que, el MTZ presenta un tiempo de elución de 3,45 min y el miconazol nitrato de 1,68 min aunque, el MN se demora en eluir en estas condiciones los valores de asimetría son mejores 1,71 para el MN y 1,38 para el MTZ el número de platos teóricos es mejor en las condiciones iniciales lo que conlleva, a una buena eficiencia de la columna, la resolución entre los picos es de  $Rs= 12,05$  lo que significa que existe una buena separación entre los analitos.

De forma similar, al comparar el área bajo la curva de los métodos, las condiciones iniciales presentaron una AUC mejor lo que nos da una concepción de la anchura de los picos y el método empírico no presentó ensanchamiento de los picos en su base.

Los dos métodos cumplen con los objetivos de los CQA planteados pero, las condiciones de trabajo iniciales exhiben un método más óptimo. Además, al analizar los gráficos mencionados anteriormente, se observó el % de la fase orgánica y la fase estacionaria son factores que influyen sobre las respuestas evaluadas, por lo tanto, se deben considerar como fijos para no tener problemas en el desarrollo del método.



**Gráfico 52-3.** Cromatograma del método analítico inicial

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.



**Gráfico 53-3.** Cromatograma del método analítico final

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En concreto, de todo el diseño experimental se llegó a tener dos condiciones de trabajo y el desarrollo empírico inicial se ratificó como el mejor el cual, pasa a la siguiente etapa de Selectividad que es la primera fase de la Validación.

### 3.1.7. Estrategia de control

Se identificaron los CCP que afectan el desarrollo del método analítico: pH de la fase móvil, flujo, temperatura, % de orgánico y fase estacionaria siendo el pH de la fase móvil y porcentaje de orgánicos parámetros críticos para el cumplimiento de los CQA. Además, se consideró como factores fijos el % de orgánico y fase estacionaria que se deben mantener dentro del rango para asegurar que se cumplan con los CQA.

### 3.1.8. Ensayo de Selectividad

Como se menciona en el ensayo de selectividad al comparar las seis respuestas del principio activo solo, con las del placebo cargado se ha obtenido los siguientes resultados:

**Tabla 20-3:** Resultados del ensayo de Selectividad

Criterio de Aceptación	Resultado		Decisión
Interferencia con el placebo	Aparece un pico de un excipiente presente en el placebo, en medio de las muestras, pero no interfiere con los principios activos. ANEXO G		Cumple
	STD MN vs Placebo cargado	STD MTZ vs Placebo cargado	
Prueba F para varianzas de dos muestras $p$ (valor) $\geq 0,05$	AUC= 0,37079504 As= 0,21436725 N° Platos teóricos=	AUC= 0,201392138 As= 0,2737757 N°Platos teóricos=	Cumple

	0,067654688	0,21426776	
Test de Student p (valor) $\geq$ 0,05	AUC = 0,13824456 As= 0,878178601 N° Platos teóricos= 0,64392447	AUC= 0,172763314 As= 0,18206313156 N° Platos teóricos= 0,1335474	Cumple
Porcentaje de discrepancia $\leq$ 5%	AUC= 0,795% Tiempos= 0,526%	AUC= 0,668% Tiempos= 0,361%	Cumple

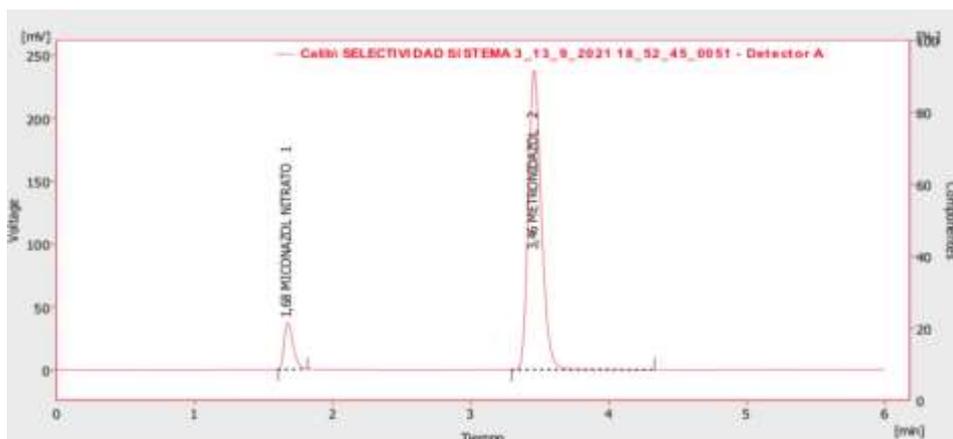
Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

En la tabla 20-3 podemos observar los resultados del ensayo de Selectividad en el primer criterio se analizó la interferencia con el placebo al observar los cromatogramas se evidencio que en el placebo existe un pico que empieza a salir a partir de la cuarta inyección, pero sale en medio de los dos picos con una  $R_s = 7,73$  pero, no interfiere con los datos de los dos principios activos. Similar a lo que (AEFI 2001, p. 46) menciona que un método analítico es selectivo cuando es reconoce únicamente la respuesta proporcionada por el analito sin interferencia de otras sustancias relacionadas con él de una u otra forma.

De igual manera, al realizar la prueba F se determinó que existe homogeneidad de varianzas ya que, con un valor de  $p \geq 0,05$  no es estadísticamente significativo por lo que, se realizó la prueba T de Student entre el estándar combinado y el placebo cargado y con un valor de  $p \geq 0,05$  se demostró que no existe diferencia significativa entre ambas muestras con una confianza del 95% por ende, la solución del placebo cargado corresponde al de la solución estándar.

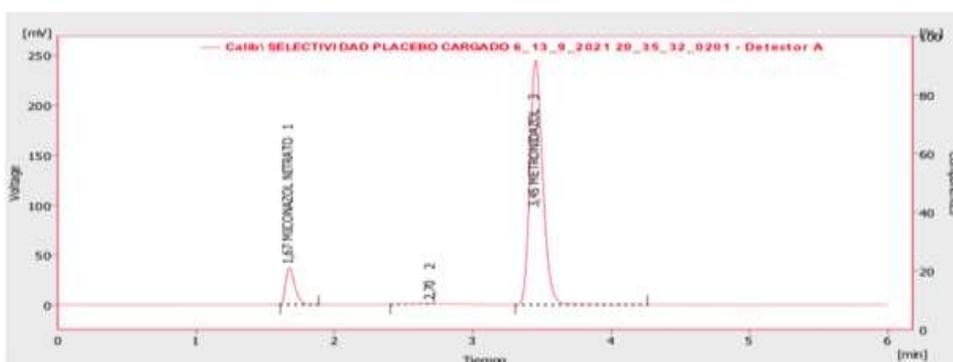
Finalmente, se determinó el porcentaje de discrepancia de las áreas bajo la curva de los principios activos, para el miconazol nitrato fue de 0,795% y 0,668% para el metronidazol y para el tiempo de retención fue de 0,526% y 0,361% para el MN y MTZ respectivamente, lo que significa que no existe diferencia significativa entre el placebo cargado y el estándar debido a que, no superan el criterio de aceptación  $\leq 5\%$ ,

En conclusión, mediante todo el análisis se puede afirmar que el método analítico es selectivo ya que, ningún componente del placebo interfiere con los analitos de interés.



**Gráfico 54-3.** Cromatograma Selectividad del Sistema

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.



**Gráfico 55-3.** Cromatograma Selectividad del Placebo Cargado

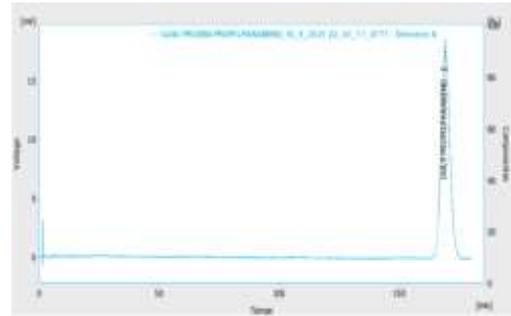
Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

- Inyección de los componentes individuales

Como se mencionó anteriormente también se inyectó los componentes individuales que forman parte de la emulsión. Como se puede observar en el Anexo E tanto el, methocel, span 80, tween 80, polawax, alcohol cetosteárico y propilenglicol al tratarse, de compuestos no cromóforos no son detectados, salvo el Metilparabeno y Propilparabeno los cuales en el tiempo de elución de trabajo normal no interfieren con los principios activos.

### 3.1.8.1. Estudio de los parabenos

Con el objetivo de elucidar el tiempo de retención de los parabenos, debido a que en el ensayo de Selectividad en la inyección del placebo se detecta picos muy pequeños, se incrementó la concentración de los parabenos desde el punto de vista investigativo a 1,75 mg/ml para el metilparabeno y 0,25 mg/ml para el propilparabeno.



**Gráfico 56-3.** Cromatogramas del metilparabeno y propilparabeno

Realizado por: Díaz, Claudia, 2022.

Como podemos observar en el gráfico 56-3, el metilparabeno eluye a los 22,678 min y el propilparabeno presenta un tiempo de retención de 168,9 min lo que, nos determina que en la prueba de Selectividad el metilparabeno, puede estar eluyendo a partir, de la cuarta inyección de la muestra, pero a medida que este eluye no interfiere en los tiempos de retención de los picos del metronidazol y miconazol nitrato, por tal razón, en base a la resolución entre el metronidazol y el metilparabeno a partir, de la cuarta inyección cumple el ensayo de Selectividad.

## CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se logró la separación y análisis simultáneo de metronidazol y miconazol nitrato presentes en una emulsión farmacéutica, con la aplicación de los principios del QbD, aplicados mediante cromatografía fase reversa usando una fase estacionaria Purospher C18 (5 $\mu$ m; 150-4,6 mm) a 220 nm, con un flujo de 1,0 mL/min, temperatura 45 °C, fase móvil (75:25 Buffer: Metanol pH 2,8).
- Con el método analítico desarrollado se pudo determinar de manera efectiva los analitos tanto del metronidazol y miconazol nitrato del resto de sus componentes de la emulsión farmacéutica, con parámetros cromatográficos satisfactorios con tiempos de retención de 3,45 min para el metronidazol y 1,68 min para el miconazol nitrato y una resolución de 12,05.
- Se identificaron los principales parámetros críticos del proceso que afectan al método analítico; el porcentaje de orgánico y pH de la fase móvil con un RPN de 384 y 286 respectivamente, se los consideró como un tipo de riesgo crítico. El tipo de fase estacionaria y flujo con un RPN de 144 y la temperatura con un valor de 72 se les asignó un tipo de riesgo mayor.
- Se determinó el grado de selectividad en el método analítico desarrollado empleando los parámetros que establece la AEFI, en el que se evaluó el % de discrepancia entre las áreas bajo la curva del placebo y placebo cargado frente a los estándares respectivos, para el cual se obtuvo un % de discrepancia del 0,795% para el miconazol nitrato y 0,668% para el metronidazol, en consecuencia, no existió interferencia entre los excipientes y los tiempos de retención de los analitos.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para la etapa de Validación y posterior análisis rutinario en la evaluación de los conservantes se sugiere que al momento de la valoración del metilparabeno se realice una corrida individualizada de 30 minutos y para el propilparabeno dependerá de los recursos empresariales y el tiempo de corrida.
- Se recomienda trabajar con la proporción de orgánico estudiada y no cambiar de columna ya que, puede tener efectos significativos sobre los resultados.
- Una vez desarrollado el método analítico mediante la directriz ICH Q8, y demostrado su selectividad se recomienda continuar con los ensayos de Validación del método analítico categoría 1, para demostrar su robustez y aplicabilidad en la evaluación cuantitativa de los resultados.

## BIBLIOGRAFÍA

**ACOFARMA.** *Ficha de información técnica.* Tween. *Acofarma*, 2013 [en línea]. [Consulta: 3 septiembre 2021]. Disponible en: <https://www.sefh.es/fichadjuntos/TWEEN80.pdf>.

**AEFI.** *Validación de Métodos.* 2021 [en línea]. [Consulta: 10 septiembre 2021]. Disponible en: [https://www.academia.edu/10365264/Validacion\\_de\\_Metodos\\_Analiticos\\_Asociacion\\_Espanola\\_de\\_Farmaceuticos\\_de\\_la\\_Industria](https://www.academia.edu/10365264/Validacion_de_Metodos_Analiticos_Asociacion_Espanola_de_Farmaceuticos_de_la_Industria).

**AKAY, C et al.** *Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC.* *Farmaco*, 2002, 57(11), pp. 953-957.

**AL-BADR, A.** *Miconazole Nitrate: Comprehensive Profile.* *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 2005, 32(05), pp. 1-66.

**ALFONSO, M.** *Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura.* *Minerva. Repositorio Institucional Da Usc*, 2008, 72(5), pp. 1-130.

**ALMODOVAR, L. Y HERNÁNDEZ, A.** *Evaluación Del Comportamiento Del Estearato De Trietanolamina Y Alcohol Cetílico En Emulsiones Cosméticas.* 2013.

**AYORA, M.** *Técnicas Cromatográficas.* 2010. [en línea]. Disponible en: [http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia\\_archivos/Quimica\\_analitica\\_ambiental/Tema6.pdf](http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica_analitica_ambiental/Tema6.pdf).

**BARQUERO, M.** *Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía líquida de alto desempeño* [en línea]. 2004. 1ed. San José: Universidad de Costa Rica. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=Q6UlxfaxvkIC&pg=PA2&dq=Ecuación+de+van+Deemter&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiZ3dOy7\\_TyAhU7STABHefPCLcQ6wF6BAGDEAE#v=onepage&q=Ecuación+de+van+Deemter&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=Q6UlxfaxvkIC&pg=PA2&dq=Ecuación+de+van+Deemter&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiZ3dOy7_TyAhU7STABHefPCLcQ6wF6BAGDEAE#v=onepage&q=Ecuación+de+van+Deemter&f=false).

**BRITAIN, H.** *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology* [en línea]. 2020. Academic Press. Disponible en: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=VwnWDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Profiles+of+Drug+Substances,+Excipients+and+Related+Methodology&ots=dnvCGDz4Qq&sig=zp14mUs0oPVBakrQk7f1FRrW\\_aQ#v=onepage&q=Profiles+of+Drug+Substances%2C+Excipients](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=VwnWDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Profiles+of+Drug+Substances,+Excipients+and+Related+Methodology&ots=dnvCGDz4Qq&sig=zp14mUs0oPVBakrQk7f1FRrW_aQ#v=onepage&q=Profiles+of+Drug+Substances%2C+Excipients)

and Related Metho.

**CHROMACADEMY.** *Instrumentation of HPLC Detectors.* Crawford Scientific 2014, [en línea]. Disponible en: <https://www.chromacademy.com/channels/hplc-training-courses/>.

**CHROMACADEMY.** *The Theory of HPLC: Chromatographic Parameters.* Crawford Scientific, 2014b. pp. 23.

**CORZO, ADRIANA.** *Técnicas de análisis en química orgánica: cromatografía.* 2019.

**DASH, A.; et al.** *Pharmaceutics: Basic Principles and Application to Pharmacy Practice.* 2014.

**DASTE, CAMILO.** *Control de Calidad en la Industria Farmacéutica.* 2015. pp. 68-70.

**DE LA MATA, JULIÁN.** *Fases alternativas al C18 y sus aplicaciones.* 2012, [en línea], pp. 1-50. Disponible en: <https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/10-Fases alternativas al C18 y sus aplicaciones-final.pdf>.

**DE ZAN, M.** *Utilización de quimiometría para mejorar el rendimiento de la cromatografía líquida de alta resolución,* 2011, pp. 30-80.

**DERMOCOSMETIC INSTITUTE.** *Polawax NF.* [en línea]. [Consulta: 24 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.institutodermocosmetica.com/wp-content/uploads/2019/01/ficha-polawax-nf.pdf>.

**DRUGBANK.** *Miconazol.* [en línea]. 2005[Consulta: 13 junio 2021]. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01110>.

**DRUGBANK.** *Aceite mineral.* 2015, [en línea] [Consulta: 29 agosto 2021]. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11057>.

**ENRÍQUEZ, J.** *Elaboración de emulsiones para la conservación higroscópica de encuadernaciones en base de pergamino de libros del área histórica.* 2017.

**ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.** *Compendio de especificaciones sobre aditivos alimentarios. Addendum 5. (Documento de la FAO sobre alimentación y nutrición - 52 Add.5).* [en línea]. 1997. [Consulta:

29 agosto 2021]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/w6355e/w6355e00.htm#Contents>.

**FARMACOPEA ARGENTINA.** *Farmacopea Argentina. Farmacopea Argentina Volumen I* [en línea], 2003, pp. 447-450. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip\\_pages/Farmacopea\\_Vol\\_I/files/assets/downloads/publication.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/downloads/publication.pdf).

**GODOY, M et al.** *Determinación del Balance Hidrófilo-Lipófilo (HLB) Requerido de Grasas y Aceites de Origen Vegetal y Animal, para su Utilización en las Formulaciones Farmacéuticas y Cosméticas*. [en línea]. 2004. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5591/1/10128225.pdf>.

**GÓNZALES, I et al.** *Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos*. [en línea]. 2015. Universidad Miguel Hernández, Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=Y4DXCQAAQBAJ&pg=PT141&dq=validación+selectividad&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwifqK2Ugpn0AhXTQjABHbVMCJA4ChDoAXoECAYQAg#v=onepage&q=validación selectividad&f=false>.

**HARRIS, DANIEL.** *Análisis químico cuantitativo* [en línea]. Reverté.2007. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=RFRfxIDep9EC&pg=PA726&dq=harris+analisis+quimico+cuantitativo++temperatura+de+la+columna&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjLraXEps70AhVRQjABHZdZCJMQ6AF6BAGDEAI#v=onepage&q=harris analisis quimico cuantitativo temperatura de la columna&f=false>.

**LEGAZ, M. et al.** *Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Series, Técnicas y Métodos. Reduca (Biología)*,2011, 4(3), pp. 33-47.

**MARTÍN, M.** *Microencapsulación Mediante La Tecnología Flow Focusing Para Aplicaciones Biotecnológicas Y Biomédicas* 2017, [en línea]. Disponible en: <https://digitalcollections.nypl.org/items/510d47dd-c9c1-a3d9-e040-e00a18064a99>.

**MARTÍNEZ, E, et al.** *Desarrollo de procedimientos de medida basados en la cromatografía líquida de alta resolución. Revista del Laboratorio Clínico*, 2015, 8(1), pp. 8-18.

**MAYOLO, K.; et al.** *Técnicas Cromatográficas Y Su Aplicación A Estudios De Cambios Conformacionales, Estabilidad Y Replegamiento De Proteínas. Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 2012, 11, pp. 415-429.

**MINITAB.** *Diseños ortogonales*. [en línea]. 2019, [Consulta: 11 octubre 2021]. Disponible en: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/basics/orthogonal-designs/>.

**NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.** *PubChem Compound Summary for CID 1030, Propylene glycol*. [en línea]. 2021a, [Consulta: 29 agosto 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1030>.

**NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.** *PubChem Compound Summary for CID 44263857, Methylcellulose*. Retrieved September 3, 2021 from. [en línea]02021b. [Consulta: 3 septiembre 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/METHYLCELLULOSE>.

**NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.** *PubChem Compound Summary for CID 7175, Propylparaben*. [en línea]. 2021c. [Consulta: 26 agosto 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propylparaben#section=MeSH-Entry-Terms>.

**NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.** *PubChem Compound Summary for CID 7456, Methylparaben*. [en línea]. 2021d. [Consulta: 29 agosto 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7456#section=Analytic-Laboratory-Methods>.

**NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.** *PubChem Compound Summary for CID 9920342, Sorbitan monooleate*. [en línea]. 2021e. [Consulta: 29 agosto 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sorbitan-monooleate#section=Viscosity>.

**OPORTA, R. et al.** *Valoración de la efectividad antimicrobiana in vitro del extracto de semilla de toronja comercializado como agente conservador* [en línea]. 2009 Disponible en: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/4931/1/214516.pdf>.

**ORLANDINI, S. et al.** *Application of quality by design to the development of analytical separation methods. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013,405, no. 2-3, pp. 443-450.

**PARAFFIN OILS.** *Pharmaceuticals-Petroleum Jellies*. [en línea]. 2005.[Consulta: 29 agosto 2021]. Disponible en: <http://www.paraffinoils.com/petroleum-jelly-pharmaceutical.htm>.

**PARRA, A et al.** *Life cycle management of analytical methods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea], 2018, 147, pp. 506-517. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.020>.

**PERAMAN, R et al.** *Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics* 2015.

**PETER WUELFING, W.; et al.** *Polysorbate 80 UV/vis spectral and chromatographic characteristics - defining boundary conditions for use of the surfactant in dissolution analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 41(3), pp. 774-782.

**PHARMAPPROACH.** *Pharmaceutical Emulsions: An Overview Manufacturing of Pharmaceutical.* [en línea]. 2020. [Consulta: 13 junio 2021]. Disponible en: <https://www.pharmapproach.com/pharmaceutical-emulsions-an-overview/>.

**PUBCHEM.** *Resumen de compuestos de PubChem para CID 4173, metronidazol. Centro Nacional de Información Biotecnológica* [en línea]. 2004a [Consulta: 13 junio 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metronidazole>.

**PUBCHEM.** *Resumen de compuestos de PubChem para CID 68553, nitrato de miconazol. Centro Nacional de Información Biotecnológica* [en línea]. 2004b. [Consulta: 13 junio 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Miconazole-nitrate>.

**PUBCHEM.** *PubChem Compound Summary for CID 5281955, Polyoxyethylene sorbitan monooleate.* [en línea]. 2004c, [Consulta: 3 septiembre 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polyoxyethylene-sorbitan-monooleate#section=Solubility>.

**PUBCHEM** *PubChem Compound Summary for CID 62238, Cetostearyl alcohol.* [en línea]. 2021b. [Consulta: 29 agosto 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62238#section=2D-Structure>.

**RAMAN, N; et al.** *Analytical Quality by Design Approach to Test Method Development and Validation in Drug Substance Manufacturing. Journal of Chemistry*, 2015.

**SAHOO, D et al.** *A Rapid and Validated RP-HPLC Method for the Simultaneous Quantification of Benzoic Acid, Metronidazole and Miconazole Nitrate in Vaginal Formulations. Journal of*

*Chromatographic Science*, 2016, 54(9), 2016, pp. 1613-1618.

**SALEME, H.; et al.** *Aplicación de la calidad basada en el diseño (QbD) en la reformulación de tabletas masticables. Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 2013, 42(2), pp. 190-214.

**SANGSHETTI, J.; et al.** *Quality by design approach: Regulatory need. Arabian Journal of Chemistry* [en línea], 2017, 10, pp. S3412-S3425. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.01.025>.

**SMOLINSKE, S.** *Handbook of Food, Drug, and Cosmetic* [en línea]. 2018. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=6XuCDwAAQBAJ&pg=PT106&dq=cetostearyl+alcohol&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjyovDm6tffyAhWsTTABHU94CR8Q6AEwAnoECAUQA#v=onepage&q=cetostearyl alcohol&f=false>.

**SOPORTE DE MINITAB.** *¿Qué son los diseños de superficie de respuesta, los diseños centrales compuestos y los diseños de Box-Behnken?* [en línea]. 2019. [Consulta: 11 septiembre 2021]. Disponible en: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/>.

**STATPOINT.** *Diseño de Experimentos-Diseño de Superficie de Respuesta.* [en línea]. [Consulta: 11 septiembre 2021]. 2006. Disponible en: <https://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE - Diseno de Superficies de Respuesta.pdf>.

**SUAREZ , D. Y MORALES, Y.** *Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. América Revista Semilleros: Formación Investigativa*, 2018, 4.

**TAPIA, C. Y SAPAG, J.** *Metilcelulosa: sus Aplicaciones Farmacéuticas. Acta Farm. Bonaerense* [en línea], 1995, 14(1), pp. 41-48. Disponible en: [http://www.latamjpharm.org/trabajos/14/1/LAJOP\\_14\\_1\\_2\\_1\\_5890M2C04B.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/14/1/LAJOP_14_1_2_1_5890M2C04B.pdf).

**TOME, T.; et al.** *Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. Organic Process Research and Development*, 2019, 23(9), pp. 1784-1802.

**TORRES, S.** *Estudio de la Estabilidad Temporal de Emulsiones Inversas Altamente Concentradas Mediante la Variación de la Relación Aceite:Tensoactivo y la Velocidad de Agitación.* 2009

**UNIVERSIDAD DE ALICANTE.** *Cromatografía: Principios generales. Repositorio Institucional de la Universidad de Alicante* [en línea], 2006, pp. 1-16. Disponible en: <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf>.

**USIÑA, K.** *Análisis De Las Propiedades Surfactantes De Saponinas Obtenidas De Los Frutos De Sapindus saponaria L.* 2017

**USP.** *Capítulos Generales: Cromatografía.* [en línea]. 2021. [Consulta: 14 junio 2021]. Disponible en: [https://online.uspnf.com/uspnf/document/4\\_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B\\_1\\_es-ES](https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_1_es-ES) 14/14.

**VÁZQUEZ, A.** *Validación de métodos analíticos.* [en línea], 2008, pp. 47. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/14634/ayded%0Avazquezmoreno.pdf?sequence=1>.

**VICENTE, D. Y PÉREZ, E.** Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2010, 28(2), pp. 122-130.

**YÚFERA, E.** *Química orgánica básica y aplicada* [en línea]. 2012, 2, Revérte. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=aU\\_aBXvAB3MC&pg=PA1228&dq=fase+reversa+hplc&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjoxYLHo7\\_0AhVMQzABHbeoC88Q6AF6BAgJEA#v=onepage&q=fase+reversa+hplc&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=aU_aBXvAB3MC&pg=PA1228&dq=fase+reversa+hplc&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjoxYLHo7_0AhVMQzABHbeoC88Q6AF6BAgJEA#v=onepage&q=fase+reversa+hplc&f=false).

**ZUMBADO, H.** *Análisis instrumental de los alimentos* [en línea]. 2021. La Habana: Universitaria (Cuba). Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=9hEYEAQAQBAJ&pg=PA13&dq=propósito+del+desarrollo+de+un+método+analítico&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj3kMzd7OjyAhV8TDABHU6pCz4Q6AEwAnoECAkQAg#v=onepage&q=propósito+del+desarrollo+de+un+método+analítico&f=false>.



## ANEXOS

### ANEXO A: CALCULO DEL HLB PARA DETERMINAR EL SIGNO DE LA EMULSIÓN

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
Vaselina blanca	24 gr
Alcohol cetosteárilico	10 gr
Aceite de vaselina	14 gr
Polawax	6 gr

a) Sumar todas las grasas de la formulación

$$24 + 10 + 14 + 6 = 54 \text{ gr}$$

b) Calcular el % de cada grasa para lo cual se dividirá cada componente entre la suma de todas las grasas.

$$\frac{24}{100} \times 100 = 44,44 \% \text{ Vaselina blanca}$$

$$\frac{10}{54} \times 100 = 18,51\% \text{ Alcohol cetosteárilico}$$

$$\frac{14}{54} \times 100 = 25,92 \% \text{ Aceite de vaselina}$$

$$\frac{6}{54} \times 100 = 11,11\% \text{ Polawax}$$

c) Cálculo del HLB requerido de cada grasa

$$\frac{44,44}{100} \times 11 = 4,88$$

$$\frac{18,51}{100} \times 15 = 2,77$$

$$\frac{25,92}{100} \times 12 = 3,11$$

$$\frac{11,11}{100} \times 14,9 = 1,65$$

d) Sumar todos los componentes y obtener el HLB requerido

$$HLB_{req} = 4,88 + 2,77 + 3,11 + 1,65 = 12,41$$

Según la escala de Griffin esta emulsión es de signo (o/w) ya que, presenta un HLB mayor a 8

## ANEXO B: DESARROLLO DEL DOE

### *Metronidazol*

Analizar Experimento - N

Nombre del archivo: C:\Users\vanec\Desktop\doe\DOEFI\_1.sfx

*Efectos estimados para N*

<b>Efecto</b>	<b>Estimado</b>	<b>Error Estd.</b>	<b>V.I.F.</b>
Promedio	4143.61	365.366	
A: FLUJO	-301.829	767.817	2.40928
B:TEMPERATURA	-250.496	767.819	2.40928
C:PH FM	788.082	767.819	2.40928
D: % B	-1625.4	767.815	2.40927
E: FASE ESTACIONARIA	294.549	767.817	2.40928
AA	568.147	438.784	1.00002
AB	-1709.92	1079.56	3.01951
AC	-830.694	1079.56	3.01951
AD	678.45	1079.56	3.01951
AE	-365.397	1079.56	3.0195
BB	-340.608	438.786	1.00002
BC	-131.437	1079.56	3.0195
BD	1124.87	1079.56	3.01951
BE	-415.117	1079.56	3.01951
CC	794.186	438.786	1.00002
CD	-2428.75	1079.56	3.01951
CE	1687.7	1079.56	3.01951
DD	-118.038	438.782	1.00002
DE	-183.972	1079.56	3.01951
EE	-364.855	438.784	1.00002

Errores estándar basados en el error total con 9 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 3.01951. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Coef. de regresión para N

Coeficiente	Estimado
Constante	-22435.4
A: FLUJO	22492.8
B:TEMPERATURA	990.213
C:PH FM	-2602.47
D:% B	89.1835
E:FASE ESTACIONARIA	-226.049
AA	3156.37
AB	-569.973
AC	-2768.98
AD	113.075
AE	-121.799
BB	-6.81215
BC	-26.2874
BD	11.2487
BE	-8.30234
CC	1588.37
CD	-242.875
CE	337.541
DD	-0.59019
DE	-1.83972
EE	-7.29709

El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\begin{aligned}
 N = & -22435.4 + 22492.8*FLUJO + 990.213*TEMPERATURA - 2602.47*PH FM + 89.1835*\% \\
 & B - 226.049*FASE ESTACIONARIA + 3156.37*FLUJO^2 - \\
 & 569.973*FLUJO*TEMPERATURA - 2768.98*FLUJO*PH FM + 113.075*FLUJO*\% B - \\
 & 121.799*FLUJO*FASE ESTACIONARIA - 6.81215*TEMPERATURA^2 - \\
 & 26.2874*TEMPERATURA*PH FM + 11.2487*TEMPERATURA*\% B - \\
 & 8.30234*TEMPERATURA*FASE ESTACIONARIA + 1588.37*PH FM^2 - 242.875*PH \\
 & FM*\% B + 337.541*PH FM*FASE ESTACIONARIA - 0.59019*\% B^2 - 1.83972*\% B*FASE \\
 & ESTACIONARIA - 7.29709*FASE ESTACIONARIA^2
 \end{aligned}$$

*Analizar Experimento - T*

Nombre del archivo: C:\Users\vanec\Desktop\doe\DOEFI\_1.sfx

Efectos estimados para T

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
Promedio	1.42735	0.00826322	
A:FLUJO	-0.0572483	0.0173651	2.40928
B:TEMPERATURA	0.0889488	0.0173652	2.40928
C:PH FM	-0.0555816	0.0173652	2.40928
D:% B	0.22112	0.0173651	2.40927
E:FASE ESTACIONARIA	0.00937452	0.0173651	2.40928
AA	0.0442994	0.00992365	1.00002
AB	0.0322982	0.0244156	3.01951
AC	0.0691918	0.0244156	3.01951
AD	-0.00199473	0.0244156	3.01951
AE	0.110137	0.0244155	3.0195
BB	-0.0264265	0.00992369	1.00002
BC	-0.0478033	0.0244155	3.0195
BD	-0.0174913	0.0244156	3.01951
BE	-0.0453386	0.0244156	3.01951
CC	-0.0284472	0.00992369	1.00002
CD	-0.00586845	0.0244156	3.01951
CE	0.00167541	0.0244156	3.01951
DD	-0.013147	0.0099236	1.00002
DE	-0.0815251	0.0244156	3.01951
EE	-0.0255602	0.00992365	1.00002

Errores estándar basados en el error total con 9 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 3.01951. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Coef. de regresión para T

Coeficiente	Estimado
Constante	-0.604749
A:FLUJO	-2.13301
B:TEMPERATURA	0.0833418
C:PH FM	0.425129
D:% B	0.0339132
E:FASE ESTACIONARIA	0.0332305
AA	0.246108
AB	0.0107661
AC	0.230639
AD	-0.000332456
AE	0.0367122
BB	-0.000528529
BC	-0.00956066
BD	-0.000174913
BE	-0.000906772
CC	-0.0568944
CD	-0.000586845
CE	0.000335081
DD	-0.0000657352
DE	-0.000815251
EE	-0.000511205

El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\begin{aligned}
T = & -0.604749 - 2.13301*FLUJO + 0.0833418*TEMPERATURA + 0.425129*PH FM + \\
& 0.0339132*\% B + 0.0332305*FASE ESTACIONARIA + 0.246108*FLUJO^2 + \\
& 0.0107661*FLUJO*TEMPERATURA + 0.230639*FLUJO*PH FM - 0.000332456*FLUJO*\% B \\
& + 0.0367122*FLUJO*FASE ESTACIONARIA - 0.000528529*TEMPERATURA^2 - \\
& 0.00956066*TEMPERATURA*PH FM - 0.000174913*TEMPERATURA*\% B - \\
& 0.000906772*TEMPERATURA*FASE ESTACIONARIA - 0.0568944*PH FM^2 - \\
& 0.000586845*PH FM*\% B + 0.000335081*PH FM*FASE ESTACIONARIA - \\
& 0.0000657352*\% B^2 - 0.000815251*\% B*FASE ESTACIONARIA - 0.000511205*FASE ESTACIONARIA^2
\end{aligned}$$

*Analizar Experimento - RS*

Nombre del archivo: C:\Users\vanec\Desktop\doe\DOEFI\_1.sfx

Efectos estimados para RS

<b>Efecto</b>	<b>Estimado</b>	<b>Error Estd.</b>	<b>V.I.F.</b>
Promedio	9.74417	0.457543	
A:FLUJO	-0.68744	0.961526	2.40928
B:TEMPERATURA	-0.879819	0.961528	2.40928
C:PH FM	2.61524	0.961528	2.40928
D:% B	-9.09436	0.961524	2.40927
E:FASE ESTACIONARIA	0.185102	0.961526	2.40928
AA	0.677003	0.549483	1.00002
AB	-2.05697	1.35192	3.01951
AC	-0.813085	1.35192	3.01951
AD	1.37669	1.35192	3.01951
AE	-0.131373	1.35191	3.0195
BB	-0.415639	0.549485	1.00002
BC	-0.738794	1.35191	3.0195
BD	1.42583	1.35192	3.01951
BE	-0.762528	1.35192	3.01951
CC	0.527473	0.549485	1.00002
CD	-3.88813	1.35192	3.01951
CE	2.31149	1.35192	3.01951
DD	1.42236	0.54948	1.00002
DE	0.315251	1.35192	3.01951
EE	-0.469042	0.549483	1.00002

Errores estándar basados en el error total con 9 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 3.01951. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Coef. de regresión para RS

Coefficiente	Estimado
Constante	-29.629
A:FLUJO	21.1801
B:TEMPERATURA	1.51822
C:PH FM	9.03863
D:% B	-0.562392
E:FASE ESTACIONARIA	-0.457023
AA	3.76113
AB	-0.685655
AC	-2.71028
AD	0.229449
AE	-0.0437909
BB	-0.00831277
BC	-0.147759
BD	0.0142583
BE	-0.0152506
CC	1.05495
CD	-0.388813
CE	0.462298
DD	0.00711178
DE	0.00315251
EE	-0.00938085

El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\begin{aligned}
 RS = & -29.629 + 21.1801*FLUJO + 1.51822*TEMPERATURA + 9.03863*PH\ FM - 0.562392* \% \\
 & B - 0.457023*FASE\ ESTACIONARIA + 3.76113*FLUJO^2 - \\
 & 0.685655*FLUJO*TEMPERATURA - 2.71028*FLUJO*PH\ FM + 0.229449*FLUJO* \% B - \\
 & 0.0437909*FLUJO*FASE\ ESTACIONARIA - 0.00831277*TEMPERATURA^2 - \\
 & 0.147759*TEMPERATURA*PH\ FM + 0.0142583*TEMPERATURA* \% B - \\
 & 0.0152506*TEMPERATURA*FASE\ ESTACIONARIA + 1.05495*PH\ FM^2 - 0.388813*PH \\
 & FM* \% B + 0.462298*PH\ FM*FASE\ ESTACIONARIA + 0.00711178* \% B^2 + 0.00315251* \% \\
 & B*FASE\ ESTACIONARIA - 0.00938085*FASE\ ESTACIONARIA^2
 \end{aligned}$$

*Analizar Experimento - TR FINAL*

Nombre del archivo: C:\Users\vanec\Desktop\doe\DOEFI\_1.sfx

Efectos estimados para TR FINAL

<b>Efecto</b>	<b>Estimado</b>	<b>Error Estd.</b>	<b>V.I.F.</b>
Promedio	3.03398	0.169753	
A:FLUJO	-2.6542	0.356736	2.40928
B:TEMPERATURA	-0.398112	0.356737	2.40928
C:PH FM	0.255767	0.356737	2.40928
D:% B	-2.52629	0.356736	2.40927
E:FASE ESTACIONARIA	0.202536	0.356736	2.40928
AA	1.09627	0.203864	1.00002
AB	-0.913457	0.501575	3.01951
AC	-0.699619	0.501576	3.01951
AD	1.33874	0.501576	3.01951
AE	-0.124699	0.501575	3.0195
BB	-0.210566	0.203865	1.00002
BC	-0.513801	0.501575	3.0195
BD	-0.151695	0.501575	3.01951
BE	-0.698239	0.501576	3.01951
CC	0.218698	0.203865	1.00002
CD	-1.60846	0.501575	3.01951
CE	0.100805	0.501575	3.01951
DD	0.550094	0.203863	1.00002
DE	-0.298881	0.501576	3.01951
EE	-0.219225	0.203864	1.00002

Errores estándar basados en el error total con 9 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 3.01951. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Coef. de regresión para TR FINAL

Coefficiente	Estimado
Constante	-30.4679
A:FLUJO	-2.93296
B:TEMPERATURA	1.10878
C:PH FM	8.00787
D:% B	0.0629393
E:FASE ESTACIONARIA	0.752678
AA	6.09039
AB	-0.304486
AC	-2.33206
AD	0.223123
AE	-0.0415664
BB	-0.00421133
BC	-0.10276
BD	-0.00151695
BE	-0.0139648
CC	0.437396
CD	-0.160846
CE	0.0201609
DD	0.00275047
DE	-0.00298881
EE	-0.0043845

El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\begin{aligned}
 \text{TR FINAL} = & -30.4679 - 2.93296*\text{FLUJO} + 1.10878*\text{TEMPERATURA} + 8.00787*\text{PH FM} + \\
 & 0.0629393*\% \text{ B} + 0.752678*\text{FASE ESTACIONARIA} + 6.09039*\text{FLUJO}^2 - \\
 & 0.304486*\text{FLUJO}*\text{TEMPERATURA} - 2.33206*\text{FLUJO}*\text{PH FM} + 0.223123*\text{FLUJO}*\% \text{ B} - \\
 & 0.0415664*\text{FLUJO}*\text{FASE ESTACIONARIA} - 0.00421133*\text{TEMPERATURA}^2 - \\
 & 0.10276*\text{TEMPERATURA}*\text{PH FM} - 0.00151695*\text{TEMPERATURA}*\% \text{ B} - \\
 & 0.0139648*\text{TEMPERATURA}*\text{FASE ESTACIONARIA} + 0.437396*\text{PH FM}^2 - 0.160846*\text{PH FM} \\
 & *\% \text{ B} + 0.0201609*\text{PH FM}*\text{FASE ESTACIONARIA} + 0.00275047*\% \text{ B}^2 - 0.00298881*\% \\
 & \text{B}*\text{FASE ESTACIONARIA} - 0.0043845*\text{FASE ESTACIONARIA}^2
 \end{aligned}$$

### ***Niconazol Nitrato***

*Analizar Experimento - T*

*Nombre del archivo: C:\Users\vanec\Desktop\doe\DOEFI\_2miconazol.sfx*

*Efectos estimados para T*

<b><i>Efecto</i></b>	<b><i>Estimado</i></b>	<b><i>Error Estd.</i></b>	<b><i>V.I.F.</i></b>
<i>Promedio</i>	<i>1.77208</i>	<i>0.160567</i>	
<i>A:FLUJO</i>	<i>-0.195597</i>	<i>0.33743</i>	<i>2.40928</i>
<i>B:TEMPERATURA</i>	<i>0.341739</i>	<i>0.337431</i>	<i>2.40928</i>
<i>C:PH FM</i>	<i>-0.336856</i>	<i>0.337431</i>	<i>2.40928</i>
<i>D:% B</i>	<i>-2.91045</i>	<i>0.33743</i>	<i>2.40927</i>
<i>E:FASE ESTACIONARIA</i>	<i>-0.329918</i>	<i>0.33743</i>	<i>2.40928</i>
<i>AA</i>	<i>-0.164962</i>	<i>0.192831</i>	<i>1.00002</i>
<i>AB</i>	<i>-0.00793082</i>	<i>0.474431</i>	<i>3.01951</i>
<i>AC</i>	<i>0.590252</i>	<i>0.474431</i>	<i>3.01951</i>
<i>AD</i>	<i>-0.109657</i>	<i>0.474431</i>	<i>3.01951</i>
<i>AE</i>	<i>1.20644</i>	<i>0.47443</i>	<i>3.0195</i>
<i>BB</i>	<i>-0.0552643</i>	<i>0.192832</i>	<i>1.00002</i>
<i>BC</i>	<i>-0.707437</i>	<i>0.47443</i>	<i>3.0195</i>
<i>BD</i>	<i>-0.53661</i>	<i>0.474431</i>	<i>3.01951</i>
<i>BE</i>	<i>0.180157</i>	<i>0.474431</i>	<i>3.01951</i>
<i>CC</i>	<i>0.18174</i>	<i>0.192832</i>	<i>1.00002</i>
<i>CD</i>	<i>0.138569</i>	<i>0.474431</i>	<i>3.01951</i>
<i>CE</i>	<i>-1.02361</i>	<i>0.474431</i>	<i>3.01951</i>
<i>DD</i>	<i>1.23021</i>	<i>0.19283</i>	<i>1.00002</i>
<i>DE</i>	<i>0.505248</i>	<i>0.474431</i>	<i>3.01951</i>
<i>EE</i>	<i>-0.0639252</i>	<i>0.192831</i>	<i>1.00002</i>

Errores estándar basados en el error total con 9 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 3.01951. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Coef. de regresión para T

<b>Coefficiente</b>	<b>Estimado</b>
Constante	-4.47026
A:FLUJO	-8.66735
B:TEMPERATURA	0.608717
C:PH FM	3.63461
D:% B	-0.324636
E:FASE ESTACIONARIA	-0.0991126
AA	-0.916454
AB	-0.00264361
AC	1.96751
AD	-0.0182762
AE	0.402146
BB	-0.00110529
BC	-0.141487
BD	-0.0053661
BE	0.00360315
CC	0.363481
CD	0.0138569
CE	-0.204722
DD	0.00615104
DE	0.00505248
EE	-0.0012785

El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\begin{aligned}
T = & -4.47026 - 8.66735*FLUJO + 0.608717*TEMPERATURA + 3.63461*PH\ FM - 0.324636*\% \\
& B - 0.0991126*FASE\ ESTACIONARIA - 0.916454*FLUJO^2 - \\
& 0.00264361*FLUJO*TEMPERATURA + 1.96751*FLUJO*PH\ FM - 0.0182762*FLUJO*\% \\
& B + 0.402146*FLUJO*FASE\ ESTACIONARIA - 0.00110529*TEMPERATURA^2 - \\
& 0.141487*TEMPERATURA*PH\ FM - 0.0053661*TEMPERATURA*\% \\
& B + 0.00360315*TEMPERATURA*FASE\ ESTACIONARIA + 0.363481*PH\ FM^2 + \\
& 0.0138569*PH\ FM*\% \\
& B - 0.204722*PH\ FM*FASE\ ESTACIONARIA + 0.00615104*\% \\
& B^2 + 0.00505248*\% \\
& B*FASE\ ESTACIONARIA - 0.0012785*FASE\ ESTACIONARIA^2
\end{aligned}$$

Analizar Experimento - N

Nombre del archivo: C:\Users\vanec\Desktop\doe\DOEFI\_2miconazol.sfx

Efectos estimados para N

<b>Efecto</b>	<b>Estimado</b>	<b>Error Estd.</b>	<b>V.I.F.</b>
Promedio	2231.43	179.672	
A:FLUJO	-572.051	377.58	2.40928
B:TEMPERATURA	-63.5552	377.581	2.40928
C:PH FM	349.619	377.581	2.40928
D:% B	-701.849	377.579	2.40927
E:FASE ESTACIONARIA	55.4915	377.58	2.40928
AA	387.991	215.775	1.00002
AB	-281.565	530.881	3.01951
AC	178.501	530.881	3.01951
AD	-247.175	530.881	3.01951
AE	563.292	530.88	3.0195
BB	-374.405	215.776	1.00002
BC	-524.792	530.88	3.0195
BD	183.893	530.881	3.01951
BE	555.675	530.881	3.01951
CC	94.6969	215.776	1.00002
CD	270.435	530.881	3.01951
CE	122.893	530.881	3.01951
DD	-491.026	215.774	1.00002
DE	1768.0	530.881	3.01951
EE	-398.94	215.775	1.00002

Errores estándar basados en el error total con 9 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 3.01951. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Coef. de regresión para N

Coeficiente	Estimado
Constante	-4239.02
A:FLUJO	-4587.28
B:TEMPERATURA	789.983
C:PH FM	1896.74
D:% B	-250.259
E:FASE ESTACIONARIA	-930.126
AA	2155.51
AB	-93.8549
AC	595.004
AD	-41.1959
AE	187.764
BB	-7.4881
BC	-104.958
BD	1.83893
BE	11.1135
CC	189.394
CD	27.0435
CE	24.5785
DD	-2.45513
DE	17.68
EE	-7.9788

El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\begin{aligned}
 N = & -4239.02 - 4587.28*FLUJO + 789.983*TEMPERATURA + 1896.74*PH FM - 250.259* \\
 & B - 930.126*FASE ESTACIONARIA + 2155.51*FLUJO^2 - \\
 & 93.8549*FLUJO*TEMPERATURA + 595.004*FLUJO*PH FM - 41.1959*FLUJO* \\
 & B + 187.764*FLUJO*FASE ESTACIONARIA - 7.4881*TEMPERATURA^2 - \\
 & 104.958*TEMPERATURA*PH FM + 1.83893*TEMPERATURA* \\
 & B + 11.1135*TEMPERATURA*FASE ESTACIONARIA + 189.394*PH FM^2 + 27.0435*PH \\
 & FM* \\
 & B + 24.5785*PH FM*FASE ESTACIONARIA - 2.45513* \\
 & B^2 + 17.68* \\
 & B*FASE ESTACIONARIA - 7.9788*FASE ESTACIONARIA^2
 \end{aligned}$$

Efectos estimados para TR FINAL

<b>Efecto</b>	<b>Estimado</b>	<b>Error Estd.</b>	<b>V.I.F.</b>
Promedio	1.50206	0.082935	
A:FLUJO	-1.30768	0.174288	2.40928
B:TEMPERATURA	-0.139227	0.174288	2.40928
C:PH FM	-0.0946323	0.174288	2.40928
D:% B	-0.212834	0.174287	2.40927
E:FASE ESTACIONARIA	0.12042	0.174288	2.40928
AA	0.531378	0.0996001	1.00002
AB	-0.277855	0.24505	3.01951
AC	-0.221786	0.245051	3.01951
AD	0.241357	0.245051	3.01951
AE	0.0483922	0.24505	3.0195
BB	-0.144991	0.0996006	1.00002
BC	-0.209559	0.24505	3.0195
BD	-0.246622	0.24505	3.01951
BE	-0.206691	0.245051	3.01951
CC	0.100097	0.0996006	1.00002
CD	-0.301022	0.24505	3.01951
CE	-0.227955	0.24505	3.01951
DD	-0.134308	0.0995997	1.00002
DE	0.200452	0.245051	3.01951
EE	-0.146433	0.0996001	1.00002

Errores estándar basados en el error total con 9 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 3.01951. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Coef. de regresión para TR FINAL

Coeficiente	Estimado
Constante	-13.4043
A:FLUJO	-3.52429

B:TEMPERATURA	0.543429
C:PH FM	2.54527
D:% B	0.139585
E:FASE ESTACIONARIA	0.314951
AA	2.9521
AB	-0.0926183
AC	-0.739285
AD	0.0402262
AE	0.0161307
BB	-0.00289982
BC	-0.0419118
BD	-0.00246622
BE	-0.00413381
CC	0.200194
CD	-0.0301022
CE	-0.045591
DD	-0.000671541
DE	0.00200452
EE	-0.00292866

El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

$$\begin{aligned}
 \text{TR FINAL} = & -13.4043 - 3.52429*\text{FLUJO} + 0.543429*\text{TEMPERATURA} + 2.54527*\text{PH FM} + \\
 & 0.139585*\% \text{ B} + 0.314951*\text{FASE ESTACIONARIA} + 2.9521*\text{FLUJO}^2 - \\
 & 0.0926183*\text{FLUJO}*\text{TEMPERATURA} - 0.739285*\text{FLUJO}*\text{PH FM} + 0.0402262*\text{FLUJO}*\% \text{ B} \\
 & + 0.0161307*\text{FLUJO}*\text{FASE ESTACIONARIA} - 0.00289982*\text{TEMPERATURA}^2 - \\
 & 0.0419118*\text{TEMPERATURA}*\text{PH FM} - 0.00246622*\text{TEMPERATURA}*\% \text{ B} - \\
 & 0.00413381*\text{TEMPERATURA}*\text{FASE ESTACIONARIA} + 0.200194*\text{PH FM}^2 - \\
 & 0.0301022*\text{PH FM}*\% \text{ B} - 0.045591*\text{PH FM}*\text{FASE ESTACIONARIA} - 0.000671541*\% \text{ B}^2 + \\
 & 0.00200452*\% \text{ B}*\text{FASE ESTACIONARIA} - 0.00292866*\text{FASE ESTACIONARIA}^2
 \end{aligned}$$

## ANEXO C: ENSAYO DE SELECTIVIDAD

- Miconazol Nitrato

### Área bajo la curva

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	<i>MICONAZOL</i>	<i>MICONAZOL</i>
Media	168,830833	167,7343333
Varianza	1,17562457	1,603751067
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	0,73304679	
P(F<=f) una cola	0,37079504	
Valor crítico para F (una cola)	0,1980069	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>MICONAZOL</i>	<i>MICONAZOL</i>
Media	168,830833	167,7343333
Varianza	1,17562457	1,603751067
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	1,38968782	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	1,61105601	
P(T<=t) una cola	0,06912228	
Valor crítico de t (una cola)	1,81246112	
P(T<=t) dos colas	0,13824456	
Valor crítico de t (dos colas)	2,22813885	

### Asimetría

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	<i>MN</i>	<i>MN</i>
Media	1,733166667	1,737666667
Varianza	0,003339367	0,001574267
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5

F	2,121220462	
P(F<=f) una cola	0,214367256	
Valor crítico para F (una cola)	5,050329058	

### Número de platos teóricos

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	<i>MN</i>	<i>MN</i>
Media	2931,5	2957,833333
Varianza	14864,3	3456,566667
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	4,300307627	
P(F<=f) una cola	0,067654688	
Valor crítico para F (una cola)	5,050329058	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>MN</i>	<i>MN</i>
Media	2931,5	2957,833333
Varianza	14864,3	3456,566667
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	9160,433333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-0,476549979	
P(T<=t) una cola	0,321962235	
Valor crítico de t (una cola)	1,812461123	
P(T<=t) dos colas	0,64392447	
Valor crítico de t (dos colas)	2,228138852	

- **Metronidazol**

#### Área baja la curva

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	<i>METRONIDAZOL</i>	<i>METRONIDAZOL</i>
Media	1552,865333	1562,4305

Varianza	175,4734615	79,1572323
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	2,216771056	
P(F<=f) una cola	0,201392138	
Valor crítico para F (una cola)	5,050329058	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>METRONIDAZOL</i>	<i>METRONIDAZOL</i>
Media	1552,865333	1562,4305
Varianza	175,4734615	79,1572323
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	127,3153469	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-1,468293209	
P(T<=t) una cola	0,086381657	
Valor crítico de t (una cola)	1,812461123	
P(T<=t) dos colas	0,172763314	
Valor crítico de t (dos colas)	2,228138852	

### Asimetría

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	<i>MTZ</i>	<i>MTZ</i>
Media	1,396666667	1,387333333
Varianza	0,000162267	9,1867E-05
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	1,766328012	
P(F<=f) una cola	0,273775744	
Valor crítico para F (una cola)	5,050329058	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>MTZ</i>	<i>MTZ</i>

Media	1,396666667	1,387333333
Varianza	0,000162267	9,1867E-05
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	0,000127067	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	1,434107098	
P(T<=t) una cola	0,091031566	
Valor crítico de t (una cola)	1,812461123	
P(T<=t) dos colas	0,182063132	
Valor crítico de t (dos colas)	2,228138852	

### Número de platos teóricos

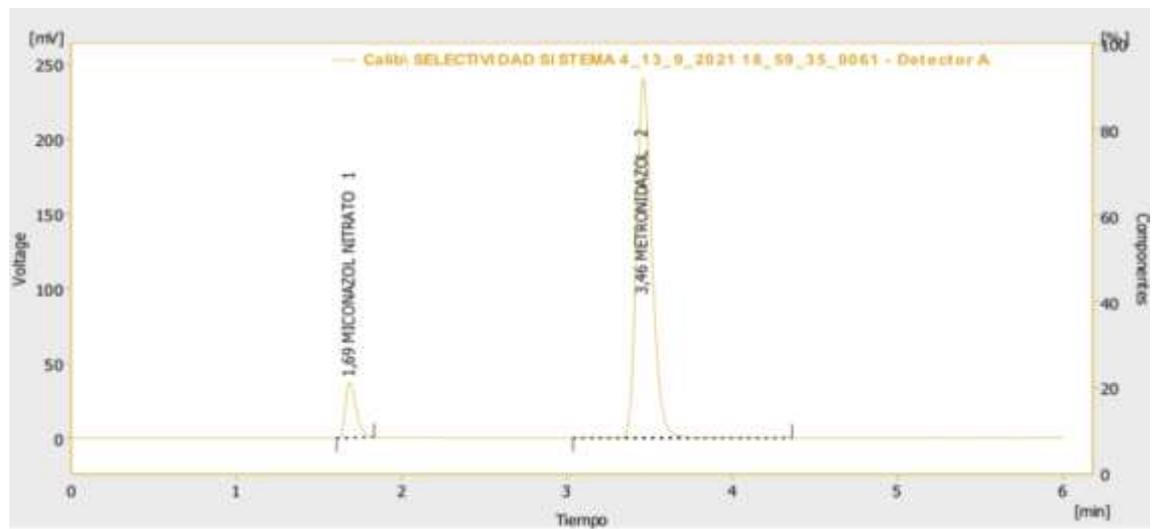
Prueba F para varianzas de dos muestras		
	<i>MTZ</i>	<i>MTZ</i>
Media	6486,5	6621,66667
Varianza	13169,5	27944,6667
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	0,471270606	
P(F<=f) una cola	0,214267759	
Valor crítico para F (una cola)	0,1980069	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>MTZ</i>	<i>MTZ</i>
Media	6486,5	6621,66667
Varianza	13169,5	27944,6667
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	20557,08333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-	
	1,632862003	

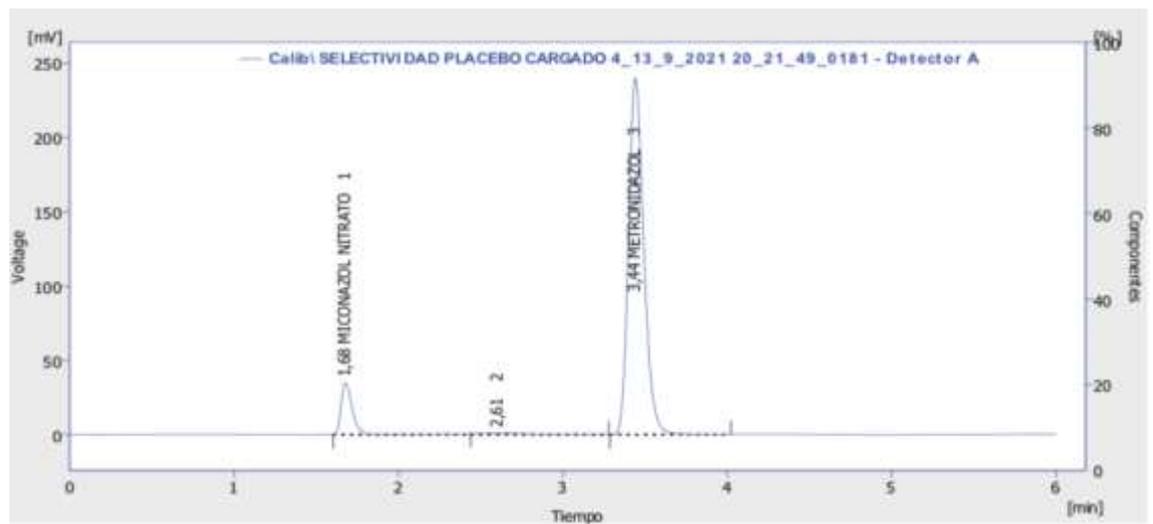
P( $T \leq t$ ) una cola	0,066773733	
Valor crítico de t (una cola)	1,812461123	
P( $T \leq t$ ) dos colas	0,133547466	
Valor crítico de t (dos colas)	2,228138852	

## ANEXO D: CROMATOGRAMAS REFERENTES AL ENSAYO DE SELECTIVIDAD

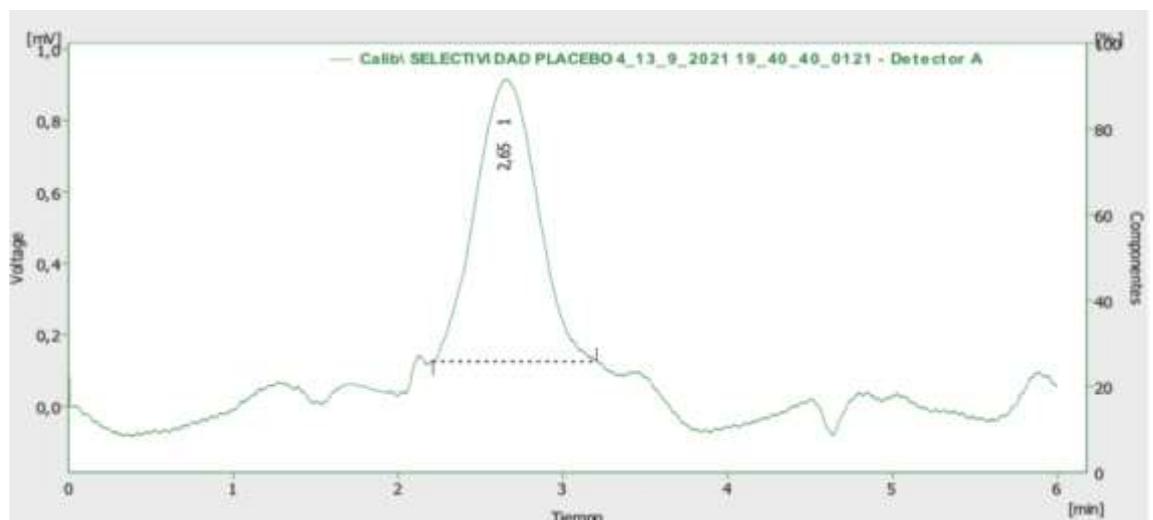
Estándar



Placebo cargado

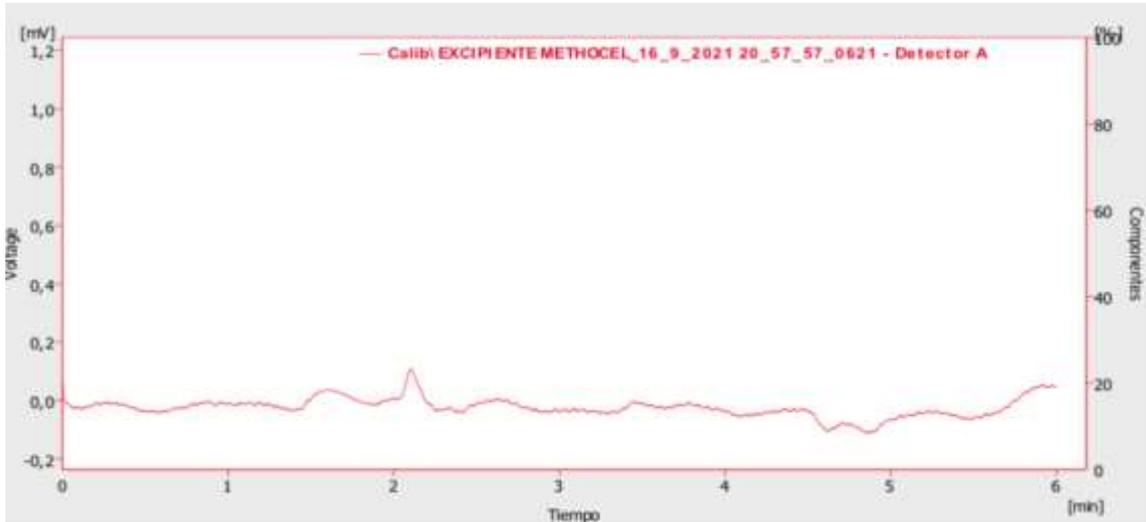


Placebo

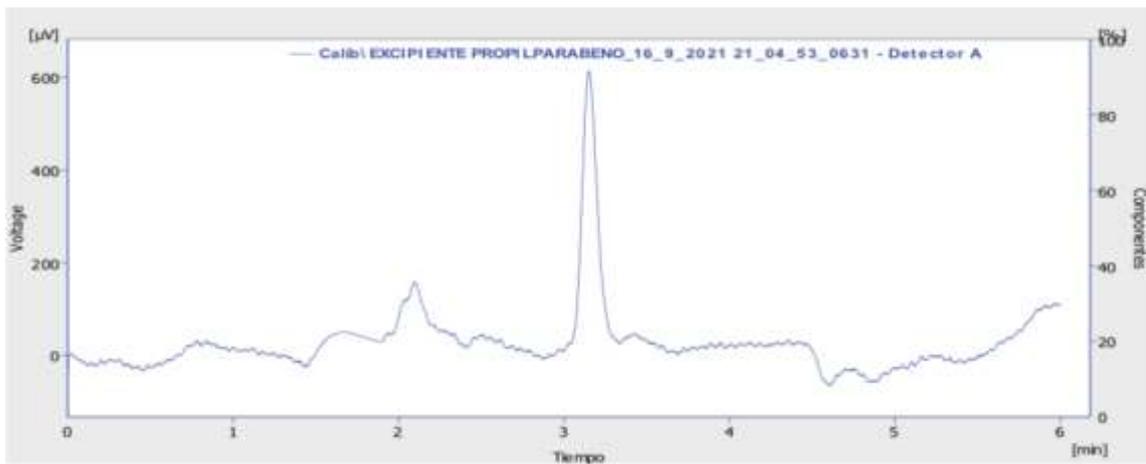


## ANEXO E: CROMATOGRAMAS DE LOS COMPONENTES INDIVIDUALES QUE FORMAN PARTE DE LA EMULSIÓN

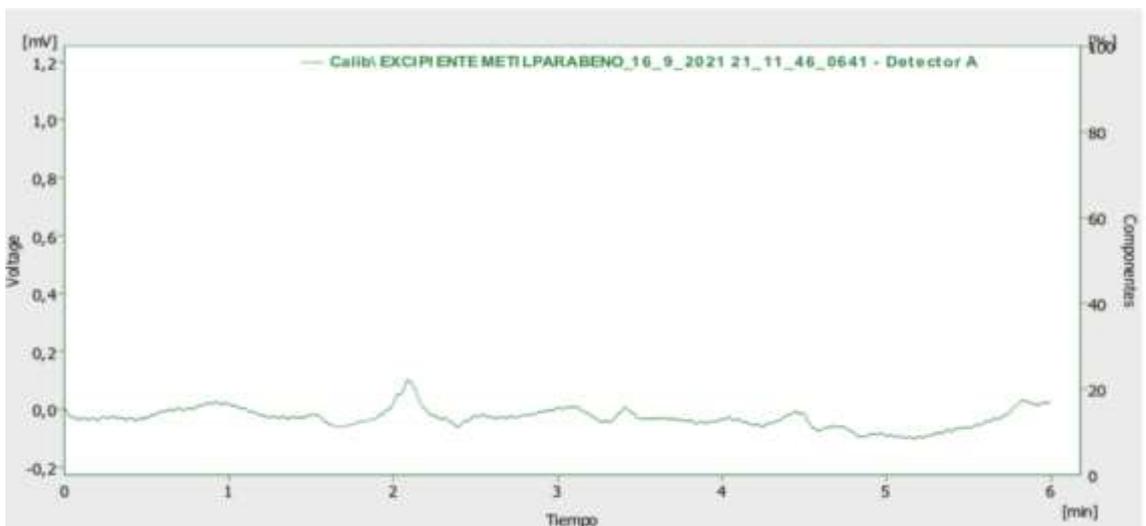
### Methocel



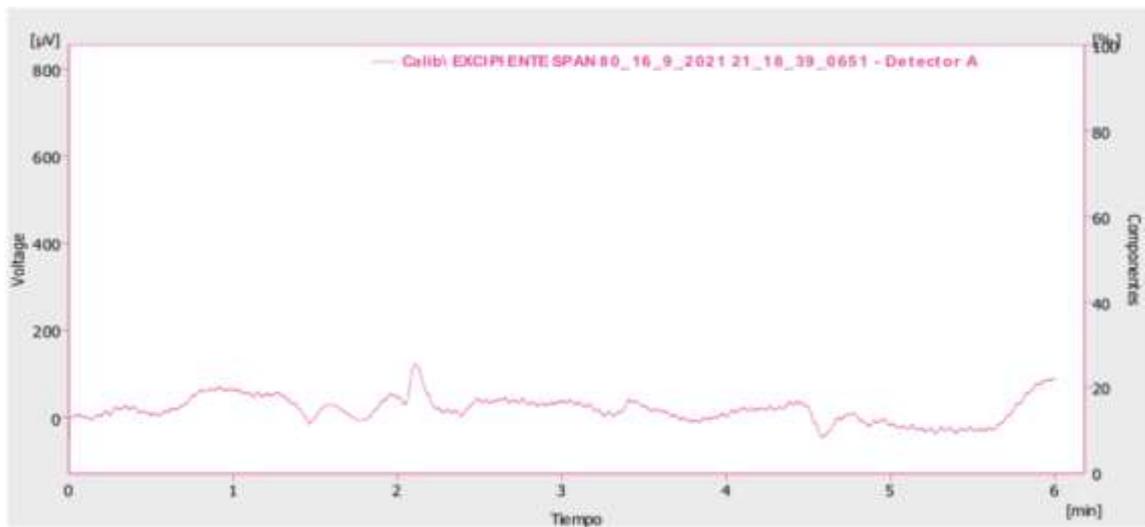
### Propilparabeno



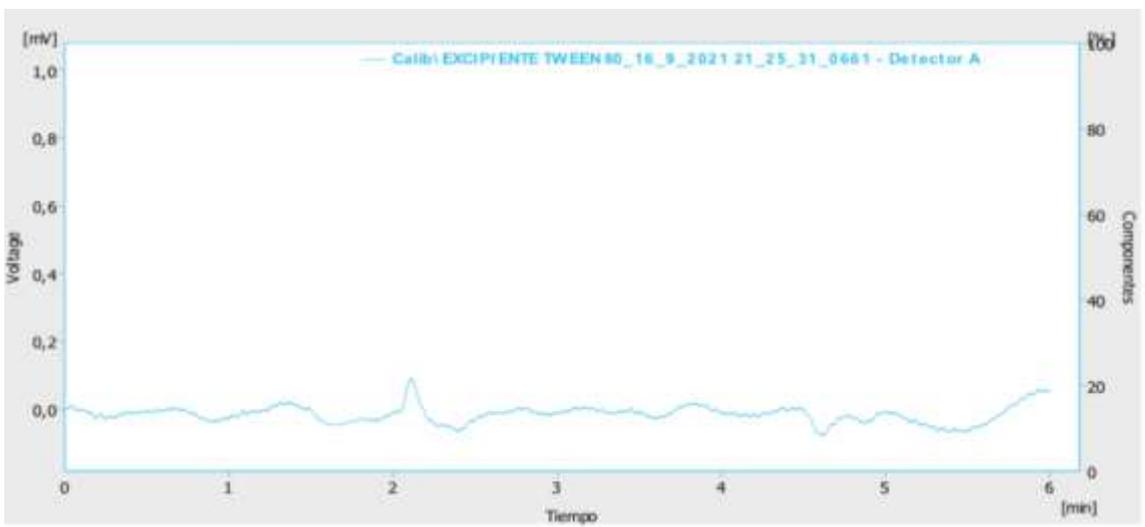
### Metilparabeno



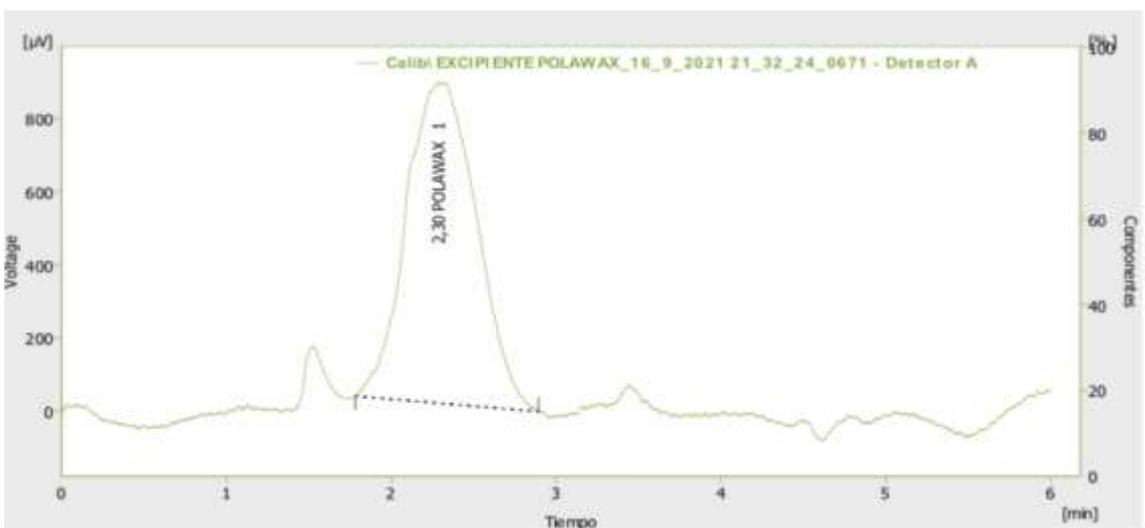
Span 80



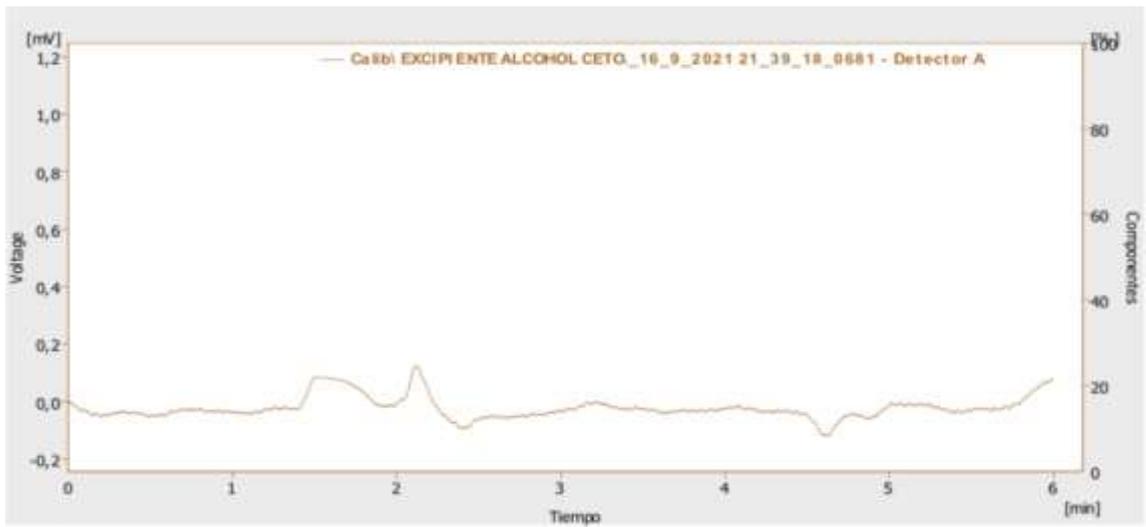
Tween 80



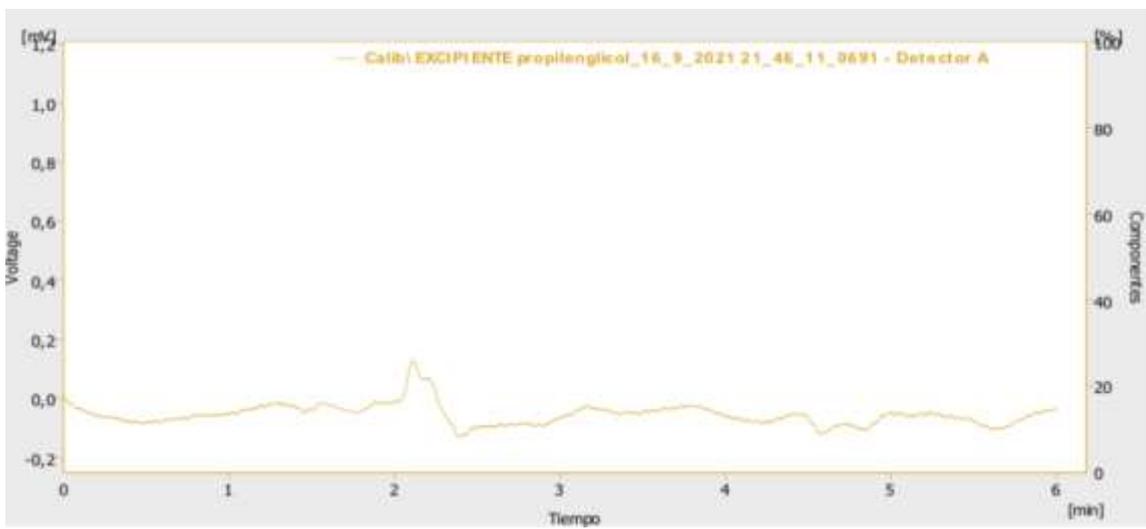
Polawax



## Alcohol cetoestearílico



## Propilenglicol



## ANEXO F: ESTÁNDARES PRIMARIOS USADOS EN EL MÉTODO ANALÍTICO

### *Metronidazol y Miconazol nitrato*



### *Parabenos*



**ANEXO G: EQUIPO HPLC UV/VIS- PDA**



## ANEXO H: EVIDENCIAS FOTOGRÁFICOS DEL DESARROLLO DEL MÉTODO

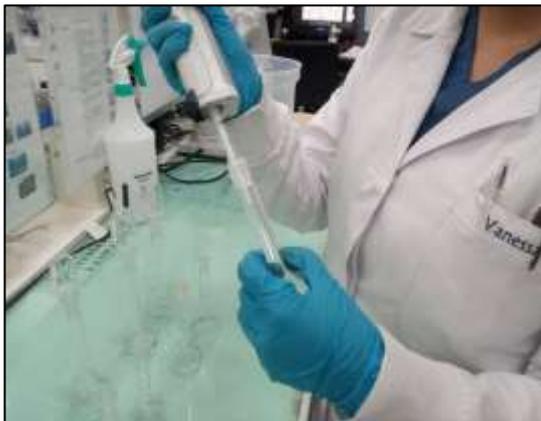
*Pesaje de los estándares*



*Preparación de la fase móvil*



*Preparación de las muestras*



*Colocación de los solventes en las líneas correspondientes del equipo*





epoch

Dirección de Bibliotecas y  
Recursos del Aprendizaje

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y  
DOCUMENTAL**

**REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

Fecha de entrega: 26 / 05 / 2022

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> <i>Claudia Vanessa Diaz Miniguano</i>
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> <i>Ciencias</i>
<b>Carrera:</b> <i>Bioquímica y Farmacia</i>
<b>Título a optar:</b> <i>Bioquímica Farmacéutica</i>
<b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b> <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>

x



0783-DBRA-UTP-2022