



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
HPLC PARA LA VALORACIÓN DEL SALICILATO DE
METILO EN FORMA FARMACÉUTICA SPRAY EN EL
LABORATORIO NEOFARMACO DEL ECUADOR CIA. LTDA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTORES: YAJAIRA ESTEFANÍA LANDA LANDA

TATIANA NICOLE OLEAS MORALES

DIRECTORA: BQF. GISELA ALEXANDRA PILCO BONILLA MSc.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Yajaira Estefanía Landa Landa & Tatiana Nicole Oleas Morales

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

Nosotras, Yajaira Estefanía Landa Landa y Tatiana Nicole Oleas Morales, declaramos que el presente Trabajo de Integración Curricular es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autoras asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 12 de mayo del 2023



Yajaira Estefanía Landa Landa
1804149282



Tatiana Nicole Oleas Morales
0605514546

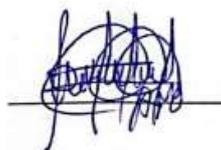
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO HPLC PARA LA VALORACIÓN DEL SALICILATO DE METILO EN FORMA FARMACÉUTICA SPRAY EN EL LABORATORIO NEOFARMACO DEL ECUADOR CIA. LTDA**, realizado por las señoritas: **YAJAIRA ESTEFANIA LANDA LANDA Y TATIANA NICOLE OLEAS MORALES**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

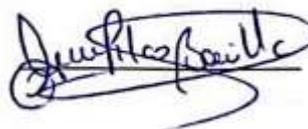
FECHA

BQF. Aida Adriana Miranda Barros MSc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



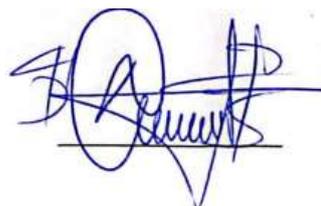
2023-05-12

BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla MSc.
DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR



2023-05-12

BQF. Diego Renato Vinueza Tapia MSc.
ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR



2023-05-12

DEDICATORIA

A nuestros padres por la confianza que depositaron en nosotros para vernos triunfar en la vida, por las palabras de aliento y superación que nunca faltaron; a nuestros amigos y familiares por el apoyo incondicional y los deseos de superación. Al personal técnico-operativo de la empresa NEOFARMACO Cia. Ltda por la apertura y confianza que nos brindaron para la realización de este trabajo de titulación.

Yajaira y Tatiana

AGRADECIMIENTO

Mil palabras no bastarían para agradecerles padres por su apoyo, comprensión y consejos en todo este trayecto. Gracias a ustedes hoy podemos alcanzar una meta de las muchas venideras en nuestra vida. A Laboratorio Neofarmaco del Ecuador, por abrirnos sus puertas y darnos la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación, por brindarnos todas las herramientas necesarias para lograr este objetivo. A Carlitos Pazmiño por toda su ayuda incondicional en la búsqueda del conocimiento, y la inspiración para descubrir la ciencia cada día. A nuestros amigos y hermanos de Neofármaco por toda su ayuda durante este proceso, con sus palabras de ánimo y sobre todo permitirnos formar parte de sus vidas y formar una linda amistad.

Yajaira y Tatiana.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	4
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	4

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Laboratorio Neofarmaco.....	6
2.1.1. <i>Misión</i>	6
2.1.2. <i>Visión</i>	6
2.2. Referencias teóricas.....	6
2.2.1. <i>Antecedentes de la investigación</i>	6
2.2.2. <i>Salicilato de metilo</i>	7
2.2.2.1. <i>Control de calidad del salicilato de metilo</i>	8
2.2.3. <i>Validación</i>	8
2.2.3.1. <i>Tipos de validación</i>	8
2.2.3.2. <i>Validación de métodos analíticos</i>	9
2.2.4. <i>Ensayos estadísticos</i>	10
2.2.4.1. <i>Distribución t-student</i>	10
2.2.4.2. <i>Análisis de varianza ANOVA</i>	11
2.2.4.3. <i>Diseño de cribado</i>	11

2.2.5.	<i>Métodos analíticos</i>	11
2.2.6.	<i>Cromatografía</i>	11
2.2.7.	<i>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i>	12
2.2.7.1.	<i>Equipo HPLC</i>	12
2.2.7.2.	<i>Parámetros Cromatográficos</i>	13
2.2.7.3.	<i>Gradiente de elución HPLC</i>	14
2.2.7.4.	<i>Tipos de gradientes</i>	14

CAPITULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	15
3.1.	Materiales, equipos y reactivos	15
3.1.1.	<i>Materiales</i>	15
3.1.2.	<i>Equipos</i>	15
3.1.3.	<i>Reactivos</i>	16
3.1.4.	<i>Estándares de referencias</i>	16
3.2.	Desarrollo del método analítico	17
3.2.1.	<i>Reconocimiento del salicilato de metilo</i>	17
3.2.2.	<i>Ensayos preliminares</i>	17
3.3.	Validación del método analítico	18
3.3.1.	<i>Preparación de soluciones</i>	18
3.3.1.1.	<i>Preparación estándares</i>	18
3.3.2.	<i>Parámetros de desempeño a evaluar</i>	19
3.3.2.1.	<i>Selectividad</i>	19
3.3.2.2.	<i>Linealidad y rango</i>	20
3.3.2.3.	<i>Exactitud</i>	21
3.3.2.4.	<i>Precisión</i>	22
3.3.2.5.	<i>Robustez</i>	22
3.3.2.6.	<i>Estabilidad</i>	23
3.3.2.7.	<i>Incertidumbre de la medición</i>	25
3.3.2.8.	<i>Idoneidad del sistema - (system suitability test)</i>	25
3.3.3.	<i>Registro y revisión de datos</i>	26

CAPÍTULO IV

4.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
----	---	----

4.1.	Desarrollo del método analítico.....	29
4.2.	Validación del método analítico.....	29
4.2.1.	<i>Selectividad</i>	29
4.2.2.	<i>Linealidad y rango</i>	30
4.2.3.	<i>Exactitud</i>	35
4.2.3.1.	<i>Precisión.....</i>	35
4.2.3.2.	<i>Robustez.....</i>	36
4.2.3.3.	<i>Estabilidad.....</i>	43
4.2.3.4.	<i>Idoneidad del sistema.....</i>	43
4.2.3.5.	<i>Incertidumbre de la medición.....</i>	44
4.2.3.6.	<i>Límite de detección y límite de cuantificación.....</i>	45
	CONCLUSIONES.....	46
	RECOMENDACIONES.....	47
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3:	Equipos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.....	15
Tabla 2-3:	Reactivos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.	16
Tabla 3-3:	Estándares utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.....	16
Tabla 4-3:	Desarrollo del método analítico.....	17
Tabla 5-3:	Concentración del salicilato de metilo para parámetro de selectividad.....	19
Tabla 6-3:	Pesos y disoluciones para parámetro de Linealidad	20
Tabla 7-3:	Variables propuestas para parámetro de Robustez	23
Tabla 8-3:	Variables respuestas establecidas por el diseño experimental (unidad).	23
Tabla 9-3:	Intervalo de tiempo para análisis de Estabilidad	23
Tabla 10-3:	Pesos y disoluciones para parámetro de Estabilidad	24
Tabla 11-3:	Tipos de degradación para parámetro de Estabilidad	24
Tabla 12-3:	Pesos y disoluciones de degradación forzada para parámetro de Estabilidad	24
Tabla 13-3:	Criterios de aceptación en base a normativa y los resultados del proyecto	26
Tabla 1-4:	Resultados de ensayo Selectividad.	29
Tabla 2-4:	Resultados del ensayo Selectividad.	29
Tabla 3-4:	Resultados del análisis de linealidad del sistema del salicilato de metilo.	30
Tabla 4-4:	Resultados del análisis de linealidad del método 1 (Placebo cargado).....	30
Tabla 5-4:	Análisis de linealidad del método 2 (Placebo cargado más yodopovidona).....	31
Tabla 6-4:	Resultados del análisis de Linealidad del sistema Salicilato de Metilo.....	32
Tabla 7-4:	Resultados del análisis de Exactitud del sistema Salicilato de Metilo	35
Tabla 8-4:	Análisis de repetibilidad del sistema y método, precisión Intermedia	35
Tabla 9-4:	Condiciones óptimas para minimizar tiempo de retención salicilato de metilo. ...	38
Tabla 10-4:	Condiciones óptimas para minimizar el número de platos teóricos	40
Tabla 11-4:	Condiciones óptimas para minimizar el número de platos teóricos	42
Tabla 12-4:	Resultados del análisis del parámetro de Estabilidad del sistema.	43
Tabla 13-4:	Resultados del análisis del parámetro de idoneidad del sistema	43
Tabla 14-4:	Resultados de la incertidumbre de la medición para salicilato de metilo.	44

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Formación del salicilato de metilo.....	8
Ilustración 1-4:	Diagrama de Pareto Estandarizado para el tiempo de retención.....	37
Ilustración 2-4:	Efectos para el tiempo de retención en influencia de salicilato de metilo	37
Ilustración 3-4:	Superficie-respuesta para el tiempo de retención de salicilato de metilo	38
Ilustración 4-4:	Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos	39
Ilustración 5-4:	Gráfico de efectos principales para el número de platos teóricos	39
Ilustración 6-4:	Superficie-respuesta para el tiempo de retención de salicilato de metilo	40
Ilustración 7-4:	Diagrama de Pareto Estandarizado para el número de platos teóricos	41
Ilustración 8-4:	Efectos para número de platos teóricos en influencia de salicilato de metilo	41
Ilustración 9-4:	Superficie-respuesta para tiempo de retención de salicilato de metilo	42
Ilustración 10-4:	Fuentes de incertidumbre para Salicilato de metilo.	45

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: DESARROLLO DEL MÉTODO

ANEXO B: LINEALIDAD

ANEXO C: PRECISIÓN INTERMEDIA

ANEXO D: PRECISIÓN INTERMEDIA

ANEXO E: REPETIBILIDAD

ANEXO F: INCERTIDUMBRE

ANEXO G: ROBUSTEZ

RESUMEN

El trabajo que se presenta a continuación describe el desarrollo y la validación de un método de cromatografía de alta eficiencia (HPLC) de fase reversa, para la cuantificación de salicilato de metilo en estándar y placebos cargados en forma farmacéutica spray. Se utilizó una columna LiChrospher® 100 RP-8 (125 x 4 mm, 5µm). La fase móvil consistió en metanol y un buffer de ácido orto fosfórico 1% utilizando el gradiente 60:40, con un flujo de 1 ml/min a 25°C. El volumen de inyección de la muestra fue de 10 µl. Posterior al desarrollo del método se procedió a validarlo, de acuerdo a la categoría 1 de Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados, descrita en la USP para la validación, demostrando ser un ser selectivo con un porcentaje de discrepancia de áreas 1,449 % y de tiempo 0,186%; lineal para el estándar $r=0,999979$ (linealidad del sistema), placebo cargado (linealidad del método 1) $r=0,999493$ y para el placebo cargado más yodopovidona (linealidad del método 2) $r=0,999365$, preciso con una repetibilidad del sistema de (RSD=0,2123), método (RSD=0,6328) y con una precisión intermedia de (RSD= 0,567), exacto (recuperación del 97,12%) , estable con un RSD que no supera el 20% de degradación. Una vez analizados todos estos resultados, se demostró que el método analítico desarrollado y validado es apropiado para la identificación y cuantificación de salicilato de metilo en forma farmacéutica spray y puede ser aplicado para el control de rutina en el laboratorio.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA >, <MÉTODO ANALÍTICO >, <CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) >, <VALIDACIÓN >, <SALICILATO DE METILO >.

1529-DBRA-UPT-2023



ABSTRACT

The following research describes the development and validation of a reversed-phase high-performance chromatography (HPLC), method for the quantification of methyl salicylate in standard and pharmaceutically spray-loaded placebos. A LiChrospher® 100 RP-8 column (125 x 4 mm, 5µm) was used. The mobile phase consisted of methanol and 1% ortho-phosphoric acid buffer using 60:40 gradient with a flow rate of 1 ml/min at 25°C. The sample injection volume was 10 µl. After method development, the method was validated according to Category 1 of the Analytical Procedures for the Quantification of Principal Components of Bulk Drugs or Active Ingredients in Finished Pharmaceutical Products, described in the USP for the validation of the method. It showed to be selective with a percentage discrepancy of areas 1.449 % and time 0.186%, linear for standard $r=0.999979$ (system linearity), placebo loaded (method 1 linearity) $r=0.999493$ and for placebo loaded plus iodopovidone (method 2 linearity) $r=0.999365$, precise with a system repeatability of (RSD=0.2123), method (RSD=0.6328) and with an intermediate precision of (RSD= 0.567), accurate (recovery of 97.12%), and stable with a RSD not exceeding 20% degradation. After analyzing all these results. It was demonstrated that the analytical method developed and validated is suitable for the identification and quantification of methyl salicylate in spray pharmacological form. Besides, it can be applied for routine control in the laboratory.

Keywords: <BIOCHEMISTRY >, <ANALYTICAL METHOD >, <HIGH EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) >, <VALIDATION >, <METHYL SALICYCYLATE >.

1529-DBRA-UPT-2023



Ing. Romel Francisco Calles Jiménez Ms.
0603877713

INTRODUCCIÓN

El laboratorio Neofármaco del Ecuador Cia. Ltda., fue fundado en la ciudad de Ambato por el Dr. Rodrigo Peña Pazmiño, químico farmacéutico de gran trascendencia a nivel nacional, el cual se rige bajo cuatro principios fundamentales calidad, integridad, profesionalismo y constancia; gracias a su brillante trayectoria de 52 años en el mercado farmacéutico ecuatoriano, es una de las empresas farmacéuticas más importantes del país, llegando a ser reconocida a nivel nacional e internacional (Laboratorio NeoFármaco, 2021).

Este laboratorio arrancó con dos productos farmacéuticos yodosalil ungüento y matico pomada, hoy en día cuenta con 82 productos farmacéuticos registrados, entre los más destacadas podemos mencionar: Apetitol®, Yodosalil®, Topic Bucal®, línea de Jabones Naturales del Dr. Peña®, Gastrogel®, entre otros (Laboratorio NeoFármaco, 2021).

Por ende, los beneficios que presentan sus productos son ampliamente aceptados por el cuerpo Médico y sus pacientes debido a su calidad y éxito terapéutico, siendo uno de los más demandados el yodosalil debido a su gran actividad analgésica. En consecuencia la producción fue expandiéndose, así como la necesidad de crear nuevas formas farmacéuticas como gel y spray.

Actualmente, Yodosalil Spray® no cuenta con una metodología específica registrada en la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) para determinación del salicilato de metilo, por ello surge la necesidad de desarrollar y validar un método analítico HPLC para la valoración del salicilato de metilo en forma farmacéutica spray en el Laboratorio Neofármaco del Ecuador Cia. Ltda.

Por lo tanto, la Agencia de Control, Regulación y Supervisión Sanitaria (ARCSA), se encarga de regular la elaboración de medicamentos y lo hace a través de su normativa entre ellos se encuentra el documento de: "Análisis de laboratorio de medicamentos, productos naturales, dispositivos médicos, reactivos bioquímicos" como se define en la Resolución 16 de la ley orgánica (ARCSA, 2017, p. 9).

Además, las pautas Q2 (R1 y R2) de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) brindan orientación sobre cómo realizar la validación analítica en la industria farmacéutica como recomendaciones para lograr resultados satisfactorios en los análisis (ICH, 1994, pp. 2-4).

Por lo tanto, es fundamental regular, validar y documentar los procesos a través de la validación analítica para que la industria farmacéutica pueda garantizar la seguridad y eficacia del producto en todas las etapas de su operación, incluido el almacenamiento, la distribución y el uso (Moreno, 2018, p. 31).

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Los procedimientos analíticos son indicadores de seguridad, y su validación es esencial para asegurar la estabilidad, efectividad, tiempo de vida útil y toxicidad de los productos farmacéuticos elaborados (Legaz et al., 2011, pp. 3-5).

Para desarrollar una metodología analítica indicadora de seguridad se debería considerar el parámetro de robustez que de acuerdo con la USP-40 se define como: “una medida de la capacidad del método analítico, que debe demostrar que una metodología no resulta afectada por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de confiabilidad durante su uso normal” (USP 42, 2017, p. 5).

La tecnología elegida para el desarrollo y validación de procedimientos analíticos indicadores de seguridad es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por su capacidad de separar líquidos e identificar productos de degradación incluso tras sufrir hidrólisis ácida, alcalina, termólisis, degradación oxidativa y fotólisis (Salgado et al, 2019, pp. 37-46).

La cromatografía HPLC es una de las técnicas más utilizadas debido a su sensibilidad, facilidad de adaptación para una cuantificación precisa, idoneidad para la separación de sustancias no volátiles o termolábiles y, lo más importante, su sensibilidad a sustancias de gran interés en la industria analítica (Legaz et al., 2011, pp. 1-32).

La molécula para la cual se desarrollará el procedimiento analítico indicador de seguridad, es el salicilato de metilo, el cual es sintetizado a partir de la reacción de ácido salicílico y metanol. Este compuesto presenta propiedades analgésicas, alivia dolores asociados a artritis, dolores de espalda, distensión muscular entre otros.

YODOSALIL es un producto farmacéutico de alta demanda en el Ecuador que se comercializa en forma de pomada sin necesidad de receta médica, se elabora en el laboratorio NEOFARMACO DEL ECUADOR CIA. LTDA. Actualmente, la empresa busca proveer al mercado de una nueva forma farmacéutica, sin embargo, no se cuenta con la validación de la técnica analítica para ejecutar los análisis correspondientes (Ayala, 2021, pp. 1-65).

1.2. Justificación

Según el Acuerdo Ministerial 58, en la ley del medicamento de Ecuador y el manual de registro sanitario se especifica la ejecución de estudios de seguridad de medicamentos para establecer fechas de vencimiento, para lo cual es indispensable disponer de un procedimiento analítico indicador de seguridad que logre cuantificar de forma inequívoca al salicilato de metilo.

Se ha realizado la búsqueda para la especificación técnica y analítica del producto terminado de spray para salicilato de metilo en la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), y no se encuentra registrada, por lo tanto, se debe realizar una técnica analítica propia y la validación respectiva.

El método analítico propuesto resultaría en una alternativa económica y factible, a su vez se estaría cumpliendo con las Buenas Prácticas de Manufactura solicitadas en los estudios de seguridad de Medicamentos exigidas bajo la resolución ministerial N° 0909 del 7 de diciembre de 2005.

Por tanto, la presente investigación estará enfocada al desarrollo y validación del método analítico HPLC para la valoración del salicilato de metilo en forma farmacéutica de spray en el laboratorio Neofarmaco del Ecuador. Para lo cual se describirá los lineamientos y criterios de validación, se medirá además la capacidad del método para permanecer inalterado ante pequeñas variaciones.

Finalmente, se estimará el límite de detección y límite de cuantificación del salicilato de metilo en forma farmacéutica de spray.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico HPLC para la valoración del salicilato de metilo en forma farmacéutica spray en el Laboratorio Neofármaco del Ecuador Cia. Ltda.

1.3.2. Objetivos específicos

- Desarrollar un método analítico HPLC para la valoración de salicilato de metilo en forma

farmacéutica de spray para el Laboratorio Neofármaco del Ecuador Cia. Ltda.

- Evaluar los parámetros de: selectividad, especificidad, sensibilidad, linealidad, límite de cuantificación, exactitud y robustez del método analítico desarrollado.
- Demostrar mediante los resultados obtenidos que el método se encuentra validado.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Laboratorio Neofarmaco

El laboratorio fue fundado en 1969 en la ciudad de Ambato, comprometida con la calidad, productividad, mejora continua, seguridad, profesionalismos, respeto y honestidad; lo que garantiza productos de alta calidad, seguridad, eficacia y sobretodo precios razonables para el consumo a nivel nacional e internacional (Laboratorio NeoFármaco, 2021).

2.1.1. Misión

Proveer a la población nacional e internacional medicamentos, productos naturales procesados de uso medicinal y cosméticos, de alta calidad seguridad y eficacia y a un costo asequible; contando con procesos e insumos adecuados y controlados, personal altamente calificado, tecnología y servicios de vanguardia que aseguran la calidad durante todo el ciclo de vida del producto (Laboratorio NeoFármaco, 2021).

2.1.2. Visión

Alcanzar el liderazgo en la industria farmacéutica en base a la innovación de la cartera de nuevos productos respaldado con los puntos de venta ubicados estratégicamente en todo el país, con el apoyo de personal especializado y altamente motivado por su filosofía de trabajo en equipo, compromiso con la calidad, venta y servicios; buscando permanentemente el desarrollo integral y equitativo del talento humano a través del bienestar y progreso de todo el personal que hacemos esta industria farmacéutica (Laboratorio NeoFármaco, 2021).

2.2. Referencias teóricas

2.2.1. Antecedentes de la investigación

En un estudio mencionan que el método por cromatografía gaseosa fue lineal, exacto, preciso y selectivo para la determinación de los analitos de mentol (MT), salicilato de metilo (SM), timol (TM) y ácido benzoico (AB) en el control de calidad, se utilizó una columna DB-WAX y dietilenglicol como estándar interno. Se determinó la linealidad en un intervalo de

concentraciones de 64,00 a 96,00 µg/mL (MT), 80,00 a 120,00 µg/mL (SM), 96,00 a 144,00 µg/mL (TM) y 48,00 a 72,00 µg/mL (AB), obteniendo coeficientes de correlación superiores a 0,999, y coeficientes de variación de los factores de respuestas de 1,18, 1,95, 3,52 y 1,48%, respectivamente (Amaro et al., 2020, pp. 306-328).

En un estudio determinaron las características físico-mecánicas y químicas de una pomada que contiene indometacina y salicilato de metilo, para realizar estudios de control y estabilidad de los principios activos. El método analítico usado se basa en la determinación de los principios activos por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de fase reversa con detección UV, en donde se empleó como fase estacionaria una columna Spherisorb ODS-2 y una fase móvil de acetonitrilo y ácido acético, la misma que fue validada gracias a los resultados obtenidos. En esta investigación se realizó la repetición de los ensayos con tres lotes de pomada en diferentes condiciones de almacenamiento lo que demostró la estabilidad (González et al, 1996, pp. 549-561).

Con la adquisición de un Cromatógrafo de gases (GC-FID), se realizó el desarrollo y validación de la técnica analítica para la identificación y cuantificación de salicilato de metilo y mentol en unguento, dando como resultado que el método es preciso (RSD = 0.9431% y RSD = 1.1084% para Salicilato de metilo y Mentol respectivamente), exacto (%R= 99.66% y %R= 99.73% para Salicilato de metilo y Mentol respectivamente), con un sistema lineal ($r^2 = 0.9940$ y $r^2 = 0.9995$ para Salicilato de metilo y Mentol respectivamente), por lo tanto es adecuada para su uso (Ayala, 2021, pp. 1-65).

Se desarrolló un método analítico indicador de estabilidad para el Ácido Acetilsalicílico tabletas en 3 marcas diferentes utilizando HPLC, variando condiciones como pH de la fase móvil, flujo, buffer, longitud de onda, columna cromatográfica, diluyente de los analitos y proporción de la fase móvil. Se determinó que la muestra es estable hasta 120 minutos. Para la validación del método analítico se tomó en cuenta parámetros como: especificidad, linealidad e intervalo, exactitud, precisión, límite de detección y de cuantificación. Como resultado de esta investigación se obtuvo que la marca “A” no cumple con el requisito de Ácido Salicílico Libre con un valor de 0,34% siendo el valor referente de 0,3 % para tabletas no recubiertas y de 3% para tabletas con recubierta según la USP-37 (Choque, 2019, p. 5).

2.2.2. Salicilato de metilo

El salicilato de metilo (CAS: 119-36-8) es un líquido orgánico incoloro y viscoso, de aroma característico “mentolado”, utilizado para la producción farmacéutica, producto químico de investigación y desarrollo y como materia prima para cosméticos (Merck, 2022, pp. 1-13).

Actúa terapéuticamente como un analgésico tópico, para el tratamiento del dolor articular o muscular. Químicamente, es un éster, derivado de un ácido carboxílico y de un alcohol, producido por la reacción del ácido salicílico y metanol en medio ácido. La reacción que describe este proceso es la siguiente ilustración 1-2.

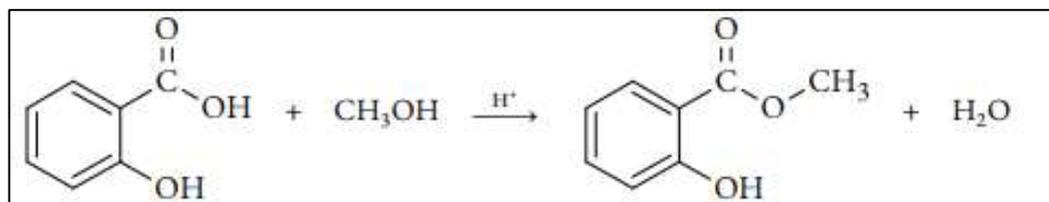


Ilustración 1-2: Formación del salicilato de metilo

Realizado por: Landa, Y; Oleas, T, 2022

Fuente: Amaro et al., 2020, pp. 306-328.

2.2.2.1. Control de calidad del salicilato de metilo

La validación de los métodos analíticos, es un requisito básico para el aseguramiento de calidad del producto terminado, incluyendo técnicas analíticas relacionadas con los límites de detección y cuantificación, la precisión, exactitud, especificidad, rango y robustez. La técnica más aplicada para la determinación de los analitos ya sea de forma individual o combinada es HPLC (Fonseca et al., 2020, pp. 306-328).

2.2.3. Validación

Es el proceso mediante el cual se recolecta y analiza datos, por lo tanto nos ayuda a establecer, después de la investigación, evidencia documentada de que el proceso es capaz de producir resultados consistentes con las especificaciones requeridas en el laboratorio y con las características de desempeño de que un proceso cumpla con los requerimientos para las distintas aplicaciones analíticas (WHO, 2006, pp. 1-21).

2.2.3.1. Tipos de validación

- *Prospectiva*

Se efectúa durante la etapa de desarrollo mediante la identificación de situaciones críticas, evaluación del riesgo, investigación de las causas posibles; determinando la probabilidad de que sucedan y su magnitud siendo esencial para limitar el riesgo de los errores (Ramírez et al., 2007, p. 9).

- *Coincidente*

Se lleva a cabo durante la producción y vigilancia de los tres primeros lotes de un producto. En este método, los estudios estadísticos se aplican a los resultados después del análisis de los parámetros clave de calidad para dar el cumplimiento necesario a criterios como robustez, así como su fiabilidad, además de la consistencia del proceso de producción (WHO, 2006, pp. 1-21).

- *Retrospectiva*

En este tipo de validación se debe verificar la experiencia de producción, asumiendo que los componentes, procesos y equipos no se deben modificar. Se evalúa esta experiencia y los resultados de las pruebas en proceso y finales. Del mismo modo se analiza los problemas y defectos de fabricación registrados para determinar los límites de los parámetros del proceso. Por otro lado, se puede realizar un análisis de tendencias para determinar qué tan bien se encuentran los parámetros del proceso dentro de los límites aceptables (Gonzalez, 2005, p. 3).

- *Revalidación*

Es necesario para tener seguridad de que los cambios en el proceso no perjudican las características del proceso ni localidad del producto, siendo o no intencionales. La revalidación se puede dividir en dos categorías generales:

- La revalidación después de cualquier cambio que repercuta en la localidad del producto.
- La revalidación periódica que se efectúa a intervalos programados (Fugate et al., 2010, pp. 23-37)

2.2.3.2. *Validación de métodos analíticos*

La validación de un método analítico busca determinar la composición química de una muestra, haciendo referencia al desempeño del equipo, esto con la finalidad de asegurar el funcionamiento del equipo basándose en las diferentes especificaciones del diseño del método, asegurando que los resultados obtenidos sean fiables y congruentes (Rodríguez, 2019, pp. 17-18).

Al hacer referencia a los parámetros de validación de un método analítico se encuentra que son: selectividad, sensibilidad y linealidad, límite de detección y cuantificación, exactitud, precisión, robustez, reproducibilidad, especificidad, margen de error y por último estabilidad (Castillo y González, 1996, pp. 1-7).

- **Selectividad:** Este método cuantifica y selecciona simultáneamente los analitos de interés

así sea en combinación con otras sustancias (AEFI, 2001, pp. 39-134).

- Sensibilidad y linealidad: El método determina la capacidad de obtener resultados proporcionales a la concentración del analito, mientras que la sensibilidad depende de la curva de calibración, cuanto mayor sea la pendiente, más sensible será el método (Skoog et al., 2005, pp. 1004-1008).
- Límite de detección y de cuantificación: El límite de detección es el nivel más bajo que se puede medir, analizando muestras con cantidades o concentraciones conocidas del analito. El límite de cuantificación (LOQ) es el valor más bajo de la concentración del análisis que se puede determinar con parámetros como precisión y reproducibilidad aceptable (Suárez et al., 2009, p. 57).
- Exactitud: Representa qué tan cerca está el resultado del valor real y el valor experimental encontrado tras el análisis (Castillo y González, 1996, pp: 1-7).
- Precisión: Se refiere a la relación entre los resultados obtenidos al aplicar repetidamente el mismo procedimiento experimental en la muestra en condiciones especificadas, la precisión engloba diferentes tipos de estudios como: repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad (Castillo y González, 1996, pp: 1-7).
- Robustez: Capacidad del método analítico para no verse afectado por pequeños cambios en el proceso, permitiendo obtener información de dichos cambios de una forma rápida y sistemática (Molina, 2010, pp. 1-38).
- Estabilidad: Se utiliza para determinar el porcentaje de degradación de la muestra cuando se expone a distintos factores como hidrólisis, oxidación y fotólisis, comprobándose si las muestras se pueden utilizar en el análisis (AEFI, 2001, pp. 39-134).
- Incertidumbre de la medición: Es el rango de duda que se presenta al realizar mediciones, debido a que estas no son exactas en lo absoluto. Teniendo una relación directamente proporcional con el rango ya que si es muy grande por ende la incertidumbre también lo será (Suárez et al., 2009, p. 57).
- Idoneidad del sistema: conjunto de ensayos que deben ser realizados previo a la utilización del método, con el fin de asegurar que las condiciones del sistema son adecuadas para la determinación del análisis (AEFI, 2001, pp. 39-134).

2.2.4. Ensayos estadísticos

2.2.4.1. Distribución t-student

La distribución “T-student” es un método estadístico en el cual se analiza la diferencia entre la media de dos grupos cuando el tamaño de la muestra es pequeña, con una distribución normal e igualdad en sus varianzas (Sánchez, 2015, pp. 59-61).

2.2.4.2. Análisis de varianza ANOVA

El análisis de varianza es una técnica estadística muy utilizada en el desarrollo de metodologías analíticas, la cual mediante resultados obtenidos permite rechazar o aceptar una hipótesis (Dagnino, 2014, pp. 306-310).

2.2.4.3. Diseño de cribado

El diseño de cribado es fundamental en la identificación de los factores más cruciales que afectan la calidad de un proceso, así como la reducción significativa de los mismos (Polo, 2007, p. 106).

2.2.5. Métodos analíticos

Se entiende por método analítico una explicación detallada de todas las operaciones para un análisis dado, además de la necesidad de respetar ciertos parámetros, que serviría de apoyo para argumentar que el método puede usarse repetidamente en cualquier momento. Dentro de estos parámetros encontramos la exactitud, idoneidad del sistema, límite de cuantificación, límite de detección, linealidad, precisión y selectividad (AEFI, 2001, pp. 39-134).

2.2.6. Cromatografía

La cromatografía es la ciencia y arte de dividir entre sí los elementos de una sustancia. La división se consigue por medio de una extensa variedad de técnicas cuyas bases moleculares poseen diferencias bastante distintas.

Ejemplificando, tienen la posibilidad de dividir moléculas en funcionalidad de sus cargas moleculares, sus tamaños moleculares, sus masas moleculares, la polaridad de sus enlaces, sus potenciales Redox, sus constantes de ionización o bien en funcionalidad de la disposición de sus enlaces (Palomino, 2021, pp. 10-11).

Como consecuencia existe una extensa variedad de técnicas para realizar la división de una sustancia. La división se hace gracias a las diferencias de afinidad de los elementos a dividir por la etapa móvil y la etapa estacionaria. Los elementos separados tienen la posibilidad de ser cuantificados mediante la decisión de alguna propiedad fisicoquímica y su comparación contra la misma propiedad en un estándar de estructura y purzas conocidas (Baena et al., 2018: pp. 424-440).

2.2.7. *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*

La cromatografía líquida (HPLC), es un tipo de cromatografía de elución utilizada para separar los componentes de una mezcla, en la cual se usa un mecanismo de separación de reparto, en donde al inyectar una combinación de solutos en la fase móvil, todos los solutos van a avanzar a través de la columna en la cual se encuentra la fase estacionaria, por lo tanto los solutos se van a mover a diferentes velocidades ya que depende de su afinidad a cada una de sus fases en el desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico (Legaz et al., 2011: pp. 1-32).

La cromatografía de líquidos tiende a ser complementarios por lo que a sus campos de aplicación se refiere. Así, para solutos con masas moleculares superiores a 10000 a menudo se utiliza la cromatografía de exclusión por tamaño, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos con cromatografía de reparto en fase inversa. Para especies iónicas de masa molecular más pequeña, se utiliza con frecuencia la cromatografía de intercambio iónico. Los métodos de reparto se aplican a las especies pocos polares, pero no iónicas.

La cromatografía de adsorción se elige con frecuencia para separar especies no polares, isómeros estructurales y grupos de compuestos como, por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos de los alcoholes alifáticos (Salgado et al., 2019, pp. 37-46).

2.2.7.1. *Equipo HPLC*

- *Recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los disolventes*

Los contenedores de fase móvil son un componente simple pero esencial de un equipo de HPLC; pueden ser recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene unos 500 mL de un disolvente, los mismos que deben ser limpiados con regularidad utilizando técnicas de lavado de material de laboratorio. Se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección (García y Yusa, 2016: pp. 6-13).

En la fase móvil del sistema HPLC es muy común la aparición de burbujas de aire. En la mayoría de los casos, los problemas de burbujas de aire se pueden eliminar sonicando la fase móvil. Con frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión de los disolventes, por ello es importante utilizar una fase móvil libre de partículas (Snyder et al., 2010: pp. 87-145).

- *Bomba*

La bomba cumple la función de impulsar a la fase móvil al flujo seleccionado con una presión adecuada para atravesar la columna y el resto del sistema, por lo general el equipo trabaja a presiones de hasta 6000 psi (400 bar), la misma que puede variar en función del operario (Snyder et al., 2010: pp. 87-145).

- *Sistema de inyección*

Es posible incorporar la muestra a la fase móvil antes que a la columna sin que exista una caída de presión que altere el caudal entregado por la bomba. Al momento de introducir la muestra en la columna es necesario que se agregue una cantidad medida de la muestra a la fase móvil, por lo general son muy pequeños. La inyección manual, era muy popular en el pasado, pero rara vez se usa en la actualidad, excepto cuando se realiza la capacitación del operador o en entornos de muy bajo rendimiento; pero puede llegar a ser satisfactorio para separaciones de columna abierta o de flujo detenido (Snyder et al., 2010, pp. 87-145).

2.2.7.2. *Parámetros cromatográficos*

- *Tiempo muerto (t_M)*

Es el tiempo requerido para la elución de un componente no retenido en fase estacionaria (Legaz et al., 2011, pp.1-32).

- *Tiempo de retención*

Es el tiempo que se recorre desde el momento que se inyecta la muestra hasta que existe un pico de respuesta (Legaz et al., 2011, pp.1-32).

- *Factor de capacidad*

Se define como la cantidad de moléculas que pasan a la fase estacionaria en equilibrio con la cantidad de moléculas que permanecen en la fase móvil (Legaz et al., 2011, pp. 1-32).

- *Eficacia o número de platos teóricos*

Es una medida de la eficiencia de la columna la misma que se utiliza para comparar el

rendimiento de diferentes columnas. Las columnas con un número alto de platos son más eficientes generando picos más estrechos para un determinado tiempo de retención (Legaz et al., 2011: 1-32).

2.2.7.3. *Gradiente de elución HPLC*

Es un método que se lleva a cabo que consiste en la validación continua de la composición de los disolventes, de forma que su fuerza vaya incrementando durante todo el tiempo de análisis. Sin embargo, al principio del proceso se utiliza una fuerza de fase móvil más débil para posteriormente ir incrementando (Sacristán et al., 2011, pp. 48-78).

- *Eficacia en el desarrollo del método HPLC*

Para obtener un buen desenvolvimiento del método es de suma importancia realizar una sola corrida de gradiente al inicio del método, con el fin de disminuir el número de corridas y por ende el error entre ellas, ayudándonos a elegir la concentración idónea para el solvente (Sacristán et al., 2011, pp. 48-78).

2.2.7.4. *Tipos de gradientes*

- *Lineal*

Es el tipo de gradiente en donde la velocidad de cambio del disolvente fuerte es proporcionalmente lineal en cuanto al tiempo (Sacristán et al., 2011: pp. 48-78).

- *Exponencial*

Convexos: este tipo de gradiente se diferencia por su rapidez que tiene en alcanzar la composición final de la fase móvil, los mismo que se utilizan para picos superpuestos al final del cromatograma (Sacristán et al., 2011: pp. 48-78).

Cóncavos: es un tipo de gradiente lento en alcanzar la composición final de la fase móvil, son utilizados para picos superpuestos al inicio del cromatograma (Sacristán et al., 2011: pp. 48-78).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

A continuación, se presentan los resultados del desarrollo y la validación del método analítico, para la cuantificación e identificación del salicilato de metilo. Para ello, se realizaron varios pasos como: identificación individual de salicilato de metilo, determinación de condiciones ideales de operación por HPLC, validación de método, protocolo de validación y los correspondientes estudios estadísticos de los datos procesados.

3.1. Materiales, equipos y reactivos

Los materiales, equipos y reactivos empleados en la determinación y cuantificación del salicilato de metilo se describen en la (Tabla 1.3)

3.1.1. *Materiales*

- Balón de Aforo
- Probeta
- Pesa muestra de vidrio
- Vaso de precipitación
- Espátula
- Gotero
- Guantes de nitrilo
- Filtros PVDF y Filtros de jeringa
- Puntas dispensadoras
- Máscara de gases

3.1.2. *Equipos*

Tabla 1-3: Equipos empleados en el desarrollo y validación del método analítico

Equipo / Instrumento	Marca	Modelo N°
Balanza Analítica	Sartorius	BP2105
Pipeta electrónica	Brand	HandyStep
Agitador ultrasónico	VWR Scientific Products	75T
Sorbona	WEMA Laboreinrichtungen	-----

Conductímetro		Mettler Toledo	Conductivity S230
Agitador electromagnético AREX		HITACHI	CROMASTER VWR
HPLC (Cromatógrafo Líquido de Alta	Unidad Bomba	HITACHI	CM5160
	Autosampler (Automuestreador)	HITACHI	CM5260
	Horno-Columna	HITACHI	CM5310
	Detector UV-VIS	HITACHI	CM5420

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

3.1.3. Reactivos

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

Reactivo / Estándar	Marca / Proveedor	Lote / F. Expiración
Acetonitrilo Grado HPLC	Merck	217515 31-Dic-2026
Metanol	Fisher	213525 / 213501 25-Jul-2026/ 30-Jul 2026
Ácido Orto Fosfórico	Merck	212149 27-Jun-2026
Agua Purificada –Grado HPLC	NEOFÁRMACO	N/A
Ácido Clorhídrico	Fisher	213221 Julio-2026
Tiosulfato de Sodio	Fisher	182798 Octubre-2023
Solución Indicadora de Almidón	Merck	IND-001-CCV1 30-Jun-2023
Yodo	Fisher	055381 06-Jun-2023

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

3.1.4. Estándares de referencias

Tabla 3-3: Estándares utilizados en el desarrollo y validación del método analítico

Estándar de Referencia	Lote	% Pureza
Salicilato de metilo	2109037V1	99,97%
YODO POVIDONA (LOTE ACTUAL)	AC210915069	N/A

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

3.2. Desarrollo del método analítico

Desarrollar un método analítico trae consigo seleccionar los requisitos imprescindibles para proporcionar una resolución aceptable para una muestra dada. Las consideraciones iniciales para el desarrollo del método son:

- Pretratar la muestra
- Seleccionar un modo cromatográfico
- Seleccionar las condiciones de separación
- Seleccionar un detector
- Validar el método y determinar los parámetros necesarios para la idoneidad del sistema

3.2.1. Reconocimiento del salicilato de metilo

El desarrollo del método comenzó con una revisión de la literatura enfocada en establecer y analizar la información fisicoquímica para el salicilato de metilo, posteriormente se realizaron pruebas exploratorias con el fin de determinar el tiempo de retención del principio activo mediante la inyección de estándares individuales y cómo interactúan en el estándar combinado. Las características fisicoquímicas que contribuyeron a la optimización del método analítico se describe en el ANEXO A.

3.2.2. Ensayos preliminares

Una vez identificado los tiempos de retención del salicilato de metilo se ejecutaron pruebas previas donde se valoraron factores como composición del orgánico y flujo.

Tabla 4-3: Desarrollo del método analítico

DESARROLLO DEL MÉTODO	CONDICIONES	OBSERVACIONES
Prueba preliminar 1	-Fase-móvil: (55:45) Metanol:Ácido ortofosfórico 0,1% -Flujo: 0,8 mL/min -Temperatura: 25 -Longitud de onda: 237	Picos sin resolución, asimétricos. Aumenta el tiempo de retención y mayor área de los picos en general.
Prueba preliminar 2	-Fase-móvil: (65:35) Metanol:Ácido ortofosfórico 0,1% -Flujo: 1,2 mL/min -Temperatura: 25 -Longitud de onda: 237	Disminución de tiempo de retención y mejora el área de los picos en general.

Prueba preliminar 3	-Fase-móvil: (60:40) Metanol:Ácido ortofosfórico 0,1% -Flujo: 1 mL/min -Temperatura: 25 -Longitud de onda: 237	Se logró mejorar los tiempos de retención, resolución y área de los picos. Método final con el cual se realizó la validación.
----------------------------	---	--

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

3.3. Validación del método analítico

3.3.1. Preparación de soluciones

3.3.1.1. Preparación estándares

- Estándar salicilato de metilo

Se preparó un estándar de salicilato de metilo con una concentración de 0,15g/mL.

3.3.1.2. Preparación de las muestras

- Placebo

Se pesó las cantidades declaradas en la fórmula maestra de YODOSALIL SPRAY, excepto los principios activos para preparar 200 mL de Placebo.

- Placebo cargado (Yodopovidona)

Se pesó las proporciones necesarias de cada excipiente para un volumen de 200 mL, incluyendo la yodopovidona.

- Placebo cargado

Se elaboró a partir de las soluciones de placebo y estándar, teniendo en cuenta las cantidades requerida de cada principio activo.

- Agua purificada (Grado HPLC)

Obtener este tipo de agua según instructivo (I-NCC-032). Filtrar por membrana 0.22 µm.

- Fase móvil

Mezclar metanol (60%) y ácido orto fosfórico 0,1% (40%). Agitar con agitador electromagnético Por 10 minutos hasta una completa homogenización, filtrar por membrana 0,22 µm.

Ácido Orto fosfórico 0,1%: Tomar 1.18mL de Ácido orto fosfórico en 1000mL de agua HPLC.

3.3.2. Parámetros de desempeño a evaluar

3.3.2.1. Selectividad

Tabla 5-3: Concentración del salicilato de metilo para parámetro de selectividad

ENSAYO: VALORACIÓN	PESOS	[C (mg/mL)	N° de inyecciones
Estándar Preparar por duplicado	150 mg Salicilato de metilo	0,15	Inyectar por triplicado
Placebo Cargado (Salicilato de Metilo) Preparar por duplicado	100mg Salicilato de Metilo + 899 mg de placebo	0,15	Inyectar por triplicado
Placebo Cargado – Yodopovidona + Salicilato de Metilo Preparar por duplicado	100mg Salicilato de Metilo + 999 mg de placebo	0,15	Inyectar por triplicado
Placebo	899mg Placebo	-	Inyectar por duplicado
Placebo cargado – Yodopovidona	999 mg de placebo	-	Inyectar por duplicado
Excipientes	Guayacol (100mg)	0,015	Inyectar
	Alcanfor (100mg)	0,075	Inyectar
	Trietanolamina (100mg)	0,04	Inyectar
Impurezas (USP)	150 mg Salicilato de metilo	0,15	Inyectar a las condiciones para detectar impurezas

	100 mg Ácido salicílico	0,15	Inyectar por triplicado
--	-------------------------	------	-------------------------

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

3.3.2.2. Linealidad y rango

Preparar soluciones a 5 distintos niveles para obtener como respuesta picos (áreas) de cada ingrediente activo con el fin, de realizar una curva de calibración, utilizando estándares y muestras para obtener la linealidad del sistema y del método respectivamente a intervalos de: 70-130%.

- *Linealidad del sistema*

Estándar de salicilato de metilo: Se preparó una solución madre de salicilato de metilo aforado con metanol a la concentración dada en la selectividad. Tomar 5 alícuotas a distintos niveles (70%, 85%, 100%, 115%, 130%) de la solución madre y aforar con metanol, como se establece en la Tabla 6-3.

- *Linealidad del método*

- Placebo cargado
- Placebo cargado (Yodopovidona) + salicilato de metilo
- Preparar la solución tomando como referencia:
- Preparación, de la muestra, y estándares, a las concentraciones adecuadas.

De las soluciones preparadas anteriormente tomar alícuotas a 5 niveles (70%, 85%, 100%, 115%, 130%) y aforar con metanol, como se establece en la Tabla 6-3.

Tabla 6-3: Pesos y disoluciones para parámetro de linealidad

LINEALIDAD DEL SISTEMA					
SALICILATO DE METILO					
ESTÁNDAR	DILUCIONES		[] (mg/mL)	[] (%)	Nº INYECCIONES
	Medio de Dilución: Metanol				
	Alícuota (mL)	Aforo (mL)			

Estándar Salicilato de Metilo (Concentración 0.15 mg/mL)	0,7	10	0.1050	70	Inyectar por triplicado
	0,85	10	0.1275	85	
	1,0	10	0.1500	100	
	1,15	10	0.1725	115	
	1,30	10	0.1950	130	
LINEALIDAD DEL MÉTODO 1					
SALICILATO DE METILO					
ESTÁNDAR	DILUCIONES Medio de Dilución: Metanol		[] (mg/mL)	[] (%)	N° INYECCIONES
	Alícuota (mL)	Aforo (mL)			
Placebo Cargado SALICILATO DE METILO	1,050	10	0.1050	70	Inyectar por triplicado
	1.275	10	0.1275	85	
	1,5	10	0.1500	100	
	1,725	10	0.1725	115	
	1.950	10	0.1950	130	
LINEALIDAD DEL MÉTODO 2					
SALICILATO DE METILO					
ESTÁNDAR	DILUCIONES Medio de Dilución: Metanol		[] (mg/mL)	[] (%)	N° INYECCIONES
	Alícuota (mL)	Aforo (mL)			
Placebo Cargado – Yodopovidona + Salicilato de Metilo	1,050	10	0.1050	70	Inyectar por triplicado
	1.275	10	0.1275	85	
	1,5	10	0.1500	100	
	1,725	10	0.1725	115	
	1.950	10	0.1950	130	

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

3.3.2.3. Exactitud

Se debe preparar soluciones a 5 concentraciones diferentes por tres réplicas. Y usando las respuestas de AUC para el placebo cargado, y los estándares para calcular el porcentaje de recuperación de cada análisis.

Intervalo con respecto a la especificación: 70-130%

Concentraciones: 70%,85%, 100%, 115% y 130%.

Calcular conforme a la siguiente fórmula:

$$(St)=PSt \frac{\%P}{FDSt} (FDSt) = \frac{1er\ aforox2do\ aforo}{Alicuota}$$

$$(Mx)=\frac{AMx}{ASt} x(St)$$

$$\% P.A = \frac{(Mx) x FD x Dosis (g)}{PMx(g) x potencia P.A (mg)} x 100$$

P.st= Peso del estándar

P = Porcentaje de pureza

FD= Factor de dilución

(Mx)= Concentración de la muestra mg/mL

AMx= Área de la muestra

ASt= Área del estándar

(St)= Concentración del estándar

Dosis= peso teórico

P Mx= Peso de la muestra

3.3.2.4. Precisión

- Repetibilidad

Repetibilidad del Sistema: Inyectar 6 veces el estándar a una concentración del 100%.

Repetibilidad de Método: Elaborar soluciones del placebo cargado con una concentración del activo de interés al 100% y efectuar 6 determinaciones.

- Precisión intermedia

Se determinará analizando la variabilidad de la respuesta AUC por triplicado de los estándares (sistema) y placebo cargado (método) al 100%, en el mismo laboratorio, equipo con dos analistas en dos días diferentes, según el diseño experimental.

3.3.2.5. Robustez

Para el test de Robustez, se aplicará el diseño experimental generado en el software estadístico STATGRAPHICS, con los siguientes factores y niveles de influencia definidos en el método analítico:

Tabla 7-3: Variables propuestas para parámetro de robustez

N°	FACTOR	VALOR DE CONDICIÓN ESTABLECIDA EN EL MÉTODO	NIVEL		RESPUESTAS EVALUADAS
			Bajo	Alto	
1	Composición del orgánico	(Metanol:Ácido fosfórico 0,1%) (60:40)	((Metanol:Ácido fosfórico 0,1%) (55:45)	(Metanol:Ácido fosfórico 0,1%) (65:35)	Tiempo de retención
2	Temperatura de la columna	25°C	23 °C	27 °C	N.º platos teóricos
3	Longitud de onda	237 nm	235 nm	239 nm	Asimetría
4	Flujo	1.0 mL/min	0,8 mL/min	1.2 mL/min	

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Tabla 8-3: Variables respuestas del diseño experimental (unidad).

Respuestas	Unidades
Tiempo de retención	Min
Número de platos teóricos	-
Resolución	-

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

3.3.2.6. Estabilidad

- Estabilidad de la solución

Preparar y determinar la estabilidad de la solución estándar en un intervalo de tiempo como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 9-3: Intervalo de tiempo para análisis de Estabilidad

ENSAYO: VALORACIÓN	Condiciones de Almacenamiento	MUESTREAR Y ANALIZAR		
		0 horas	24 horas	48 horas
Estándar Combinado	Ambiente (25°C)	0 horas	24 horas	48 horas
Estándar Combinado	Refrigeración	0 horas	24 horas	48 horas

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Tabla 10-3: Pesos y disoluciones para parámetro de estabilidad

Salicilato de Metilo						
Ensayo	Pesos	DILUCIONES			C (mg/mL)	N° de inyecciones
		Medio de Dilución: Fase móvil				
		Aforo (mL) Metanol	Alícuota (mL)	Aforo (mL) Metanol		
Estándar Preparar por duplicado	150 mg Salicilato de metilo	100 mL	1 mL	10 mL	0,15	Inyectar por triplicado

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

- *Degradación forzada***Tabla 11-3:** Tipos de degradación para parámetro de estabilidad

TIPO DE DEGRADACIÓN	CONDICIONES EXPERIMENTALES	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	TIEMPO DE EXPOSICIÓN
Hidrólisis	Sln. Estándar aforo con: HCl 0.1N	25°C (ambiente)	24HORAS
	Sln. Estándar aforo con: NaOH 0.1N	25°C (ambiente)	24HORAS
Oxidación	Sln. Estándar aforo con: H ₂ O ₂ 3%	25°C (ambiente)	24HORAS
Fotolítica	Sln. Madre exposición: Luz Uv corta	25°C (ambiente)	1 HORA
	Sln. Estándar exposición: Luz Solar Directa		24 HORAS
	Sln. Estándar exposición: Baño María		1 HORA

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Tabla 12-3: Pesos y disoluciones de degradación forzada para la estabilidad

Salicilato de Metilo						
Ensayo	Pesos	DILUCIONES			C (mg/mL)	N° de inyecciones
		Medio de Dilución: Fase móvil				
		Aforo (mL) Metanol	Alícuota (mL)	Aforo (mL) Metanol		
Estándar Preparar por duplicado	150 mg Salicilato de metilo	100 mL	1 mL	10 mL	0,15	Inyectar por triplicado

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

3.3.2.7. Incertidumbre de la medición

- Se define como el mensurado y al porcentaje, de un principio activo determinado
- Se identifican las magnitudes de entrada (X_i) para posterior establecer un modelo matemática el cual nos va ayudar a determinar la incertidumbre de la medición del mensurado Y .

$$y = f(x)$$

- Se identifican las fuentes de incertidumbre.
- Se cuantifica la variabilidad de cada fuente y se le asocia a una distribución (Normal, Rectangular, Triangular, etc.).
- Se obtiene la incertidumbre estándar $u(x_i)$
- Se estiman las correlaciones (por medio de la ley de propagación de la incertidumbre) y se determina la incertidumbre estándar combinada u_c .

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 [u(x_i)]^2}$$

- Se determina el nivel de confianza deseado.
- Se calculan los grados de libertad efectivos y se determina el factor de cobertura k .
- Con el factor de cobertura se determina la incertidumbre expandida U .

$$U = u_c \times k$$

3.3.2.8. Idoneidad del sistema - (system suitability test)

Se generará de forma automática en el equipo HPLC mediante el software Clarity evaluando los siguientes parámetros: área, altura, cantidad, factor de asimetría, eficiencia de platos teóricos y resolución.

Método: Inyectar soluciones de estándar al 100% por 6 determinaciones.

3.3.3. Registro y revisión de datos

Tabla 13-3: Criterios de aceptación en base a normativa y los resultados del proyecto

PARÁMETRO		CRITERIO DE ACEPTACIÓN	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO
SELECTIVIDAD	TIEMPO DE RETENCIÓN	El tiempo de retención del pico principal de la Solución Muestra corresponde al de la Solución Estándar.	< RSD 2%
	INTERFERENCIA CON EL PLACEBO	El/los principio/s activo/s no deben presentar interferencia de otras sustancias o impurezas presentes en la formulación del producto. Los excipientes no deben retenerse en el mismo tiempo que los activos.	CUALITATIVO
	IDENTIFICACIÓN DE EXCIPIENTES	Nombrar a los cromatogramas identificados como excipientes.	CUALITATIVO
	PORCENTAJE DE DISCREPANCIA	Máximo 5%	% Discrepancia = Respuesta media placebo cargado – Respuesta media estándar) x100 / Respuesta media estándar o activo solo
LINEALIDAD Y RANGO	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	$r \geq 0.999$	ANÁLISIS DE REGRESIÓN- MÍNIMOS CUADRADOS
	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN	$r^2 \geq 0.9980$	ANÁLISIS DE REGRESIÓN- MÍNIMOS CUADRADOS
	COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES RESPUESTA	EL COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS FACTORES RESPUESTA DEBE SER $\leq 5\%$ PARA INDICAR LINEALIDAD	$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100$ \bar{X} = valor medio de los resultados S = desviación estándar
	PENDIENTE	Correlación lineal significativa $b \neq 0$	ECUACIÓN DE LA RECTA INFORMATIVO

	INTERCEPTO Y TEST DE PROPORCIONALIDAD	Comprobación que la recta pasa por el origen $a = 0$	ECUACIÓN DE LA RECTA INFORMATIVO
	REGRESIÓN LINEAL	Regresión lineal	ECUACIÓN DE LA RECTA
	HOMOGENIDAD DE VARIANZAS	p (valor): ≥ 0.05	TEST COCHRAN
	HOMOCEASTICIDAD	Constante	GRÁFICA DE RESIDUOS
	COMPARACIÓN PLACEBO CARGADO Y ESTÁNDAR	No debe existir diferencia estadística significativa entre el valor medio del placebo cargado y el estándar • p (valor): ≥ 0.05	TEST DE STUDENT
	EL FACTOR CONCENTRACIÓN NO INFLUYE EN LA VARIABILIDAD DE LOS RESULTADOS	p (valor): ≥ 0.05	TEST DE COCHRAN
EXACTITUD	RECOBRO O PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	97% - 103% de la cantidad de principio activo adicionado en el placebo.	Resultado = $(r_u / r_s) \times (C_s / C_u) \times 100$
PRECISION.- - Repetibilidad - Precisión Intermedia	REPETIBILIDAD DEL SISTEMA O INSTRUMENTAL	Coficiente de variación menor o igual a 2.0%.	$CV(\%) = \frac{S}{\bar{x}} * 100$ \bar{x} = valor medio de los resultados S = desviación estándar
	REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	Coficiente de variación menor o igual a 2.0%	
	PRECISIÓN INTERMEDIA	Coficiente de variación menor o igual a 4.0%	
	LOS ANÁLISIS EN LABORATORIO POR DIFERENTES ANALISTAS NO DEBEN TENER EFECTO ESTADÍSTICO SIGNIFICATIVO	p (valor): ≥ 0.05	ANOVA
ROBUSTEZ	DETERMINACIÓN DE DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS SIGNIFICATIVAS	p (valor): ≥ 0.05	TEST DE ANOVA

	EVALUACIÓN DE LOS GRÁFICOS SUPERFICIE-REPUESTA PARA CONDICIONES ÓPTIMAS	Zona Caliente Zona Fría Cimas Valles	DISEÑO DE CRIBADO Factorial 2 ⁴
ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	La diferencia absoluta de cada condición con respecto a la normal no debe exceder el RSD ≤ 20% de la precisión del sistema.	$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100$ \bar{X} = valor medio de los resultados S= desviación estándar
	DEGRADACIÓN FORZADA	Identificación de Degradantes y sus tiempos de retención	Cualitativo
IDONEIDAD DEL SISTEMA - (SYSTEM SUITABILITY TEST)	PRECISIÓN DEL SST	RSD ≤ 2%	SST SOFTWARE CLARITY SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC
	FACTOR DE CAPACIDAD	K' > 1	
	NÚMEROS DE PLATOS TEÓRICOS	N > 2000	
	FACTOR DE ASIMETRÍA	Asimetría < 2.0	
	RESOLUCIÓN	Rs > 2.0	

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

CAPÍTULO IV

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Desarrollo del método analítico

Se determinaron varios parámetros fisicoquímicos especificados en el Anexo A, se establecieron las condiciones de operación (Tabla 1-4) y se evaluaron en las distintas pruebas de validación.

Tabla 1-4: Resultados de ensayo selectividad

Fase Estacionaria:	Columna Lichrospher 100RP 8 5µm
Flujo:	1.0 mL/min
Detector:	237 nm
Tiempo	10 minutos
Temperatura de la Columna	25°C
Volumen de Inyección	10 µL

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Se evaluó la incidencia de distintos factores como: temperatura de la columna, porcentaje del orgánico y longitud de onda y como resultado se puede evidenciar que, el porcentaje de orgánico es directamente proporcional al tiempo de retención y a la absorbancia del pico; en las primeras etapas del desarrollo analítico se experimentó diferentes porcentajes de orgánico para determinar el valor adecuado al cual se logra un tiempo de retención y absorbancia óptima.

4.2. Validación del método analítico

4.2.1. Selectividad

Tabla 2-4: Resultados del ensayo selectividad

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	PRINCIPIO ACTIVO	PARÁMETRO (PORCENTAJE DE DISCREPANCIA)		DECISIÓN
		Área	Tiempo	
≤ 5%	Salicilato de Metilo	1.449	0.186	Cumple

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

En la Tabla 2-4 se señala el porcentaje de discrepancia del salicilato de metilo, la finalidad de esta prueba, es medir y evaluar los analitos de interés simultáneamente o en diferentes momentos (AEFI, 2001, pp. 39-134). Para el principio activo de interés se determinó el porcentaje de discrepancia de áreas y tiempos de retención, siendo 1.449% y 0,186% respectivamente. Los datos analizados indican que no existe una interferencia significativa entre los componentes del placebo y el principio activo, encontrándose dentro de los rangos establecidos. El porcentaje de discrepancia de los tiempos de retención son inferiores al 1% siendo 0,186% el valor obtenido, no se considera crítico para la prueba.

4.2.2. Linealidad y rango

Este ensayo determina una respuesta lineal en función a las concentraciones evaluadas del salicilato de metilo. A su vez, se analizó la respuesta de las soluciones estándares y placebo cargado a concentraciones de 70%, 85%, 100%, 115% y 130%. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 3-4: Resultados del análisis de linealidad del sistema del salicilato de metilo

Ensayo	(Concentración %)	(AUC)
1	70	3826,49
	70	3824,578
	70	3820,214
2	85	4621,892
	85	4623,392
	85	4636,203
3	100	5458,9730
	100	5459,053
	100	5442,566
4	115	6259,969
	115	6248,2780
	115	6258,2810
5	130	7062,458
	130	7064,764
	130	7070,699

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Tabla 4-4: Análisis de linealidad del método 1 (Placebo cargado) salicilato de metilo

Ensayo	(Concentración %)	(AUC)
1	70	3730.818

	70	3739.575
	70	3737.326
2	85	4517.059
	85	4508.305
	85	4499.977
3	100	5262.511
	100	5289.244
	100	5299.625
4	115	5986.192
	115	6039.487
	115	6046.481
5	130	6936.999
	130	6868.814
	130	6890.719

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Tabla 5-4: Linealidad método 2 (Placebo cargado más yodopovidona) salicilato de metilo

Ensayo	(Concentración %)	(AUC)
1	70	3732.333
	70	3712.285
	70	3703.561
2	85	4473.217
	85	4468.567
	85	4479.037
3	100	5275.163
	100	5284.110
	100	5271.719
4	115	6042.089
	115	6060.830
	115	6048.589
5	130	6970.793
	130	6965.066
	130	6973.265

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Los test estadísticos aplicados a los resultados del ensayo de linealidad de estándar y placebo cargado son:

- Determinación de la ecuación de la recta.
- Representación gráfica de la recta
- Coeficiente de correlación y de determinación

- Análisis de varianza
- Test de proporcionalidad
- Comparación de medias entre placebo cargado y estándar

Tabla 6-4: Resultados del análisis de Linealidad del sistema salicilato de metilo

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN		RESULTADO	DECISIÓN
		SALICILATO DE METILO	
Coefficiente de análisis	$r \geq 0,999$	Estándar 0,999979 Placebo cargado 0,999493 Placebo cargado más yodopovidona 0,999365	Cumple
Coefficiente de determinación	$r^2 \geq 0,990$	Estándar 1 Placebo cargado 0,999 Placebo cargado más yodopovidona 0,9987	Cumple
Coefficiente de varianza de los factores respuesta	El coeficiente de variación de los factores respuesta debe ser = 5%	Estándar 0,218094 Placebo cargado 0,219091 Placebo cargado más yodopovidona 0,223537	Cumple
Pendiente	Correlación lineal significativa $b \neq 0$	Estándar P(valor) 0,0000 Placebo cargado P(valor) 0,0000 Placebo cargado más yodopovidona P(valor) 0,0000	Cumple
Intercepto informativo	Comprobación que la recta pasa por el origen $a=0$	Estándar P(valor) 0,0000 Placebo cargado P(valor) 0,0000 Placebo cargado más yodopovidona P(valor) 0,0000	Cumple
Límite de confianza		Estándar Hipérbole superior 7070,7 Hipérbole inferior	Cumple

		3820,21 Placebo cargado Hipérbole superior 6973,27 Hipérbole inferior 3703,56 Placebo cargado más yodopovidona Hipérbole superior 6937,0 Hipérbole inferior 3730,82	
Regresión lineal	La regresión es estadísticamente representativa, la pendiente es distinta de 0	Estándar $y = 54,083x + 36,902$ Placebo cargado $y = 52,277x + 62,554$ Placebo cargado más yodopovidona $y = 53,895x - 92,087$	Cumple
Homogenidad de varianza	$p(\text{valor}) \geq 0,05$ Test de Levens.	Estándar 0,1526 Placebo cargado 0,1882 Placebo cargado más yodopovidona 0,0489	Cumple
Homocedasticidad	Constante	No hay tendencias, las gráficas de residuos muestran una distribución aleatoria de los puntos.	Cumple
El factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados	$p(\text{valor}) \geq 0,05$	Estándar 0,1526 Placebo cargado 0,1882 Placebo cargado más yodopovidona 0,0489	Cumple
Comparación placebo cargado vs estándar	Significativa entre el valor medio del placebo cargado y el estándar $p(\text{valor}) \geq 0,05$	Placebo cargado 0,735333 Placebo cargado más yodopovidona 0,71904	Cumple

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

La Tabla 6-4, describe los resultados obtenidos a partir de los parámetros de linealidad y rango, se determinó la ecuación de la recta entre: placebo cargado vs nivel, placebo cargado más yodopovidona vs nivel y estándar vs nivel cuyos gráficos se expresan como se muestra en el Anexo D.

Los coeficiente de correlación entre las muestras analizadas fueron: estándar $r=0,999979$ (linealidad del sistema), placebo cargado (linealidad del método 1) $r= 0,999493$ y para el placebo cargado más yodopovidona (linealidad del método 2) $r=0,999365$; estableciendo una relación lineal entre las variables concentración y respuesta con una alta probabilidad.

La prueba de coeficiente de determinación indica la variación total de la variable respuesta, en las muestras estudiadas, los valores obtenidos son: estándar (linealidad del sistema) $r^2= 1$, para el placebo cargado (linealidad del método 1) $r^2= 0,999$ y para el placebo cargado más yodopovidona (linealidad del método 2) $r^2=0,999$ dando como resultado el cumplimiento del criterio de $r^2 \geq 0,990$.

El criterio de aceptación para el coeficiente de variación deber ser menor o igual al 5%, y los valores fuera de este rango se consideran no lineales; todas las respuestas obtenidas estuvieron dentro del rango menor a 5%, observándose un coeficiente de variación entre 0,218094, 0,219091 y 0,223537 para el estándar, placebo cargado y placebo cargado más yodopovidona respectivamente, valores que se encuentran dentro del rango de aceptación (AEFI, 2001, pp. 39-134).

Los siguientes criterios de evaluación son la pendiente (b) e intercepto, en el punto de partida de la estimación de ordenadas, donde la sensibilidad del método va a depender del valor de la pendiente, siendo esta directamente proporcional.

En el ensayo de linealidad los resultados para el principio activo como para el estándar, placebo cargado y placebo cargado más yodopovidona dan resultados estadísticamente diferentes a cero.

Se aplicó la prueba de Levene para determinar la homogeneidad de la varianza. Esto nos permitió determinar si el factor de concentración tenía algún efecto sobre la variabilidad de los resultados. Esto se aplicó tanto al placebo estándar y cargado como al placebo cargado con yodopovidona y, por lo tanto, se consideró aceptable si $p(\text{valor}) < 0,05$, es decir, sin diferencias significativas entre las desviaciones estándar, como se indica en el ANEXO C.

La varianza residual (homocedasticidad) proporciona información sobre la validez del modelo, y este parámetro evalúa la distribución aleatoria de los puntos graficados en las gráficas de residuos, no refleja tendencia, como se observa en el ANEXO D.

Finalmente, se comparó las medias entre el estándar, placebo cargado y placebo cargado con yodopovidona con la prueba de t-student, la cual nos ayudó a determinar la diferencia significativa entre las muestras; por lo que se considera aprobado cuando el p (valor) >0.05 de confianza.

4.2.3. Exactitud

Tabla 7-4: Resultados del análisis de Exactitud del sistema salicilato de metilo

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	SALICILATO DE METILO	DECISIÓN
PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	97% al 103% de la cantidad de principio activo adicionado en el placebo	97,12%	Cumple

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

En el ensayo de exactitud se determinó el porcentaje de recuperación del estándar usando placebo cargado a diferentes niveles (AEFI, 2001, pp. 39-134). La recuperación determinada para el salicilato de metilo fue de 97,12%. Como se detalla en la Tabla 7-4, el porcentaje de recuperación del salicilato de metilo se encuentra dentro del rango de aceptación.

4.2.3.1. Precisión

Tabla 8-4: Repetibilidad del sistema y método, precisión intermedia del salicilato de metilo

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	SALICILATO DE METILO	DECISIÓN
REPETIBILIDAD DEL SISTEMA	Coefficiente de variación menor o igual a 2%	0,2123	Cumple

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	Coeficiente de variación menor o igual a 2%	0,6328	Cumple
PRECISIÓN INTERMEDIA	Coeficiente de variación menor o igual a 4%	0,567	Cumple
	Los análisis en laboratorio por diferentes analistas no deben tener efecto estadístico significativo p (valor) : $\geq 0,05$ comparación de medias	0,694671	Cumple

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Esta prueba analiza dos variables repetibilidad y precisión intermedia tanto del sistema como del método en diferentes etapas dando como resultado de coeficiente de variación un valor de 0,2123 y 0,6328 para el salicilato de metilo en el análisis de repetibilidad del sistema y del método, esto fue para evaluar la variabilidad del método cuando se realizaron inyecciones consecutivas en la misma muestra en diferentes condiciones operativas, y se evaluó la variabilidad entre las ejecuciones del operador y las diferentes fechas.

Los valores presentados en la Tabla 5-4 indican que el coeficiente de variación para el salicilato de metilo se encuentra dentro del rango establecido.

Estadísticamente, la diferencia media significativa entre los analistas A y B se evaluó a partir del valor p ($>0,05$) con un 95 % de confianza, como se muestra en el Apéndice B3, y se determinó que no había una diferencia estadísticamente significativa entre los dos analistas.

4.2.3.2. Robustez

- *Tiempo de retención*

Se evaluaron los factores temperatura de la columna, flujo, longitud de onda y compuesto orgánico.

- *Salicilato de metilo*

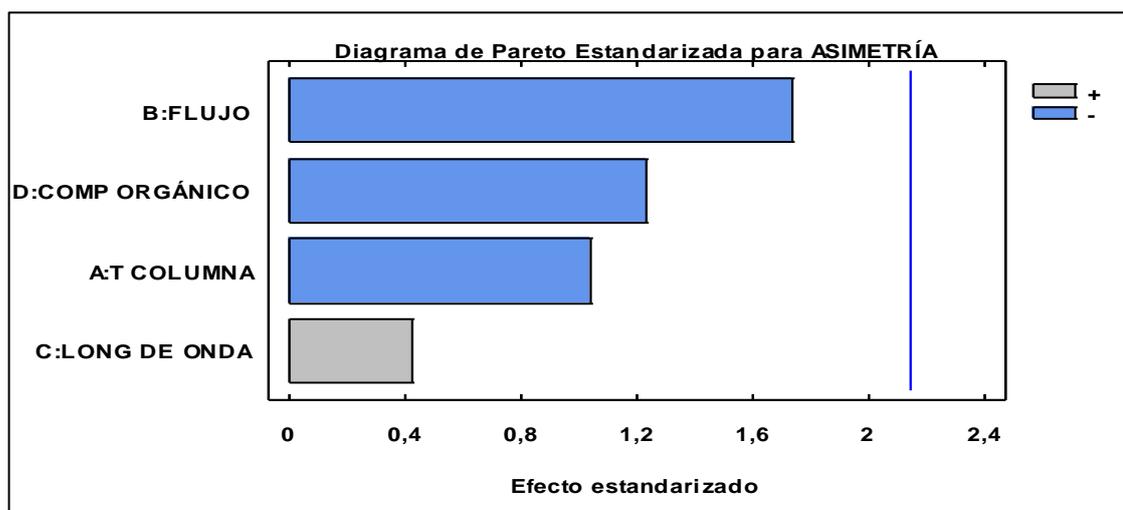


Ilustración 1-4: Diagrama de Pareto estandarizado para tiempo de retención salicilato de metilo

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

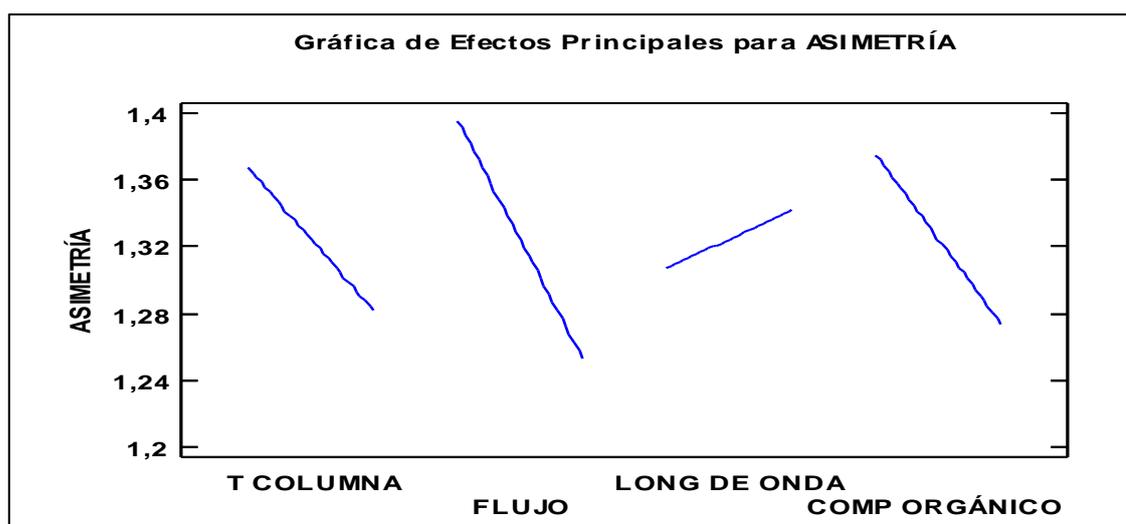


Ilustración 2-4: Efectos para el tiempo de retención en influencia de salicilato de metilo

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

En la prueba de robustez se evaluó el tiempo de retención teniendo en cuenta factores como la composición del orgánico, flujo, longitud de onda y temperatura de la columna para el salicilato de metilo.

Los resultados que se muestran en la figura 1-4 y 2-4, indica que no existen diferencias significativas entre los parámetros comparados, lo que significa que las variaciones de los factores evaluados dentro del área de estudio no afectan significativamente los tiempos de retención

Al evaluar el factor de composición del orgánico y flujo durante el tiempo de retención de salicilato de metilo, se encontró que tiene un nivel de significancia por debajo del 5%; el gráfico de efectos principales ilustración 2-4 muestra una tendencia lineal que al aumentar los factores de longitud de onda, composición del orgánico y las variables de temperatura no existe variación en el tiempo de retención, sin embargo el flujo y el tiempo de retención con directamente proporcional.

La condiciones óptimas se determinaron para la composición de orgánico, flujo, longitud de onda y temperatura de la columna de cromatografía de salicilato de metilo. El resultado es el siguiente:

Tabla 9-4: Condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
T COLUMNA	23,0	27,0	23,0
FLUJO	0,8	1,2	0,8
LONG DE ONDA	235,0	239,0	239,0
COMP ORGÁNICO	55,0	65,0	55,0

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

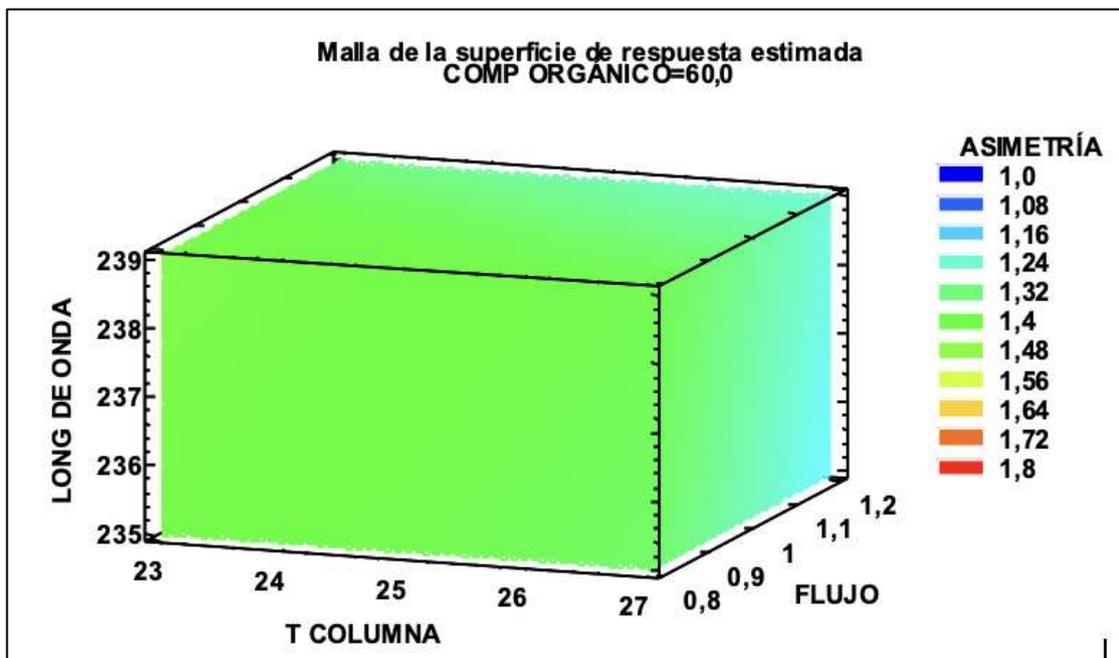


Ilustración 3-4: Superficie-respuesta estimada para tiempo de retención de salicilato de metilo

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

En la Tabla 9-4 se muestran las condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención del principio activo teniendo valores óptimos de la composición del orgánico, flujo, longitud de onda y temperatura de la columna.

En el ilustración 3-4 se comparan los factores evaluados en el diseño experimental para deducir las condiciones óptimas que disminuir el tiempo de retención del salicilato de metilo; de color azul se observa las zonas frías con condiciones óptimas.

- *Número de platos teóricos*

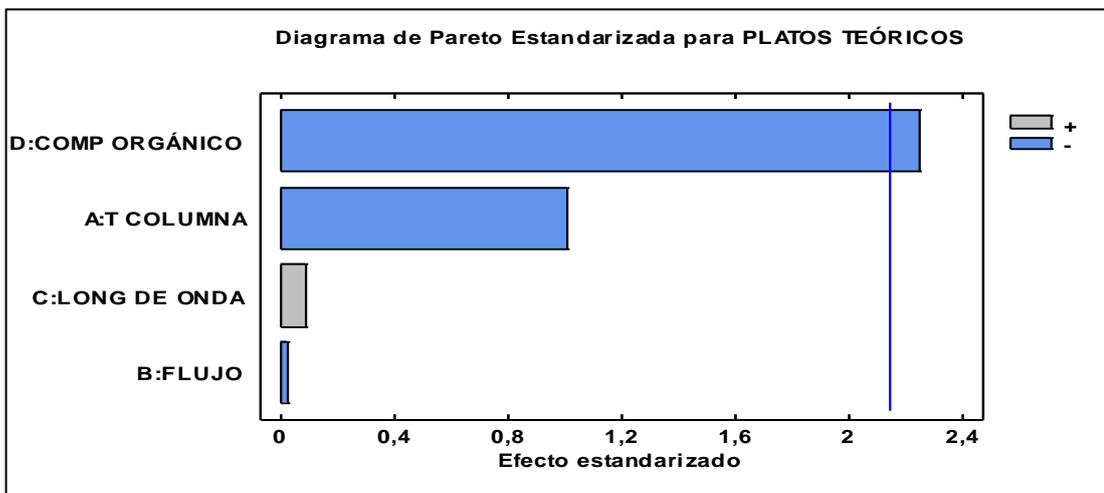


Ilustración 4-4: Diagrama de Pareto Estandarizado para platos teóricos de salicilato de metilo

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

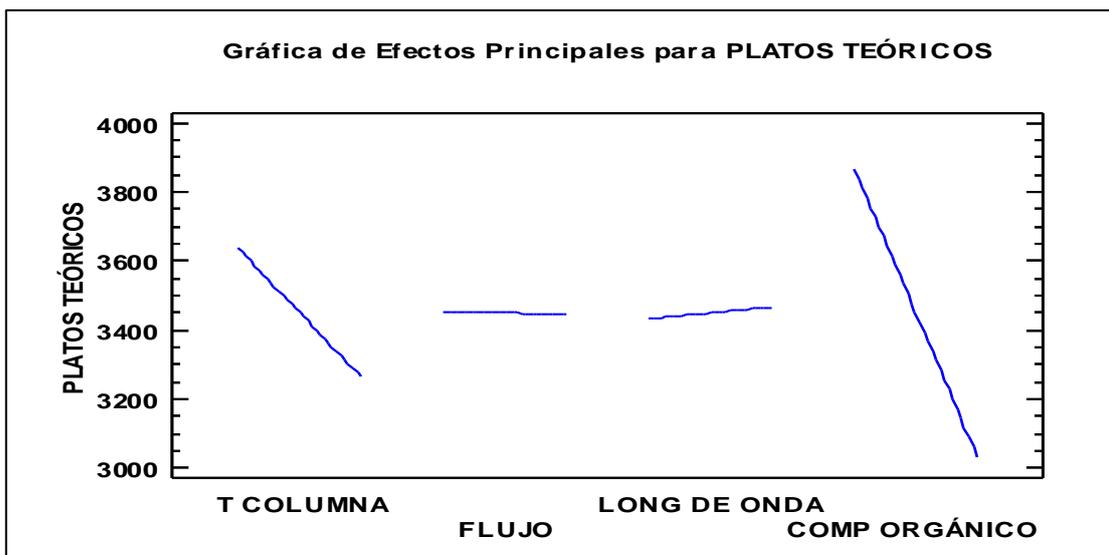


Ilustración 5-4: Efectos principales para platos teóricos en influencia de salicilato de metilo

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

En la prueba de robustez se determinó el número de platos teóricos para ello se usó la composición del orgánico, temperatura, flujo y longitud de onda; teniendo como objetivo maximizar el número de platos teóricos del analito analizado.

Al evaluar la composición del orgánico se mostraron valores de eficiencia de platos teóricos con un nivel de significancia <5% con una variación negativa; según la ilustración 4-4 al aumentar la composición del orgánico, temperatura y flujo disminuye el número de platos teóricos, mientras que al aumentar la longitud de onda aumenta el número de platos teóricos.

Se determinó las condiciones óptimas de los factores composición de orgánico, temperatura, longitud de onda y flujo. Los resultados se exponen a continuación:

- *Optimización de número de platos teóricos*

Tabla 10-4: Condiciones óptimas para minimizar el número de platos teóricos

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
T COLUMNA	23,0	27,0	23,0
FLUJO	0,8	1,2	0,8
LONG DE ONDA	235,0	239,0	239,0
COMP ORGÁNICO	55,0	65,0	55,0

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

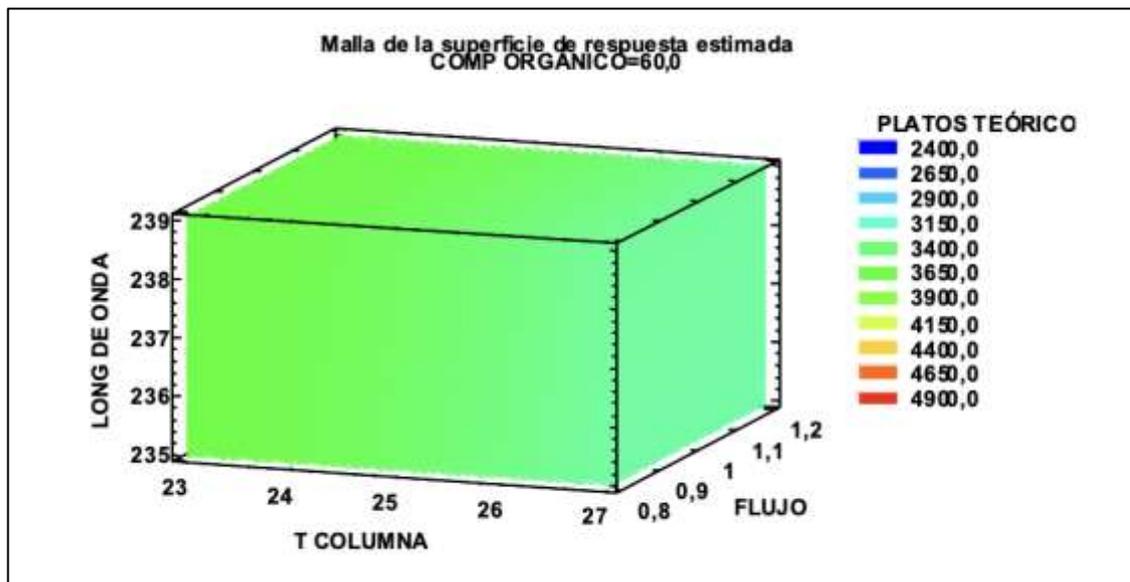


Ilustración 6-4: Superficie-respuesta estimada para tiempo de retención de salicilato de metilo

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

En la Tabla 10-4 se muestran las condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención del principio activo teniendo valores óptimos de la composición del orgánico, flujo, longitud de onda y temperatura de la columna.

En la ilustración 6-4 se comparan los factores evaluados en el diseño experimental para deducir las condiciones óptimas que aumentan la eficacia de platos teóricos del salicilato de metilo; de color azul se observa las zonas frías con condiciones óptimas.

- Resolución

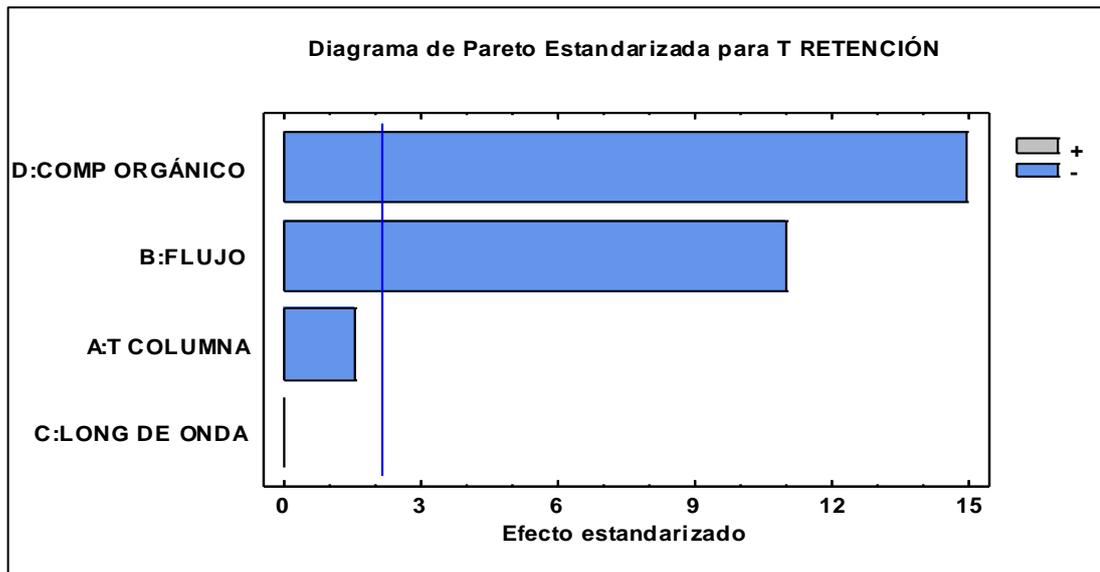


Ilustración 7-4: Diagrama de Pareto Estandarizado para número de platos teóricos

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

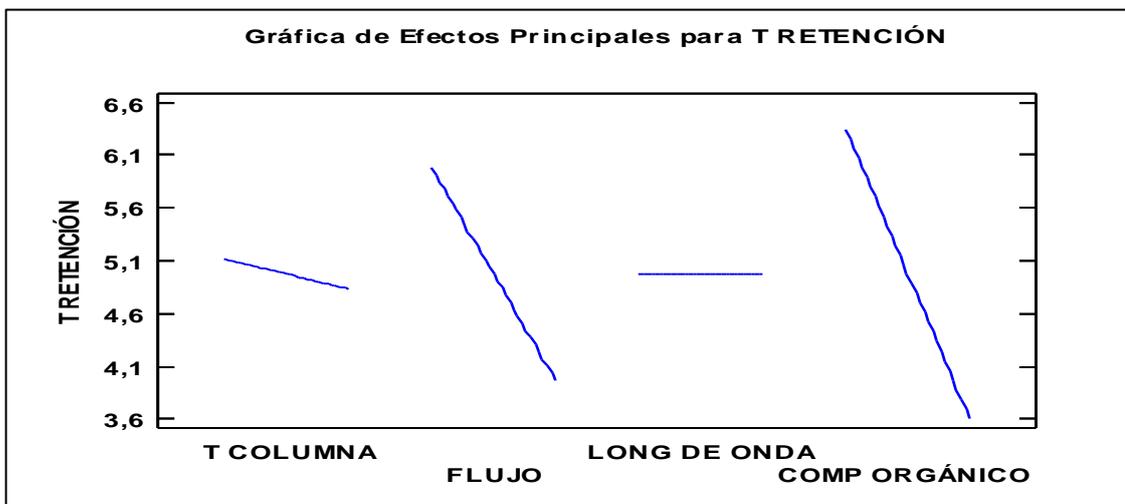


Ilustración 8-4: Efectos principales para número de platos teóricos en influencia del salicilato

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Los resultados, que se muestran en las ilustraciones 7-4 a 8-4, demuestran que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los parámetros comparados para la resolución evaluada por el pico de salicilato de metilo. Ser estadísticamente significativo. Afecta la resolución de las sustancias activas.

- *Optimización de la resolución*

Tabla 11-4: Condiciones óptimas para minimizar el número de platos teóricos

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
T COLUMNA	23,0	27,0	23,0
FLUJO	0,8	1,2	0,8
LONG DE ONDA	235,0	239,0	239,0
COMP ORGÁNICO	55,0	65,0	55,0

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

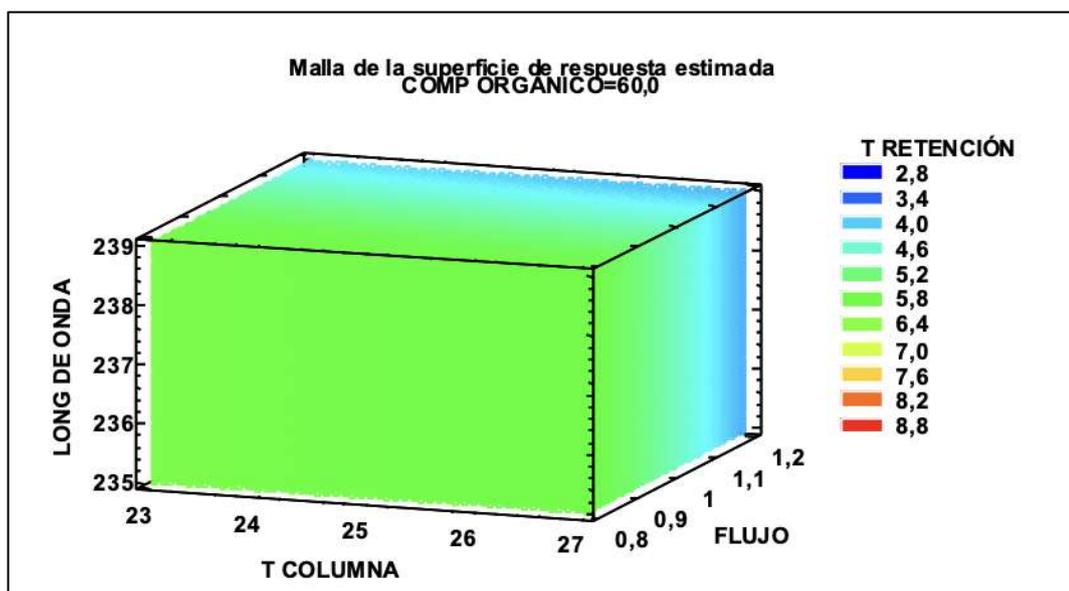


Ilustración 9-4: Superficie-respuesta estimada para el tiempo de retención

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

En la Tabla 11-4 se muestran las condiciones óptimas para minimizar el tiempo de retención del principio activo teniendo valores óptimos de la composición del orgánico, flujo, longitud de onda y temperatura de la columna.

En la ilustración 9-4 se comparan los factores evaluados en el diseño experimental para deducir las condiciones óptimas que aumentan la resolución del salicilato de metilo; de color azul se observa las zonas frías con condiciones óptimas.

4.2.3.3. Estabilidad

Tabla 12-4: Resultados del análisis del parámetro de estabilidad del sistema

CRITERIO DE ACEPTACIÓN	CONDICIONES	TIEMPO (HORAS)	% DIFERENCIA ABSOLUTA (AUC)
			SALICILATO DE METILO
La diferencia absoluta de cada condición con respecto a la normal no debe exceder el RSD 20% de la precisión del sistema.	AMBIENTE	0	0,057
		24	0,6372
		48	1,7378
	REFRIGERACIÓN	0	0,2745
		24	1,6368
		48	3,6073

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

Estudios de estabilidad de la solución realizados a las 0, 12 y 24 horas. La Tabla 9-4 detalla los factores ambientales del método analítico y las tasas de degradación de los ingredientes activos evaluados a baja temperatura frente a condiciones de tiempo y temperatura ambiente.

Los estudios de estabilidad del principio operativo han demostrado que el RSD no se degrada en más del 20%, la tasa de descomposición del RSD es baja y se puede considerar estable con la temperatura y el tiempo.

4.2.3.4. Idoneidad del sistema

Tabla 13-4: Resultados del análisis del parámetro de idoneidad del sistema

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN		SALICILATO DE METILO
PRECISIÓN DEL SST	RSD ≤ 2%	0,2123 %
FACTOR DE CAPACIDAD	TIEMPO DE RETENCIÓN	4,559 min
NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS	N > 1000	4292,960
FACTOR DE ASIMETRÍA	ASIMETRÍA	1,178

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

La Tabla 10-4 presenta los resultados de los estudios de idoneidad del sistema, demostrando que el sistema de cromatografía es suficiente para cumplir con las determinaciones establecidas.

Se definieron criterios como la precisión de SST para evaluar esta prueba. Evaluó los cambios en los datos después de múltiples inyecciones consecutivas de la misma muestra y notó una (AEFI, 2001, pp. 39-134).

Un valor de 4559 (minutos) para un factor de capacidad centrado en evaluar la retención de muestras. Dado que este valor es superior a 1 minuto, la selectividad del método no se ve afectada.

Se obtuvo un valor de 4.292.960 para el número de platos teóricos. Esto demuestra que se respetan los límites establecidos además de las buenas condiciones de operación de las columnas cromatográficas y las condiciones cromatográficas para el análisis.

4.2.3.5. Incertidumbre de la medición

En el análisis de incertidumbre, confirme que las fuentes de errores en el análisis se evalúan de acuerdo con las 6M de Ishikawa, Mano de obra, Medio ambiente, Maquinaria, Materiales, Métodos y Materias primas, y la suma de los elementos individuales de incertidumbre. Obtenemos una incertidumbre expandida combinada, que permite una mejor evaluación de la influencia de los factores antes mencionados en . Además, se determinó qué factores influyen en el grado de incertidumbre.

Tabla 14-4: Resultados de la incertidumbre de la medición para salicilato de metilo

PARÁMETRO	PRINCIPIO ACTIVO
	SALICILATO DE METILO
Incertidumbre combinada	$\mu =$ 1.34E-02
Incertidumbre expandida	$U = k\mu$ 2.68E-02

Fuente: Departamento de I+D+i & Departamento de Validaciones

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

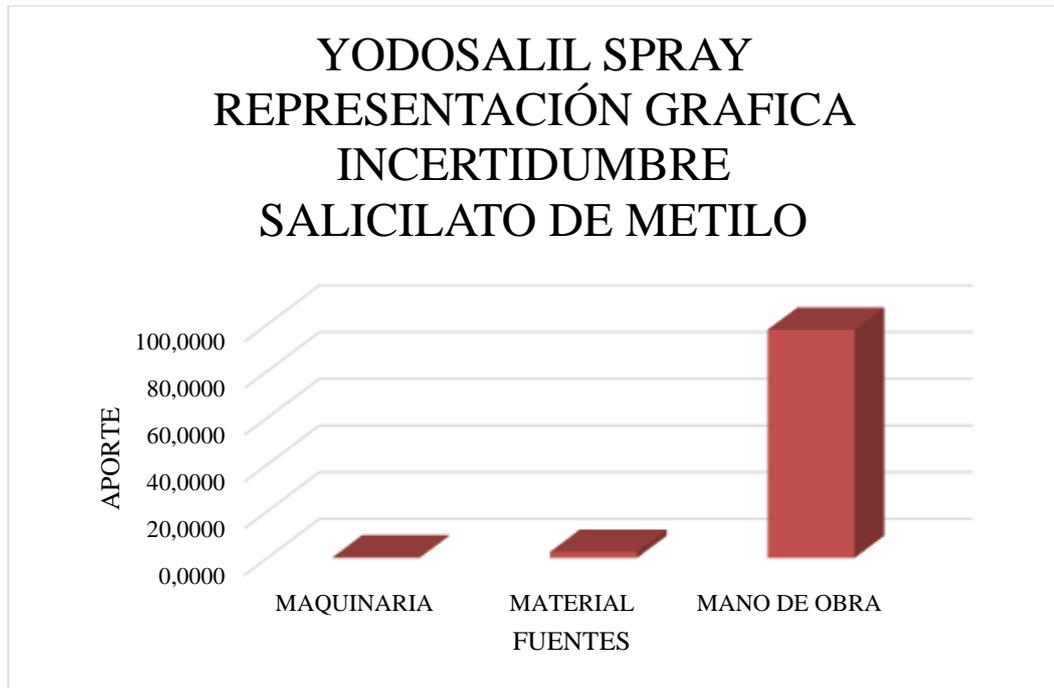


Ilustración 10-4: Fuentes de incertidumbre para salicilato de metilo

Realizado por: Landa, Yajaira; Oleas, Tatiana, 2023.

La ilustración 10-4 muestra que el trabajo es la mayor fuente de error. Esto significa que es probable que los analistas experimenten una mayor incertidumbre al pesar, diluir y cuantificar. Las máquinas y los equipos son fuentes típicas de error en los procesos de fabricación, que en última instancia conducen a una completa incertidumbre, pero no representan valores elevados como la mano de obra, la controlabilidad y la minimización.

4.2.3.6. Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites de detección y los límites de cuantificación se evalúan en las Tablas 8-4 y cumplen los criterios de aceptación de 3-10 desviaciones estándar por encima de los valores de ruido de las sustancias activas evaluadas.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló y validó un método analítico selectivo, específico, lineal, exacto, preciso y estable para determinar salicilato de metilo en una forma farmacéutica spray en el Laboratorio Neofármaco del Ecuador Cia. Ltda.
- Se desarrolló un método analítico para determinar salicilato de metilo, al modificar factores como flujo, temperatura, porcentaje de orgánico y longitud de onda logrando mejorar los parámetros cromatográficos como tiempo de retención, eficacia de platos teóricos y resolución, siendo capaz de cuantificar y diferenciar eficientemente el salicilato de metilo en el spray.
- Se evaluó los parámetros de selectividad con un porcentaje de discrepancia de 1,449 para las áreas y 0,186 para los tiempos de retención evaluados en el estándar demostrando que el método es específico; lineal con un $r^2=1$ para estándar, 0,999 placebo cargado y 0,9987 placebo cargado más yodopovidona a niveles del 70 al 130%, sensible con una pendiente de 54,083 para estándar, 52,277 para placebo cargado y 53,895 para placebo cargado más yodopovidona, preciso con una recuperación del 97,12 %, los parámetros cromatográficos sólidos en el espacio de diseño evaluados con factores como la longitud de onda, la temperatura, el porcentaje de compuestos orgánicos y el caudal se pueden cuantificar a 10 desviaciones estándar del ruido en la parte inferior del detector.
- Demostrar que el método desarrollado cumple con los parámetros de validación USP Tipo 1. Se demostró mediante resultados que el método analítico desarrollado cumple con los parámetros de validación establecidos, por lo tanto dicho método será transferido al departamento de control de calidad de la empresa para el análisis rutinario.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para las diluciones se tome una alícuota que tenga el 50% de la capacidad de la punta de la pipeta automática.
- Si el análisis no se puede realizar el mismo día que la preparación de la muestra, las muestras deben almacenarse en el refrigerador hasta 48 horas en el ambiente sin más del 20 % de degradación.
- Recomendar la transferencia de tecnología al departamento de control de calidad para que el método desarrollado y probado pueda ser aplicado al control regular de la empresa.
- Utilizar material calibrado con el fin de evitar errores en el análisis de resultados.
- Realizar correctamente los aforos para evitar diferencia significativa en los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

ACUERDO MINISTERIAL 586. *Reglamento de registro sanitario para medicamentos en general.* Ecuador : Control Sanitario, 2016.

AMARO, R et al. *Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de ibuprofeno y tiocolchicosido en comprimidos".* *Afinidad LXXVI*, 2019, pp. 132-140.

ARCSA. *Estatuto Organico Agencia De Regulacion Y Vigilancia Sanitaria* [en línea] 2017. Disponible en: https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/07/ARCSA-DE-016-2017-JCGO_ESTATUTO-ORGANICO-ARCSA.pdf.

AEFI. *Validación de métodos analíticos.* Barcelona : Edición Hewlett Packard, 2001, pp. 39-134.

AYALA, A. *Implementación De Análisis Por Cromatografía De Gases (Gc-Fid) Y Desarrollo De La Validación De Técnica Analítica Para La Identificación Y Cuantificación De Mentol Y Salicilato De Metilo En Ungüento.* 2021. pp. 1-65.

BAENA, Y. et al. *Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD.* *Revista Colombiana Científica Química Farmaceutica*, 2018, pp. 424-440.

CASTILLO , B. y GONZÁLEZ, R. *Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos.* *Rev Cubana Farm.* 1996, pp. 1-7.

CHOQUE, C. *Desarrollo y validacion de un metodo analitico indicador de estabilidad para el analisis de acido acetil salicilico en tabletas por HPLC.* 2019. pp. 5.

DAGNINO, J. *Análisis De Varianza.* *Rev Chil Anest*, vol. 43, (2014), (Chile) pp. 306-310.

FONSECA, A. et al. *Desarrollo y validación de un método de cromatografía gaseosa para la determinación de mentol, salicilato de metilo, timol y ácido benzoico en solución antiséptica.* 2020. pp. 306-328.

FUGATE, T et al. *Pharmaceutical Cleaning a Comprehensive Approach*. [en línea] 2010. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/349394261/pharmaceutical-cleaning-a-comprehensive-approach-0>.

GARCÍA, A. y YUSÁ, D. *HPLC instrumental*. 2016. pp. 6-13.

GONZÁLEZ, H., et al. *Evaluación analítica y tecnológica de una pomada de indometacina*. 1996. pp. 549-561.

Gonzalez, C. *Validación Retrospectiva Y Control Estadístico De Procesos En La Industria Farmacéutica*. 2005. pp 5.

ICH, Q2. *Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)*. USA : EMEA, 1994, pp. 2-8.

LABORATORIO NEOFÁRMACO. *Quienes somos: Laboratorio NeoFármaco. A. Sitio Web de Laboratorio NeoFármaco*. [en línea]. 2021. Disponible en: <https://neofarmaco.com/quienes-somos/>.

LEGAZ, E. et al. *Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas*. 2011. pp. 1-32.

MERCK. *Ficha de datos de seguridad metilo salicilato*. 2022.

MOLINA, G. *Validación de métodos analíticos físico-químicos. Guía Técnica*. México : CONACYT, 2010, pp. 1-38.

PALOMINO, M. *Implementación de análisis por cromatografía de gases y desarrollo de la validación de técnica para la identificación y cuantificación de mentol y salicilato de metilo en unguento*. 2021. pp. 10-11.

POLO, M. *Desarrollo de nuevos métodos de microextracción en fase sólida para la determinación de contaminantes emergentes en matrices acuosas*. 2007. pp. 106.

RAMÍREZ, F. et al. *Desarrollo y validación prospectiva del método de análisis de valoración de Glimipiride 2mg/ Rosiglitazona 4mg Tabletas recubiertas por Cromatografía líquida de alta*

performance. 2007. pp 9.

RODRÍGUEZ, S. *Desarrollo Y Validación De Un Método Analítico Para La Determinación Y Cuantificación De Di(2-Etilhexil) Adipato En Aguas Superficiales Del Lago y Pcarai*. 2019. pp. 17-18.

SACRISTÁN, M, et al. *Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte III. Práctica de laboratorio: optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvil*. 2011. pp. 48.78.

SALGADO, S., et al. *Validación del método analítico para la cuantificación de aspirina y ácido salicílico libre en tabletas de 100 mg por cromatografía líquida de alta resolución*. 2019. pp. 37-46.

SÁNCHEZ, R. *T-Student. Usos y abusos*. *Rev Mex Cardiol*. 2015. pp. 59-61.

SNYDER, L et al. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2010. pp. 87-145.

SUAREZ, R. et al. *Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario*. 2009. pp. 53-26.

SKOOG, D. et al. *Fundamentos de química analítica*. Barcelona : Editorial Reverté, 2005, pp. 1004-1008.

USP 42. *USP NF* [en línea]. 2017. Disponible en: https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B76ABD5E72964_4_es-ES?source=Quick%20Search&highlight=1225.

WHO. *Anexo 6 informe 34 WHO Practicas adecuadas de fabricacion*. [en línea] 2006. Disponible en: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/7_Anexo_6_del_informe_34.pdf.

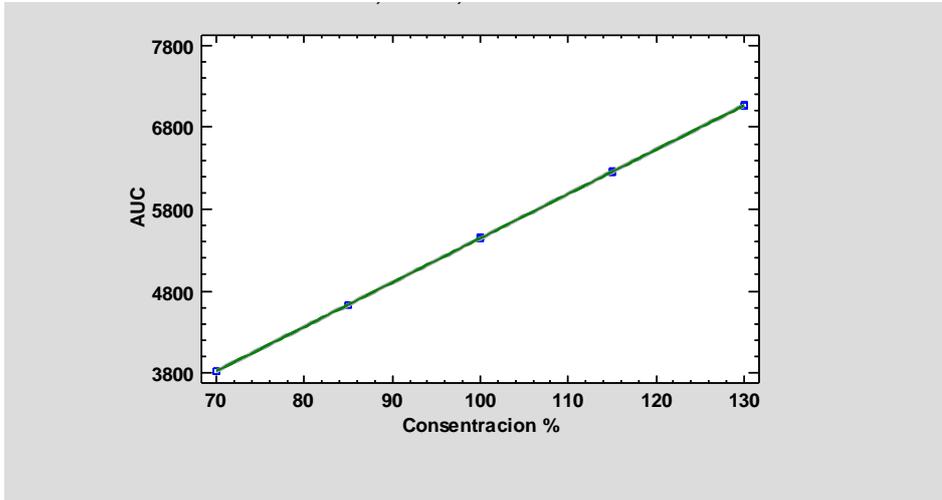
ANEXOS

ANEXO A: DESARROLLO DEL MÉTODO

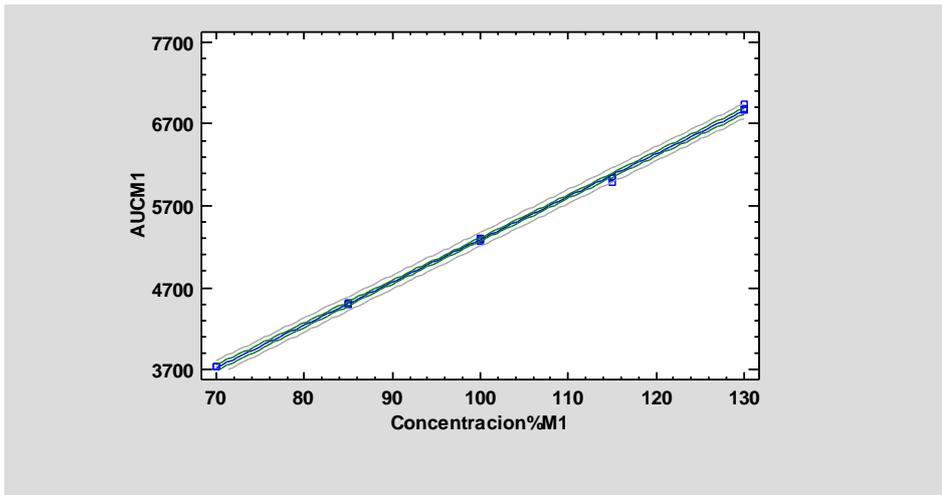
PRINCIPIO ACTIVO	
SALICILATO DE METILO	
 Salicilato de metilo	
LogP	2.55
Aspecto	Líquido aceitoso de amarillo a rojo o incoloro.
Olor	Olor característico de la gaulina
Punto de fusión	222°C,
Punto de ebullición	-8,6 °C, 432 °F a 760 mm Hg
Solubilidad en agua, g/100ml a 20°C	0.07
Densidad relativa	1,174 g/cm ³ a 25 °C
Presión de vapor, Pa a 20°C	6
Densidad relativa de vapor (aire = 1)	5.24
Punto de inflamación:	96°C copa cerrada
Temperatura de autoignición	451°C
Estabilidad/Vida útil	Sensible a la luz y al calor
Calor de combustión	-902,2 kcal/mol a 25 °C
Calor de vaporización	11.155 kcal/mol
Tensión superficial	44,2 dinas/cm a -19,8 °C; 19,8 dinas/cm a 212,2 °C
Índice de refracción	1.534-1.538
Enlaces de hidrógenos aceptores	1
Enlaces de hidrógenos receptores	3
Masa exacta	152.047344113
Masa monoisotópica	152.047344113

ANEXO B: LINEALIDAD

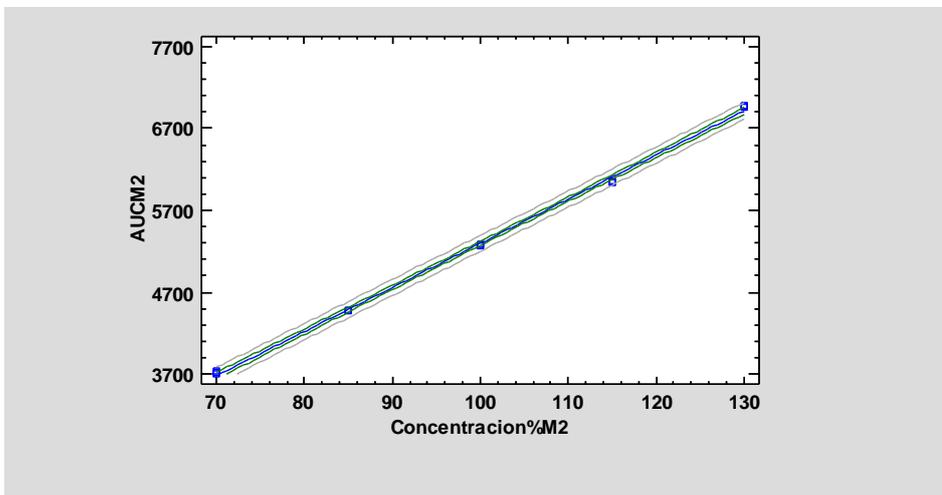
Salicilato de metilo Sistema



Salicilato de metilo Sistema **Método 1**



Salicilato de metilo Sistema **Método 2**



ANEXO C: PRECISIÓN INTERMEDIA

- Salicilato de metilo

Regresión simple Estándar vs nivel

Coefficientes

Parámetro	Mínimos Cuadrados Estimado	Estándar Error	Estadístico T	Valor-P
Intercepto	202806,	58915,4	3,44232	0,0044
Pendiente	2943,91	5,22083	563,879	0,0000

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2,35841E15	1	2,35841E15	317959,08	0,0000
Residuo	9,64256E10	13	7,41735E9		
Total (Corr.)	2,35851E15	14			

Coefficiente de Correlación = 0,99998

R-cuadrada = 99,9959 porciento

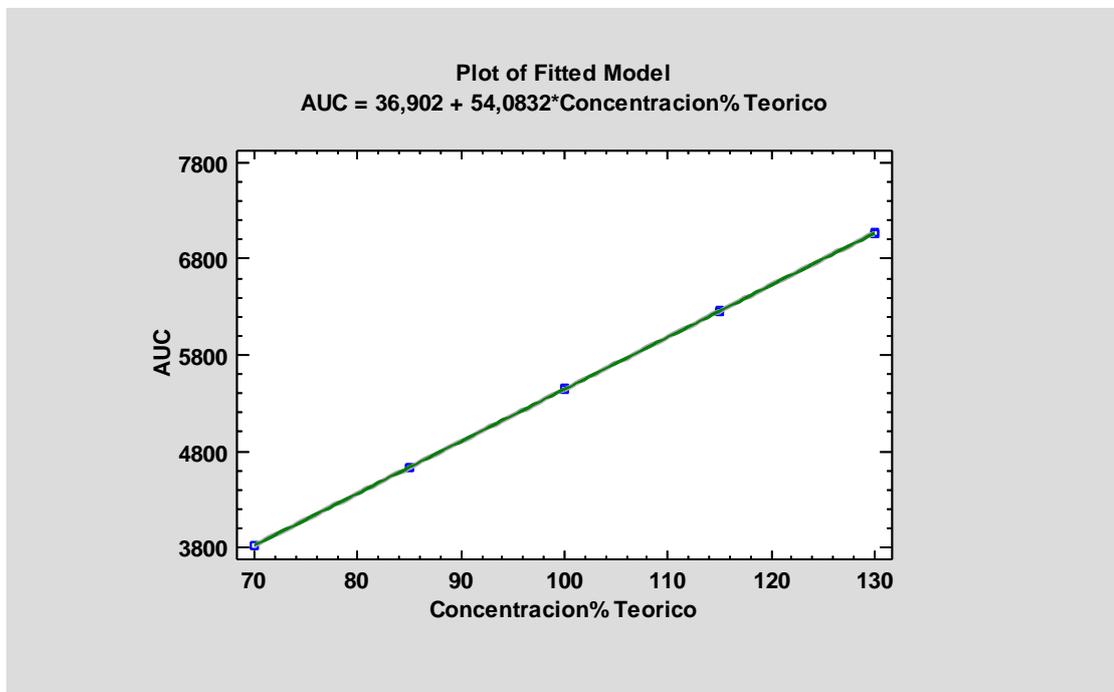
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,9956 porciento

Error estándar del est. = 86124,1

Error absoluto medio = 63752,8

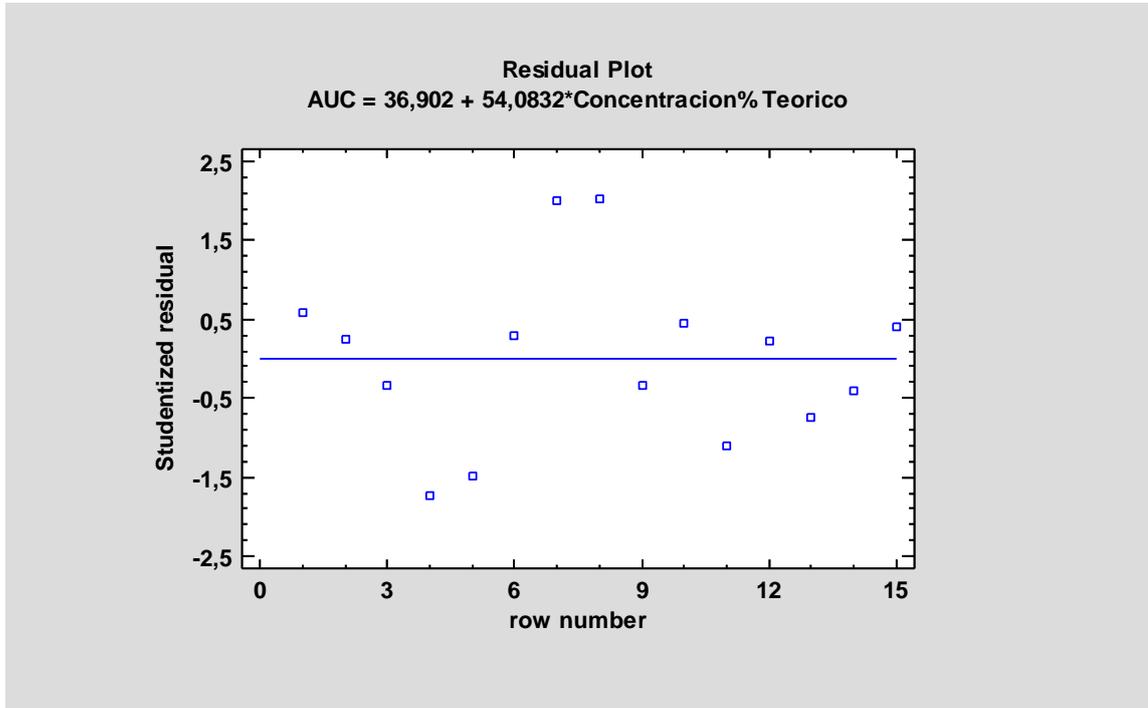
Estadístico Durbin-Watson = 1,39178 (P=0,0590)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,294286



Residuos Atípicos

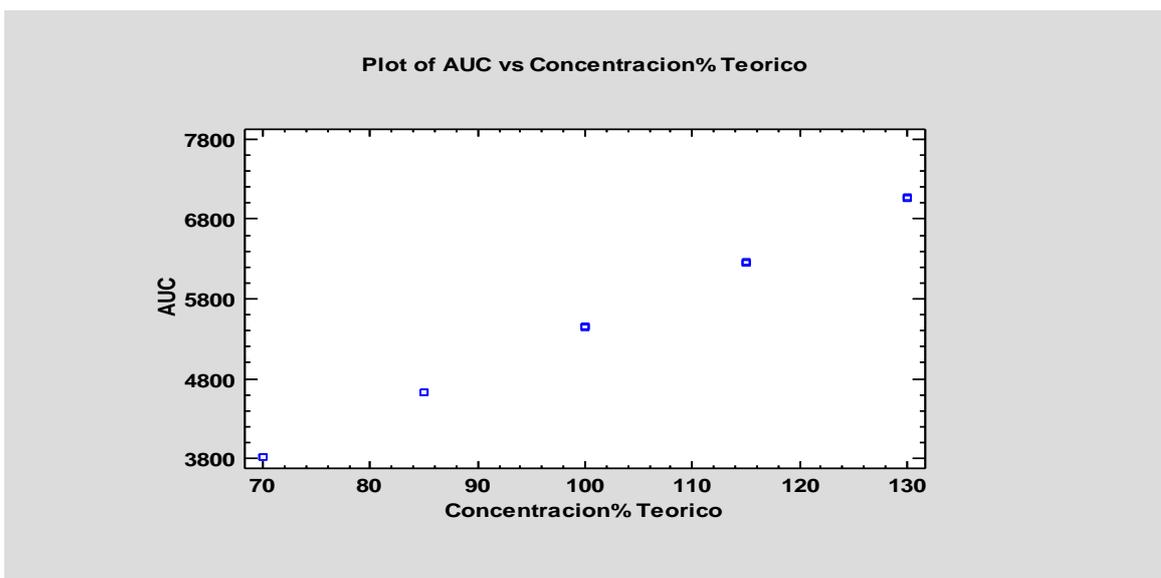
Fila	X	Y	Predicciones Y	Residuos	Residuos Estudentizados
7	100,0	5458,97	5445,22	13,7557	2,01
8	100,0	5459,05	5445,22	13,8357	2,02



ANOVA simple Estándar combinado vs nivel

Número de observaciones: 15

Número de niveles: 5



Resumen Estadístico para AUC

Contar	15
Promedio	5445,22
Desviación estándar	1187,57
Coefficiente de variación	21,8094%
Mínimo	3820,21
Máximo	7070,7
Rango	3250,48
Sesgo Estandarizado	-0,00461938
Curtosis Estandarizada	-1,055

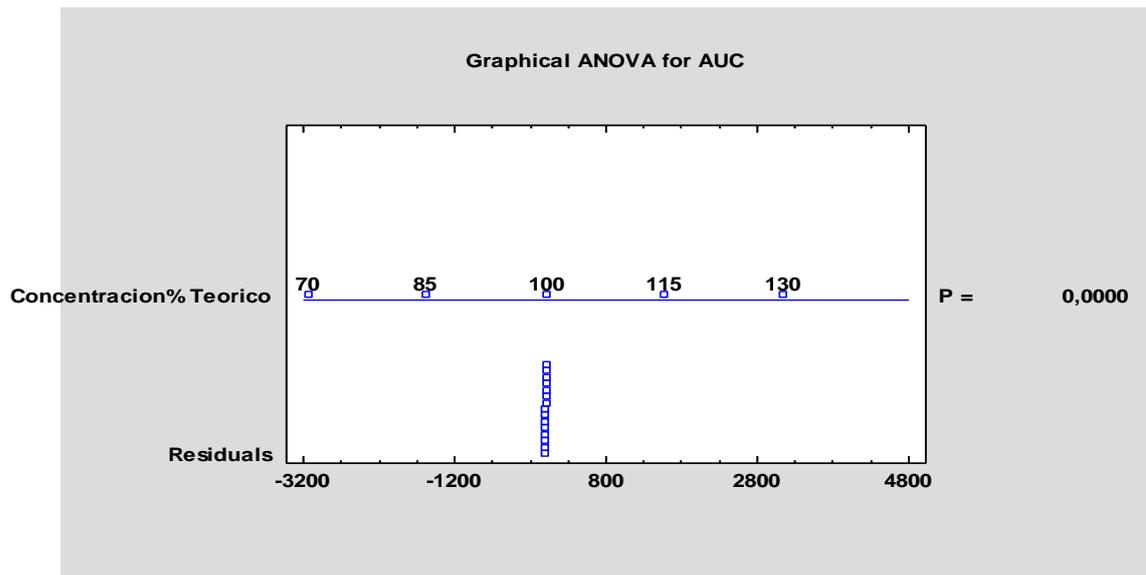
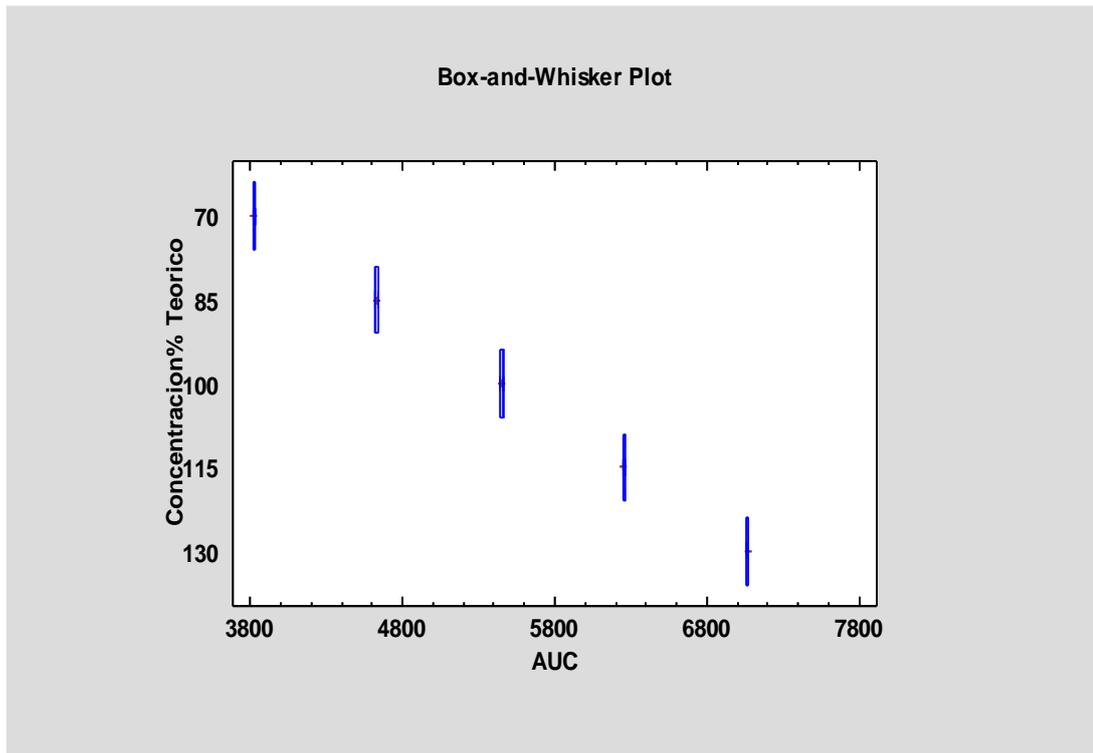


Tabla ANOVA para AUC por NIVEL

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,9744E7	4	4,93601E6	111370,27	0,0000
Residuo	443,207	10	44,3207		
Total (Corr.)	1,97445E7	14			



Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	2,12196	0,1526

Regresión simple Placebo cargado 1 vs nivel

Coefficientes

<i>Parámetro</i>	<i>Mínimos Cuadrados Estimado</i>	<i>Estándar Error</i>	<i>Estadístico T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-92,0866	54,4952	-1,68981	0,1149
Pendiente	53,8946	0,53309	101,099	0,0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,96062E7	1	1,96062E7	10220,92	0,0000
Residuo	24937,2	13	1918,25		
Total (Corr.)	1,96312E7	14			

Coefficiente de Correlación = 0,999365

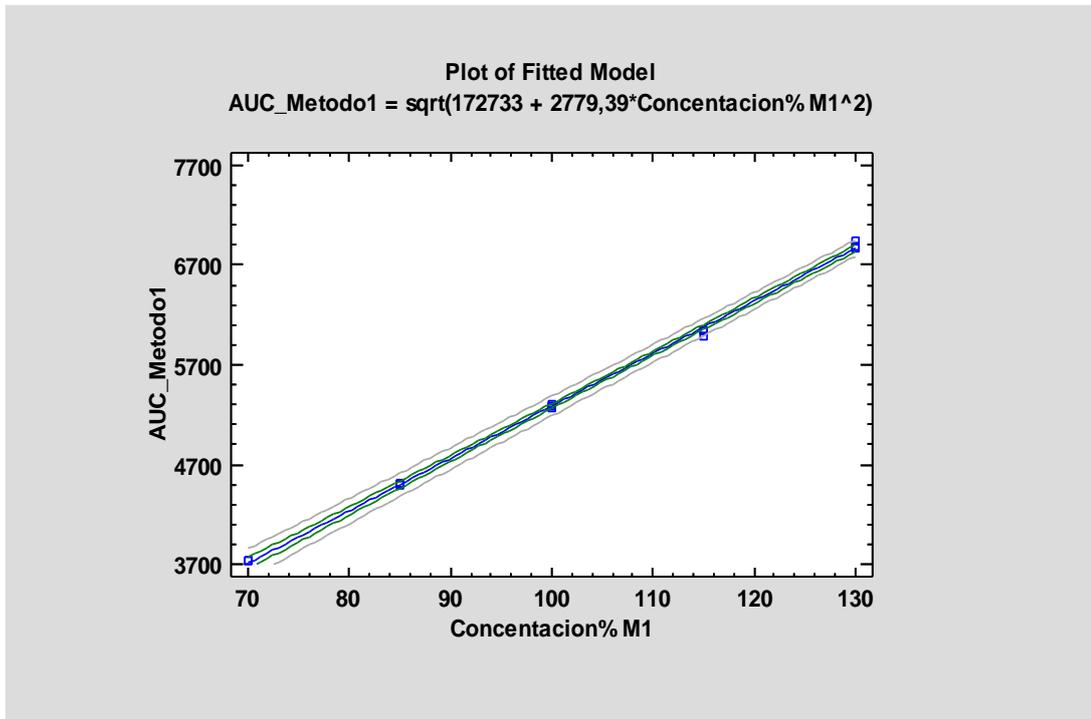
R-cuadrada = 99,873 porciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,8632 porciento

Error estándar del est. = 43,7978

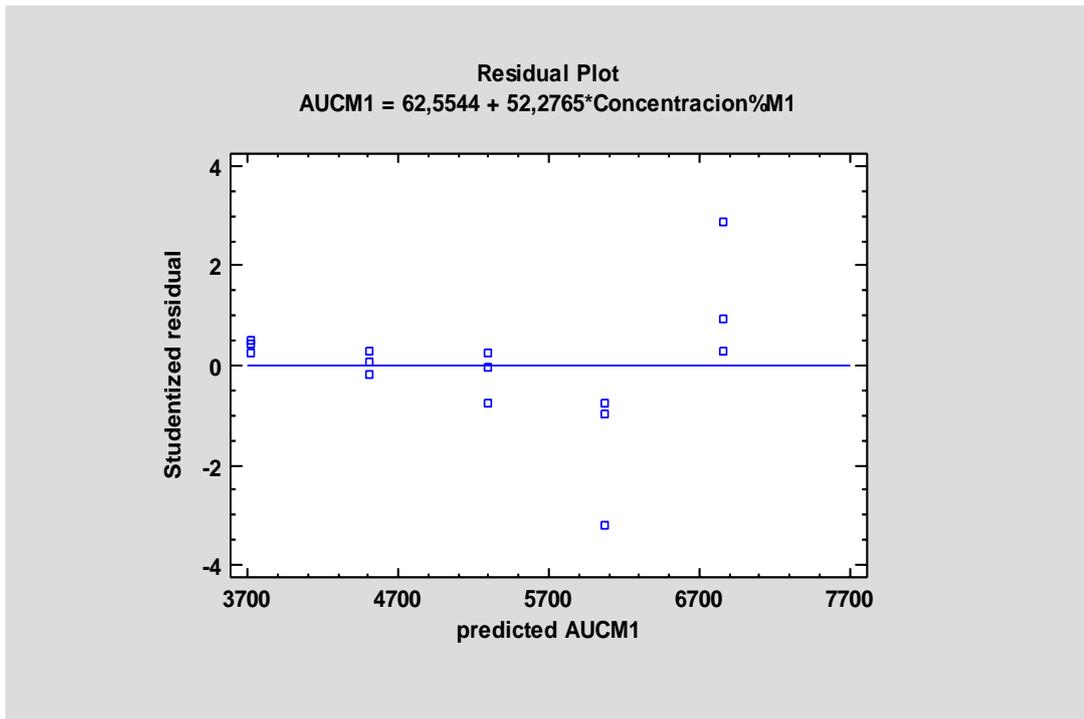
Error absoluto medio = 36,4071

Estadístico Durbin-Watson = 0,701457 (P=0,0005)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,525561



Residuos Atípicos

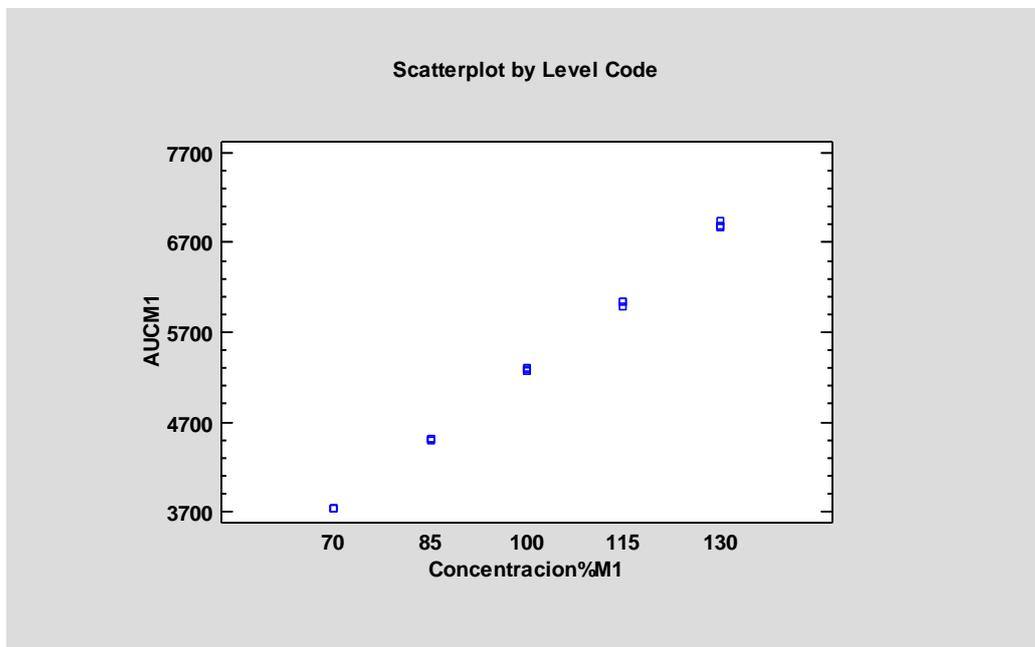
<i>Fila</i>	<i>X</i>	<i>Y</i>	<i>Predicciones Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos Estudentizados</i>
10	115,0	5986,19	6074,36	-88,165	-3,21
13	130,0	6937,0	6858,51	78,4939	2,90



ANOVA simple Placebo cargado 1 vs nivel

Número de observaciones: 15

Número de niveles: 5



Resumen Estadístico para AUCM1

Contar	15
Promedio	5290,21
Desviación estándar	1148,46
Coefficiente de variación	21,7091%

Mínimo	3730,82
Máximo	6937,0
Rango	3206,18
Sesgo Estandarizado	0,0852802

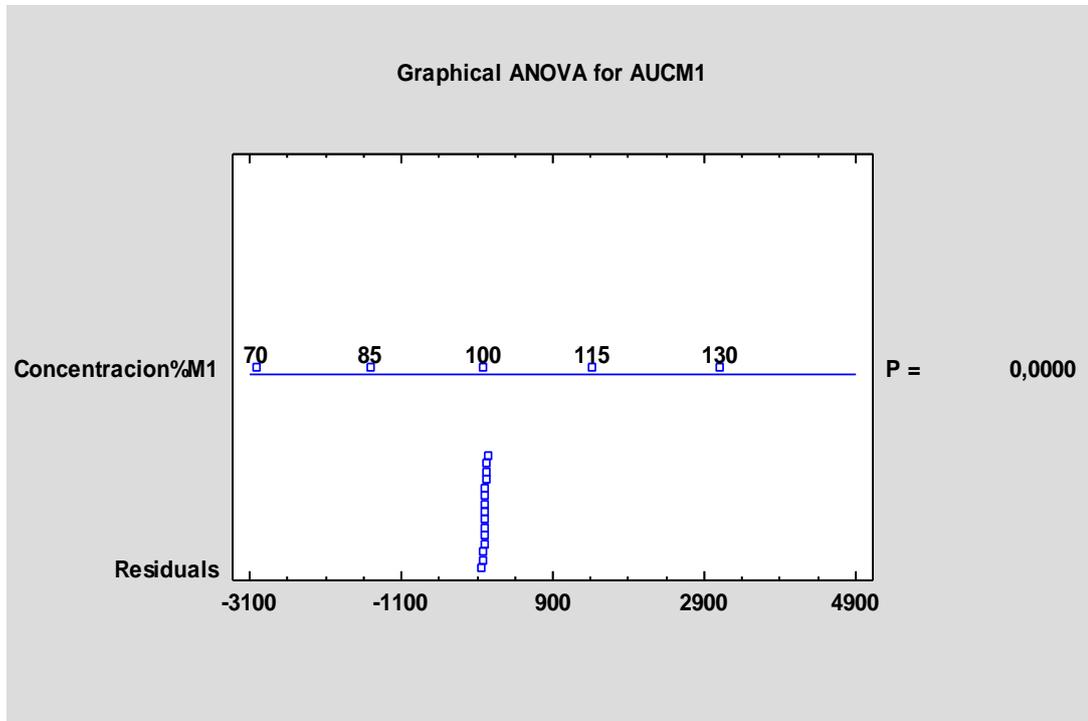
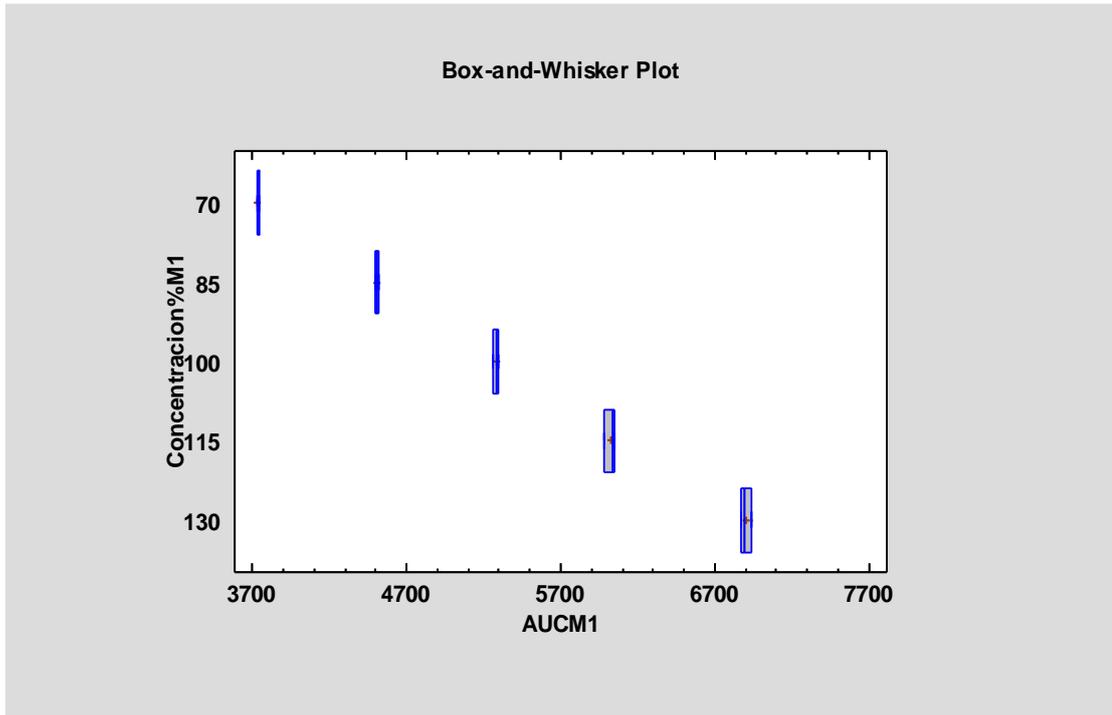


Tabla ANOVA para AUCM1 por NIVEL

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,84599E7	4	4,61496E6	8362,13	0,0000
Residuo	5518,88	10	551,888		
Total (Corr.)	1,84654E7	14			



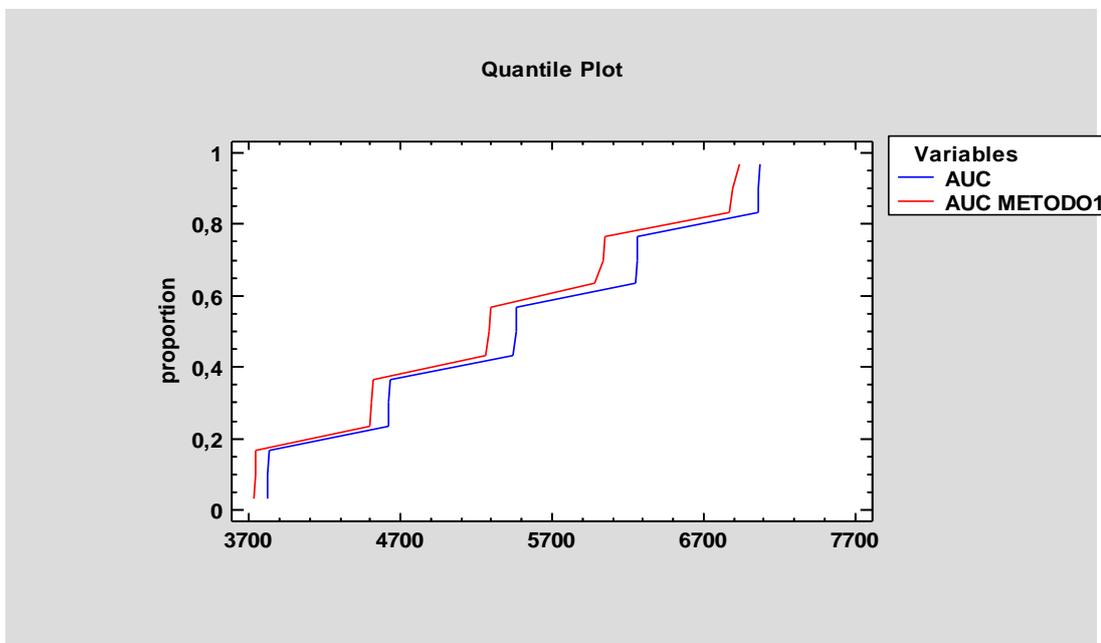
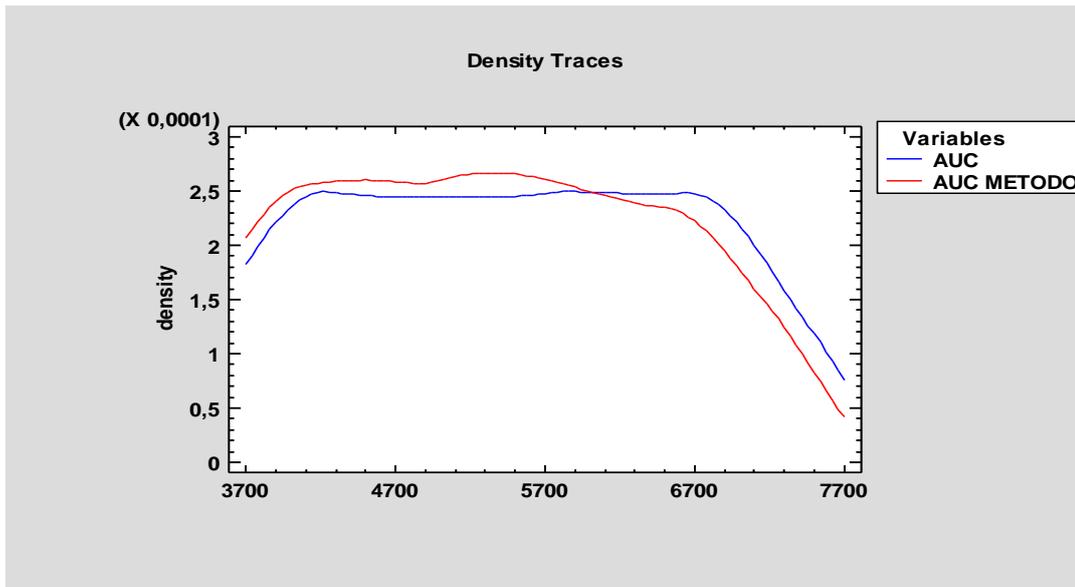
Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	3,50893	0,0489

Comparación de medias Estándar combinado vs Placebo cargado 1

Resumen Estadístico

	<i>AUC</i>	<i>AUC PLACEBO CARGADO 1</i>
Recuento	15	15
Promedio	5445,22	5290,21
Desviación Estándar	1187,57	1148,46
Coefficiente de Variación	21,8094%	21,7091%
Mínimo	3820,21	3730,82
Máximo	7070,7	6937,0
Rango	3250,48	3206,18
Sesgo Estandarizado	-0,00461938	0,0852802
Curtosis Estandarizada	-1,055	-1,00055



Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de AUC: 5445,22 +/- 657,655 [4787,56; 6102,87]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de AUC MÉTODO 1: 5290,21 +/- 635,996 [4654,21; 5926,2]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias suponiendo varianzas iguales: 155,009 +/- 873,766 [-718,757; 1028,77]

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $\text{media1} = \text{media2}$

Hipótesis Alt.: $\text{media1} < \text{media2}$

suponiendo varianzas iguales: $t = 0,363394$ P-value = 0,71904

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$

Regresión simple Placebo cargado 2 vs nivel

Coefficientes

Parámetro	Mínimos Cuadrados Estimado	Estándar Error	Estadístico T	Valor-P
Intercepto	172733,	318364,	0,542564	0,5966
Pendiente	2779,39	28,212	98,5178	0,0000

Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2,10217E15	1	2,10217E15	9705,75	0,0000
Residuo	2,81568E12	13	2,16591E11		
Total (Corr.)	2,10499E15	14			

Coefficiente de Correlación = 0,999331

R-cuadrada = 99,8662 por ciento

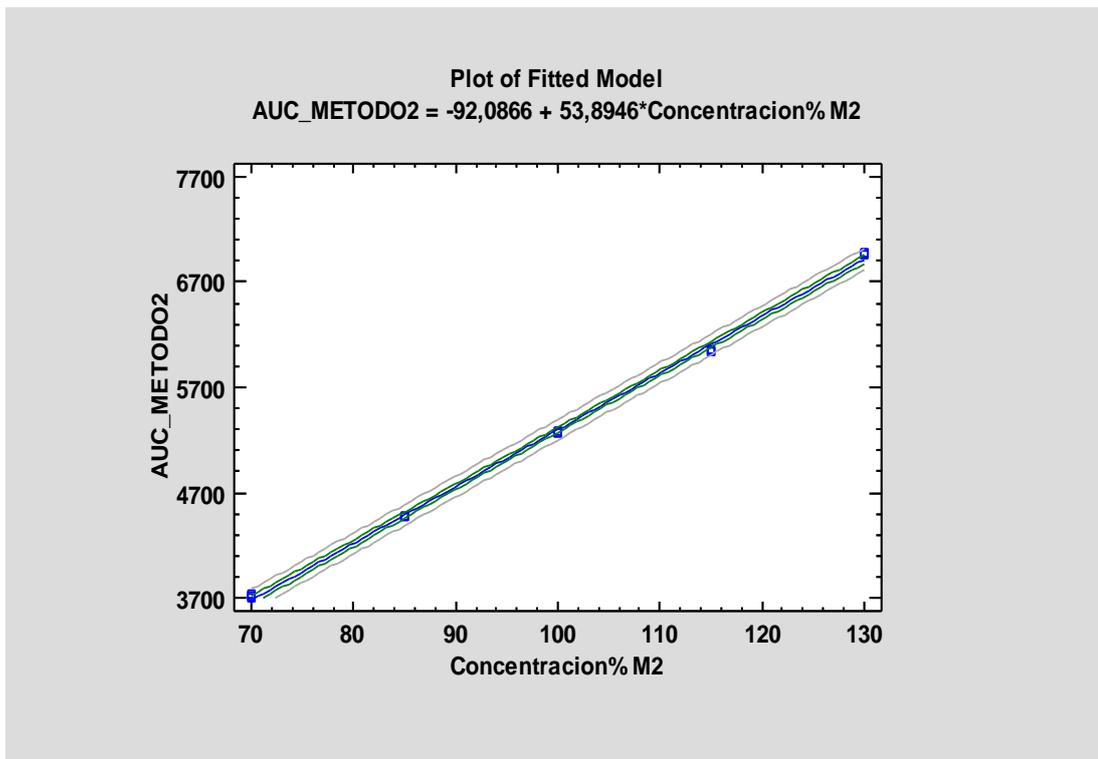
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,8559 por ciento

Error estándar del est. = 43,7978,

Error absoluto medio = 292957,

Estadístico Durbin-Watson = 1,72911 (P=0,1971)

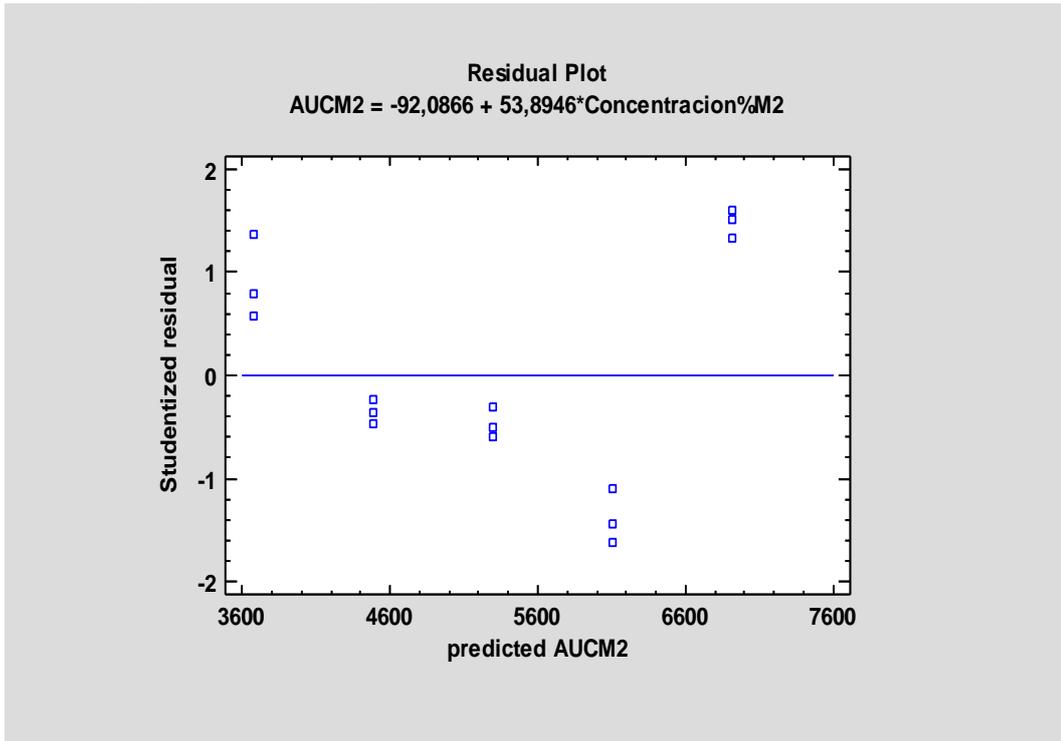
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,112325



Residuos Atípicos

Fila	X	Y	Predicciones Y	Residuos	Residuos Estudentizados
------	---	---	----------------	----------	-------------------------

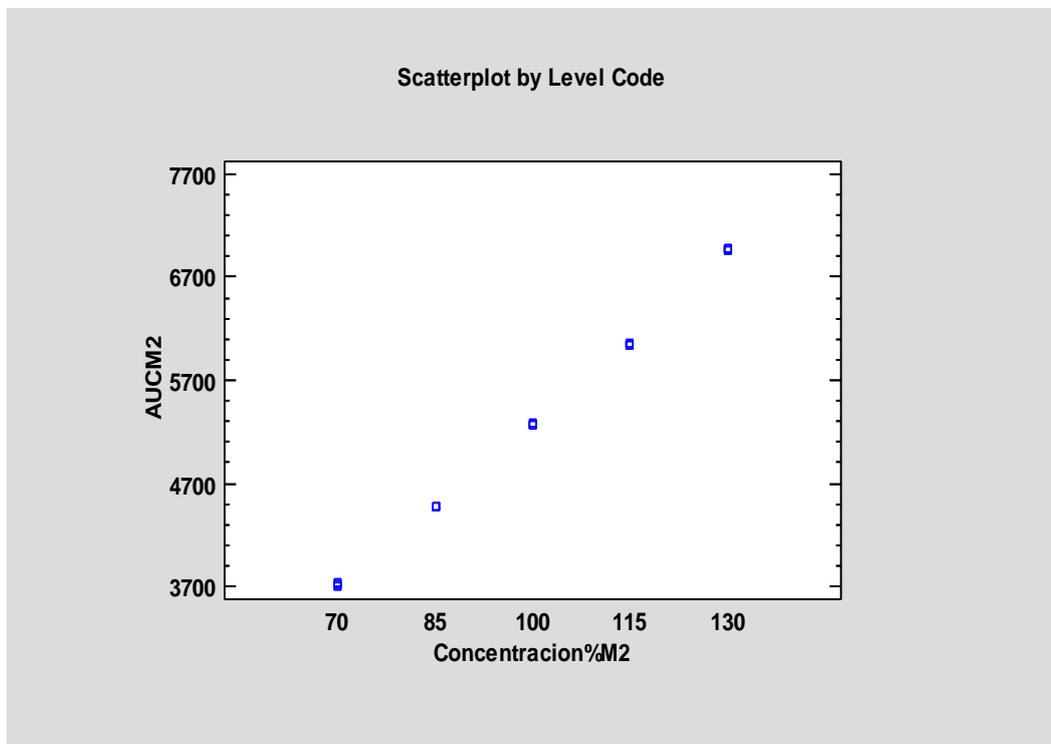
El modelo no presenta datos atípicos



ANOVA simple Placebo cargado 2 vs nivel

Número de observaciones: 15

Número de niveles: 5



Resumen Estadístico para AUC

Contar	15
Promedio	5297,37
Desviación estándar	1184,16
Coefficiente de variación	22,3537%
Mínimo	3703,56
Máximo	6973,27
Rango	3269,7
Sesgo Estandarizado	0,13902
Curtosis Estandarizada	-1,01024

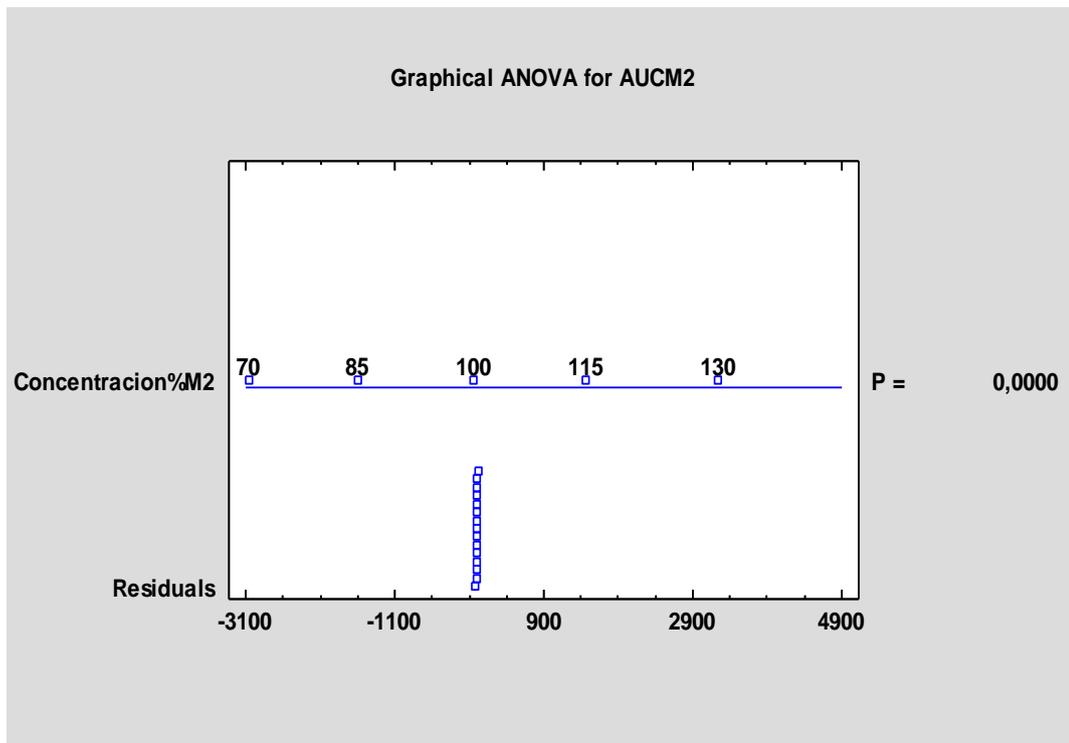
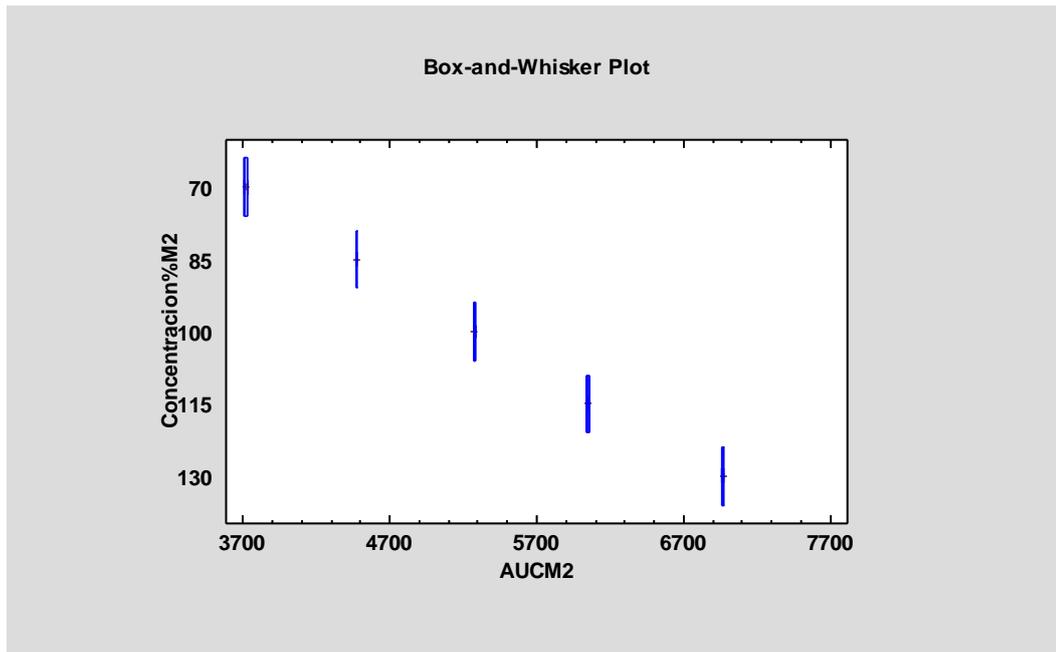


Tabla ANOVA para AUCM2 por NIVEL

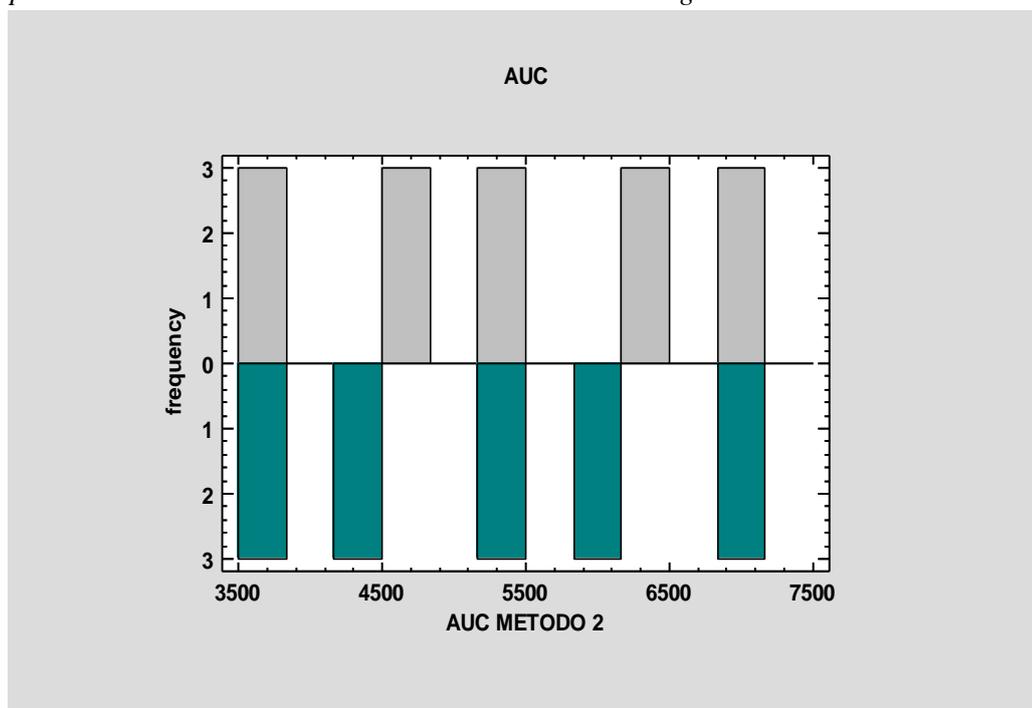
Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,96304E7	4	4,9076E6	62229,93	0,0000
Residuo	788,624	10	78,8624		
Total (Corr.)	1,96312E7	14			



Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,8938	0,1882

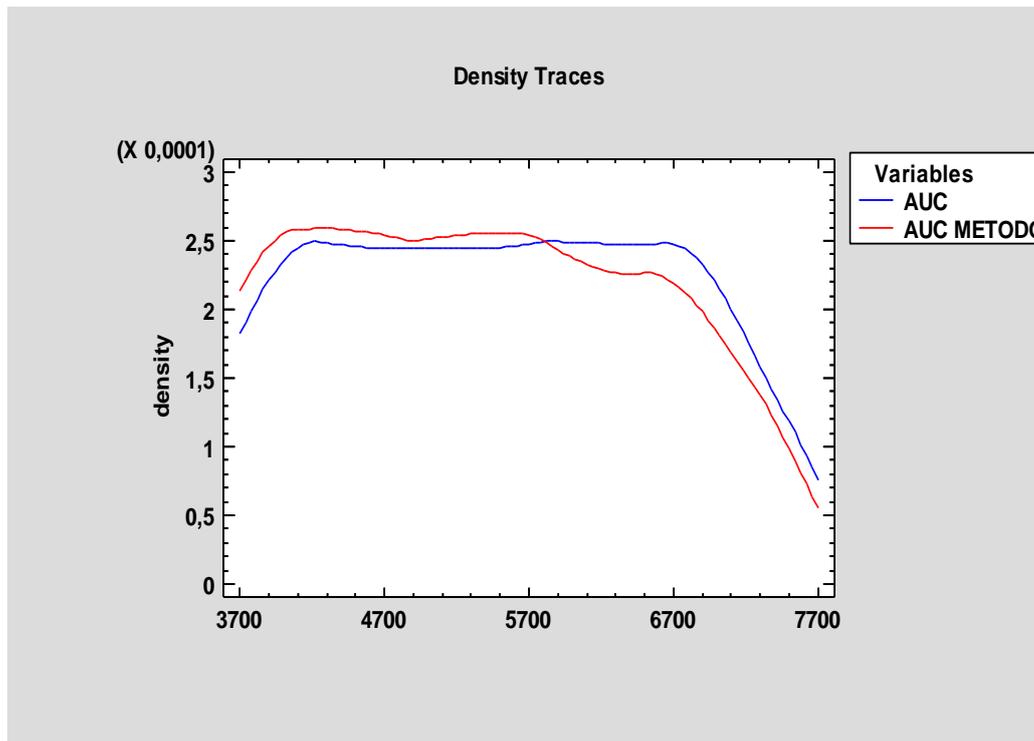
Comparación de medias Estándar combinado vs Placebo cargado 2



Resumen Estadístico

	<i>AUC</i>	<i>AUC PLACEBO CARGADO 1</i>
Recuento	15	15
Promedio	5445,22	5297,37

Desviación Estándar	1187,57	1184,16
Coefficiente de Variación	21,8094%	22,3537%
Mínimo	3820,21	3703,56
Máximo	7070,7	6973,27
Rango	3250,48	3269,7
Sesgo Estandarizado	-0,00461938	0,13902
Curtosis Estandarizada	-1,055	-1,01024



Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de AUC: 5445,22 +/- 657,655 [4787,56; 6102,87]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de AUC MÉTODO 2: 5297,37 +/- 655,766 [4641,61; 5953,14]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias suponiendo varianzas iguales: 147,842 +/- 886,996 [-739,153; 1034,84]

Prueba t para comparar medias

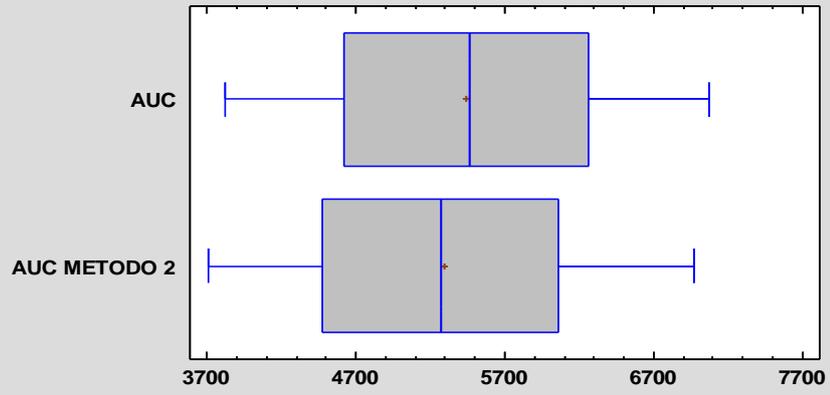
Hipótesis nula: $media1 = media2$

Hipótesis Alt.: $media1 <> media2$

suponiendo varianzas iguales: $t = 0,341425$ P-value = 0,735333

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$

Box-and-Whisker Plot



ANEXO D: PRECISIÓN INTERMEDIA

- Salicilato de Metilo

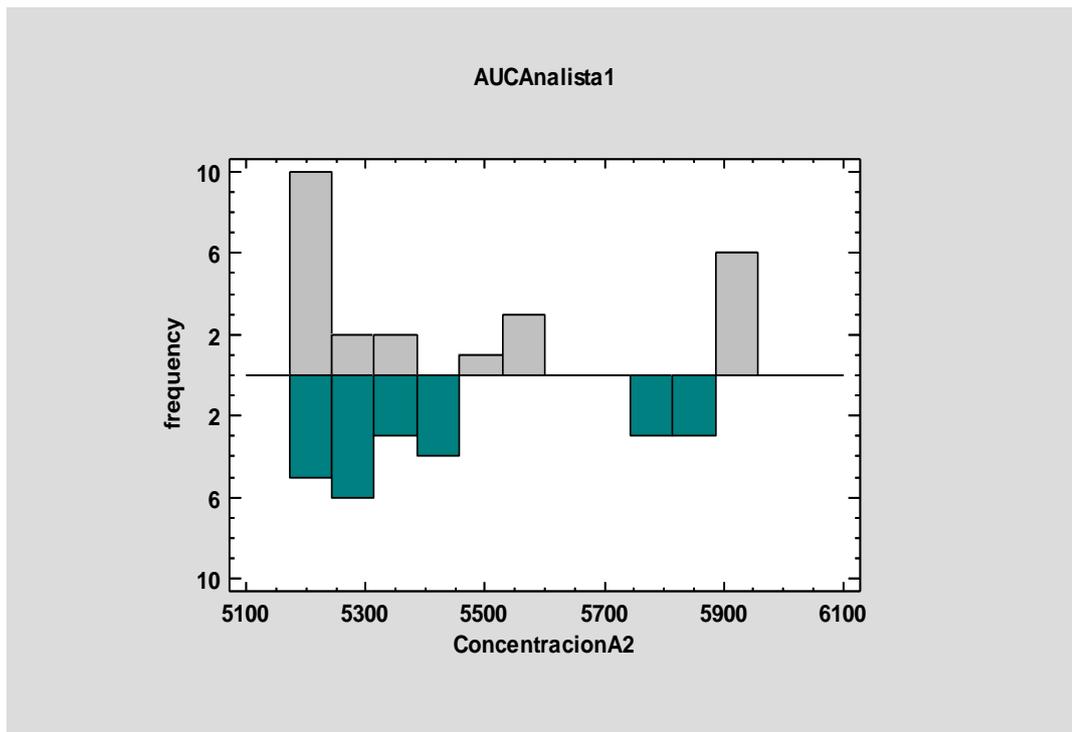
Comparación de Dos Muestras - analista 1 & analista 2

Muestra 1: AUCAnalista1

Muestra 2: ConcentracionA2

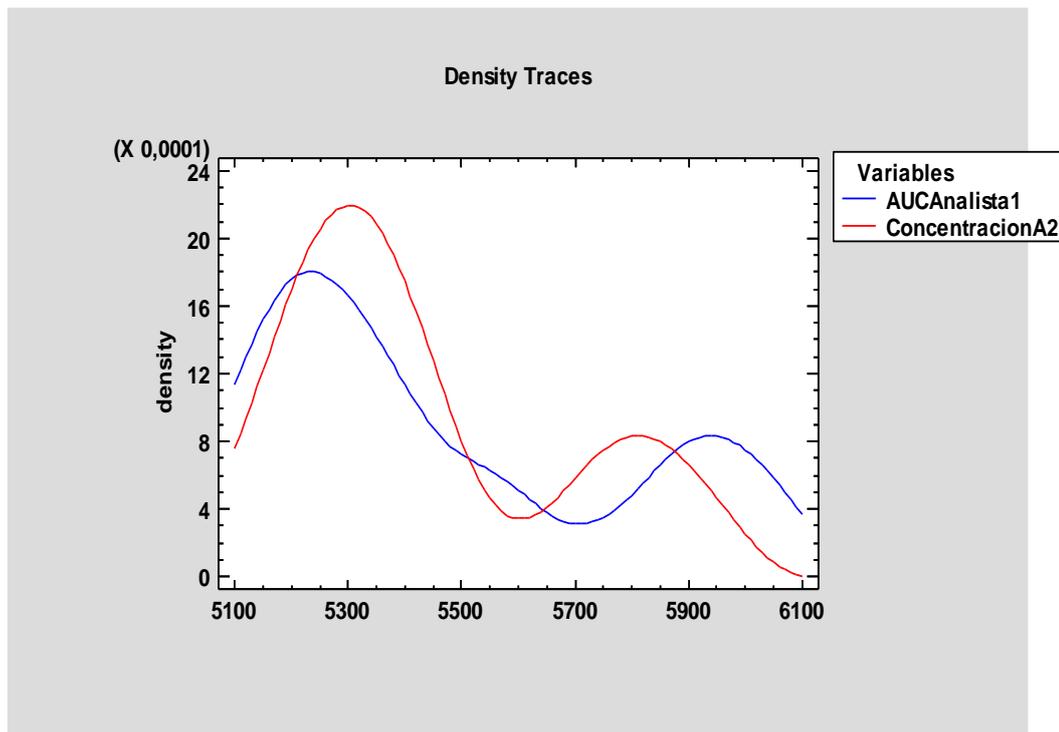
Muestra 1: 24 valores en el rango de 5173,75 to 5948,53

Muestra 2: 24 valores en el rango de 5202,59 to 5823,42



Resumen Estadístico

	<i>AUCAnalista1</i>	<i>ConcentracionA2</i>
Recuento	24	24
Promedio	5461,11	5430,13
Desviación Estándar	305,871	232,606
Coefficiente de Variación	5,60089%	4,28361%
Mínimo	5173,75	5202,59
Máximo	5948,53	5823,42
Rango	774,78	620,83
Sesgo Estandarizado	1,56888	1,97923
Curtosis Estandarizada	-1,09651	-0,739344



Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de AUCAnalista1: 5461,11 +/- 129,158
[5331,95; 5590,27]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de ConcentracionA2: 5430,13 +/- 98,2209
[5331,91; 5528,35]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias
suponiendo varianzas iguales: 30,9829 +/- 157,889 [-126,906; 188,872]

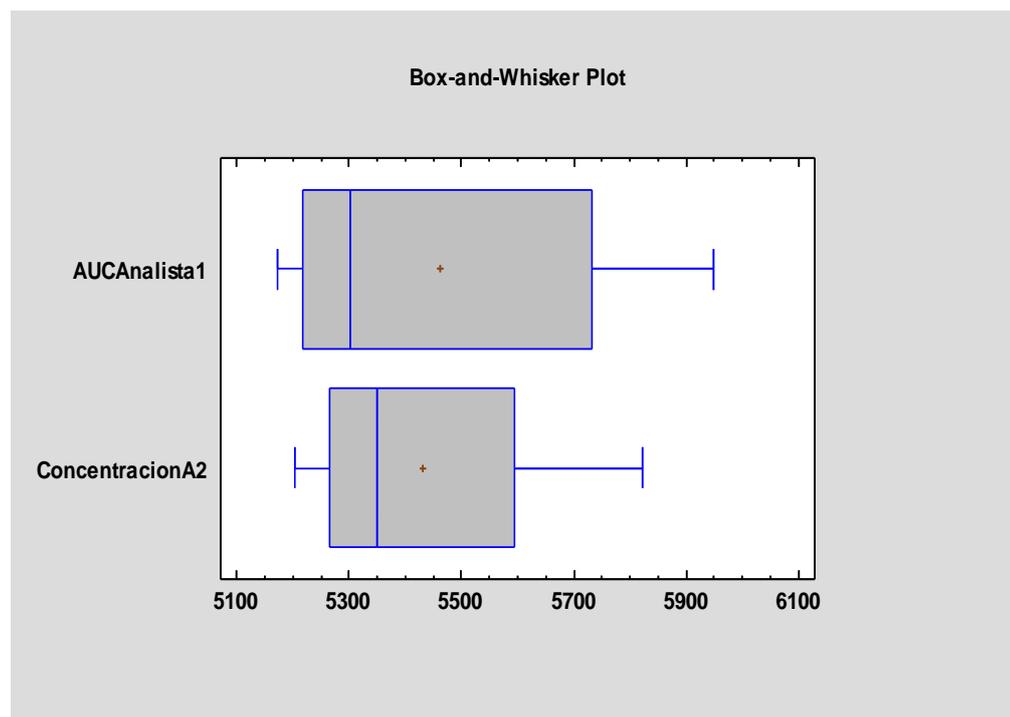
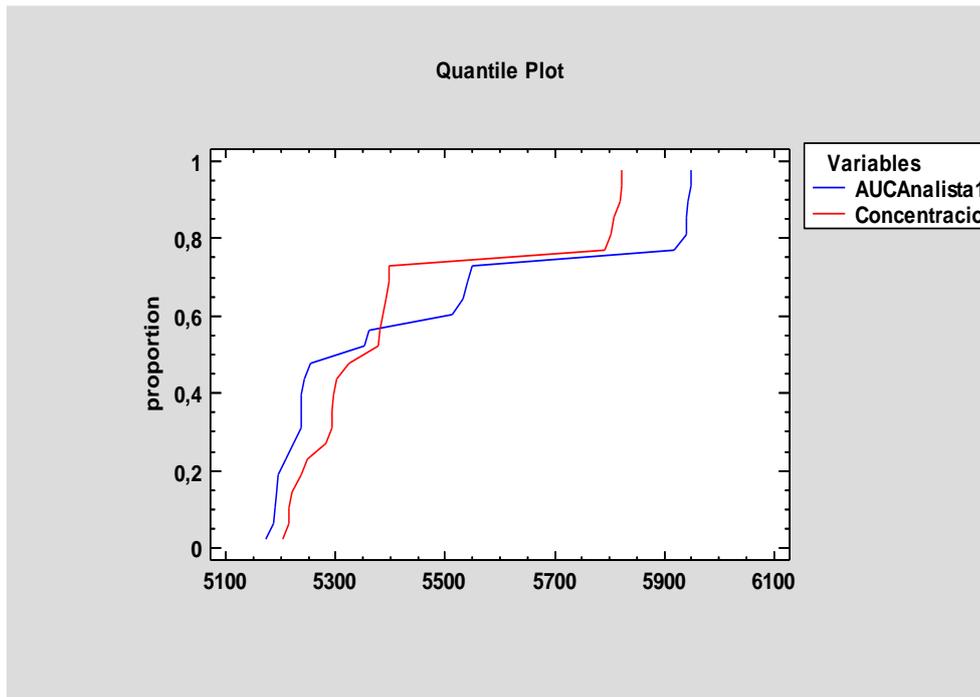
Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 \neq media2

suponiendo varianzas iguales: t = 0,394996 P-value = 0,694671

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05



Comparación de Desviaciones Estándar

	<i>AUCAnalista1</i>	<i>ConcentracionA2</i>
Desviación Estandar	305,871	232,606
Varianza	93556,9	54105,4
GI	23	23

Razón de Varianzas= 1,72916

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de AUCAnalista1: [237,727; 429,063]
Desviación Estándar de ConcentracionA2: [180,784; 326,29]
Razones de Varianzas: [0,748023; 3,9972]

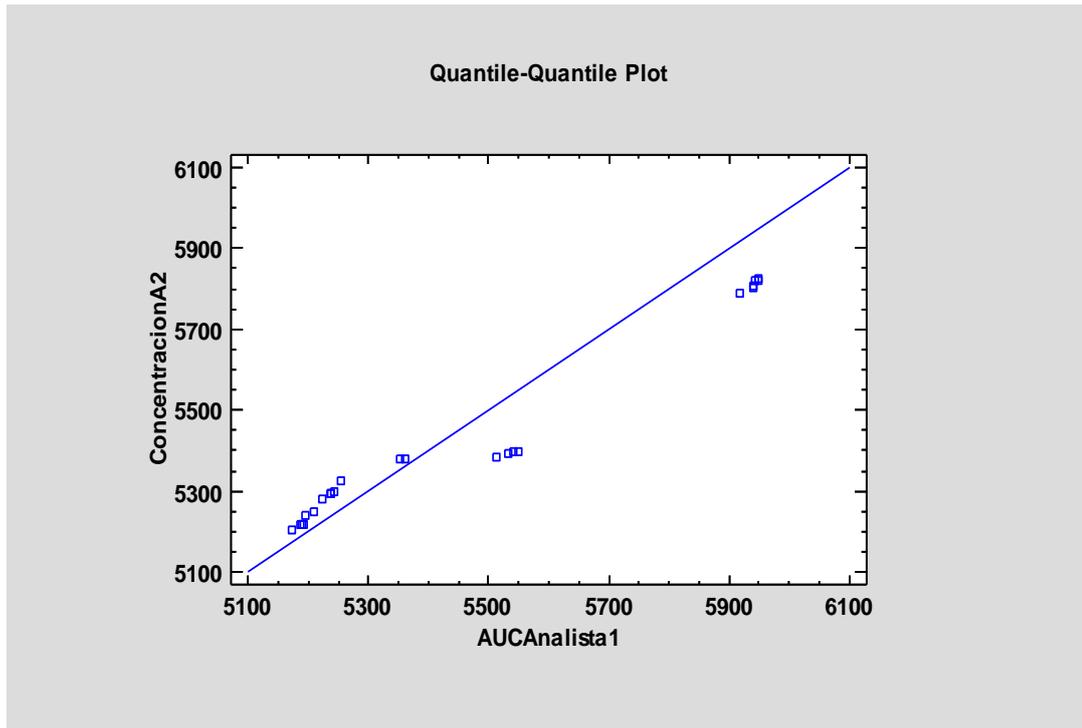
Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula: $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.: $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 1,72916 P-value = 0,196669

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.



Comparación de Medianas

Mediana de muestra 1: 5302,87

Mediana de muestra 2: 5350,47

Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas

Hipótesis Nula: $mediana_1 = mediana_2$

Hipótesis Alt.: $mediana_1 < mediana_2$

Rango Promedio de muestra 1: 23,6667

Rango Promedio de muestra 2: 25,3333

W = 405,0 valor-P = 0,687619

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

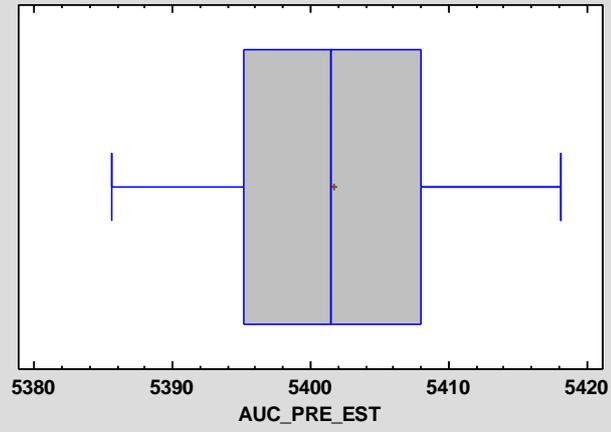
ANEXO E: REPETIBILIDAD

PARÁMETRO		CRITERIO DE ACEPTACIÓN	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO
PRECISION. - -Repetibilidad - Precisión - Intermedia	REPETIBILIDAD DEL SISTEMA O INSTRUMENTAL	Coeficiente de variación menor o igual a 2.0%.	$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100$ $\bar{X} = \text{valor medio de los resultados}$ $S = \text{desviación estándar}$
	REPETIBILIDAD DEL MÉTODO	Coeficiente de variación menor o igual a 2.0%	
	PRECISIÓN INTERMEDIA	Coeficiente de variación menor o igual a 4.0%	
	LOS ANÁLISIS EN LABORATORIO POR DIFERENTES ANALISTAS NO DEBEN TENER EFECTO ESTADÍSTICO SIGNIFICATIVO	p (valor): ≥ 0.05	ANOVA

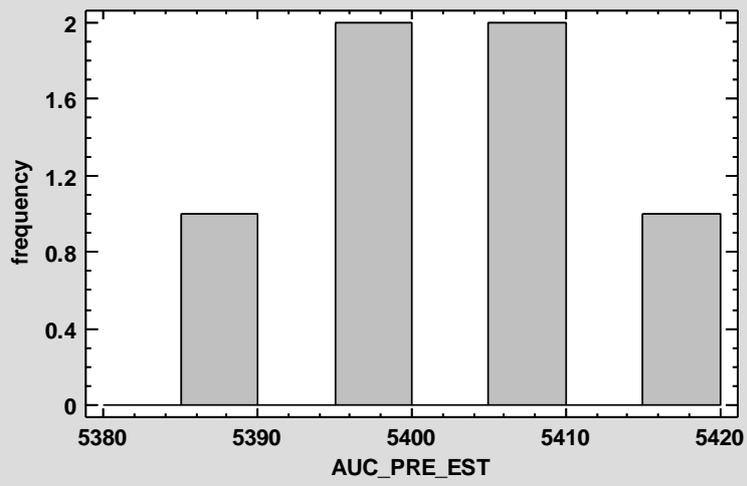
SALISATO DE METILO ESTANDAR

Recuento	6
Promedio	5401.66
Desviación Estándar	11.4693
Coeficiente de Variación	0.212328%
Mínimo	5385.61
Máximo	5418.11
Rango	32.506
Sesgo Estandarizado	0.0564828
Curtosis Estandarizada	-0.208914

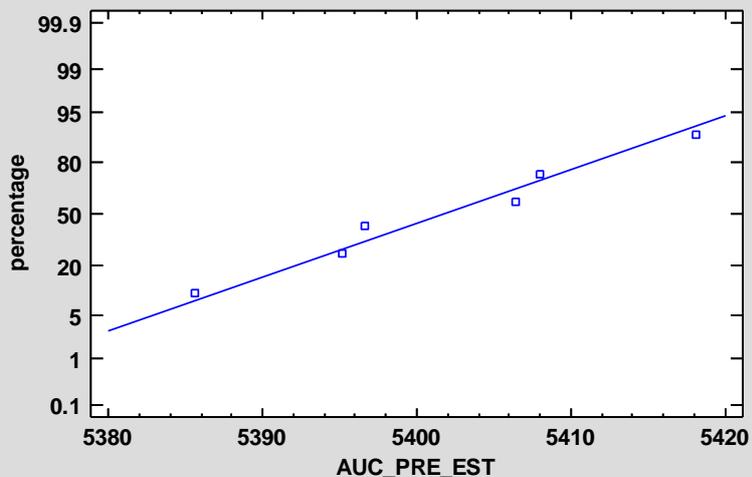
Box-and-Whisker Plot



Histogram

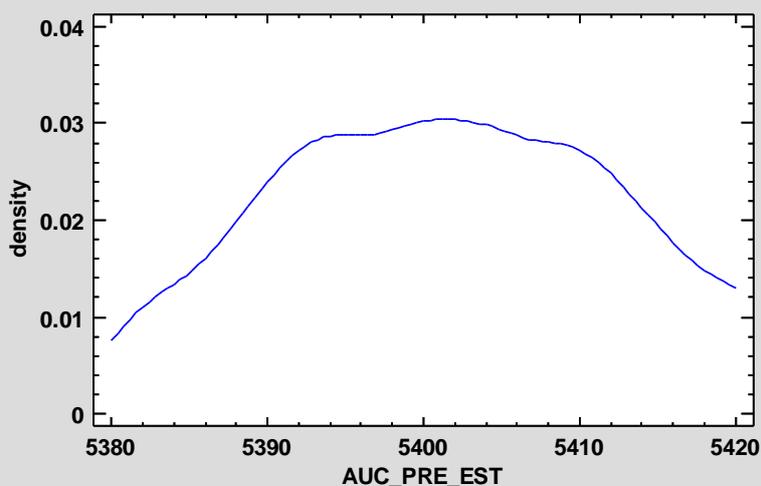


Normal Probability Plot



n:6
 Mean:5401.66
 Sigma:11.4693
 W:0.977151
 P:0.9366

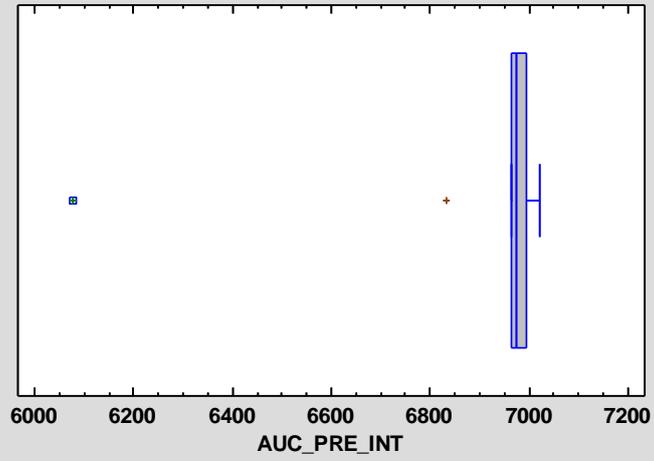
Density Trace



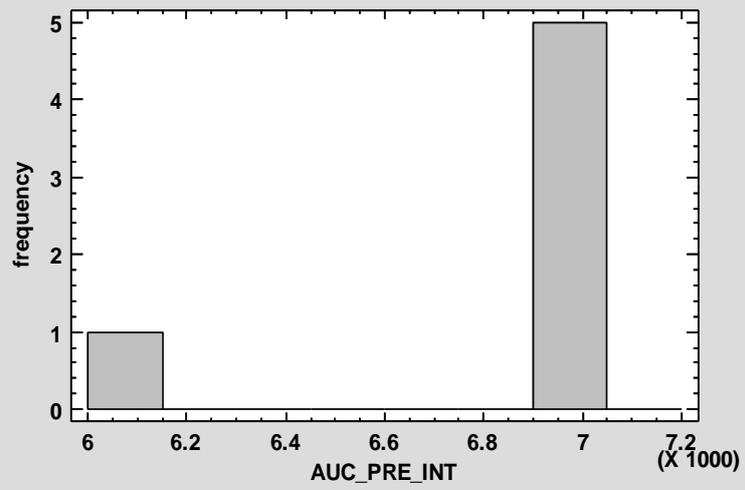
SALISATO DE METILO PLACEBO CARGADO

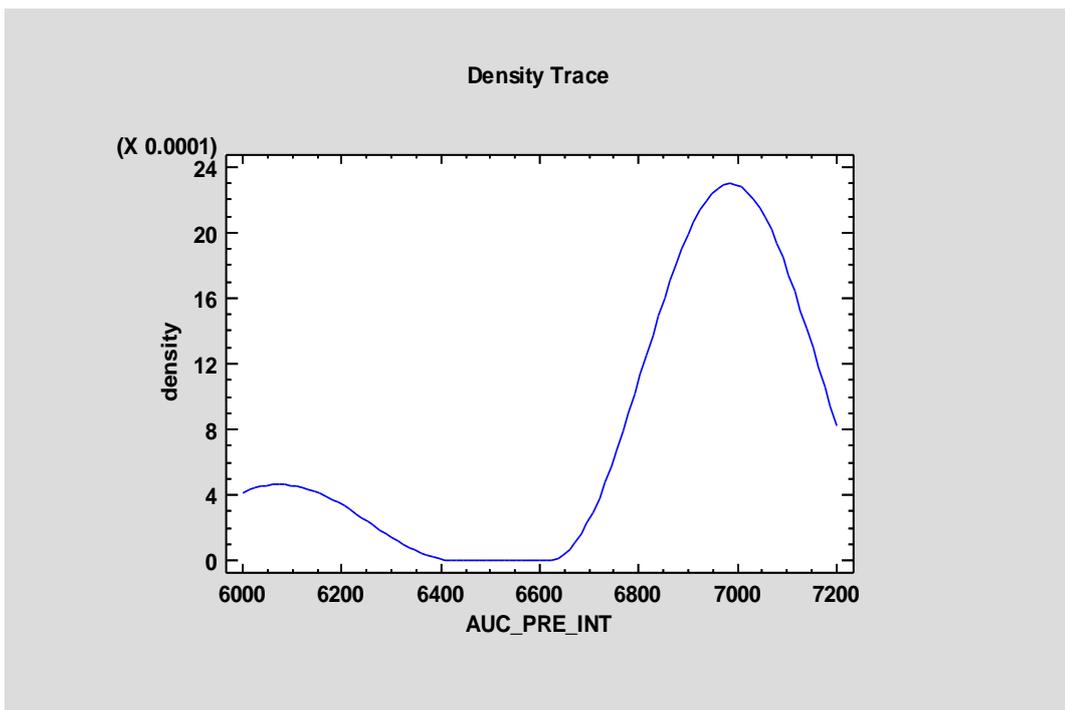
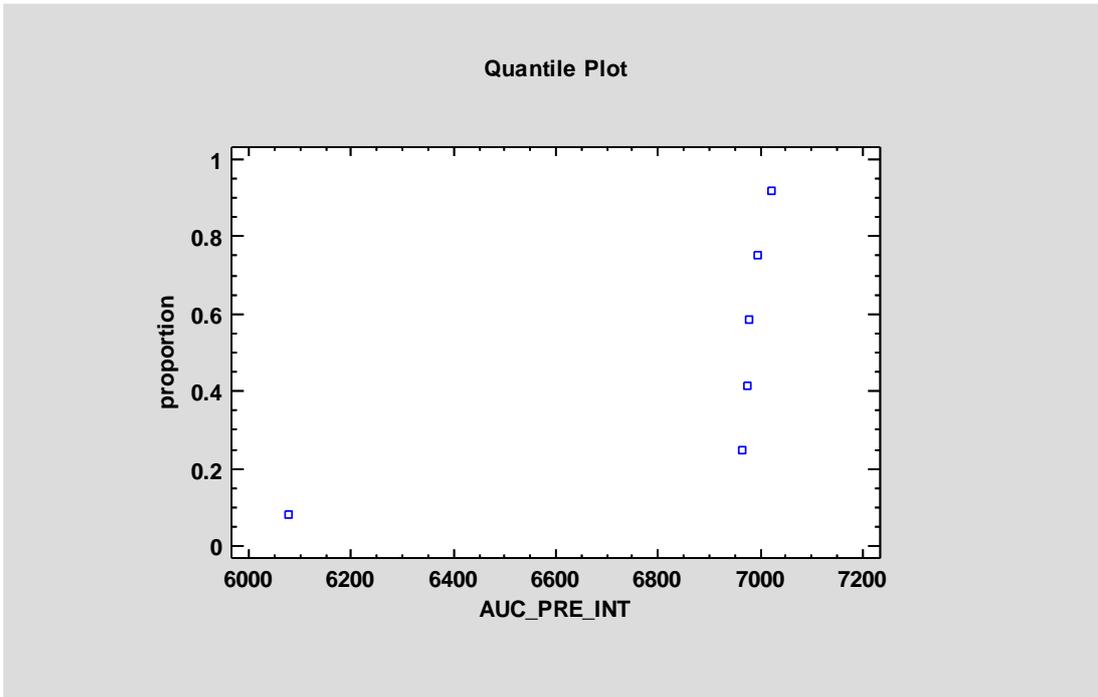
Recuento	6
Promedio	6834.29
Desviación Estándar	372.396
Coefficiente de Variación	5.44894%
Mínimo	6075.23
Máximo	7020.72
Rango	945.489
Sesgo Estandarizado	-2.43347
Curtosis Estandarizada	2.97013

Box-and-Whisker Plot



Histogram





SALISATO DE METILO INTERMEDIA

Resumen estadístico de A1_AUC_SIST

Recuento	6
Promedio	5939.58
Desviación Estándar	11.6148
Coefficiente de Variación	0.195549%
Mínimo	5917.09
Máximo	5948.53

Rango	31.448
Sesgo Estandarizado	-1.91521
Curtosis Estandarizada	2.02531

Resumen estadístico de B1_AUC_SIST

Recuento	6
Promedio	5810.58
Desviación Estándar	13.069
Coefficiente de Variación	0.224918%
Mínimo	5790.5
Máximo	5823.42
Rango	32.917
Sesgo Estandarizado	-0.639669
Curtosis Estandarizada	-0.545424

Resumen estadístico de A2_AUC_SIST

Recuento	6
Promedio	5474.58
Desviación Estándar	92.3764
Coefficiente de Variación	1.68737%
Mínimo	5352.82
Máximo	5549.66
Rango	196.84
Sesgo Estandarizado	-0.893444
Curtosis Estandarizada	-0.935694

Resumen estadístico de B2_AUC_SIST

Recuento	6
Promedio	5389.05
Desviación Estándar	9.19507
Coefficiente de Variación	0.170625%
Mínimo	5377.41
Máximo	5398.88
Rango	21.472
Sesgo Estandarizado	-0.13374
Curtosis Estandarizada	-1.04911

Resumen estadístico de A1_AUC_MET

Recuento	6
Promedio	5238.5
Desviación Estándar	9.91485
Coefficiente de Variación	0.189269%
Mínimo	5222.65
Máximo	5252.92
Rango	30.268

Sesgo Estandarizado	-0.261776
Curtosis Estandarizada	0.752493

Resumen estadístico de B1_AUC_MET

Recuento	6
Promedio	5263.29
Desviación Estándar	32.8294
Coefficiente de Variación	0.623743%
Mínimo	5219.61
Máximo	5300.47
Rango	80.859
Sesgo Estandarizado	-0.178264
Curtosis Estandarizada	-1.05585

Resumen estadístico de A2_AUC_MET

Recuento	6
Promedio	5191.78
Desviación Estándar	11.8063
Coefficiente de Variación	0.227404%
Mínimo	5173.75
Máximo	5209.76
Rango	36.011
Sesgo Estandarizado	-0.0120816
Curtosis Estandarizada	0.679757

Resumen estadístico de B2_AUC_MET

Recuento	6
Promedio	5257.59
Desviación Estándar	52.0216
Coefficiente de Variación	0.989457%
Mínimo	5202.59
Máximo	5323.52
Rango	120.928
Sesgo Estandarizado	0.150118
Curtosis Estandarizada	-1.32159

ANALISTA A

Resumen estadístico de MET_INT_A

Recuento	24
Promedio	5461.11
Desviación Estándar	305.87
Coefficiente de Variación	5.60087%
Mínimo	5173.75
Máximo	5948.53
Rango	774.788

Sesgo Estandarizado	1.56888
Curtosis Estandarizada	-1.09651

ANALISTA B

Resumen estadístico de MET_INT_B

Recuento	24
Promedio	5430.13
Desviación Estándar	232.605
Coefficiente de Variación	4.28361%
Mínimo	5202.59
Máximo	5823.42
Rango	620.826
Sesgo Estandarizado	1.97924
Curtosis Estandarizada	-0.73934

ANOVA

Resumen estadístico

	Count	Average	Standard deviation
MET_INTERMEDIA_A	24	5461.11	305.87
MET_INTERMEDIA_B	24	5430.13	232.605
Total	48	5445.62	269.268

	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
MET_INTERMEDIA_A	5.60087%	5173.75	5948.53	774.788
MET_INTERMEDIA_B	4.28361%	5202.59	5823.42	620.826
Total	4.94466%	5173.75	5948.53	774.788

	Std. skewness	Std. kurtosis
MET_INTERMEDIA_A	1.56888	-1.09651
MET_INTERMEDIA_B	1.97924	-0.73934
Total	2.50248	-1.14435

The StatAdvisor

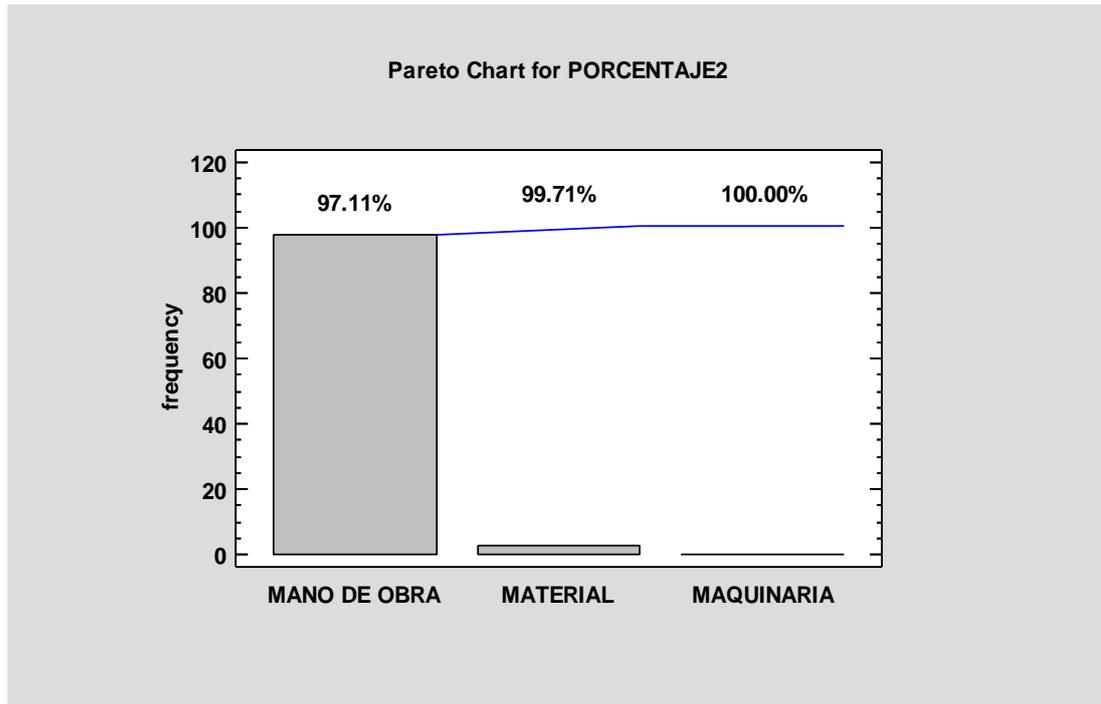
ANOVA Table

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	11518.7	1	11518.7	0.16	0.6947
Within groups	3.39622E6	46	73830.8		
Total (Corr.)	3.40773E6	47			

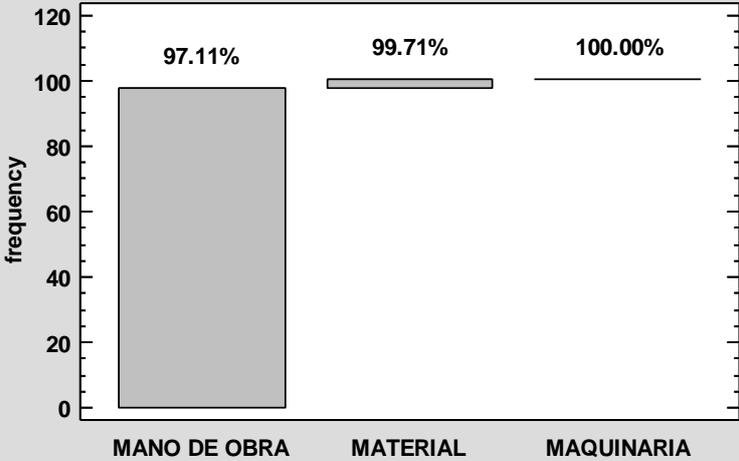
ANEXO F: INCERTIDUMBRE

Gráfico de Pareto con frecuencias acumuladas

<i>Class Label</i>	<i>Rank</i>	<i>Count</i>	<i>Weight</i>	<i>Weighted Score</i>	<i>Cum. Score</i>	<i>Percent</i>	<i>Cum. Percent</i>
MANO DE OBRA	1	97.7206	1	97.7206	97.7206	97.11	97.11
MATERIAL	2	2.6213	1	2.6213	100.342	2.60	99.71
MAQUINARIA	3	0.2889	1	0.2889	100.631	0.29	100.00
Total		100.631		100.631			

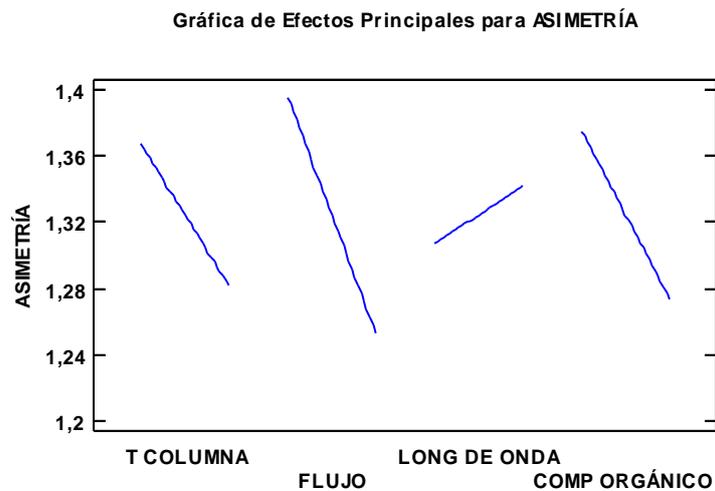
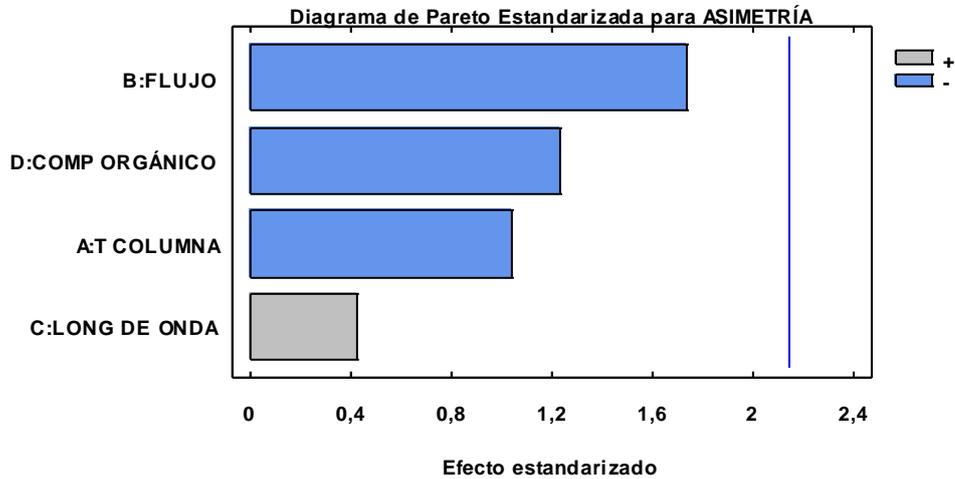


Pareto Chart for PORCENTAJE2



ANEXO G: ROBUSTEZ

- Asimetría

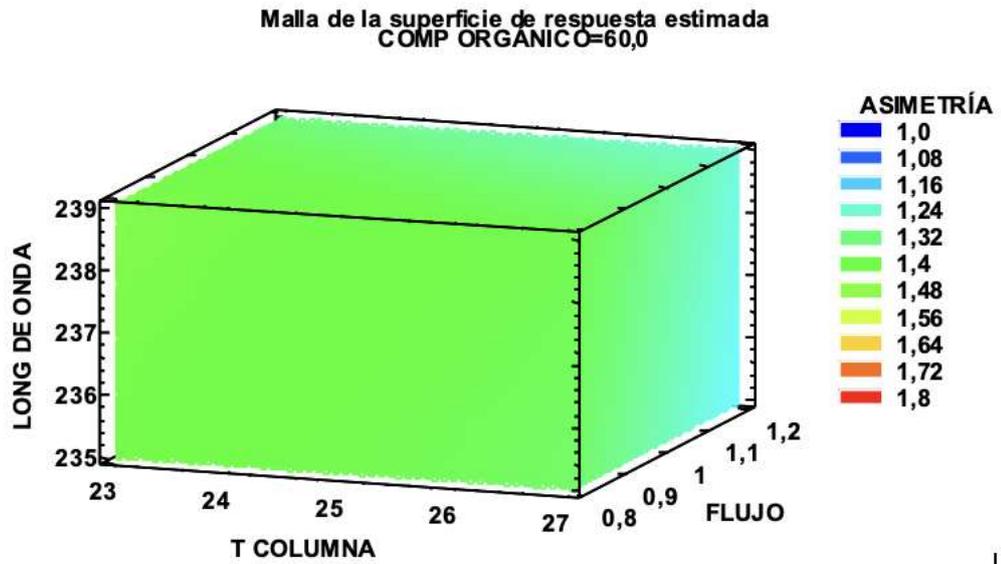


Optimizar Respuesta

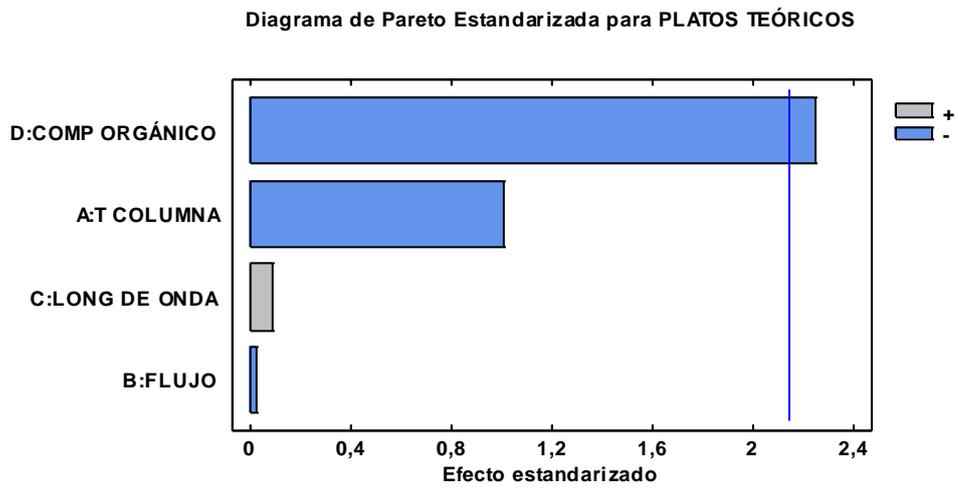
Meta: maximizar ASIMETRÍA

Valor óptimo = 1,50555

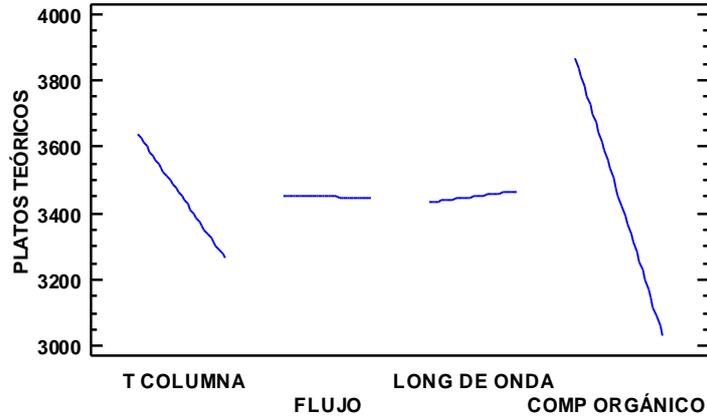
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
T COLUMNA	23,0	27,0	23,0
FLUJO	0,8	1,2	0,8
LONG DE ONDA	235,0	239,0	239,0
COMP ORGÁNICO	55,0	65,0	55,0



- Número de platos teóricos



Gráfica de Efectos Principales para PLATOS TEÓRICOS



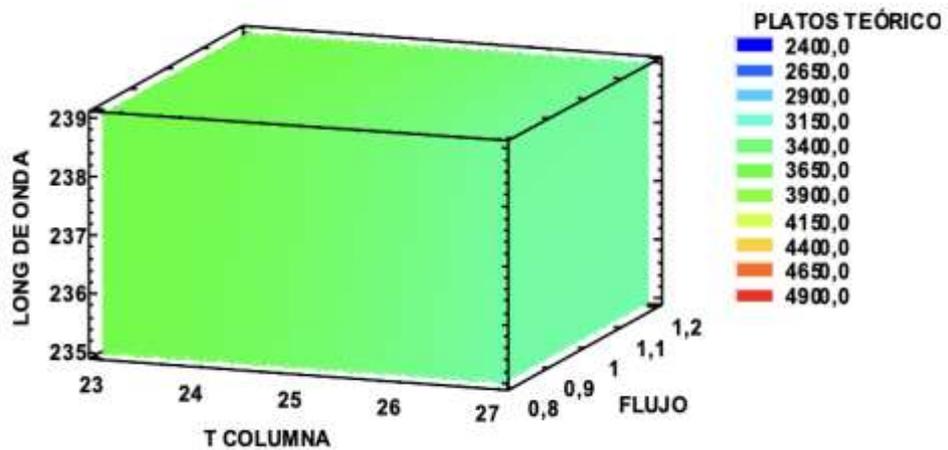
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar PLATOS TEÓRICOS

Valor óptimo = 4073,88

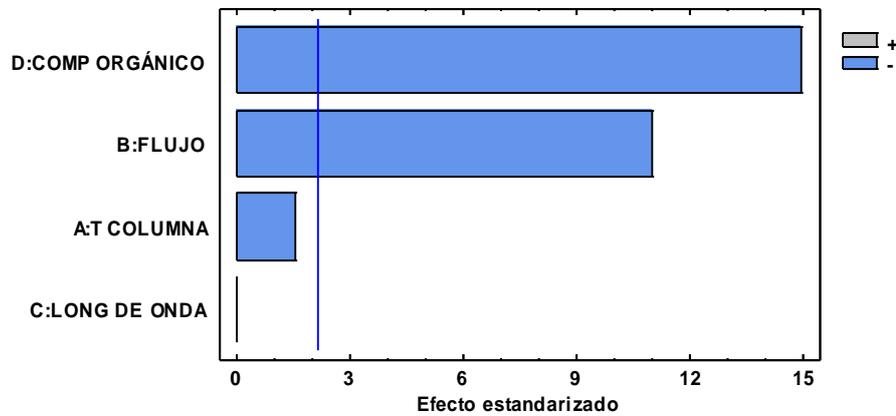
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
T COLUMNA	23,0	27,0	23,0
FLUJO	0,8	1,2	0,8
LONG DE ONDA	235,0	239,0	239,0
COMP ORGÁNICO	55,0	65,0	55,0

Malla de la superficie de respuesta estimada
COMP ORGÁNICO=60,0

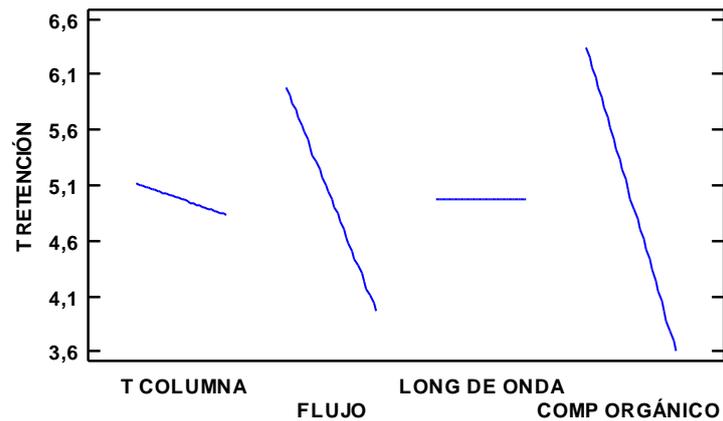


- Tiempo de retención

Diagrama de Pareto Estandarizada para T RETENCIÓN



Gráfica de Efectos Principales para T RETENCIÓN



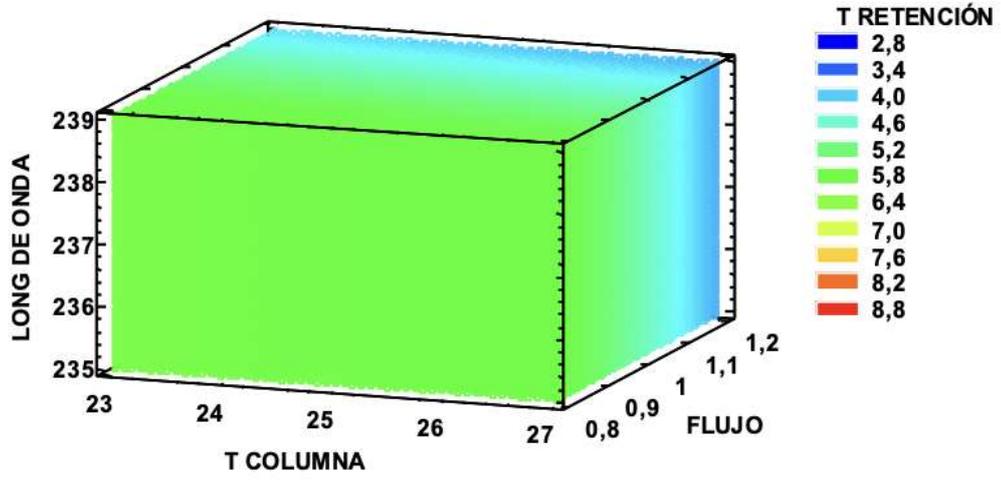
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar T RETENCIÓN

Valor óptimo = 7,49122

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
T COLUMNA	23,0	27,0	23,0
FLUJO	0,8	1,2	0,8
LONG DE ONDA	235,0	239,0	239,0
COMP ORGÁNICO	55,0	65,0	55,0

Malla de la superficie de respuesta estimada
COMP ORGANICO=60,0





esPOCH

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: 18 / 02 / 2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: TATIANA NICOLE OLEAS MORALES YAJAIRA ESTEFANÍA LANDA LANDA
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: CIENCIAS
Carrera: BIOQUÍMICA Y FARMACIA
Título a optar: BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo



1529-DBRA-UPT-2023