

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

***“Estandarización de un método espectrofotométrico para la determinación de Metronidazol 500 mg en óvulos vaginales sólidos”***

INFORME FINAL DE TESIS

Presentado por:  
Claudia Vanessa Peren Barrios  
Estudiante de Química Farmacéutica

Guatemala, Noviembre de 2014

## **JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cobar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

## **DEDICATORIA**

*Al único y Soberano Dios, por su infinito amor, gracia y bondad*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios mi Padre porque en su bondad me permitió llegar hasta aquí

A mis Padres Eliseo y Aurorita por todo su amor, comprensión y fortaleza, mi gratitud es eterna

A mis abuelos por su ejemplo de trabajo constante a lo largo de su vida, siempre confiando en Dios.

A mis hermanas Prisci y Dianita por su cariño incondicional

A la Licda. Julita Garcia por ser mi apoyo, solo puedo expresarle mi admiración y profunda gratitud

A mis amigos que con sincero cariño me dieron palabras de aliento para culminar este trayecto que el día de hoy se hace realidad, gracias por estar aquí.

Al claustro de catedráticos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por impartirme con dedicación su conocimiento y formación profesional.

## INDICE

	Pág.
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	4
4. JUSTIFICACIÓN.....	10
5. OBJETIVOS.....	11
6. HIPÓTESIS.....	12
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
8. RESULTADOS.....	19
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	28
10. CONCLUSIONES.....	32
11. RECOMENDACIONES.....	33
12. ANEXOS.....	34
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

## I. RESUMEN

El Metronidazol es un agente antibacteriano y antiprotozoario sintético, perteneciente al grupo de los 5-nitroimidazoles. Su espectro antibacteriano comprende la mayoría de los anaerobios patógenos y su actividad antiparasitaria se manifiesta sobre *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* entre otros (Bendesky, A., y Menéndez, D., 2001).

Por su actividad farmacológica, este principio activo ha sido incluido en el listado de los principios activos esenciales de la Organización Mundial de la Salud -OMS-, y debido a su amplio espectro de acción e indicaciones se encuentra disponible en diversas formas farmacéuticas (World Health Organization [WHO]. 2011)

Debido a su importancia y comercialización, se conocen oficialmente diversos métodos analíticos que cuantifican el principio activo en estudio, según las formas farmacéuticas más comunes. La bibliografía reconoce entre las técnicas analíticas más empleadas, la Cromatografía Líquida acoplada a un detector Ultravioleta (UV) y la Cromatografía Gaseosa (CG).

El presente trabajo, se enfocó en desarrollar la estandarización de un método que permite la cuantificación de Metronidazol en óvulos vaginales sólidos por medio de la espectrofotometría UV-Vis, con el fin de aportar un método que agilice el análisis de control de la calidad para la forma farmacéutica mencionada.

A través de los resultados obtenidos, se comprobó que el método en estudio tuvo adecuada linealidad y exactitud en todo el intervalo de concentración aplicado, desde 80% hasta 120% de la concentración del analito presente en la muestra (equivalente a 400 mg – 600 mg). Tanto la repetibilidad como la precisión intermedia, ambas a la concentración nominal (de trabajo), cumplieron con los criterios de aceptación al obtenerse Coeficientes de Variación menores al 2% establecido. La selectividad hacia el analito se demostró de forma cualitativa a través del análisis y comparación espectral de la matriz (mezcla sin principio activo), la solución estándar y muestras de producto terminado.

Todo lo anterior sustenta la estandarización del método en estudio, confirmando que su aplicación es apropiada en el control de la calidad y estudios de estabilidad que cuantifican el principio activo Metronidazol en óvulos vaginales sólidos.

## 2. INTRODUCCION

La industria farmacéutica es responsable de producir medicamentos de calidad, brindando total garantía que estos son seguros y eficaces para el consumo humano. Con el fin de lograr este objetivo, se han establecido diversos parámetros de calidad en todos los procesos de la industria, desde la investigación y desarrollo de un producto, hasta el análisis químico del producto terminado. (Organismo Argentino de Acreditación [OAA]. 2008).

Evaluar la calidad de un producto, implica someterlo a diversos ensayos analíticos que permitirán dictaminar si el mismo cumple con los requerimientos ya establecidos en las referencias oficiales es decir, farmacopeas y otros entes de regulación sanitaria. De allí la importancia de contar con métodos analíticos que garanticen la obtención de resultados reproducibles y confiables tras su aplicación (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria [AEFI]. 2001).

Sin embargo, las metodologías descritas en las obras oficiales, pueden ser complejas y requieren de mucho tiempo en su desarrollo y aplicación.

Por esta razón, se hace necesario estandarizar metodologías de análisis que sean de fácil aplicación y permitan obtener resultados estadística y analíticamente válidos. Para ello se hace necesario demostrar que el método, cumple con los parámetros o indicadores básicos de validez analítica, como lo son linealidad, exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad (AEFI, 2001).

Estos parámetros permiten confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes en relación a su aplicación. Por ende, los parámetros a considerar en la estandarización varían de acuerdo a la naturaleza de cada ensayo.

En términos generales, las categorías y parámetros a evaluar en una estandarización establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos de América -nombre y siglas en inglés United States Pharmacopeia USP-, en su capítulo general <1225> *Validación de métodos farmacopeicos*, han sido ampliamente aplicados y aceptados, incluyendo los entes regulatorios en la región centroamericana.

En el marco de regulación sanitaria, la estandarización y validación de técnicas analíticas aplicadas a los medicamentos, es una tarea de carácter regulado, por lo que actualmente los laboratorios farmacéuticos en Guatemala deben cumplir presentando metodologías que aseguren la validez de los datos generados tras el análisis de sus productos, lo cual garantiza la calidad de sus ensayos, procesos y productos al alcance del consumidor final.

En el presente trabajo se desarrolló la estandarización de una metodología de análisis para cuantificar Metronidazol 500 mg en óvulos vaginales sólidos por espectrofotometría UV-Vis y se evaluaron los parámetros de desempeño del método en cuanto a selectividad, exactitud, precisión, linealidad y rango.

Los aportes de este trabajo consisten en conocimientos técnico-científicos que podrán ser aplicados en las actividades de control de calidad e investigación de los laboratorios farmacéuticos del país.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Generalidades

El Metronidazol es un agente antiparasitario y antibacteriano de origen sintético que pertenece a la familia de los nitroimidazoles. (Bendesky, A., y Menéndez, D., 2001).

Se ha documentado que desde 1955 se aisló a partir de *Streptomyces ssp.*, la azomicina (2-nitroimidazol), molécula a la que se le atribuyó actividad microbicida contra *Trichomonas vaginalis*, dando origen a la síntesis de fármacos derivados de nitroimidazoles. (Raviña, E., 2008)

A finales de la década de los años 1950, Cosar y Joulou, con el propósito de combatir infecciones por *Trichomonas vaginalis*, sintetizaron el Metronidazol cuyo nombre químico es: o(1-(β-hidroxietil (-2-metil-5- nitroimidazol) (Ver figura No. 1) (Buckle, G., y Pennant, G., 1981)

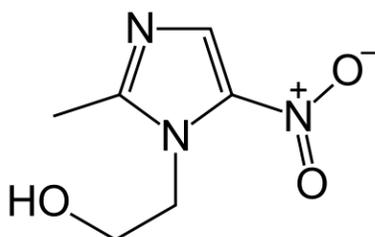


Figura No. 1: Estructura química del Metronidazol

Posterior a su síntesis y desde 1963, la utilización del Metronidazol en la práctica clínica cuenta el respaldo de la asociación de alimentos y drogas de Estados Unidos -por su nombre y siglas en inglés Food and Drug Administration (FDA)-, aprobando diversas formas farmacéuticas para este principio activo administradas por vía oral, parenteral, vaginal y tópica. (Raviña, E., 2008)

Con el pasar de los años se le ha llegado a considerar de los principios activos más efectivos para combatir las infecciones provocadas por protozoarios como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* e infecciones por bacterias anaerobias gram-negativas y positivas destacando la infección por *Helicobacter pylori*. Su uso se ha diversificado al tratamiento de afecciones dérmicas como la rosácea y acné vulgar entre otras.

Recientemente, se ha dado a conocer que este principio activo es efectivo como radiosensibilizador para células hipóxicas, lo cual ha permitido que se utilice para incrementar la efectividad biológica de la radiación ionizante durante la radioterapia de pacientes con cierta clase de tumores, así como en combinación con agentes alquilantes para mejorar la eficacia de la terapia antitumoral. (Bendesky, A., y Menéndez, D., 2001)

Su mecanismo de acción dentro de los organismos patógenos se explica mediante la acción de proteínas transportadoras de electrones como la piruvato-ferrodoxina-oxidoreductasa o flavodoxina localizadas en el interior del parásito o bacteria, las cuales al entrar en contacto con el Metronidazol llevan a cabo la reducción de su grupo nitro y de esta reacción resulta la formación de N-(2-hidroxiethyl) del ácido oxámico y de acetamida, lo cual se traduce en daño celular (citotoxicidad) por la formación de aductos con las proteínas y los ácidos nucleicos de los organismos susceptibles. (Buckle, G., y Pennant, G., 1981)

### **3.2 Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del Metronidazol**

Este principio activo es administrado por vía oral, intravenosa, tópica, vaginal y rectal. Las dosis orales son rápidamente absorbidas y distribuidas a casi totalidad del organismo. Los niveles en suero pueden llegar a detectarse después de 1 hora de la ingestión alcanzando una biodisponibilidad de  $\pm 90\%$  por vía oral. También es buena la absorción por vía rectal. La absorción por vía vaginal es menor y representa el 50% de lo absorbido en la vía oral.

Su distribución se considera cerca del 80% del peso corporal y se liga a las proteínas plasmáticas en aproximadamente el 20%. La penetración es total en casi todos los tejidos y líquidos corporales, incluido el líquido cefalorraquídeo, saliva, leche materna, huesos e incluso en abscesos (cerebrales, hepáticos, etc.). Se conoce que atraviesa la placenta y alcanza en el suero fetal en concentraciones similares a las del suero materno. (Sweetman, S., 2009)

Su metabolismo es en el hígado, por oxidación o hidroxilación de las cadenas largas alifáticas y por conjugación, con ello se forman varios metabolitos, siendo el más importante el 2-hidroximetil Metronidazol, el cual también tiene actividad antibacteriana. Su eliminación se realiza fundamentalmente por vía renal y en menor proporción por vía fecal. (Sweetman, S., 2009)

Su uso terapéutico se ha descrito ampliamente en la bibliografía, siendo los más comunes los siguientes casos: (Bendesky, A., y Menéndez, D., 2001)

*Amibiasis*: provocada por *E. histolytica*, es una causa común de diarrea crónica y aguda, particularmente en países en desarrollo. El espectro clínico de la enfermedad puede ir de portador asintomático a enfermedad invasiva con formación de abscesos hepáticos secundarios a su actividad lítica de tejidos. El Metronidazol es el tratamiento de elección en el 50% de estos casos.

*Helicobacter pylori*: es un bacilo gram-negativo pequeño, relacionado en las patologías úlceropépticas. El Metronidazol en este caso se ha combinado con antibióticos y antagonistas del receptor de histamina H2 e inhibidores de la bomba de protones debido a problemas de resistencia de este microorganismo.

*Trichomoniasis*: provocado por el parásito protozoario *T. vaginalis* causante principal de infecciones del tracto urinario, causando vaginitis en las mujeres y uretritis y/o prostatitis en los hombres. Una única dosis oral de 2 g de Metronidazol en un régimen de 7 días, es lo más común pues se ha observado éxito en un 80 a 100% de los casos. (Mason P., 1980)

*Vaginosis bacteriana*: es una infección polimicrobiana pues los microorganismos involucrados son *Gardenerella vaginalis*, y otros microorganismos anaerobios como *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Mobilincus spp.*, *Bacteroides spp.* y *micoplasmas*. El tratamiento de elección para esta infección es Metronidazol a una dosis de 500 mg oralmente dos veces al día por 7 días, 2 g orales en dosis única, o como óvulos administrados intravaginalmente una vez al día por 5 días, con éxito en el tratamiento de 80 al 100% de los casos tratados. (Mason P., 1980)

El uso de un tratamiento intravaginal presenta las siguientes ventajas clínicas:

- El óvulo permite rápida disolución en el medio vaginal, pues se desintegra en pocos minutos, liberando el principio activo que se impregna fácilmente en la mucosa vaginal durante el tiempo necesario desde el fondo hacia afuera, logrando una disminución más rápida de los síntomas.
- Por su dimensión y forma se adapta anatómicamente a la cavidad vaginal.

*Giardiasis*: provocada por *G. lamblia* es un protozooario intestinal que causa una infección intestinal sintomática con un síndrome de diarrea crónica, mala absorción y pérdida de peso. Dosis altas de Metronidazol, 3 veces al día por 7 días son efectivas para adultos.

Otros usos: también es utilizado en el tratamiento de infecciones bacterianas anaeróbicas intra-abdominales, en abscesos cerebrales anaeróbicos o infecciones anaeróbicas del SNC; como profiláctico en cirugía de colon, cabeza y cuello; en infecciones dermatológicas como acné rosácea, acné vulgaris y otras afecciones como colitis por *Clostridium difficile*. (Sweetman, S., 2009), (Bendesky, A., y Menéndez, D., 2001)

### **3.3 Epidemiología de las Infecciones vaginales por Trichomoniasis**

La disponibilidad de datos epidemiológicos de las infecciones vaginales actualmente en Guatemala es poco precisa, esto puede deberse a que estas afecciones suelen ser asintomáticas y poco percibidas por las pacientes que las padecen. La información disponible a través de los programas de salud puede ser inconsistente o poco actualizada. Sin embargo, en el año 2003 se realizó en poblaciones específicas un “Estudio Multicéntrico sobre Comportamientos y Prevalencias de VIH/ITS en Guatemala, Puerto Barrios, Izabal y Puerto San José, Escuintla”, que incluyó la incidencia de infecciones causadas por *T. vaginalis* del cual se puede extraer que en el 10-15% de las pacientes estudiadas predominó la Trichomoniasis. (Guatemala. Programa Nacional de Prevención y Control de ITS/VIH/SIDA, 2007)

### **3.4 Análisis químico del Metronidazol**

Dado que la población femenina es afectada comúnmente por infecciones de tipo vaginal, se considera que debe existir de forma accesible un tratamiento efectivo para este padecimiento. Además es importante que existan diversos productos que le permitan al médico tratante seleccionar de manera adecuada el mejor tratamiento para cada paciente.

Debido a que el Metronidazol constituye el tratamiento de elección para infecciones causadas por *T. vaginalis*, los productos que están al alcance de los pacientes deben optimizar la efectividad terapéutica a través de la aplicación de un control de calidad de producto terminado que permita asegurar que el producto, si es adecuadamente aplicado, será efectivo en el tratamiento de las infecciones previamente citadas.

En América Latina, se considera como bibliografía fundamental la Farmacopea de los Estados Unidos de América, por su nombre y siglas en inglés: United States Pharmacopeia -USP-, para definir el análisis químico y microbiológico de los medicamentos.

En Guatemala, los métodos presentados por dicha farmacopea son considerados oficiales y se aplican a numerosos principios activos.

El método existente y desarrollado por la USP para Metronidazol es para la forma farmacéutica de tabletas orales. El mismo consiste en la aplicación de cromatografía líquida de alta performance- HPLC- para la identificación y cuantificación del principio activo por medio de un cromatografo líquido equipado con una columna de Octilsilano enlazado químicamente con partículas de sílice (L7), a través de la cual eluye a 1mL/minuto, en una fase móvil de Agua: Metanol (80:20) el estándar y muestra de Metronidazol tabletas, que son detectados a una longitud de onda de 254 nm.

La cuantificación se realiza por medio de la relación de las áreas de los picos obtenidos para el estándar y muestra inyectados al equipo de forma automática. (United States Pharmacopeia [USP], 2010)

Este es un método preciso y efectivo, sin embargo debido a lo complejo de la cromatografía líquida, su desarrollo puede tomar un tiempo prudencial hasta obtener los resultados requeridos en los laboratorios de control de calidad.

Por este motivo con anterioridad se han desarrollado metodologías que cuantifican el principio activo Metronidazol, en diversas formas farmacéuticas. En cada estudio se establecieron condiciones analíticas distintas y en algunos de los casos se trabajaron estandarizaciones midiendo los parámetros basados en las fuentes oficiales:

En 1991 Klee, K.G., estableció un estudio comparativo de dos métodos de análisis de Metronidazol en tabletas.

En el año 1997 Sandoval, M., realizó la “Evaluación de la calidad fisicoquímica de comprimidos de Metronidazol que se comercializan en Guatemala”, en donde se cuantifica el principio activo según lo establece la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, por medio de extracción con acetona en caliente y posterior cuantificación por titulación con ácido perclórico.

Valenzuela, A.C., en 1999, desarrolló la “Validación del método espectrofotométrico para la cuantificación de Metronidazol, Mebendazol, Albendazol y Tinidazol (tableta y suspensión)”, en el que por medio de espectrofotometría Uv-Vis evaluó la especificidad, linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud del método aplicado en tabletas y suspensión, estableciéndolo como alternativa aplicable en el control de calidad de las formas farmacéuticas mencionadas.

En relación a métodos de análisis por medio de cromatografía líquida de alta resolución -HPLC-, son relevantes los siguientes métodos:

La alternativa presentada en 2007 por Tavakoli, N., Varshosaz, J., Dorkoosh, F. y Zargarzadeh, M. R., por medio de la cuantificación simultánea de Metronidazol y Amoxicilina en una tableta de liberación sostenida. En este estudio la cuantificación y validación se llevo a cabo con una columna Octadecilsilano unido químicamente a sílice porosa de 3 $\mu$ m a 10 $\mu$ m de diámetro a con flujo isocrático y fase móvil de buffer pH 4.0 a una longitud de onda de 254nm. Las muestras y el inyector del equipo se estabilizaron como mínimo por 12 horas a 37°C.

Otro estudio relacionado a la forma farmacéutica es del Samol, A.T., en 2007, quien presento la “Estandarización del método utilizado en el Laboratorio Nacional de Salud para la identificación y cuantificación de Clotrimazol en óvulos sólidos por cromatografía líquida de alta resolución”.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente la estandarización de métodos como parte del Control de Calidad de la industria es una herramienta de competencia y responde al cumplimiento de normativas nacionales impuestas por las autoridades regulatorias y de salud.

La aprobación de cada lote producido en la industria farmacéutica, depende de los resultados obtenidos por análisis químico de los productos. Es allí donde, radica la importancia de contar con métodos analíticos que proporcionen resultados confiables.

Asimismo, se hace necesario estandarizar los métodos analíticos aplicados en el análisis rutinario, lo cual implica documentar la validez de sus resultados y demostrar el cumplimiento de las especificaciones establecidas para los productos según las normativas de salud.

La herramienta principal para soportar el proceso de estandarización es el análisis estadístico, pues permite establecer juicios científicos sobre el correcto desarrollo y aplicación del método estandarizado.

La estandarización del método espectrofotométrico desarrollada en este trabajo, está basada en la necesidad de establecer que el mismo aporta resultados confiables y su aplicación constante es favorable por razones científicas, operativas y económicas para la industria que lo aplique.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general:**

Estandarizar el método por espectrofotometría Uv-Vis para la cuantificación de Metronidazol en óvulos vaginales sólidos.

### **5.2 Objetivos específicos:**

**5.2.1** Determinar el desempeño del método por medio de la linealidad, exactitud, precisión, y rango para la cuantificación de Metronidazol en óvulos vaginales sólidos.

**5.2.2** Aportar un método alternativo y aplicable que permita cuantificar de forma confiable Metronidazol en óvulos vaginales sólidos.

## **6. HIPOTESIS**

El método por espectrofotometría Uv-Vis utilizado para la cuantificación de Metronidazol en óvulos vaginales sólidos es un método confiable, específico, lineal, exacto, preciso, reproducible y puede ser aplicado en la industria farmacéutica que elabore la forma farmacéutica estudiada.

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 Universo de trabajo:**

Óvulos vaginales sólidos de Metronidazol 500 mg producidos en Guatemala, Centro América.

#### **7.1.1 Muestra:**

Muestras de óvulos vaginales sólidos de Metronidazol 500 mg producidos por un laboratorio farmacéutico guatemalteco.

### **7.2 Materiales**

#### **7.2.1 Recursos humanos**

- Autora: Br. Claudia Vanessa Peren Barrios
- Analista I de laboratorio fisicoquímico de Control de Calidad Industria C
- Asesora: Licda. Julia Amparo García Bolaños
- Revisora. Licda. Aylin E. Santizo Juárez

#### **7.2.2 Recursos materiales:**

- Materiales de oficina
- Equipos de computación
- Fuentes bibliográficas

#### **7.2.3 Cristalería y Equipo de laboratorio:**

- Balones aforados de 50 mL y 100 mL
- Pipetas volumétricas de 1mL- 10 mL
- Espátula de metal
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Cubetas espectrofotométricas de cuarzo x 1 cm
- Campana de extracción
- Baño de ultrasonido

#### **7.2.4 Reactivos de laboratorio**

- Metanol grado reactivo -GR-
- Estándar de Metronidazol al 99%
- Agua desmineralizada

### **7.3 Metodología**

#### **7.3.1 Preparación de las soluciones de trabajo:**

7.3.1.1 Preparación de estándar de referencia (solución estándar de Metronidazol 0.1mg/mL): pesar sobre papel parafinado 25 mg de Metronidazol, transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 50 ml, disolver con metanol GR y colocar en baño ultrasonido por 5 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con metanol GR.

7.3.1.2 Preparación de estándar de referencia (solución estándar de Metronidazol 0.01mg/mL): pesar sobre papel parafinado 25 mg de Metronidazol, transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 50 ml, disolver con metanol GR y colocar en baño ultrasonido por 5 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con metanol GR. Tomar una alícuota exactamente de 1mL de la solución anterior y transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 50 mL, disolver y llevar a volumen con metanol GR, agitar.

7.3.1.3 Preparación de la muestra (0.01mg/ mL): triturar en mortero 10 óvulos y pesar el equivalente a 100 mg de Metronidazol y transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, disolver con metanol GR y colocar en baño ultrasonido por 5 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con metanol GR. Tomar una alícuota exactamente de 1mL de la solución anterior y transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con metanol GR, agitar.

7.3.1.4 Solución blanco: Metanol GR

**7.3.2 Curva de calibración:** tomando como referencia el estándar de Metronidazol a concentración 0.1mg/mL preparar soluciones volumétricas a las siguientes concentraciones:

Tabla No.1 Niveles para Curva de calibración:

<b>Nivel</b>	<b>%</b>	<b>Concentración mg/mL</b>
1	80	0.008 mg/mL
2	90	0.009 mg/mL
3	100	0.01 mg/mL
4	110	0.011 mg/mL
5	120	0.012 mg/mL

Fuente: Experimental

**7.3.3 Condiciones de trabajo en el equipo:**

- Equipo: Espectrofotómetro UV/Vis
- Celda: Cuarzo de 1cm
- Intervalo espectral: 200 - 400 nanómetros
- Absorbancia máxima: 310 nanómetros
- Diluyente: Metanol GR

**7.4 Diseño estadístico:**

**7.4.1 Linealidad:**

En la Farmacopea de los Estados Unidos se define *Linealidad* como: “La capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido.” Dicho parámetro se mide mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. Para el análisis de un principio activo siempre se tiene un valor nominal fijo y único, siendo lo ideal evaluar la linealidad del método en un rango de  $\pm 20$  -30 % del valor nominal tomando como mínimo cinco diferentes concentraciones del analito. La selección del rango y del número de puntos experimentales está relacionada a la aplicación del método.

En este caso se evaluaron 5 estándares, realizando tres replicas por cada uno de ellos. Para el análisis de datos, se realizó una curva de regresión determinada sobre puntos individuales evaluados por regresión lineal a través de coeficiente de determinación  $r^2$  y análisis de varianza.

Para esta determinación se utilizó una solución madre de 0.1mg/mL a partir de la cual se preparó por dilución 5 estándares de concentraciones 80%, 90%, 100%, 110% y 120% (ver tabla No. 1), analizados por triplicado. Y a partir de dichos resultados, se proyectó la relación lineal entre la concentración del analito y la señal del equipo, mediante una gráfica que en el eje de las “x” refleja la concentración del analito y en el eje “y” la respuesta analítica que en este caso fue absorbancia, por ser un método espectrofotométrico.

En este análisis de regresión lineal se determinó la ecuación de la recta a través del siguiente modelo:

$$Y=bX+a.$$

Siendo (b) la *pendiente*, a través de la cual se obtiene la sensibilidad del método. El límite de confianza para el estimador de la pendiente (b) se calcula en función de su varianza  $S_b$ . Se considera que a mayor pendiente, mayor sensibilidad y que mientras más pequeño sea el coeficiente de variación de la pendiente mayor será la linealidad (coeficientes de variación de la pendiente mayores que el 5,0 % indican falta de linealidad).

Siendo (a) la *ordenada al origen o intercepto*, que determina la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que ante cualquier desviación se pueda adjudicar únicamente a un error aleatorio.

Como parte del análisis de la regresión se obtuvo:

$r$  = *Coefficiente de correlación*, que expresa la medida del grado de asociación entre las mediciones y la concentración del analito, considerando que los valores mayores de 0.98 indican linealidad.

$r^2$  = *Coefficiente de determinación*, que mide la exactitud con la que se ajusta la curva de regresión a los valores experimentales y a un nivel de significancia alfa ( $\alpha$ ) de 0.05, análisis de varianza. Se consideran como señal de linealidad los valores mayores o iguales a 0.998.

Así mismo, el análisis de regresión lineal de incluir un *diagrama de residuales* el cual se construyó mediante la sustracción del valor real de cada concentración menos el calculado por la ecuación de regresión para cada valor de X (valores

conocidos como *residuos*). Se espera de este diagrama una distribución aleatoria de los residuos, puesto que las tendencias sistemáticas son indicativas de no linealidad. (Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos, centro cubano de química farmacéutica, 1997)

#### 7.4.2 Exactitud

La exactitud se evaluó utilizando 9 determinaciones, sobre 3 niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado siendo 80%, 100%, 120% en relación a la concentración normal de trabajo del método y con tres repeticiones de cada concentración. Además se utilizó para la preparación de las muestras, un estándar del principio activo de una concentración certificada.

Para la determinación de este parámetro, se analizaron cantidades conocidas del analito y luego se calculó el porcentaje de recuperación de cada muestra en relación a su valor conocido. La recuperación obtenida permitió ver el rendimiento del método en estudio en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original.

Para ello se utilizó la fórmula:

$$R = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} \cdot 100$$

Donde:  $\bar{X}$  = concentración encontrada y  $\hat{X}$  = concentración original.

El porcentaje de recuperación esperado debe encontrarse entre el 98%-102%. Lo cual es equivalente a  $\pm 2$  % de error relativo. (Guía de validación de métodos analítico, Ministerio de Salud Costa Rica, 1998). También se evaluó por medio de t de Student con un nivel de significación ( $\alpha$ ) = 0,05%, reportando intervalos de confianza sobre el valor promedio del porcentaje de recuperación.

#### 7.4.3 Repetibilidad:

Se trabajó con submuestras de una muestra homogénea, bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. Realizando 10 determinaciones al 100% de la concentración normal de trabajo, para luego calcular desviación estándar y coeficiente de variación (CV%), cuyo valor debe ser menor al 2%.

#### **7.4.4 Precisión:**

Se determinó realizando diez determinaciones al 100% de la concentración de trabajo, con muestras del mismo lote, según el procedimiento descrito para la preparación de la muestra, analizadas por dos distintos analistas en diferentes días. Cada una de las muestras se preparó de forma individual. Luego de leer cada una de ellas se calculó la desviación estándar y coeficiente de variación. El criterio de aceptación debe ser un Coeficiente de Variación  $< 2.0\%$ . También se realizó un análisis de Varianza de dos vías para establecer si hay diferencias significativas entre analistas.

#### **7.4.5 Rango**

Se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior de principio activo para el cual se ha demostrado la correcta especificidad, precisión, exactitud y linealidad del método descrito. Se reportó en base a los resultados obtenidos para los parámetros estudiados.

#### **7.4.6 Selectividad:**

Este parámetro se realiza para determinar la capacidad que tiene un método analítico de distinguir o separar la respuesta del analito del resto de los componentes de la muestra.

En este caso se comparó de forma cualitativa:

- Comportamiento de la matriz con respecto a la solución estándar
- Comportamiento de muestra con respecto al comportamiento del estándar

Ambos ensayos se realizaron por triplicado y como criterio de aceptación se estableció que no debe existir absorbancia significativa de la matriz en la longitud de onda de trabajo.

También se evaluó el comportamiento de la matriz fortificada con una solución estándar con respecto al comportamiento de la matriz fortificada con la muestra, reflejando en ambos casos la presencia del principio activo por medio de absorbancia en la longitud de onda de trabajo. (Costa Rica. Ministerio de Salud. 2007)

## 8. RESULTADOS

Para la cuantificación de Metronidazol en óvulos vaginales por medio de espectrofotometría UV-VIS, se realizó una curva de calibración preparando estándares del principio activo -Metronidazol-, a diferentes concentraciones, (0.008, 0.009, 0.01, 0.011, 0.012 mg/mL) cada uno de ellos preparados por triplicado.

Se realizó un análisis de regresión lineal que permitió evaluar el parámetro de linealidad y obtener un coeficiente de correlación y determinación y los valores obtenidos fueron 0.999 y 0.999 respectivamente. (Tabla No.2). Así mismo se realizó una grafica de residuales de la regresión, la cual indica que los residuos se distribuyen de forma aleatoria, y no se muestra sesgo para el modelo de regresión. (Gráfica No.2)

Tabla No. 1 Linealidad de Curva de calibración –Estándares de Metronidazol-

<b>Concentración Teórica (mg/mL)</b>	<b>Lectura de Absorbancia</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Coefficiente de variación %</b>
0.008	0.426	0.000014	0.00339
0.009	0.478	0.000017	0.00354
0.01	0.535	0.000012	0.00215
0.011	0.585	0.000009	0.00155
0.012	0.643	0.000008	0.00129

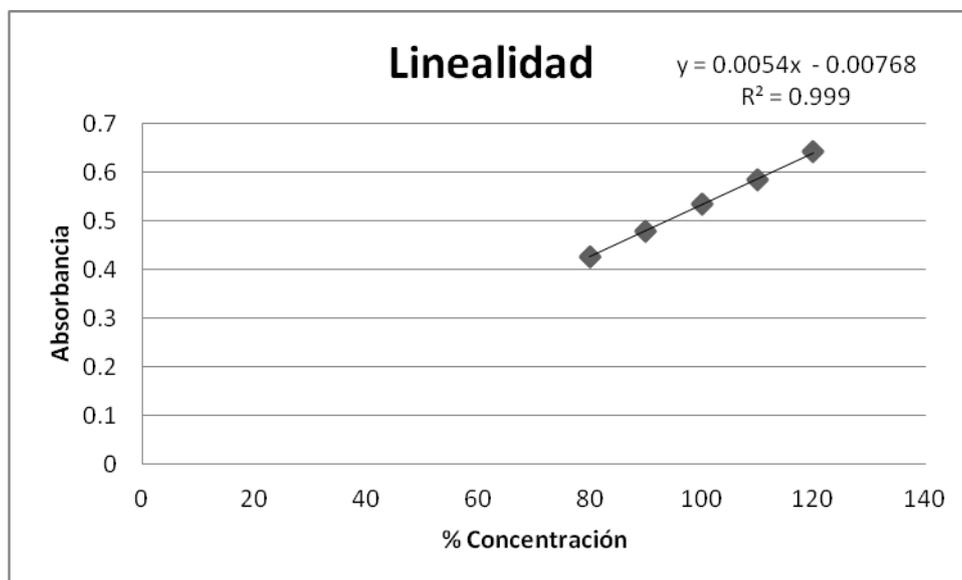
Fuente: Experimental, operación de datos en Excel

Tabla No.2 Estadística de la regresión lineal–Estándares de Metronidazol-

<b>Coefficiente de correlación</b>	0.999
<b>Coefficiente de determinación</b>	0.999
<b>Modelo de regresión</b>	$Y = 0.0054 X - 0.000768$
<b>Valor p Análisis de varianza para la regresión</b>	2.777E-20

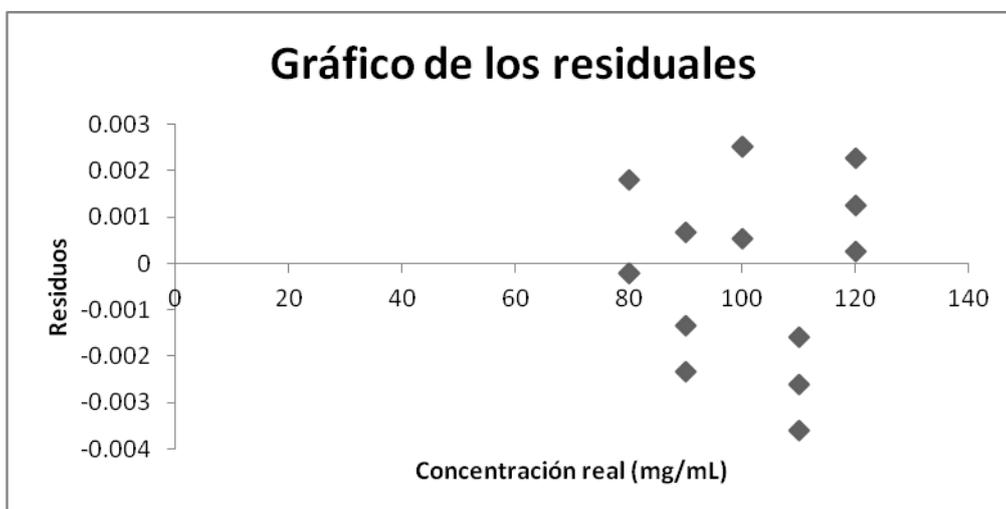
Fuente: Experimental, operación de datos en Excel

Gráfica No.1: Linealidad curva de calibración –Estándares de Metronidazol-



Fuente: Experimental

Gráfica No.2: Análisis de residuos –Estándares de Metronidazol-



Fuente: Experimental

La linealidad de las soluciones muestras se evaluó por medio de un análisis de regresión lineal, cuyo coeficiente de correlación fue 0.998 y coeficiente de determinación fue 0.996. (Gráfica No.3). En el análisis de residuos se observó una distribución aleatoria en relación a la coordenada "X" (Gráfica No. 4)

Tabla No. 3 Linealidad de Curva de calibración – Soluciones muestras -

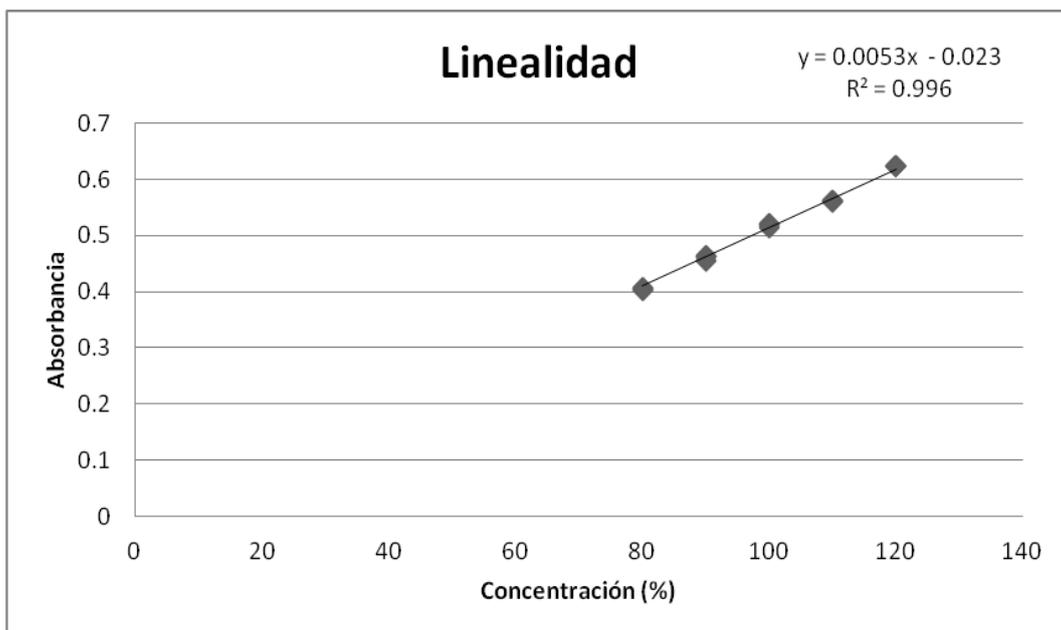
Concentración Teórica (mg/mL)	Lectura de Absorbancia	Desviación estándar	Coefficiente de variación %
0.008	0.405	0.000026	0.006420
0.009	0.461	0.000048	0.010506
0.01	0.519	0.000032	0.006198
0.011	0.561	0.000019	0.003371
0.012	0.624	0.000005	0.000771

Fuente: Experimental, operación de datos en Excel

Tabla No.4 Estadística de la regresión lineal

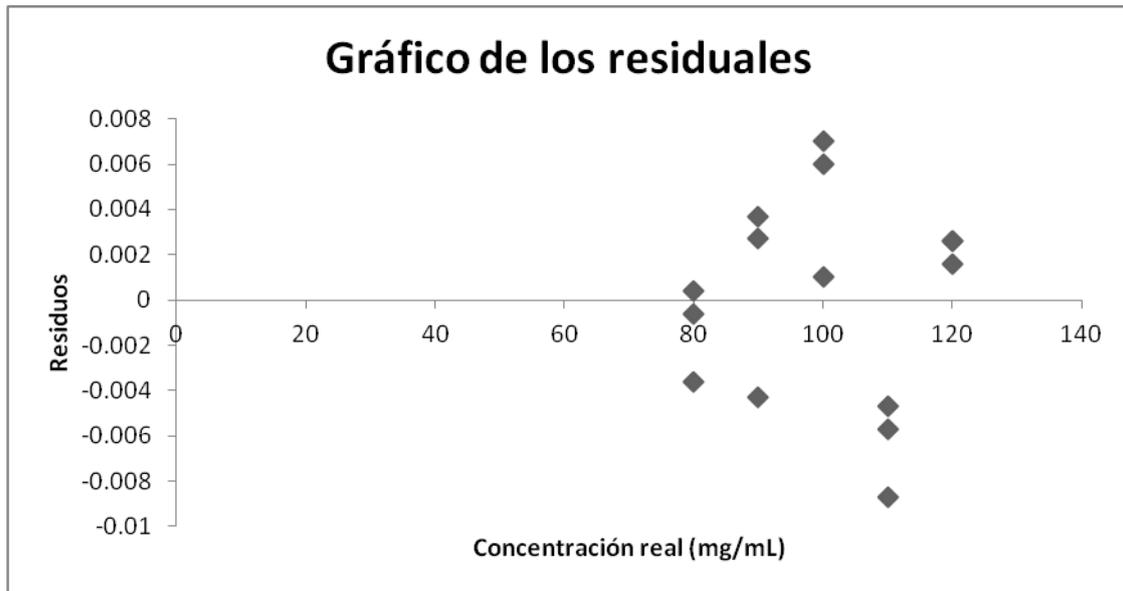
<b>Coefficiente de correlación</b>	0.998
<b>Coefficiente de determinación</b>	0.996
<b>Modelo de regresión</b>	$y = 0.00537 X - 0.023$
<b>Valor p</b>	1.572E-17
<b>Análisis de varianza para la regresión</b>	

Grafica No.3: Linealidad de soluciones muestras –Estándares de Metronidazol-



Fuente: Experimental

Grafica No.4: Análisis de residuos –Soluciones muestras-



Fuente: Experimental

Para evaluar el parámetro de exactitud se calculó el porcentaje de recuperación de las muestras con un rango desde 80% hasta 120%. El promedio de recuperación fue de 94.54%, 99.94%, 100.68% en cada nivel estudiado respectivamente. (Tabla No. 5)

Se aplicó la prueba de t Student para evaluar si los valores del porcentaje de recuperación tienen diferencia estadísticamente significativa. Los valores de  $t_{\text{calculado}}$  fueron menores a  $t_{\text{tabulado}}$  considerando un error  $\alpha$  0.05 con un 95% de confianza. (Tabla No.6)

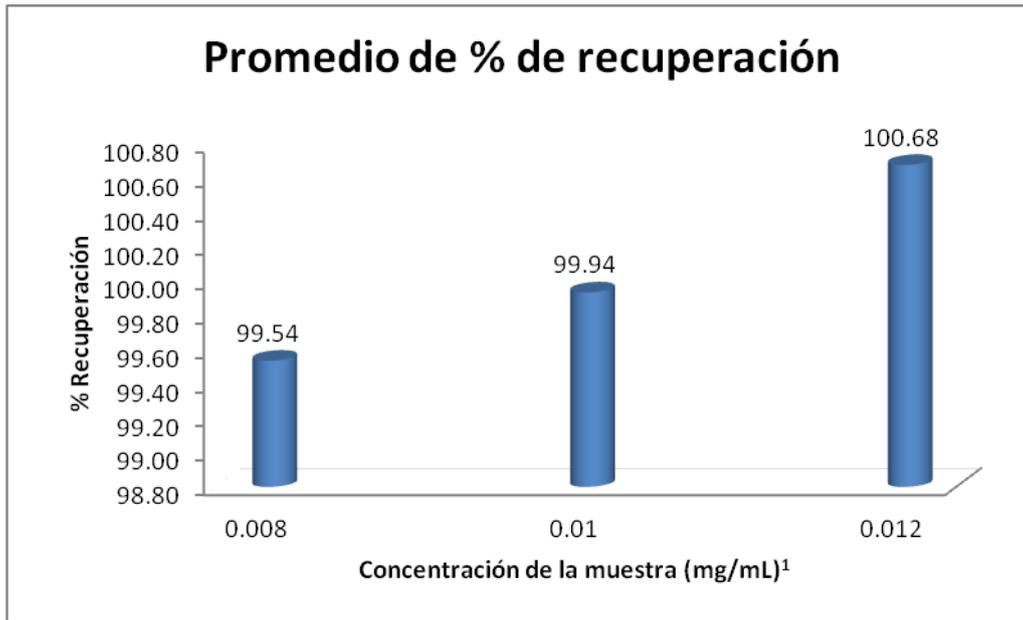
Tabla No.5 Exactitud-Soluciones muestras-

% Concentración	Concentración mg/mL	Conc. Hallada Metronidazol (mg/mL)	Absorbancia Metronidazol	% Recuperación
80	0.008	0.007963	0.416	99.54%
				S.D.: 0.1383
				C.V.: 0.1
100	0.01	0.009994	0.522	99.94%
				S.D.: 0.2926
				C.V.: 0.3
120	0.012	0.012082	0.631	100.68
				S.D.: 0.4018
				C.V.: 0.4

Fuente: Experimental, operación de datos en Excel

S.D.: desviación estándar /C.V.: Coeficiente de variación

Grafica No.5: Promedio de porcentajes de recuperación –Soluciones muestras-



1: Tres réplicas evaluadas por cada nivel de concentración

Tabla No.6 Prueba t Student para porcentaje de recuperación -Soluciones muestras-

% Concentración	% Recuperación	Desviación estándar (S.D.)	n	t calculado	n-2	Alfa (α)	t tabulado
80	99.54	0.1383	3	1.93333333	1	0.05	12.7062047
100	99.94	0.2926	3	0.12598816	1		
120	100.68	0.4018	3	-0.97884046	1		

Fuente: Experimental, operación de datos en Excel

La precisión del método se evaluó por medio de la repetibilidad y la precisión intermedia. En el primer caso se calculó a partir de la lectura y concentración de 10 replicas el coeficiente de variación de este grupo de muestras, obteniendo un valor de C.V.: 0.3902 (Tabla No.7)

*Tabla No.7 Repetibilidad -Soluciones muestras-*

<b>Repetición</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración teórica (mg/mL)</b>	<b>Concentración obtenida</b>
1	0.529	0.01	0.00989
2	0.527	0.01	0.00985
3	0.529	0.01	0.00989
4	0.532	0.01	0.00994
5	0.532	0.01	0.00994
6	0.527	0.01	0.00985
7	0.529	0.01	0.00989
8	0.530	0.01	0.00991
9	0.532	0.01	0.00994
10	0.527	0.01	0.00985
<b>Promedio:</b>	0.52940	<b>Promedio:</b>	0.00990
<b>S.D.:</b>	0.00206559	<b>S.D.:</b>	3.66279E-05
<b>C.V.:</b>	0.3902	<b>C.V.:</b>	0.3702

Fuente: Experimental, operación de datos en Excel

Para el parámetro de precisión intermedia se aplicó un análisis de la varianza ANOVA de dos factores con varias muestras por grupo, basado en los resultados de las mediciones de muestras a la concentración nominal de dos analistas en días diferentes. (Ver tabla No.8)

Tabla No.8 Precisión intermedia -Soluciones muestras-

Analista A/ Día 1				Analista A/ Día 2			
Repetición	Absorbancia	Concentración teórica (mg/mL)	Concentración obtenida	Repetición	Absorbancia	Concentración teórica (mg/mL)	Concentración obtenida
1	0.525	0.01	0.01000	1	0.522	0.01	0.00981
2	0.533	0.01	0.01015	2	0.529	0.01	0.00994
3	0.523	0.01	0.00996	3	0.525	0.01	0.00987
4	0.533	0.01	0.01015	4	0.522	0.01	0.00981
5	0.528	0.01	0.01006	5	0.522	0.01	0.00981
6	0.527	0.01	0.01004	6	0.530	0.01	0.00996
7	0.522	0.01	0.00994	7	0.529	0.01	0.00994
8	0.530	0.01	0.01010	8	0.525	0.01	0.00987
9	0.530	0.01	0.01010	9	0.522	0.01	0.00981
10	0.527	0.01	0.01004	10	0.530	0.01	0.00996
<b>Promedio:</b>	0.528	<b>Promedio:</b>	0.01005	<b>Promedio:</b>	0.526	<b>Promedio:</b>	0.00988
<b>S.D.:</b>	0.003794733	<b>S.D.:</b>	6.85714E-05	<b>S.D.:</b>	0.003565265	<b>S.D.:</b>	6.35772E-05
<b>C.V.:</b>	0.7190	<b>C.V.:</b>	0.6821	<b>C.V.:</b>	0.6783	<b>C.V.:</b>	0.6435

Abs Std.	0.525
----------	-------

Abs Std.	0.532
----------	-------

Analista B/ Día 1				Analista B/ Día 2			
Repetición	Absorbancia	Concentración teórica (mg/mL)	Concentración obtenida	Repetición	Absorbancia	Concentración teórica (mg/mL)	Concentración obtenida
1	0.523	0.01	0.01002	1	0.534	0.01	0.00991
2	0.521	0.01	0.00998	2	0.530	0.01	0.00983
3	0.527	0.01	0.01010	3	0.532	0.01	0.00987
4	0.521	0.01	0.00998	4	0.532	0.01	0.00987
5	0.530	0.01	0.01015	5	0.530	0.01	0.00983
6	0.529	0.01	0.01013	6	0.530	0.01	0.00983
7	0.522	0.01	0.01000	7	0.529	0.01	0.00981
8	0.521	0.01	0.00998	8	0.532	0.01	0.00987
9	0.531	0.01	0.01017	9	0.534	0.01	0.00991
10	0.529	0.01	0.01013	10	0.529	0.01	0.00981
<b>Promedio:</b>	0.525	<b>Promedio:</b>	0.01007	<b>Promedio:</b>	0.531	<b>Promedio:</b>	0.00986
<b>S.D.:</b>	0.004168666	<b>S.D.:</b>	7.57614E-05	<b>S.D.:</b>	0.001873796	<b>S.D.:</b>	3.29803E-05
<b>C.V.:</b>	0.7934	<b>C.V.:</b>	0.7527	<b>C.V.:</b>	0.3527	<b>C.V.:</b>	0.3346

Abs Std.	0.522
----------	-------

Abs Std.	0.539
----------	-------

Resultados tabulados entre analistas:

<b>Promedio:</b>	0.0099625
<b>S.D.:</b>	0.00011679
<b>C.V.:</b>	1.17228921

Fuente: Experimental, operación de datos en Excel

Tabla No.9 ANOVA de dos vías -Soluciones muestras-

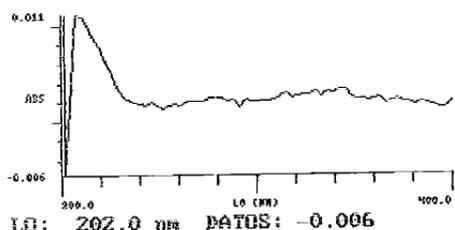
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	4.9E-10	1	4.9E-10	0.113018965	<b>0.73868463</b>	4.113165219
Columnas	3.7249E-07	1	3.7249E-07	85.91517171	<b>4.5342E-11</b>	4.113165219
Interacción	2.89E-09	1	2.89E-09	<b>0.66658124</b>	<b>0.41961605</b>	4.113165219
Dentro del grupo	1.5608E-07	36	4.3356E-09	Fuente: Experimental, operación de datos en Excel		

Para la selectividad del método se obtuvieron espectros de Absorbancia para establecer comparación del comportamiento para las siguientes condiciones:

- Comportamiento de la matriz con respecto a la solución estándar
- Comportamiento de muestra con respecto al comportamiento del estándar

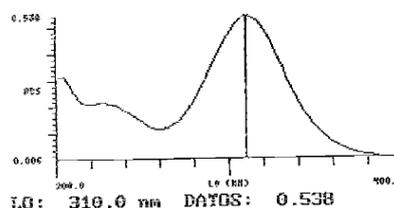
Grafica No.6: Espectros del comportamiento de la matriz, estándar y muestra

Aplicación: BARRIDO  
 Nombre análisis: MATRIZ  
 Archivo Datos: DEFAULT(0)  
 Long Onda Inicial: 200.0  
 Long Onda Final: 400.0  
 Tiempo: 0.0  
 Temperature: ----



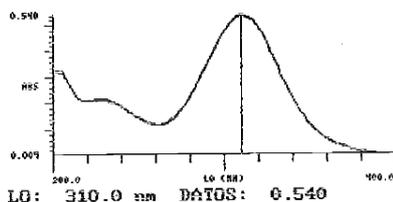
Matriz: sin principio activo - Fuente: Experimental-

Aplicación: BARRIDO  
 Nombre análisis: STD  
 Archivo Datos: DEFAULT(0)  
 Long Onda Inicial: 200.0  
 Long Onda Final: 400.0  
 Tiempo: 0.0  
 Temperature: ----



Estándar Metronidazol 0.01mg/mL -Fuente: Experimental-

Aplicación: BARRIDO  
 Nombre análisis: STPB.MXP  
 Archivo Datos: DEFAULT(0)  
 Long Onda Inicial: 200.0  
 Long Onda Final: 400.0  
 Tiempo: 0.0  
 Temperature: ----

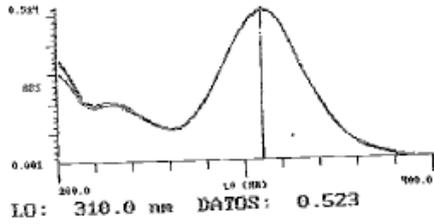


Estándar Metronidazol 0.01mg/mL + Muestra -Fuente: Experimental-

Según los espectros, se establece que no hay absorbancia significativa de la matriz que interfiera a la longitud de onda de trabajo del método. La muestra y el estándar muestran comportamientos similares.

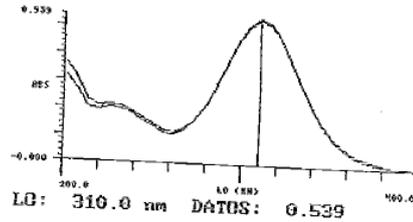
Grafica No.7: Espectros del comportamiento de la matriz + estándar y matriz + muestra

Aplicación: BARRIDO  
Nombre análisis:  
Archivo Datos: DEFAULT(0)  
Long Onda Inicial: 200.0  
Long Onda Final: 400.0  
Tiempo: 0.0  
Temperature: -----



Matriz + Estándar Metronidazol 0.01mg/mL Fuente: Experimental

Aplicación: BARRIDO  
Nombre análisis:  
Archivo Datos: DEFAULT(0)  
Long Onda Inicial: 200.0  
Long Onda Final: 400.0  
Tiempo: 0.0  
Temperature: -----



Matriz + Muestra Fuente: Experimental

Se refleja en ambos casos la presencia del principio activo -Metronidazol- por su absorbancia característica a la longitud de onda de trabajo del método.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la estandarización de este método se realizó un análisis estadístico de los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, precisión, rango y selectividad con el objetivo de verificar el adecuado desarrollo del mismo así como, la consistencia y validez de los datos obtenidos a través de este.

El análisis de linealidad se llevó a cabo por medio de una curva de calibración de 5 soluciones estándar cuyas concentraciones y respuestas fueron expresadas en términos de absorbancia. Para cada nivel de concentración, se calculó el coeficiente de variación (CV), obteniendo valores menores a 2% (Ver tabla No. 1), tal como lo establece el criterio de aceptación.

El análisis para los datos de linealidad por medio de mínimos cuadrados, reflejó que la curva de calibración se expresa por la ecuación  $Y = 0.0054X - 0.000768$ . En donde el valor de la ordenada al origen es: -0.000768 y 0.0054 el valor de la pendiente.

Los resultados del análisis de correlación ( $r$ ) y regresión lineal ( $r^2$ ) reportaron valores de 0.999 y 0.999 respectivamente (Ver tabla No. 2). Estos valores definen de forma parcial que hay una relación lineal significativa entre la absorbancia (respuesta del instrumento) y la concentración del Metronidazol analizado por el método en cuestión. La curva de regresión obtenida se ajusta a los valores experimentales reportados, pues el valor de  $r^2$  obtenido fue mayor a 0.998, según establecido por el criterio de aceptación a un nivel de significancia alfa ( $\alpha$ ) de 0.05.

Para dar soporte al análisis de linealidad, también se graficaron los valores residuales, que son definidos como los puntos experimentales de la curva de regresión lineal, todos expresados en dirección paralela del eje y (absorbancia). Es de notar que los valores están aleatoriamente distribuidos y no muestran una tendencia (Ver gráfico No.2), lo cual define un grado válido de linealidad.

Por último, se realizó un análisis de varianza para obtener el valor p (p-value), el cual representa la probabilidad de obtener resultados por casualidad. El valor obtenido fue: 2.777 E-20. Debido a que es un valor muy pequeño, confirma que es improbable que los resultados se hayan obtenido por casualidad.

Dados resultados satisfactorios para el parámetro de linealidad, se aplicaron las mismas especificaciones a un grupo de muestras a los mismos 5 niveles de concentración previamente analizados y con tres réplicas para cada nivel. Los valores de coeficiente de variación obtenidos fueron todos menores al 2% establecido por el criterio de aceptación. (Ver tabla No.3)

La ecuación de regresión calculada al graficar las respuestas de absorbancia obtenidas en relación a la concentración del analito fue:  $Y = 0.00537X - 0.023$ . Para esta ecuación el valor de la ordenada es -0.0023 y el valor de la pendiente: 0.00537. (Ver tabla No.4)

El coeficiente de correlación ( $r = 0.998$ ) y determinación ( $r^2 = 0.996$ ) fueron mayores que el límite de aceptación establecidos para la validación de los métodos analíticos. (0.98 y 0.99 respectivamente). Estos valores son un indicativo de la relación lineal que existe entre la absorbancia y concentración del analito bajo las condiciones descritas por el método en estudio. (Ver tabla No.4)

La gráfica de los valores residuales, complementa el análisis de linealidad. Estos valores mostraron una distribución aleatoria y sin seguir una tendencia (Ver gráfica No.4).

Como otra indicación de linealidad, se calculó por análisis de varianza el valor  $-p = 1.572E-17$ . Este valor determina que la ecuación expresada representa de forma estadísticamente significativa la asociación que existe entre la absorbancia y la concentración de las muestras.

Cumplidos los criterios de aceptación para las pruebas de significancia estadística del parámetro de linealidad, se puede establecer que la linealidad del método es óptima.

Se realizó el análisis de resultados del parámetro de exactitud, por medio de la determinación del porcentaje de recuperación obtenido a las concentraciones de 80%, 100% y 120% de Metronidazol. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron 99.54%, 99.94%, 100.68% respectivamente para cada nivel. (Ver Gráfico No. 5)

En cada nivel se cumple con el criterio de aceptación para el porcentaje de recuperación, todos los valores obtenidos estuvieron dentro del intervalo 98.0 a 102.0 %.

Así mismo, a los datos obtenidos se aplicó el test de Student para demostrar que no existe diferencia significativa entre la cantidad añadida y el porcentaje recuperado promedio en cada nivel analizado. Se obtuvo un  $t_{exp}$  de 1.93, 0.12, -0.97, respectivamente para los niveles de 80%, 100%, 120% analizados. Para cada nivel el valor  $t$  según las tablas es  $t_{tab} = 12.70$  ( $\alpha = 0,05$ ;  $n-2$ ) (Ver tabla No. 6). De acuerdo al criterio de aceptación, si el valor de  $t_{exp}$  obtenido es menor a  $t_{tab}$  se puede sustentar que el método es exacto al intervalo de concentraciones estudiado para el analito en cuestión.

En relación a la repetibilidad del método, que fue evaluada por medio del coeficiente de variación que mostraron 10 determinaciones a la concentración nominal del analito, se obtuvo una desviación estándar de  $3.66 \times 10^{-5}$  y un coeficiente de variación (% CV) de 0.3702. (Ver tabla No. 7). Dado que el valor de aceptación para el coeficiente de variación (% CV), debe ser menor al 2% entre las mediciones, es posible establecer la repetibilidad de los resultados obtenidos por medio el método en estudio para analito Metronidazol.

La precisión del método se determinó por medio de la medición de diez determinaciones muestras al de la concentración de trabajo (100% equivalente a 0.01mg/mL), de un mismo lote, analizadas por dos distintos analistas en diferentes días. El criterio de aceptación para este parámetro debe ser la obtención de un coeficiente de variación (%CV) menor a 3.0% entre los analistas.

El coeficiente de variación obtenido entre analistas fue de 1.17%, lo cual que es válido según el criterio de aceptación, y permite determinar que la precisión intermedia del método es adecuada aún cuando este se desarrolla en días diferentes y por distintos analistas. (Ver tabla No.8)

A partir de los mismos datos entre analistas, se realizó un ANOVA (Análisis de varianza) de dos vías para comparar y validar estadísticamente los resultados obtenidos por los dos diferentes analistas.

Por medio del ANOVA se obtuvo el valor estadístico "F" para validar la diferencia entre los resultados obtenidos por los analistas. El valor de la F para este grupo de muestras debe ser menor a 4.11, que es el valor crítico de F para este particular,(Ver tabla No. 9).

En este caso, el análisis demuestra que el valor de  $F$  para los resultados de los analistas es: 0.66. Debido a que el valor  $F$  no es mayor al valor crítico de la  $F$  teórica, es posible establecer que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los analistas para la determinación del analito por método en estudio.

La selectividad del método se evaluó de forma cualitativa por medio de comparación de la respuesta obtenida (absorbancia) del estándar, solución placebo o matriz (sin el principio activo) y la solución muestra.

En relación al comportamiento de la matriz con respecto a la solución estándar, se establece que la matriz no presenta ningún tipo de señal que interfiera con la señal presentada por la solución estándar de Metronidazol a la concentración de trabajo.

El comportamiento de la muestra con respecto al comportamiento del estándar, es similar y comparable a la señal que presenta la solución estándar de Metronidazol. Ninguna muestra presenta algún tipo de señal que interfiera con la señal de la solución estándar.

En relación al comportamiento del placebo fortificado con la solución estándar con respecto al comportamiento de placebo fortificado con la muestra, la señal que presenta el placebo fortificado la solución estándar de Metronidazol es similar y comparable al comportamiento de placebo fortificado con la muestra, lo cual confirma que la matriz no aporta ningún tipo de señal que interfiera con la medición.

En base a los resultados anteriores, para los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, y selectividad del método antes descrito, se puede definir que desde la concentración 0.008 mg/mL hasta la concentración de 0.012 mg/mL, se considera que el método es apto para su aplicación y desarrollo para la cuantificación de Metronidazol en óvulos vaginales.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 El método evaluado demostró adecuada linealidad en la curva de calibración y en la lectura de las soluciones muestras, con valores de coeficientes de correlación “r” de 0.99 y de determinación “r<sup>2</sup>” respectivamente. Estadísticamente fue posible establecer la asociación significativa entre la concentración de las muestras y la absorbancia medida por el espectrofotómetro.
- 10.2 El parámetro de exactitud, evaluado por medio del porcentaje de recuperación, fue satisfactorio y estadísticamente significativo según el desarrollo de la prueba de t de Student, confirmando la concordancia entre el valor experimental y el valor verdadero para el rango de concentraciones evaluadas.
- 10.3 La precisión se evaluó mediante ensayos de repetibilidad y de precisión intermedia. Se obtuvo un CV de la repetibilidad y un CV promedio para la precisión intermedia de 0.3902 y 1.1722%, respectivamente, valores inferiores al límite establecido para el coeficiente de variación 2% que fue establecido para este parámetro. De manera que, se puede considerar que el método en estudio es preciso en el rango de las concentraciones evaluadas.
- 10.4 Los resultados obtenidos para la selectividad del método indican que no hay interferencias significativas aportadas por la muestra o su matriz, por lo que se puede establecer que el método es específico para la determinación de Metronidazol en la forma farmacéutica en estudio.
- 10.5 El método propuesto en este trabajo de investigación para la cuantificación por espectrofotometría Uv-Vis de Metronidazol 500 mg en óvulos vaginales sólidos es confiable, ya que cumple con los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, especificidad, y rango establecidos por la bibliografía y normativas reconocidas.

## II. RECOMENDACIONES

- II.1 Adherirse a las condiciones de análisis establecidas por el método para garantizar la confiabilidad de los resultados de análisis. La modificación de alguna de las condiciones analíticas puede implicar el desarrollo de una nueva validación
- II.2 Verificar la calificación de los equipos a utilizar previo al desarrollo del método presentado, para asegurar que los resultados se vean afectados por este motivo.
- II.3 El método para la cuantificación por espectrofotometría Uv-Vis de Metornidazol 500 mg en óvulos vaginales sólidos, se adapta a las condiciones de un laboratorio de control de calidad, por lo que se recomienda sea adoptado en los laboratorios de análisis de rutina como parte del control de calidad para la mencionada especialidad farmacéutica, siempre y cuando incluyan en cada rutina, una o más muestras de concentración conocida como parte del control interno de cada análisis realizado.
- II.4 Estandarizar la cuantificación por espectrofotometría Uv-Vis de diversas formas farmacéuticas cuyo principio activo sea Metronidazol.

## **12. ANEXOS**

### **12.1 Generalidades y relevancia de la estandarización de un método analítico:**

La estandarización de un método puede definirse como la confirmación por medio de una evaluación, con la cual se suministra la evidencia necesaria para ratificar que los objetivos de diseño del método bajo especificaciones particulares se cumplen en su totalidad.

También se ha definido como el procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

Según las definiciones anteriores un método analítico debe conducir con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

Por esta razón la estandarización de un método analítico es implementada por los laboratorios de control de calidad para contar con una herramienta que les permita asegurar la calidad de los productos destinados al consumo humano.

Debido a la importancia que han cobrado estas definiciones y sus innumerables aplicaciones en los sistemas de garantía de calidad en laboratorios analíticos, se ha desarrollado un movimiento industrial que tiene como fin cumplir con las normativas nacionales e internacionales en todas las áreas del análisis. Por lo tanto los laboratorios han tomado medidas que aseguren que son capaces de producir datos con el más alto nivel de calidad. Las medidas comprenden la estandarización de los procedimientos internos de control de calidad y una adecuada práctica de las mediciones de análisis químico.

Los sistemas de garantía de calidad se han fundamentado en las distintas normativas que hacen referencia a la importancia de la calidad y a la obtención de resultados confiables y certeros que cumplan con lo requerido por el mercado. De allí que la industria por medio de los laboratorios de análisis han utilizado ampliamente la normativa conocida como ISO.

Se han propuesto algunos principios que deben ser tomados en cuenta para la estandarización de métodos analíticos:

- Las mediciones analíticas deben hacerse para satisfacer un objetivo definido.
- Las mediciones analíticas deben realizarse usando métodos y equipos evaluados, y así asegurar que estos son adecuados para su propósito.
- Los analistas responsables de los análisis deben estar calificados y ser competentes para realizar de forma adecuada el análisis.
- Las mediciones analíticas en un lugar en particular deben ser consistentes con aquellas realizadas en cualquier otro laboratorio.

## **12.2 Clasificación de métodos analíticos:**

### **12.2.1 Según Desarrollo del método:**

12.2.1.1 Métodos estándar o normalizados: se refiere a aquellos métodos publicados por organizaciones técnicas respetables y reconocidas que se ejecutan tal y como se describen en estas publicaciones. Algunas de las Instituciones mejor conocidas que se encuentran en esta categoría son:

- United States Pharmacopeia (USP)
- National Formulary (NF)
- British Pharmacopeia (BP)
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist (AOAC)
- Food Chemical Codex

Aunque existen muchos métodos normalizados es necesario verificar su aplicación analítica específica dentro del laboratorio en el cual será usado.

12.2.1.2 Métodos no normalizados: son los métodos que no han sido publicados por fuentes validadas. Para estos métodos no se dispone de estudios de o datos de normalización. Por lo que se requiere que sean estandarizados, documentados y autorizados.

### **12.2.2 Según categoría del método:**

El Reglamento Técnico Centroamericano ha definido cuatro categorías para la clasificación de los métodos analíticos y según su categoría se establecen los parámetros de desempeño que son objeto de estandarización.

**Categoría I:** Pruebas cuantitativas del contenido del (los) principio(s) activo(s), constituyen procedimientos químicos que miden el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada.

**Categoría II:** Pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas. Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado.

**Categoría III:** Pruebas físico químicas del desempeño. Constituyen procedimientos de ensayo que miden características propias del desempeño del medicamento.

**Categoría IV:** Pruebas de identificación, las que se realizan asegurando la identidad de un analito en una muestra.

Según estas categorías se han establecido los parámetros de desempeño de los procedimientos analíticos físico-químicos que permiten estandarizar un método, a continuación se resumen en una tabla.

Tabla IA : Parámetros de desempeño según categoría del método a validar

CATEGORÍA DE PRUEBA	CATEGORÍA I	CATEGORÍA II		CATEGORÍA III	CATEGORÍA IV
Parámetro de desempeño	Principio Activo	Prueba de límite cuantitativa	Prueba de límite cualitativa	Físicoquímico desempeño	Identificación
<i>Exactitud</i>	Si	Si	*	*	No
<i>Precisión</i>	Si	Si	No	Si	No
<i>Especificidad</i>	Si	Si	Si	*	Si
<i>Límite de Detección</i>	No	No	Si	*	No
<i>Límite de Cuantificación</i>	No	Si	No	*	No
<i>Linealidad</i>	Si	Si	No	*	No
<i>Intervalo</i>	Si	Si	*	*	No

*\*Puede requerirse según la naturaleza del ensayo*

### 12.3 Generalidades de espectrofotometría Ultravioleta –Visible:

Basados en el principio que todas las sustancias pueden absorber energía radiante según su estructura molecular, se ha tomado la espectrofotometría como el análisis óptico más usado para análisis cualitativos y cuantitativos de compuestos químicos, estas técnicas de análisis tienen gran importancia para los diferentes sectores de la industria, por su accesibilidad, rapidez operativa y precisión en el análisis.

Cuando se habla de espectrofotometría es importante conocer algunas definiciones básicas:

- 12.3.1 Energía radiante: propagación de la energía a través del espacio sin el soporte de la materia.
- 12.3.2 Transmitancia: Magnitud que relaciona la energía radiante que atraviesa una muestra y la energía radiante que incide sobre ella. Es el paso de la radiación a través de un medio sin cambio en su frecuencia de componentes monocromáticos.
- 12.3.3 Absorbancia: Magnitud que representa la cantidad de energía radiante que es absorbida por un cuerpo o sustancia.
- 12.3.4 Longitud de onda: magnitud que representa la distancia en la dirección de propagación entre dos puntos sucesivos de una onda periódica en la cual la fase es la misma.
- 12.3.5 Espectro electromagnético: Es un conjunto de ondas que van desde las ondas con mayor longitud hasta los que tienen menor longitud. Entre estos dos límites están: ondas de radio, microondas, infrarrojos, luz visible, luz ultravioleta y rayos X. La región Ultravioleta-Visible abarca desde 10nm hasta 780nm.

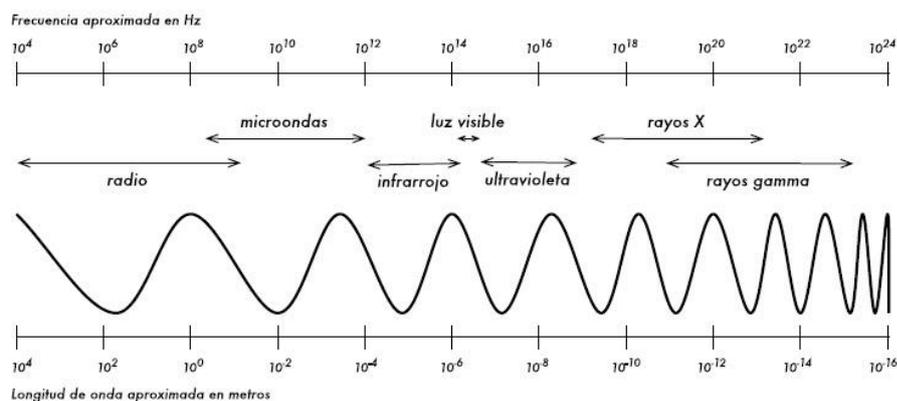


Figura 1A: Espectro electromagnético de absorción

## 12.4 Principio de Medición:

La espectroscopia UV-Vis se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética (en el rango de longitudes de onda del ultravioleta y visible) que puede absorber o transmitir una muestra en función de la cantidad de sustancia presente.

Todas las técnicas de absorción suponen que cuando una radiación incide sobre una muestra se produce una absorción parcial de esta radiación, lo que hace que se produzca una transición entre los niveles energéticos ( $\Delta E$ ) de la sustancia: átomo, molécula o ión  $-E_0-$ , pasando al estado excitado  $-E_f^*$ -y el resto de radiación es transmitida.

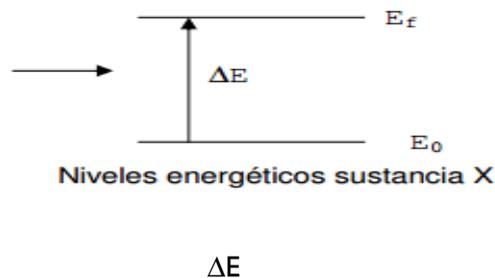


Figura IIA: Niveles de absorción energética

La transición entre los niveles energéticos ( $\Delta E$ ) es característico de cada sustancia, por lo que el análisis puede ser cualitativo para cada analito en una muestra. Además la cantidad de energía (E) absorbida o transmitida es proporcional a la concentración del analito lo cual permite realizar un análisis cuantitativo.

La proporcionalidad ente intensidad de luz absorbida o transmitida y la concentración de analito viene definida por la ley de Lambert-Beer.

## 12.5 Ley de Lambert-Beer:

Es el resumen de dos leyes que relaciona la fracción de radiación absorbida con la concentración del analito y el espesor del medio. Se cumple para cualquier proceso de absorción en cualquier zona del espectro y se basa en que cada unidad de longitud a través de la cual pasa la radiación absorbe la misma fracción de radiación.

Si tenemos un haz de luz monocromática, " $I_0$ ", que pasa a través de un material de espesor, " $b$ " la disminución de la intensidad de luz transmitida, " $I_t$ ", será proporcional al camino recorrido y a la concentración de la sustancia absorbente, " $c$ ", su relación se expresa de la siguiente manera:

$$I = I_0 e^{-\epsilon b c}$$

El factor de proporcionalidad, “ $\epsilon$ ”, se denomina absorptividad molar y está relacionado con la probabilidad de absorción de radiación por parte de la sustancia en análisis.

Derivado de estas relaciones surge el concepto de transmitancia (T) definido como la fracción de la radiación incidente transmitida por una sustancia:

$$T = I/I_0$$

A fin de tener ecuaciones de ajuste lineal se utiliza su forma transformada logarítmica conocida como absorbancia (A)

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I}$$

La absorbancia de una sustancia aumenta cuanto mayor es la atenuación del haz de luz, ocurrido lo inverso en la transmitancia. La absorbancia es directamente proporcional a la longitud b de la trayectoria a través de la solución y a la concentración c de la especie absorbente. De manera que la ley de Lambert-Beer lo expresa como sigue:

$$A = \epsilon b c$$

$\epsilon$ : Absortividad molar en  $L \text{ mol}^{-1}$

b: paso óptico en cm

c: Concentración en  $\text{mol L}^{-1}$

Es importante resaltar que una sustancia cualquiera, que absorbe en el rango ultravioleta visible, debido a su configuración electrónica no lo hará a una única energía sino que podrá absorber en un rango de energías con distinta eficiencia en cada una de ellas, esto da lugar al espectro de absorción de esta sustancia que indica la intensidad de luz absorbida de cada longitud de onda o energía.

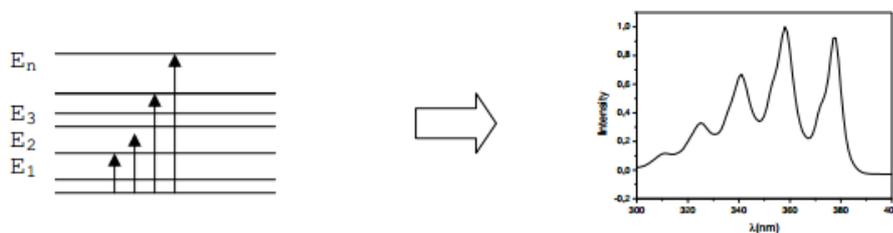


Figura IIIA: Niveles de absorción energética en el espectro

Cada sustancia tiene un espectro de absorción característico que dependerá de la configuración electrónica de la molécula, átomo o ión y de los posibles tránsitos electrónicos que se puedan producir con la radiación que incide sobre ella.

La naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos, y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos.

## **12.6 Espectrofotómetro ultravioleta-visible**

El instrumento utilizado en la espectrometría ultravioleta-visible se llama espectrofotómetro UV-Vis. Mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra.

Las partes básicas de un espectrofotómetro son:

12.6.1 Fuente de luz/radiación: deben ser continuas en una amplia zona del espectro, de intensidad elevada y constante con la longitud de onda. En la zona del visible la fuente más utilizada es la lámpara de filamento de Wolframio, basada en la emisión de radiación por efecto de la temperatura. Por debajo de 350 nm su potencia es inadecuada por lo que se utilizan fuentes formadas por una ampolla que contiene dos electrodos en el seno de un gas (Ar, Xe). Los electrodos aplican una descarga eléctrica que excita las partículas de gas, de modo que cuando éstas vuelven al estado fundamental lo hacen emitiendo luz ultravioleta.

12.6.2 Monocromadores: son sistemas que seleccionan un haz de radiación con un estrecho rango de longitudes de onda. Los filtros de absorción se usan en la región del visible y los de interferencia en las regiones ultravioleta y visible. Los monocromadores se caracterizan por producir un haz de gran pureza espectral y por variar la longitud de onda de la radiación de forma continua y en un amplio intervalo. Los componentes básicos de un monocromador son, una rendija de entrada, que selecciona un haz de radiación policromática entrante, un elemento dispersante (prisma), que dispersa la radiación en sus longitudes de onda individuales, y una rendija de salida, que aísla la banda espectral deseada.

12.6.3 Detector: son transductores que convierten la radiación electromagnética en un corriente o voltaje que posteriormente es amplificada y cuantificada. Este instrumento puede ser de un único haz o de doble haz. En un instrumento de un solo haz toda la luz pasa a través de la célula muestra. La medición se realiza retirando la muestra. Este fue el primer diseño, y todavía está en uso en la enseñanza. El más utilizado en la actualidad es el instrumento de doble haz, la luz se divide en dos haces antes de llegar

a la muestra. Un haz se utiliza como referencia, y el otro haz de luz pasa a través de la muestra. Algunos instrumentos de doble haz tienen dos detectores (fotodiodos), y el haz de referencia y el de la muestra se miden al mismo tiempo. En otros instrumentos, los dos haces pasan a través de un bloqueador que impide el paso de un haz. El detector alterna entre la medida del haz de muestra y la del haz de referencia.

## **12.7 Métodos espectrofotométricos para análisis cuantitativo:**

La absorción de radiación luminosa en las regiones ultravioleta y visible presenta multitud de aplicaciones en análisis cuantitativo. No es necesario que el compuesto a analizar absorba directamente radiación si se puede transformar en un derivado que posea un cromóforo. Mediante este mecanismo es posible analizar también una gran variedad de especies químicas cuya absorción es inicialmente muy débil o bien se encuentran en una parte del espectro en la que coexisten otras absorciones que interfieren. Con este fin, la medida de absorbancia está precedida de una transformación química que debe ser específica, total, rápida, reproducible y conducir a un derivado estable en disolución.

Para el análisis de una sustancia individual se comienza por el establecimiento de una curva de calibrado, a partir de disoluciones de concentraciones conocidas del mismo, sometidas al mismo tratamiento que la muestra. Esta curva, frecuentemente ajustada a una línea recta para disoluciones diluidas, permite deducir la concentración.

### **12.7.1 Preparación de muestras para espectrofotometría ultravioleta-visible:**

Las muestras para espectrofotometría UV-Vis suelen ser líquidas, aunque la absorbancia de los gases e incluso de los sólidos también puede medirse. Las muestras se colocan en una celda transparente, conocida como cubeta. Las cubetas suelen ser rectangulares, con una anchura interior de 1 cm. Esta anchura se convierte en la longitud de ruta,  $L$ , en la Ley de Beer-Lambert. También se pueden usar tubos de ensayo como cubetas en algunos instrumentos. Las mejores cubetas están hechas con cuarzo de alta calidad, debido a que la mayoría de los plásticos absorben en el UV, lo que limita su utilidad para longitudes de onda visibles.

### 13. REFERENCIAS

Argentina. Organismo argentino de Acreditación OAA. (2008). Guía para la Validación de Métodos de ensayo. Versión 2.

Armenta R, Gómez.(2004) Universidad de Sonora. México, Sistemas de Calidad ISO 9000.  
Recuperado de:  
[http://webs.demasiado.com/ing\\_industrial/ingenieria/sistemas/nnc/ISO9000.html](http://webs.demasiado.com/ing_industrial/ingenieria/sistemas/nnc/ISO9000.html)

Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (2001). Validación de métodos analíticos. España. pp.35-125

Aure, J. C., yGjonnaess, H. (1969). Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica.  
Metronidazole. Treatment of Trichomonal Vaginitis A Comparison of Cure Rates in 1961 and 1967. , pp 440–445

Baudritt, Olga., (2005). Guía de Validación de Métodos Analíticos Físicoquímicos Ligeramente Modificados o Mejor Definidos. Costa Rica.

Bendesky, A., Menéndez D. (2001). Metronidazol: una visión integral. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Revista Facultad de Medicina UNAM. Vol.44 No.6

Buckle, G., Pennant, G., (1981) Progress in Medicinal Chemistry. Vol.18 United States of America. Elsevier pp. 108-110.

Cerna Vásquez, Rafael Estuardo (2006). *Validación del método espectrofotométrico en infrarrojo para cuantificación de Amoxicilina capsulas de 500 mg. (Tesis de Licenciatura)* Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods.(2009). *A laboratory guide to method validation and related topics*. Reino Unido. Recuperado de:  
<http://www.eurachem.org/guides/mval.htm>

- Food and Drugs Administration. (1990). *Guidelines for Drug Stability Studies and methods validations*. United States of America.
- Food and Drug Administration. U.S., Department of Health and Human Services. Public Health Service. (1987). *Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation*. United States of America.
- Food and Drug Administration. U.S., Department of Health and Human Services (2000). *Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. Chemistry Manufacturing, and Controls Documentation*. United States of America.
- Ministerio de Salud de Costa Rica. (1998) *Guía de validación para métodos analíticos*. Costa Rica. Recuperado de:  
<http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>
- Guatemala. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. (2007). Programa nacional de prevención y control de ITS/VIH/SIDA. “*Manual para el abordaje integral de las infecciones de transmisión sexual con énfasis en el manejo sindrónico.*”
- Guatemala. Oficina de acreditación de Guatemala (2009). *Política de selección y validación de métodos de ensayo*.
- Harris, D. (1992). *Análisis Químico Cuantitativo*. (3a ed.). México. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V.
- Harelec, L., Meingasser y J., Mieth, H.(1978). *Studies on strain sensitivity of Trichomonas vaginalis to Metronidazole*. British Journal of venereal diseases, pp. 54, 72-76
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH. (1994). *Harmonised Tripartite Guideline Q2A Text on Validation of Analytical Procedures*.
- Instituto Colombiano de normas técnicas y certificación (1994). *Norma técnica colombiana NTC-ISO-ECA8402: Quality management and Quality assurance*. Colombia

- Instituto de hidrología, meteorología, y estudios ambientales. (1999). Protocolo estandarización de métodos. Colombia
- ISO/IEC 17025:2005 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- Lyman O. (1997) *An introduction to statistical methods and data analysis.*(6a ed). Massachusetts: Duxburypress.
- Palacios Villatoro, Ma. Del Carmen (2004). “*Inhibición del crecimiento de Gardnerella vaginalis por seis plantas de uso medicinal de la flora suroccidental guatemalteca*” . Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Mason, PR. (1980). Trichomoniasis; *New ideas on an old disease.* S afr. pp 857-859
- Maryadele, J. (2006). *The Merck Index An encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals* (14va ed.). Merck Research Laboratories.
- Millar, J., Millar, y Jane C. (2002) *Estadística y Quimiometría para Química Analítica.* (4a ed) España: Prentice Hall.
- Organización Panamericana de la Salud (1999).*Glosario de medicamentos, Desarrollo Evaluación y Uso.* Washington D.C.
- Raviña, E. (2008). *Medicamentos: un viaje a lo largo de la evolución del descubrimiento de fármacos.* España: Universidad de Santiago de Compostela.
- Reglamento técnico centroamericano (2006). *Productos farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos.* Consejo de Ministros de Integración Económica de Centroamérica.
- Salguero, R. *Estadística y Estadística Comparativa.* 2006. (s.n.)

Samol, A.T. (2007). *Estandarización del método utilizado en el Laboratorio Nacional de Salud para la identificación y cuantificación de clotrimazol en óvulos sólidos por cromatografía líquida de alta resolución*. Guatemala.Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Skoog D.(1994). *Análisis instrumental*.( 4a ed). España. McGraw-Hill/interamericana.

Sweetman, S., (2009). *Martindale: The Complete Drug Reference*. U.S.A.:  
Pharmaceutical Press

Toledo B. J. (2000). *Validación de método espectrofotométrico, como metodología alterna, para la medición de alcohol en sangre*. Guatemala.Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

United States Pharmacopeia XXXVIII /National Formulary XXVIII. (2010) United States Pharmacopeial Convention. USA.

Universidad Nacional de Colombia. (1997).*Memorias del curso análisis instrumental*.  
Bogotá. (n.s)

Valenzuela A. C.(1999). *Validación del método espectrofotométrico para cuantificación de metronidazol, mebendazol, albendazol y tinidazol (Tableta y suspensión)*.  
Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

World Health Organization [WHO]. (2011). *Model List of Essential Medicines, 17th List*.  
Geneva, Switzerland.