

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS**

**PROYECTO DE TITULACIÓN**

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

**“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE QUÍMICA”**

**TEMA:**

< VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA EN LA CUANTIFICACIÓN DE METOCLOPRAMIDA CLORHIDRATO POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO >

**AUTOR:**

< MARIUXI MERCEDES MOREJÓN GARCÍA >

Guayaquil - Ecuador

<<2022>>

## RESUMEN

El Clorhidrato de Metoclopramida es un fármaco que se clasifica en el grupo farmacoterapéutico para el tracto alimentario y metabolismo [1], está indicado en adultos para la prevención de náuseas y vómitos postoperatorios, y en niños para la prevención de náuseas y vómitos retardados inducidos por quimioterapia como opción de segunda línea [2]. Para la obtención del Registro Sanitario, ante una Autoridad Regulatoria Nacional, los métodos presentados por los diferentes fabricantes, en ciertos casos resultan ser costosos, y solucionar este problema representa un desafío cuando no se cuenta con los suficientes recursos económicos, equipos, reactivos, entre otros. Por lo antes mencionado el objetivo de este proyecto es verificar la técnica analítica utilizada para la cuantificación de metoclopramida clorhidrato en inyectables por espectrofotometría UV-VIS. Para llevar a cabo la verificación del método analítico, se tomó en consideración los lineamientos de la Farmacopea Brasileña. Una vez realizada la verificación de las características de desempeño diseñadas inicialmente, las cuales se cumplieron con el objetivo proyectado, estos son: exactitud con un IC del 90 – 110 %, repetibilidad ( $\leq 2.00$  % CVSr), reproducibilidad ( $\leq 2.00$  % CVSR), selectividad (no presenta interferencias con otros analitos), LOD (3SD), LOQ (10SD), linealidad ( $r^2 \geq 0.995$ ), incertidumbre ( $\leq 5\%$ ), y robustez, por lo que se puede aplicar dentro de los ensayos del laboratorio y garantizar los resultados del mismo.

Palabras claves: Metoclopramida Clorhidrato, Espectrofotometría, Farmacopea Brasileña, Verificación.

## ABSTRACT

Metoclopramide hydrochloride is a drug classified in the pharmacotherapeutic group for the alimentary tract and metabolism [1]. It is prescribed to adults to prevent postoperative nausea and vomiting and to children to prevent delayed nausea and vomiting induced by chemotherapy as a second-line option [2]. To obtain Sanitary Registration before a National Regulatory Authority, the methods presented by the different manufacturers sometimes turn out to be expensive. Solving this problem represents a challenge when there are insufficient economic resources, equipment, and reagents. Therefore, this project aims to verify the analytical technique used to quantify the metoclopramide hydrochloride injectables by UV-VIS spectrophotometry. The Brazilian Pharmacopoeia guidelines were considered to carry out the analytical verification method. Once the proof of the initially designed performance characteristics was performed, it showed that an accuracy of IC of 90 - 110 %, repeatability ( $\leq 2.00$  % CVSr), reproducibility ( $\leq 2.00$  % CVSR), selectivity (no interference with other analytes), LOD (3SD), LOQ (10SD), linearity ( $r^2 \geq 0.995$ ), uncertainty ( $\leq 5\%$ ), and robustness. This proof fulfilled the projected objective; therefore, it can be applied to laboratory tests and guarantee laboratory results.

Keywords: Metoclopramide Hydrochloride, Spectrophotometry, Brazilian Pharmacopoeia, Verification.

## DEDICATORIA

Todo este esfuerzo está dedicado con mucho cariño:

A Dios, por ser el pilar principal que soporta mi vida, por brindarme salud y darme la fuerza necesaria para continuar cada día; y, sobre todo por permitirme llegar hasta este momento tan especial.

A mi esposo Q.F. Iván Tuarez Cedeño, por su apoyo incondicional y sobre todo por su paciencia, que, con su amor y respaldo, me ayuda a alcanzar mis objetivos.

A mis Padres el Sr. Neyser Morejón y Sra. Rosa García, quienes son mi mayor inspiración, que, a través de su amor y buenos valores, han ayudado a trazar mi camino.

A mis hijos Daniela, Sofia y Emiliano, por su amor incondicional.

A mis hermanos por estar siempre presentes, con su apoyo moral, que me brindaron a lo largo de esta etapa.

Y finalmente, esta tesis la quiero dedicar a toda mi familia, por extender su mano en momentos difíciles y por el cariño brindado cada día; por apoyarme cuando más los necesito.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi mayor gratitud a Dios, por que, sin él, nada de esto hubiera sido posible.

A mi esposo, quién con su apoyo permitió que alcance una meta más, a través de sus consejos, de su amor, y sobre todo por su paciencia. ¡Porque en el camino encuentras personas que iluminan tu vida!

A mis padres por el esfuerzo, dedicación, paciencia, por su confianza y por todo lo que me ha dado a lo largo de mi vida.

Al Laboratorio de Referencia de la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria “ARCSA”, el cual es parte fundamental en mi desarrollo profesional.

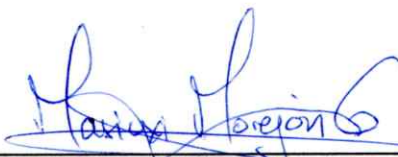
De igual manera mis agradecimientos a la Escuela Superior Politécnica del Litoral, a la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, a mis profesores quienes, con la enseñanza de sus valiosos conocimientos, hicieron que pueda crecer profesionalmente.

Finalmente, pero no menos importante, deseo manifestar mi agradecimiento a la Magister María José Morales, colaboradora principal durante este proceso, quién con su tiempo, enseñanza, dirección, y colaboración, permitió el desarrollo de esta tesis.

## DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación, me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.



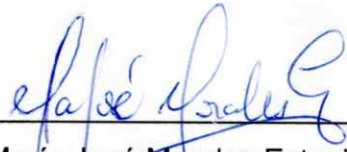
Q.F. Mariuxi Mercedes Morejón García

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



<< Dr. Joel Eduardo Vielma Puente >>

PRESIDENTE



<< Mgtr. María José Morales Estupiñán >>

TUTOR



<< Mgtr. Nadia Magaly Flores Manrique >>

DOCENTE EVALUADOR

## ABREVIATURAS O SIGLAS

USP	Farmacopea de los Estados Unidos
WHOCC	Centro Colaborador de Estadísticas de Medicamentos de la OMS
ATC	Clasificación Anatómico Terapéutico Químico
RAM	Reacciones adversas de un medicamento
ACh	Acetilcolina
5HT	Serotonina
STN	Núcleo subtalámico
CTZ	Zona de activación de quimiorreceptores
D2	Receptores de dopamina
cm	Centímetro
DCI	Denominación Común Internacional
ISO	Organización Internacional de Normalización
UV/VIS	Ultravioleta/visible
ANOVA	Análisis de varianza
ABS	Absorbancia
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
IC	Intervalo de confianza
CV	Coefficiente de variación
S	Desviación estándar
S <sub>0</sub>	Desviación estándar estimada de los resultados individuales en o cerca de una concentración de cero
S <sub>0</sub> '	Desviación estándar utilizada en el cálculo de un LOD o LOQ
S <sub>r</sub>	Desviación estándar por repetibilidad
S <sub>R</sub>	Desviación estándar por reproducibilidad
u	Incertidumbre típica
U	Incertidumbre expandida
K	Factor de cobertura
$\bar{x}$	Valor medio (media aritmética)
K <sub>Q</sub>	Factor utilizado en el cálculo del límite de cuantificación
mL	Mililitros
mg	Miligramos
r	Coefficiente de correlación



$r^2$	Coeficiente de determinación
%	Porcentaje
m	Pendiente
HCl	Clorhidrato
M	Molar
HCL	Ácido clorhídrico.
BLK	Blanco
a	Intercepto
$S_{y,x}$	Error de estimación de Y
$S_b$	Desviación estándar de la pendiente
$S_a$	Desviación estándar del intercepto
Fig.	Figura

# TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1 .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Descripción del problema .....	3
1.3. Objetivos .....	4
1.3.1. Objetivos específicos .....	4
1.4. Hipótesis.....	5
1.5. Alcance.....	5
CAPÍTULO 2.....	6
2. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1. La metoclopramida como principio activo .....	6
2.2. La metoclopramida en su forma farmacéutica inyectable .....	7
2.3. Acción farmacológica de interés terapéutico de la metoclopramida.....	7
2.3.1. Características farmacológicas. ....	8
2.3.2. Propiedades farmacocinéticas .....	8
2.3.3. Reacciones adversas de la metoclopramida.....	9
2.4. Agentes procinéticos que estimulan la motilidad gastrointestinal .....	11
2.5. Antagonistas de los receptores de dopamina .....	12
2.6. Antinauseosos y antieméticos .....	12
2.7. Metodología Analítica .....	13
2.7.1. Método de análisis .....	14
2.8. Validación de métodos analíticos .....	14
2.9. Espectrofotometría .....	15
2.10. Radiación electromagnética .....	15
2.11. Métodos de adquisición de espectro .....	16
2.12. Instrumentación utilizada en Ultravioleta (UV) y Visible (VIS) .....	17
2.13. Identificación por Espectrofotometría .....	18
2.14. Ultravioleta (UV) y visible (VIS) .....	18
2.15. Uso Cuantitativo de la Espectrofotometría .....	19
2.16. Características de desempeño.....	20
2.16.1. Exactitud.....	21
2.16.2. Precisión.....	21
2.16.3. Selectividad / Especificidad .....	21
2.16.4. Límite de Detección .....	21
2.16.5. Límite de cuantificación .....	22
2.16.6. Linealidad .....	22

2.16.7.	Incertidumbre .....	22
2.16.8.	Intervalo.....	22
2.16.9.	Robustez .....	23
CAPÍTULO 3.....		24
3.	METODOLOGÍA .....	24
3.1.	Escenario y ámbito de estudio.....	24
3.2.	Tipo de estudio .....	24
3.2.1.	Tipo de diseño .....	24
3.3.	Muestra de estudio .....	24
3.3.1.	Muestra .....	24
3.4.	Diseño experimental .....	25
3.4.1.	Objetivo.....	25
3.4.2.	Alcance e intervalo de trabajo .....	25
3.4.3.	Método de referencia .....	25
3.4.4.	Método analítico por espectrofotometría uv-visible .....	25
3.4.5.	Preparación de soluciones reactivas.....	26
3.4.6.	Preparación del estándar para la curva de calibrado .....	26
3.4.7.	Preparación de las muestras.....	28
3.4.8.	Reactivos, disolventes, materiales y equipos.....	29
3.4.9.	Validación del método de cuantificación del principio activo .....	31
CAPÍTULO 4.....		33
4.	RESULTADOS.....	33
4.1.	Exactitud.....	33
4.2.	Precisión del método .....	34
4.2.1.	Repetibilidad .....	34
4.2.2.	Reproducibilidad .....	43
4.3.	Selectividad .....	44
4.4.	Límite de detección.....	47
4.5.	Límite de cuantificación .....	48
4.6.	Linealidad .....	49
4.7.	Incertidumbre.....	53
4.8.	Robustez .....	57
4.8.1.	Variación del color de los envases, de la temperatura de conservación y del tiempo de lectura. ....	58
4.8.2.	Variación de la concentración del disolvente ácido clorhídrico.....	66
4.9.	Discusión .....	68
CAPÍTULO 5.....		70
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	70
5.1.	Conclusiones .....	70

5.2. Recomendaciones.....	71
6. Referencias.....	1
7. Anexos y apéndices.....	3

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Fig. 2. 1.</b> Estímulos eméticos.....	13
<b>Fig. 2. 2</b> Espectro de referencia de la metoclopramida [17] .....	19
<b>Fig. 3.1.</b> Presentación esquemática de la preparación del estándar y de la curva de calibración.....	27
<b>Fig. 3.2.</b> Presentación esquemática de la preparación de la muestra.....	28
<b>Fig. 4. 1.</b> Grafica de concentración medicamento genérico vs medicamento de marca ..	47
<b>Fig. 4. 2.</b> Grafica de las 10 curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.....	51
<b>Fig. 4. 3.</b> Grafica del promedio absorbancias de 10 curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.....	53
<b>Fig. 4. 4.</b> Gráfico de análisis de residuales de la curva de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.....	53
<b>Fig. 4. 5 .</b> Gráfico de factores de incertidumbre expresado en porcentaje del nivel alto ..	55
<b>Fig. 4. 6.</b> Gráfico de factores de incertidumbre expresado en porcentaje del nivel medio	56
<b>Fig. 4. 7.</b> Gráfico de factores de incertidumbre expresado en porcentaje del nivel bajo ..	57
<b>Fig. 4. 8.</b> Gráfico de envases de color ámbar vs temperatura ambiente y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto .....	59
<b>Fig. 4. 9.</b> Gráfico de envases de color ámbar vs temperatura refrigeración y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto .....	60
<b>Fig. 4. 10.</b> Gráfico de envases transparentes vs temperatura ambiente y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto .....	61
<b>Fig. 4. 11.</b> Gráfico de envases transparentes vs temperatura de refrigeración y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto .....	62
<b>Fig. 4. 12.</b> Gráfico de envases de color ámbar vs temperatura de ambiente y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio .....	63
<b>Fig. 4. 13.</b> Gráfico de envases de color ámbar vs temperatura de refrigeración y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio .....	64
<b>Fig. 4. 14.</b> Gráfico de envases transparentes vs temperatura ambiente y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio .....	65
<b>Fig. 4. 15.</b> Gráfico de envases transparentes vs temperatura de refrigeración y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio .....	66
<b>Fig. 4. 16.</b> Gráfico de variación de concentración del disolvente ácido clorhídrico. ....	67

## LISTADO DE TABLAS

<b>TABLA 2.1.</b> Características fisicoquímicas.....	6
<b>TABLA 2.2.</b> Clasificación anatómica-terapéutica química .....	7
<b>TABLA 2.3.</b> Reacciones adversas de la metoclopramida [11] .....	9
<b>TABLA 2.4.</b> Métodos químicos analíticos.....	14
<b>TABLA 2.5.</b> Rangos de longitud de onda [16] . .....	15
<b>TABLA 3.1.</b> Condiciones del espectrofotómetro.....	26
<b>TABLA 3.2.</b> Curva de calibración. ....	27
<b>TABLA 3.3.</b> Reactivos .....	29
<b>TABLA 3.4.</b> Materiales .....	30
<b>TABLA 3.5.</b> Equipos.....	30
<b>TABLA 3.6.</b> Características de desempeño .....	31
<b>TABLA 4. 1.</b> Evaluación de la exactitud del método en estudio .....	33
<b>TABLA 4. 2.</b> Datos estadísticos nivel alto día 1 por tres analistas.....	34
<b>TABLA 4. 3.</b> Datos estadísticos nivel medio día 2 por tres analistas.....	35
<b>TABLA 4. 4.</b> Datos estadísticos nivel bajo día 3 por tres analistas.....	36
<b>TABLA 4. 5.</b> Data estadística del nivel alto de concentración al 150%.....	38
<b>TABLA 4. 6.</b> Análisis de varianza de un factor de la concentración al 150%.....	39
<b>TABLA 4. 7.</b> Data estadística del nivel medio de concentración al 100%.....	39
<b>TABLA 4. 8.</b> Análisis de varianza de un factor de la concentración al 100%.....	40
<b>TABLA 4. 9.</b> Data estadística del nivel bajo de concentración al 50%.....	41
<b>TABLA 4. 10.</b> Análisis de varianza de un factor de la concentración al 50%.....	42
<b>TABLA 4. 11.</b> Cálculo del porcentaje de repetibilidad (Sr).....	42
<b>TABLA 4. 12.</b> Cálculo del porcentaje de reproducibilidad (SR) .....	43
<b>TABLA 4. 13.</b> Datos comparativos del clorhidrato de metoclopramida inyectable como medicamentos; genérico y marca. ....	44
<b>TABLA 4. 14.</b> Datos estadísticos del clorhidrato de metoclopramida inyectable en medicamento genérico.....	45
<b>TABLA 4. 15.</b> Datos estadísticos del clorhidrato de metoclopramida inyectable en medicamento de marca .....	46
<b>TABLA 4. 16.</b> Límite de detección.....	47
<b>TABLA 4. 17.</b> Límite de cuantificación.....	48

<b>TABLA 4. 18.</b> Absorbancias de las curvas de calibración en el rango de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.....	49
<b>TABLA 4. 19.</b> Estimación lineal de las curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.....	50
<b>TABLA 4. 20.</b> Promedio de absorbancias de 10 curva de calibración en el rango de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.....	51
<b>TABLA 4. 21.</b> Estimación lineal del promedio de las curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.....	52
<b>TABLA 4. 22.</b> Data estadística de la incertidumbre del nivel alto a 150% .....	54
<b>TABLA 4. 23.</b> Data estadística de la incertidumbre del nivel medio a 100% .....	55
<b>TABLA 4. 24.</b> Data estadística de la incertidumbre del nivel bajo a 50% .....	56
<b>TABLA 4. 25</b> Data estadística en envases de color ámbar, con variación de temperatura y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto. ....	58
<b>TABLA 4. 26</b> Data estadística en envases transparentes, con variación de temperatura y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto.....	60
<b>TABLA 4. 27</b> Data estadística en envases de color ámbar, con variación de temperatura y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio. ....	62
<b>TABLA 4. 28</b> Data estadística en envases transparentes, con variación de temperatura y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio.....	64
<b>TABLA 4. 29</b> Variación de concentración del disolvente de HCL a 0,01M; 0,1M y 1M....	66

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas [3].

La industria farmacéutica, siempre ha tenido la misión de fabricar medicamentos que sean completamente seguros, efectivos y de alta calidad. En la mayoría de las situaciones, cuando el laboratorio está interesado en medir el analito en una muestra, es ineludible contar con una técnica de medición. Cuando se trata de un método normalizado que se aplica exactamente como está descrito en la norma (USP, BP, EP, etc.), y si se trata de una modificación a un método normalizado (modificaciones que pueden tener repercusión sobre los resultados) o, cuando se trata de un método propio [4].

Hoy en día, los países en miras de desarrollo, tienen una visión amplia de la necesidad de verificar sus procedimientos de pruebas. Alcanzar el nivel más alto de calidad de los medicamentos, requiere la máxima certeza de los resultados, que solo pueden garantizarse mediante procedimientos validados. En este sentido, la validación debe considerarse un paso esencial para asegurar que los resultados obtenidos por los métodos descritos sean confiables, considerando, a su vez, que es un requisito indispensable para alcanzar la acreditación del laboratorio, ante el ente de referencia.

En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea de manera que esta se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable [5].

Una técnica que es muy utilizada para el análisis de una gran variedad de analitos corresponde a la espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis). Esta es un tipo de espectroscopia de absorción en la que se ilumina una muestra con rayos electromagnéticos de varias longitudes de onda en el rango ultravioleta (UV) y visible (VIS). Según la sustancia, la muestra absorbe parcialmente los rayos de luz ultravioleta o visible. El resto de la luz, es decir, la luz transmitida, se registra como una función de la longitud de onda mediante un



detector adecuado. El detector produce entonces el espectro UV-VIS único de la muestra (también conocido como el “espectro de absorción”) [6].

Dado que, en el país, se debe cumplir con la exacción de la Norma ISO/IEC 17025, los métodos analíticos tienen que ser verificados para asegurar la confiabilidad y validez técnica de los resultados emitidos por los laboratorios. En este contexto, el presente trabajo de investigación se centra en verificar el método de determinación de la concentración del analito clorhidrato de metoclopramida por espectrofotometría UV-VIS, en inyectables. Para este estudio, se establecen parámetros estadísticos que ayudan a concluir si el método utilizado, cumple con los requerimientos para la aplicación analítica propuesta.

### **1.1. Antecedentes**

El surgimiento de la validación se debe a un historial de respuestas a accidentes desafortunados y a fraudes en la industria farmacéutica que parten desde principios del siglo pasado. En 1906, se publicó en los Estados Unidos (EU) un libro llamado “La Jungla” de Upton Sinclair, en el que describía lo malas y turbias que eran las condiciones de los productos. La reacción del presidente Teddy Roosevelt en ese momento fue convencer al Congreso de crear la Food and Drug Administration (FDA) [7].

En 1976, la FDA propuso un nuevo sistema regulatorio sobre las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) en la industria farmacéutica (IF). Luego de tres años de audiencias públicas estas nuevas regulaciones se convirtieron en ley. Ya a finales de 1979 se postulaba que un incumplimiento de las BPF podía conllevar a una demanda por un acto criminal. Las nuevas BPF daban a la FDA mucho más poder regulatorio. El mensaje clave transmitido por estas nuevas regulaciones fue validar, validar métodos analíticos, validar procesos de manufactura de medicamentos asépticos, estériles y no estériles; y validar sistemas de computación [7].

Para la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), los procedimientos de prueba para la evaluación de los niveles de calidad de los artículos farmacéuticos, están sujetos a diversos requisitos. Según el Artículo 501 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, los ensayos y especificaciones de las monografías de USP–NF constituyen normas legales [3].

Los reglamentos sobre Buenas Prácticas de Fabricación Vigentes, requieren que los métodos de prueba, que se utilizan para evaluar el cumplimiento de los artículos farmacéuticos, con las especificaciones establecidas, deben cumplir normas adecuadas de exactitud y confiabilidad. Al reconocer el carácter legal de las normas USP y NF, es esencial, por lo tanto, que las propuestas para adoptar procedimientos analíticos farmacopeicos nuevos o revisados, estén respaldadas por suficientes datos de laboratorio que documenten su validez [3].

La metoclopramida fue descrita por primera vez por Louis Justin-Besaçon y Charles Laville en 1964 y está disponible en Estados Unidos desde 1979 [8] . Este es un antagonista de los receptores de dopamina que se ha utilizado para el tratamiento de diversos síntomas gastrointestinales durante los últimos treinta años [9].

El Acuerdo Ministerial 586, Reglamento de Registro Sanitario para Medicamentos en General, establece directrices cuando se requiere obtener el registro sanitario de un medicamento en el país. Por consiguiente, determina que la metodología analítica utilizada para la cuantificación del medicamento, deber estar conforme a las Farmacopeas oficiales vigentes establecidas en el Art. 26 del acuerdo. Por el contrario, en caso de no estar descrita en una Farmacopea oficial, la metodología analítica deber ser validada [10].

## **1.2. Descripción del problema**

La validación de un método de cuantificación, es una de las exigencias de las Buenas Prácticas de Manufactura y de las Buenas Prácticas de Laboratorio. No obstante, tanto la industria farmacéutica, como el laboratorio de referencia nacional, tienen que acatar estas regulaciones. Dentro de este marco, se requiere garantizar que la evaluación de la calidad de los productos se realiza dentro de un sistema de calidad confiable, siendo que con ello se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado.

La validación se define como el establecimiento de pruebas de laboratorio, debidamente documentadas. Esta aporta un alto grado de seguridad de que el proceso planificado se efectuará uniformemente, en conformidad con los resultados previstos especificados. Por tal motivo, se podrá afirmar que dicho proceso será apropiado para el uso propuesto [11].

Las agencias reguladoras, como garantes de la calidad de los medicamentos, en uso de sus facultades, orientan a los laboratorios a validar sus métodos analíticos. Para lograrlo, se utilizan como referencia las monografías oficiales de las farmacopeas, como son: Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP); Farmacopea Británica (BP); Farmacopea Europea (Ph. Eur); entre otras.

Las Farmacopeas constituyen las normas oficiales de calidad. Para el registro de Medicamentos ante los Organismos de Control, no solo es necesario aportar datos de seguridad y eficacia de las materias primas y los productos terminados, sino que es imprescindible garantizar esas condiciones, estableciendo adecuados controles de calidad [11].

Los métodos presentados por los diferentes fabricantes, para la obtención del Registro Sanitario, en ciertos casos resultan ser costosos. Solucionar este problema representa un desafío cuando no se cuenta con los suficientes recursos económicos, equipos, reactivos, entre otros.

El Laboratorio de Control de Calidad ha desarrollado un método para la cuantificación de metoclopramida clorhidrato, en inyectables; el cual se usa como un método alterno, al método de cromatografía líquida de alta eficacia, esto debido a que no siempre se cuenta con los recursos necesarios, y a su vez considerando que este procedimiento no ha sido validado, y los resultados obtenidos con su aplicación no son confiables se planteó validar el método.

### **1.3. Objetivos**

Verificar la técnica analítica utilizada para la cuantificación de metoclopramida clorhidrato en inyectables por espectrofotometría UV-VIS.

#### **1.3.1. Objetivos específicos**

1. Demostrar que la técnica analítica utilizada para la cuantificación de Metoclopramida clorhidrato en inyectables, cumple con las especificaciones establecidas en el método alternativo del laboratorio de referencia.
2. Desarrollar los lineamientos a seguir en la validación de la metodología analítica para la cuantificación de Metoclopramida clorhidrato en inyectables por espectrofotometría.
3. Corroborar mediante criterios de desempeño que la técnica por espectrofotometría para la cuantificación de Metoclopramida clorhidrato en inyectables cumple con las necesidades analíticas del laboratorio referencia.

#### **1.4. Hipótesis**

La metodología de referencia a utilizar para la cuantificación de un derivado del ácido para-aminobenzoico (PABA), METOCLOPRAMIDA CLORHIDRATO, en inyectables, por espectrofotometría UV-VIS, cumple con los parámetros de desempeño analítico.

#### **1.5. Alcance**

Esta investigación, consiste en verificar que la técnica analítica utilizada para la cuantificación de metoclopramida clorhidrato, en inyectables, por espectrofotometría UV-VIS, cumpla con los parámetros de desempeño analítico.

Permitiendo de esta manera, que el laboratorio entregue resultados confiables, así como también, se pueda considerar la posibilidad de una acreditación en dicho parámetro.

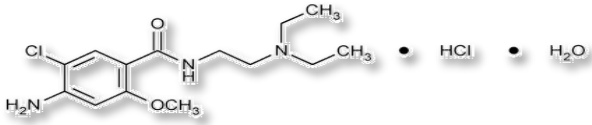
# CAPÍTULO 2

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. La metoclopramida como principio activo

Es preciso conocer a fondo la estructura y naturaleza de la muestra en investigación. Por lo tanto, hay que destacar las características más sustanciales que pueden influir en el análisis por espectrometría UV-VIS. Además, es importante considerar sus características fisicoquímicas, tal como se muestra en la tabla 2.1, estas informan el comportamiento del analito durante el transcurso del tiempo, ante las exposiciones externas, como el calor, la humedad, entre otros [12].

**TABLA 2.1.** Características fisicoquímicas

Denominación Común Internacional D.C.I.	Metoclopramida
Nombre Químico	(4-Amino-5-cloro-N-[2-(dietilamino) etil]-o-anisamida monohidrato)
Estructura Química	
Familia química	Carboxamida aromática
Fórmula molecular	$C_{14}H_{22}ClN_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$
Peso Molecular	354.27
Estado físico	Sólido
Forma	Polvo cristalino
Color	Blanco Blanquecino
Olor	Inodoro
Solubilidad (agua)	Fácilmente soluble
Solubilidad (otros)	
Alcohol	Fácilmente soluble
Benceno	Moderadamente soluble

Cloroformo	Moderadamente soluble
Éter	Prácticamente insoluble

Nota: Se describen las características fisicoquímicas de la metoclopramida [12].

## 2.2. La metoclopramida en su forma farmacéutica inyectable

El Clorhidrato de Metoclopramida como producto terminado en su forma farmacéutica Inyectable, es un líquido transparente, incoloro o inodoro, está indicado en adultos para la prevención de náuseas y vómitos postoperatorios (NVPO), para el tratamiento sintomático de náuseas y vómitos, incluyendo náuseas y vómitos inducidos por migraña aguda y como prevención de náuseas y vómitos inducidos por radioterapia (NVIR), en niños (entre 1-18 años de edad) está indicado para la prevención de náuseas y vómitos retardados inducidos por quimioterapia (NVIQ) como opción de segunda línea, tratamiento de náuseas y vómitos postoperatorios establecidos (NVPO) como opción de segunda línea [2].

## 2.3. Acción farmacológica de interés terapéutico de la metoclopramida

El WHOCC, menciona la clasificación química terapéutica anatómica del clorhidrato de metoclopramida, la cual se detalla en la tabla 2.2. en ella lo clasifica en el grupo farmacoterapéutico para el tracto alimentario y metabolismo [1].

**TABLA 2.2.** Clasificación anatómica-terapéutica química

Códigos ATC				
A03FA01	A03FA	A03F	A03	A
Metoclopramida	Propulsivos	Propulsivos	Medicamentos para Trastornos Funcionales Gastrointestinales	Tracto Alimentario y Metabolismo

Nota: Se describe la clasificación anatómica-terapéutica química de la metoclopramida [1].

### **2.3.1. Características farmacológicas.**

La metoclopramida es un sustituto de la benzamida que pertenece a los neurolépticos y se utiliza principalmente por sus propiedades antieméticas. La actividad antiemética resulta de dos mecanismos de acción:

- Antagonismo de los receptores dopaminérgicos D2 de estimulación quimicoceptora y en el centro emético de la médula implicada en la apomorfina – vómito inducido.
- Antagonismo de los receptores serotoninérgicos 5-HT3 y agonismo de los receptores 5-HT4 implicados en el vómito provocado por la quimioterapia.

También posee una actividad procinética con el mecanismo de acción siguiente:

- Antagonismo de los receptores D2 al nivel periférico y acción anticolinérgica indirecta que facilita la liberación de acetilcolina [2].

La administración de metoclopramida da como resultado contracciones coordinadas que mejoran el tránsito. Sus efectos se limitan en gran medida al tracto digestivo superior, donde aumenta el tono del esfínter esofágico inferior y estimula las contracciones antrales y del intestino delgado. La metoclopramida no tiene efectos clínicamente significativos sobre la motilidad del intestino grueso [13].

Usos Terapéuticos. - La metoclopramida está indicada en pacientes con gastroparesia, en quienes el fármaco puede causar mejoras moderadas del vaciamiento gástrico. La inyección de metoclopramida se usa como medida complementaria en procedimientos médicos o de diagnóstico, como la endoscopia digestiva alta o la radiografía con contraste del tracto gastrointestinal (dosis IV única de 10 mg). Su mayor utilidad radica en su capacidad para mejorar las náuseas y los vómitos que a menudo acompañan a los síndromes de dismotilidad gastrointestinal. La metoclopramida está disponible en formas de dosificación oral (tabletas y solución) y como preparación parenteral para administración intravenosa o intramuscular [13].

### **2.3.2. Propiedades farmacocinéticas**

Tras su administración, la metoclopramida se distribuye pronto hacia la mayor parte de los tejidos (volumen de distribución: 3,5 litros/Kg) y cruza con facilidad la barrera hematoencefálica y la placenta. Su concentración en la leche materna puede sobrepasar a

la del plasma. La metoclopramida se une en un 13-30 % a las proteínas plasmáticas. Hasta 39 % de la metoclopramida se excreta sin cambios por la orina y el resto se elimina en ésta y en la bilis después de su conjugación con sulfato o ácido glucurónico, siendo el sulfoconjugado N-4 el metabolito principal. La vida media del fármaco en la circulación es de cinco a seis horas [2].

### 2.3.3. Reacciones adversas de la metoclopramida

Las reacciones adversas de un medicamento (RAM) se describen según el sistema de clasificación de órganos. Las frecuencias se han definido según la siguiente convención: muy frecuentes ( $\geq 1/10$ ), frecuentes ( $\geq 1/100$ ,  $< 1/10$ ), poco frecuentes ( $\geq 1/1000$ ,  $< 1/100$ ), raras ( $\geq 1/10.000$ ,  $< 1/1000$ ), muy raras ( $< 1/10.000$ ), frecuencia no conocida (no puede estimarse a partir de los datos disponibles) [2]. En la tabla 2.3., Se detallan las RAM de la metoclopramida.

**TABLA 2.3.** Reacciones adversas de la metoclopramida [11].

Sistema de clasificación de órganos	Frecuencia	Reacciones adversas
<b>Trastornos del sistema inmunológico</b>		
	Poco frecuentes	Hipersensibilidad.
	Frecuencia no conocida	Reacción anafiláctica (incluyendo shock anafiláctico particularmente con presentaciones intravenosas).
<b>Trastornos de la sangre y del sistema linfático</b>		
	Frecuencia no conocida	Metahemoglobinemia, que podría estar relacionada con una deficiencia en la NADH citocromo b5 reductasa, especialmente en neonatos. Sulfohemoglobinemia, principalmente en la administración concomitante de dosis altas de medicamentos que liberan azufre.
<b>Trastornos cardiacos</b>		



	Poco frecuentes	Bradicardia, particularmente con presentaciones intravenosas.
	Frecuencia no conocida	Paro cardiaco, que ocurre poco después del uso inyectable, y que puede ser una consecuencia de bradicardia.  Bloqueo atrioventricular, Paro sinusal particularmente con las presentaciones intravenosas; Electrocardiograma QT prolongado; Torsade de Pointes.

#### **Trastornos endócrinos\***

	Poco frecuentes	Amenorrea, Hiperprolactinemia.
	Raras	Galactorrea.
	Frecuencia no conocida	Ginecomastia.

#### **Trastornos gastrointestinales**

	Frecuentes	Diarrea.
--	------------	----------

#### **Trastornos generales y alteraciones en el lugar de administración**

	Frecuentes	Astenia.
--	------------	----------

#### **Trastornos del sistema nervioso**

	Muy frecuentes	Somnolencia.
	Frecuentes	Trastornos extrapiramidales (especialmente en niños y adultos jóvenes y/o cuando se ha excedido la dosis recomendada, incluso siguiendo la administración de una única dosis de este medicamento, Parkinsonismo, Acatisia.
	Poco frecuentes	Distonía (incluidas alteraciones visuales y crisis oculógira), Discinesia, Nivel de consciencia disminuido.
	Raras	Convulsiones especialmente en pacientes epilépticos.
	Frecuencia no conocida	Discinesia tardía que podría ser persistente, durante o después de un tratamiento prolongado, particularmente en pacientes de

		edad avanzada. Síndrome neuroléptico maligno.
<b>Trastornos psiquiátricos</b>		
	Frecuentes	Depresión
	Poco frecuentes	Alucinación.
	Raras	Estado de confusión.
	Frecuencia no conocida	Ideación suicida.
<b>Trastornos vasculares</b>		
	Frecuentes	Hipotensión, particularmente con fórmulas intravenosas
	Frecuencia no conocida	Shock, síncope después del uso inyectable, hipertensión aguda en pacientes con o sin feocromocitoma. Aumento transitorio de la presión arterial.

\*Trastornos endocrinos durante tratamiento prolongado en relación con hiperprolactinemia (amenorrea, galactorrea, ginecomastia).

Las siguientes reacciones, algunas veces asociadas, suceden más frecuentemente cuando se usan dosis altas:

Síntomas extrapiramidales: distonía aguda y discinesia, síndrome de Parkinson, acatisia, incluso después de la administración de una dosis única del medicamento, particularmente en niños y adultos jóvenes.

Somnolencia, nivel de consciencia disminuido, confusión, alucinación.

#### **2.4. Agentes procinéticos que estimulan la motilidad gastrointestinal**

Anteriormente se detalló la clasificación que el WHOCC, le dio a la metoclopramida en cuanto a su ATC, es por ello, por lo que en este párrafo se detalla a los agentes procinéticos. Los cuales son medicamentos que mejoran la motilidad gastrointestinal coordinada y el tránsito de material en el tracto gastrointestinal. Dichos agentes potencian la liberación de neurotransmisores excitadores en la unión nervio-músculo sin interferir con el patrón fisiológico normal y el ritmo de la motilidad [13].

## **2.5. Antagonistas de los receptores de dopamina**

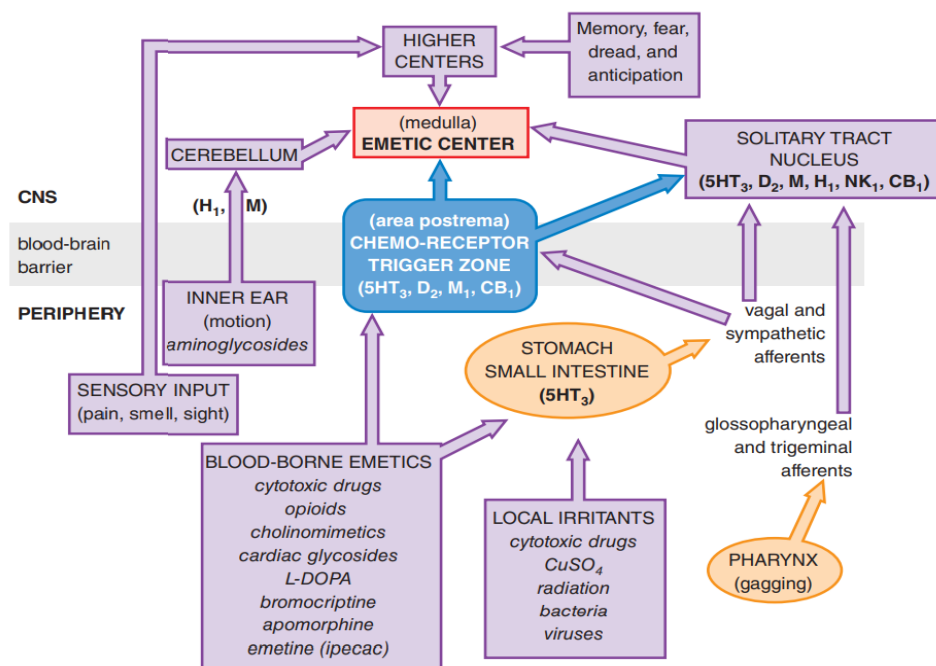
Los antagonistas de los receptores de dopamina son eficaces como agentes procinéticos. Tienen la ventaja de aliviar las náuseas y vómitos mediante el antagonismo de los receptores de dopamina en la CTZ (zona de activación de quimiorreceptores) del tronco encefálico. La dopamina se encuentra presente en cantidades significativas en el tracto gastrointestinal y tiene varios efectos inhibitorios sobre la motilidad, incluida la reducción del esfínter esofágico inferior y las presiones intragástricas. Estos efectos, que resultan de la supresión de la liberación de ACh (acetilcolina) de las neuronas motoras mientéricas, están mediados por los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, como ejemplos tenemos a la metoclopramida y domperidona [13].

## **2.6. Antinauseosos y antieméticos**

La emesis y la sensación de náusea que frecuentemente la acompaña, se considera componentes de un reflejo protector que sirve para eliminar sustancias tóxicas del estómago y el intestino y para evitar su posterior ingestión. El vómito parece estar coordinado por un centro de emesis central en la formación reticular lateral del mesencéfalo adyacente tanto a la CTZ como al STN. El centro de emesis recibe información del intestino, a través del STN y a través de la médula espinal. Otras dos entradas importantes al centro de emesis provienen de la corteza cerebral y el aparato vestibular [13].

La falta de una barrera hematoencefálica en el CTZ permite monitorear la sangre y el líquido cefalorraquídeo constantemente en busca de sustancias tóxicas y transmitir información al centro de emesis para desencadenar náuseas y vómitos. La CTZ tiene altas concentraciones de receptores para serotonina (5HT<sub>3</sub>), dopamina (D<sub>2</sub>), ACh (muscarínico M<sub>1</sub>), neuroquinina (NK<sub>1</sub>), cannabinoides (CB<sub>1</sub>) y opioides [13].

El STN es rico en receptores para encefalina, histamina y ACh y también expresa receptores 5HT<sub>3</sub>. Numerosos agonistas de neurotransmisores para estos receptores participan en las náuseas y los vómitos. Los antieméticos por lo general se clasifican de acuerdo con el receptor predominante sobre el cual se propone que actúen [13].



**Fig. 2. 1. Estímulos eméticos**

En la fig. 2.1, se muestra la visión del farmacólogo sobre los estímulos eméticos. Muchas vías de señalización conducen desde la periferia hasta el centro emético. Estas vías involucran neurotransmisores específicos y sus receptores. Se muestran los receptores para dopamina (D<sub>2</sub>), ACh (muscarínico, M), histamina (H<sub>1</sub>), cannabinoides (CB<sub>1</sub>), sustancia P (NK<sub>1</sub>) y 5HT<sub>3</sub>. Algunos de estos receptores también pueden mediar en la señalización en el centro emético [13].

Las náuseas son distintas a las de la emesis y son un efecto secundario frecuente de los medicamentos, así como una característica común de enfermedades que van desde trastornos del STN, hasta trastornos gastrointestinales e infecciones. Los centros cerebrales involucrados en la sensación de náusea están ubicados en regiones cerebrales más altas que los centros eméticos e incluyen las cortezas insulares, cingulada anterior, orbitofrontal, somatosensorial y prefrontal [13].

## 2.7. Metodología Analítica

Existen varios métodos para la estimación del clorhidrato de metoclopramida, los cuales corresponden a:

- Método de titulación potenciométrica
- Espectrofotométrico visible
- Potenciométrico
- Espectrofluorimétrico
- Quimioluminiscente por inyección de flujo
- LC –ESIMS
- HPLC
- Fluorescencia continua extinguida.

Estos métodos requieren instrumentos costosos o sofisticados y no son simples para el análisis de rutina [14].

### 2.7.1. Método de análisis

En la tabla 2.4, se muestra los diferentes métodos químicos analíticos para la cuantificación de metoclopramida clorhidrato en solución inyectable, tabletas y solución oral.

**TABLA 2.4.** *Métodos químicos analíticos*

<b>Forma Farmacéutica</b>	<b>Método de Análisis</b>	<b>Bibliografía</b>
Solución Inyectable	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	USP (Farmacopea de los Estados Unidos)
Solución Oral		
Tabletas	Espectrofotometría UV-Vis	Farmacopeia Brasileira

### 2.8. Validación de métodos analíticos

La Norma ISO/IEC 17025, establece dentro de sus directrices que, los laboratorios deben de validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma. Esta normativa ha ayudado a clarificar el significado de validar un método analítico. Así como de exigir a los laboratorios que demuestren que los métodos deben adecuarse a su uso previsto [15].

## 2.9. Espectrofotometría

Las técnicas espectrofotométricas se basan en la absorción de energía electromagnética por parte de las moléculas, estas dependen tanto de la concentración como de sus estructuras químicas. Según el rango de frecuencia de la energía electromagnética aplicada, la espectrofotometría de absorción puede dividirse en ultravioleta, visible e infrarroja, y puede utilizarse como técnica para la identificación y cuantificación de sustancias [16].

## 2.10. Radiación electromagnética

Cabe considerar que, la radiación electromagnética es una forma de energía que se propaga como ondas y generalmente se puede subdividir en regiones de longitud de onda característica. Aun así, también puede considerarse como un flujo de partículas llamadas fotones (o cuantos). Cada fotón contiene una cierta energía cuya magnitud es proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda [16].

La longitud de onda ( $\lambda$ ) generalmente se especifica en nanómetros, nm y en algunos casos, en micrómetros,  $\mu\text{m}$ . En el caso del infrarrojo, la radiación electromagnética también puede describirse en términos de número de onda y expresarse en  $\text{cm}^{-1}$ . Los rangos de longitud de onda de la energía electromagnética de interés para la espectrofotometría se describen en la tabla 2.5 [16].

**TABLA 2.5.** Rangos de longitud de onda [16].

Región	Rango de Longitud de Onda
Ultravioleta (UV)	100 - 380 nm
Visible (VIS)	380 - 780 nm
Infrarrojo cercano (NIR)	780 – 2500 nm (13300 – 4000 $\text{cm}^{-1}$ )
Infrarrojo medio (MIR)	4 – 25 $\mu\text{m}$ (2500 – 400 $\text{cm}^{-1}$ )
Infrarrojo lejano	25 – 300 $\mu\text{m}$ (400 – 33 $\text{cm}^{-1}$ )

## 2.11. Métodos de adquisición de espectro

Los espectros se pueden obtener utilizando diferentes métodos de adquisición. A continuación, se detallan estos:

- Espectrofotometría UV/VIS, el método principal es la transmisión.
- Espectrofotometría NIR y MIR, los espectros se pueden adquirir utilizando el método de transmisión y reflexión. Esta última se subdivide en reflexión difusa y reflexión total atenuada.

También existe la posibilidad de combinar métodos de transmisión y reflexión, llamados transreflexión [16].

A continuación, se detallan las definiciones de cada caso:

La transmisión, es la medida de la disminución de la intensidad de la radiación a determinadas longitudes de onda cuando la radiación atraviesa la muestra. La muestra se dispone en el haz óptico entre la fuente y el detector [16].

La transmisión (T) se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

$I_0$  = intensidad de la radiación incidente

I = intensidad de la radiación transmitida

Los espectros de emisión se pueden convertir a absorbancia:

$$A = \text{Log}_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right)$$

La reflexión difusa, es la medida de la relación entre la intensidad de la luz reflejada por la muestra y la luz reflejada por una superficie de referencia reflectante. La radiación no absorbida se refleja hacia el detector [16].

En la reflexión total atenuada, la radiación infrarroja se propaga en el interior de un elemento reflectante internamente (alto índice de refracción) a través de reflejos en las paredes de este elemento. La muestra se pone en contacto con la pared de este elemento de reflexión donde interactúa con la radiación infrarroja (onda evanescente) [16].

La transreflexión, es la combinación de los métodos de transmisión y reflexión. En la medición de transreflexión, se usa un espejo o una superficie reflectante para reflejar la radiación transmitida a través de la muestra, golpeándola una segunda vez para luego desviar la trayectoria óptica. La radiación no absorbida se refleja hacia el detector [16].

## **2.12. Instrumentación utilizada en Ultravioleta (UV) y Visible (VIS)**

Los espectrofotómetros utilizados en la región ultravioleta y visible están fundamentalmente equipados. Estos cuentan con, una fuente de radiación; un selector de longitud de onda; celdas de absorción (cubetas) para la inserción de soluciones de muestra en el haz de luz monocromática; un detector de radiación y una unidad de lectura y procesamiento de señales [16].

Los instrumentos para las regiones UV/VIS suelen estar equipados con uno o más dispositivos para restringir la radiación que se mide a una banda estrecha que es absorbida o emitida por el analito. Las lámparas más utilizadas como fuente de radiación en espectrofotometría en la región ultravioleta y visible son las de deuterio y tungsteno, que proporcionan una radiación entre 160 y 380 nm y 320 y 2500 nm, respectivamente [16].

Los equipos que utilizan un monocromador o filtro para aislar la banda de longitud de onda deseada, solo se detectan y miden la banda de interés. Los monocromadores generalmente tienen una rejilla de difracción, mientras que los filtros pueden ser de interferencia o de absorción. Los fotómetros o colorímetros son instrumentos más simples que usan un filtro para seleccionar la longitud de onda y generalmente se usan en la región visible [16].

Las cubetas, son compartimentos utilizados para recibir la muestra, estas deben tener ventanas que sean transparentes en la región espectral de interés. Para la región UV se necesitan cubetas de cuarzo, mientras que para la región VIS se pueden utilizar cubetas de vidrio o acrílico [16].

Los fototubos, son los principales tipos de detectores de las matrices de fotodiodos y los dispositivos de transferencia de carga. Estos son los detectores más simples y su respuesta



se basa en el efecto fotoeléctrico. El detector de matriz de diodos permite monitorear todas las longitudes de onda simultáneamente [16].

Los espectrofotómetros se pueden encontrar en configuraciones de:

- Un solo haz
- Doble haz
- Multicanal

Los instrumentos de, un solo haz son aquellos en los cuales el haz de luz sigue una única trayectoria entre la fuente y el detector. Los de doble haz tienen la ventaja de compensar cualquier fluctuación en la potencia radiante de la fuente en comparación con los instrumentos de un solo haz. Los multicanal son más recientes y utilizan detectores de matriz de diodos y dispositivos de transferencia de carga, lo que permite obtener el espectro completo de una muestra en menos de un segundo. En estos instrumentos, el sistema dispersivo es un espectrógrafo de celosía colocado después de la celda de muestra [16].

Los espectrofotómetros tienen registradores gráficos que permiten obtener espectros de absorción. Esta característica es importante para la caracterización de sustancias a partir de la obtención de las longitudes de onda donde se obtienen las absorbancias más altas. La mayoría de los espectrofotómetros cuentan con conexión a una microcomputadora y un programa apropiado, que permite obtener los espectros de absorción de sustancias en medios digitales [16].

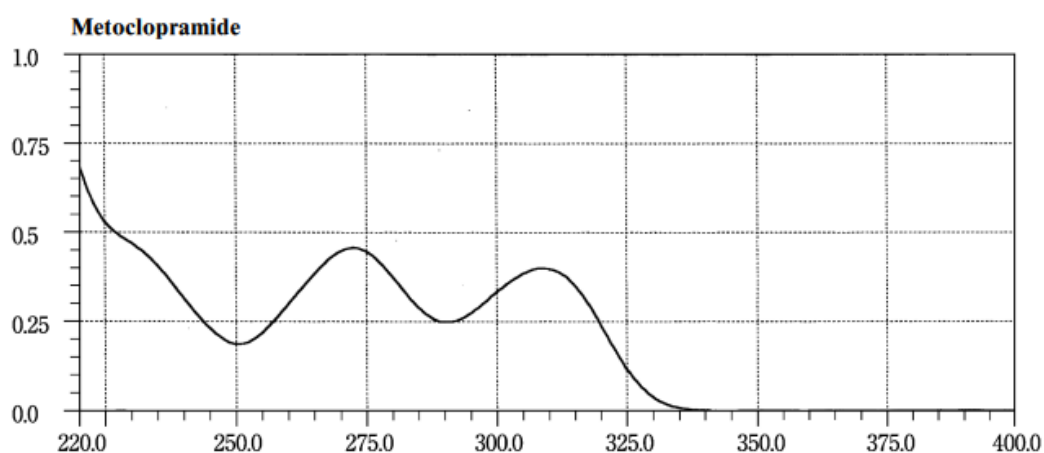
### **2.13. Identificación por Espectrofotometría**

La identificación de varias sustancias farmacéuticas se puede realizar utilizando las regiones ultravioletas, visible, del infrarrojo medio y del infrarrojo cercano. A pesar de ser más sensibles, los espectros obtenidos en las regiones UV/VIS tienen menor especificidad en comparación con los espectros en la región MIR. Cuando sea posible, el espectro obtenido debe compararse con el espectro de la sustancia química de referencia [16].

### **2.14. Ultravioleta (UV) y visible (VIS)**

Varias monografías incluyen espectros de absorción ultravioleta como prueba de identificación. En estos casos, se especifica la longitud del barrido espectral, el solvente, la concentración de la solución y el grosor de la cubeta (camino óptico). Algunos medicamentos requieren el uso de estándares de referencia [16].

Para la caracterización mediante espectrofotometría UV/VIS, el fármaco se disuelve utilizando un disolvente adecuado. Tales como: agua, alcoholes, éteres y soluciones diluidas de ácidos y alcalinas. Finalmente se verifica que los solventes no absorban en la región espectral que se está utilizando [16]. A continuación, se muestra en la Fig. 2.2, el espectro de referencia de la metoclopramida.



**Fig. 2. 2** Espectro de referencia de la metoclopramida [17].

## 2.15. Uso Cuantitativo de la Espectrofotometría

El análisis espectrofotométrico cuantitativo por absorción se basa en la relación directa entre la cantidad de luz absorbida y la concentración de la sustancia, conocida como ley de Beer [16]. Dentro de este marco, se puede decir que es una técnica analítica, que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Cuando la concentración (c) se expresa en mol. L<sup>-1</sup> y la trayectoria de la luz (b) en centímetros, la ecuación se convierte en:

$$A = \epsilon bc$$

En que

A = absorbancia, logaritmo de la transmitancia inversa ( $A = -\log T$ )

$\epsilon$  = absorptividad molar.

T = transmitancia

Sabiendo que la transmitancia es el cociente entre la intensidad de la radiación transmitida por la solución (I) y la intensidad de la radiación incidente ( $I_0$ ), tenemos:

$$\log_{10}(I_0/I) = A = \epsilon bc$$

La intensidad de absorción de la luz ultravioleta por las sustancias cromóforas se expresa, en general, como absorptividad molar, en condiciones de máxima absorción. Si no se conoce la masa molar de la sustancia, es posible expresar la intensidad de absorción mediante la ecuación de la capacidad de absorción específica – A (1 %, 1 cm):

$$A(1\%, 1cm) = A/bc$$

Por lo tanto, se puede resaltar que, A (1%, 1 cm) corresponde a la absorbancia de la solución al 1% (p/v) de la sustancia, cuando el camino óptico es de 1 cm. Finalmente, para evitar posibles desviaciones en la ley de Beer, se debe intentar trabajar con soluciones diluidas (del orden de 0,01 M), evitando asociaciones entre moléculas, y con radiación monocromática [16].

## 2.16. Características de desempeño

Las características típicas de validación [18], que se deben tener en cuenta, se enumeran a continuación:

- Exactitud
- Precisión
- Selectividad / Especificidad
- Límite de Detección
- Límite de cuantificación
- Linealidad
- Incertidumbre
- Intervalo

- Robustez

### **2.16.1. Exactitud**

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real. La exactitud debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico [18] [19].

### **2.16.2. Precisión**

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea [18], [19].

En términos reales más bien se debe considerar la imprecisión que corresponde, aproximadamente, al término dispersión y variabilidad analítica. La imprecisión se determina haciendo ensayos repetitivos de una misma muestra analítica o de cada conjunto de muestras analíticas y luego se calcula la desviación estándar, siendo muy importante en este caso la homogeneidad del sustrato [20].

### **2.16.3. Selectividad / Especificidad**

La especificidad es la capacidad de un método para evaluar inequívocamente al analito en presencia de los componentes que pueden estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc. La falta de especificidad de un método analítico puede ser compensada por otros procedimientos analíticos [18] [21].

### **2.16.4. Límite de Detección**

El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto [18], [22].

#### **2.16.5. Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con la precisión y exactitud adecuadas. El límite de cuantificación es un parámetro de los ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación [18], [22].

#### **2.16.6. Linealidad**

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado [18].

#### **2.16.7. Incertidumbre**

La incertidumbre es el parámetro asociado al resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mesurando. El mesurando se refiere al analito o a la propiedad que estamos determinando, por lo tanto, éste debe interpretarse correctamente para considerar todas las fuentes de incertidumbre asociada al análisis [23].

#### **2.16.8. Intervalo**

Lineal: Intervalo de concentración de analito sobre el cual el método produce resultados proporcionales a la misma [24].

De trabajo o lectura directa: Intervalo de concentración donde actúa el método en cuestión, sin ninguna dilución. Debe estar incluido en el rango lineal [24].

De aplicación del método: Intervalo de concentración para el método incluyendo la mayor dilución permitida para una muestra. En general se acepta hasta una dilución de cien veces, a menos de que el método no lo permita [24].

### **2.16.9. Robustez**

La robustez de un procedimiento analítico, es la medida de la capacidad de este, para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicado, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico [18].

# CAPÍTULO 3

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1. Escenario y ámbito de estudio

Como escenario para la ejecución de la presente tesis, se eligió las instalaciones del área de análisis físico-químicos de medicamentos, del laboratorio de referencia de la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria en la ciudad de Guayaquil.

### 3.2. Tipo de estudio

El tipo de estudio del trabajo realizado se clasificó como descriptivo, puesto que se realizó un análisis estadístico [25], simultáneamente fue univariado, porque refirió y estimó el comportamiento de la variable referente a los parámetros en la población de estudio a partir de una muestra [26]. Finalmente, fue transversal siendo que implicó la recolección de datos en un sólo corte en el tiempo.

#### 3.2.1. Tipo de diseño

Es conveniente indicar que el tipo de diseño en el trabajo ejecutado, correspondió a un diseño experimental, puesto que se demostró la idoneidad del método espectrofotométrico UV-visible para la cuantificación de metoclopramida clorhidrato, en inyectables.

### 3.3. Muestra de estudio

#### 3.3.1. Muestra

Las muestras colectadas fueron tomadas usando un muestreo aleatorio, seleccionando 70 ampollas de metoclopramida clorhidrato de 10 mg/2mL.

### **3.4. Diseño experimental**

#### **3.4.1. Objetivo**

Mostrar el diseño experimental a seguir durante el proceso de verificación del procedimiento para la cuantificación del analito de metoclopramida HCl en inyectables, mediante método espectrofotométrico.

#### **3.4.2. Alcance e intervalo de trabajo**

Aplicable para la cuantificación del analito de metoclopramida HCl, en inyectables de concentración de 10mg/2mL [27].

#### **3.4.3. Método de referencia**

Farmacopea Brasileña - Volumen II, clorhidrato de metoclopramida, solução injetável, sexta edición, EF097-00, página 606, año 2019.

Técnica: Espectrofotometría de absorción en ultravioleta

#### **3.4.4. Método analítico por espectrofotometría uv-visible**

##### **3.4.4.1. Condiciones del espectrofotómetro**

En la tabla 3.1, se detallan las condiciones del espectrofotómetro.



**TABLA 3.1. Condiciones del espectrofotómetro**

<b>Equipo</b>	Espectrofotómetro UV-VIS
<b>Marca</b>	Thermo Scientific
<b>Modelo</b>	Evolution 300 UV
<b>Detector</b>	Fotodiodo de silicio
<b>Celda</b>	Cuarzo de 1 cm
<b>Longitud de onda analítica</b>	309 nm
<b>Rango de espectro</b>	190-1100 nm

### **3.4.5. Preparación de soluciones reactivas**

#### **3.4.5.1. Ácido clorhídrico (HCL 0.1 M)**

Se preparó una solución de ácido clorhídrico 0.1M.

### **3.4.6. Preparación del estándar para la curva de calibrado**

Solución estándar madre: Se pesó 10,0 mg de estándar de referencia de metoclopramida HCl, se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL, y se agregó 15 mL de ácido clorhídrico (HCL) 0,1M, este se colocó en el ultrasonido hasta disolución y fue enrasado con el mismo solvente.

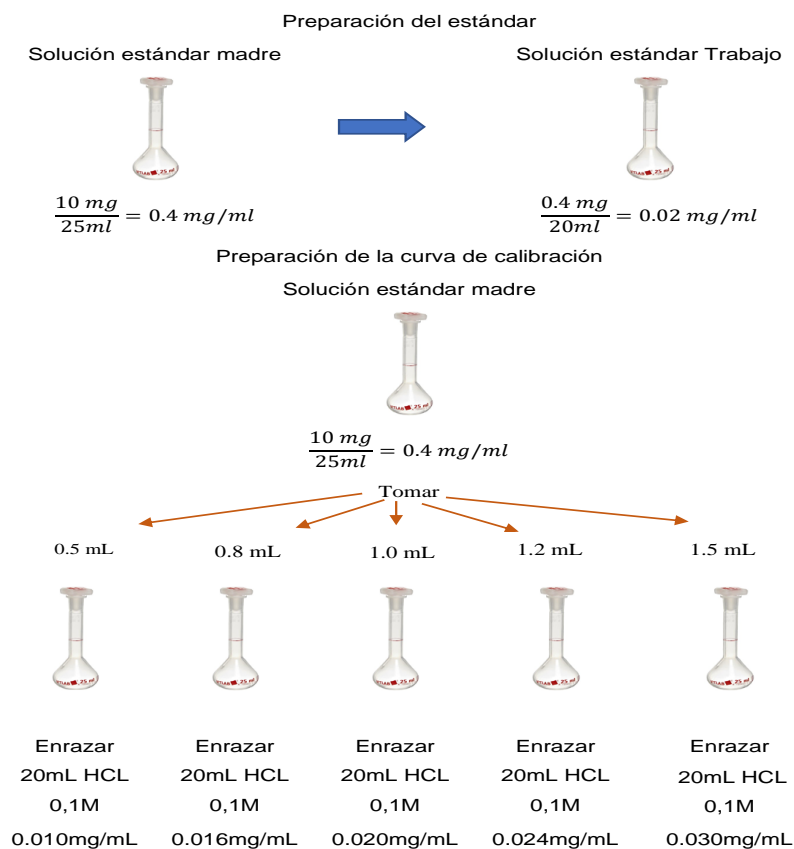
Solución estándar trabajo: Se tomó una alícuota de 1 mL de solución estándar madre y se transfirió al matraz volumétrico de 20 mL, finalmente se agregó HCL 0,1M hasta enrase, obteniendo una concentración final de 0,02 mg/mL.

Preparación de la curva de calibración de metoclopramida. – La curva de calibración se preparó, tomando alícuotas de 0.5 mL, 0.8 mL, 1 mL, 1.2 mL y 1.5 mL de la solución estándar madre y se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL en cada caso, se agregó HCL 0,1M hasta enrase, obteniendo las concentraciones finales de 0.010 mg/mL, 0.016 mg/mL, 0.020 mg/mL, 0.024 mg/mL y 0.030 mg/mL. A continuación, se detalla la preparación en las diferentes soluciones en la tabla 3.2.

**TABLA 3.2.** Preparación de curva de calibración.

Concentración de la solución estándar madre	Volumen de la Solución estándar madre	Volumen de aforo con el medio de disolución	Concentración de la solución de Stock (curva de calibración)	Concentración nominal	
				(mg)	(%)
0.4 (mg/mL)	0.5 (mL)	20.0 (mL)	0.010 (mg/mL)	5	50
0.4	0.8	20.0	0.016	8	80
0.4	1.0	20.0	0.020	10	100
0.4	1.2	20.0	0.024	12	120
0.4	1.5	20.0	0.030	15	150

Seguidamente, se muestra de manera esquemática la preparación del estándar y curva de calibrado en la Fig. 3.1.



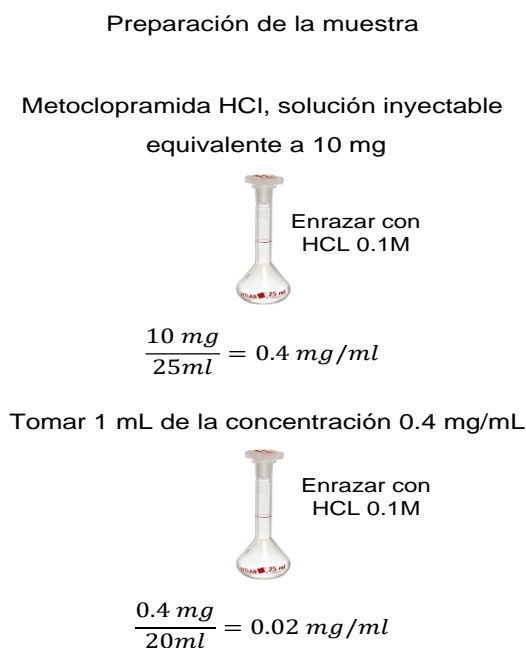
**Fig. 3.1.** Presentación esquemática de la preparación del estándar y de la curva de calibración

### 3.4.7. Preparación de las muestras

Se transfirió un volumen de la solución inyectable, equivalente a unos 10 mg de metoclopramida HCl a un matraz volumétrico de 25 mL, se agregó aproximadamente 15 mL de ácido clorhídrico 0,1M, se homogenizó y se llevó a volumen con el mismo solvente.

De esta solución se tomó una alícuota de 1 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se agregó ácido clorhídrico 0,1M hasta enrase, obteniendo una concentración final de 0,02 mg/mL.

A continuación, se muestra de manera esquemática la preparación de la muestra en la Fig. 3.2.



**Fig. 3.2.** Presentación esquemática de la preparación de la muestra

Lectura:

Se midió las absorbancias de las soluciones del estándar y de la muestra en un espectrofotómetro UV a 309 nm, utilizando ácido clorhídrico 0,1M como blanco para el ajuste de cero en celdas de 1 cm.

Se procedió a realizar los cálculos de la cantidad de C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>CIN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>.HCl en la solución inyectable, a partir de las lecturas obtenidas.

Cálculos:

$$y = mx \pm b[28]$$

Dónde:

**y** es la absorbancia

**m** es la pendiente de la recta

**x** es la concentración del analito, representada en el eje de abscisas

**b** punto intercepto

Tomando dos puntos de la recta, se calculó la pendiente, y se obtuvo la concentración [29] de analito midiendo la señal acorde a la siguiente ecuación:

$$x = (y \pm b)/m$$

Se aplicó el FD multiplicando por la concentración obtenida inicialmente.

Además, de la determinación de las concentraciones de analitos en muestras, de las curvas de calibrado; también se utilizaron para comprobar el correcto funcionamiento de instrumentos analíticos.

El contenido del IFA (ingrediente farmacéutico activo) del producto objeto de análisis es de 90 % a 110 %, acorde a la Farmacopea de referencia [27] [12].

### 3.4.8. Reactivos, disolventes, materiales y equipos

**TABLA 3.3** *Reactivos*

Reactivos					
Nombre	Fórmula Química	Marca	Grado	Lote	Fecha de vencimiento

Ácido Clorhídrico fumante 37%	HCL	Merck	ACS, ISO, Reag. Ph Eur	K51376417	2024-04-30
-------------------------------	-----	-------	------------------------	-----------	------------

**TABLA. Disolventes**

Disolventes	
Nombre	Tipo
Agua	Tipo I (Ultrapura)

**TABLA 3.4. Materiales**

Materiales		
Nombre	Capacidad	Clase/ Tolerancia
Matraz aforado	25 mL	AW
Matraz aforado	20 mL	A
Pipeta aforada	1 mL	B
Celdas de cuarzo	n/a	N/A
Papel absorbente	n/a	N/A

**TABLA 3.5. Equipos**

Equipos					
Nº	Nombre	Marca	Modelo	Nº Serie	Fecha de calibración
1	Espectrofotómetro	Thermo Scientific	Evolution 300 UV	EVOL 354001	2021-11-22
2	Balanza	Sartorius	MSA224S	26202353	2021-11-04
3	Ultrasonido	Branson	8510	103586	Mantenimiento preventivo
4	Micropipeta	Rainin instrument	Pipet Lite XLS	G1491310T	2021-11-22

Nota: Equipos instrumentales verificados y calibrados por la empresa ELICROM CIA. LTDA., garantizando el cumplimiento de la norma vigente.

### 3.4.9. Validación del método de cuantificación del principio activo

#### 3.4.9.1. Parámetros aplicables para la verificación del método analítico para la cuantificación del principio activo por espectrofotometría UV-VIS

Es significativo demostrar los parámetros que se utilizaron para valorar el desempeño del método en la verificación de un procedimiento analítico. Es por ello que se precisaron las necesidades analíticas con sus concernientes particularidades de desempeño, tal como se especifica en la tabla 3.6.

**TABLA 3.6.** Características de desempeño

PARÁMETRO	OBJETIVO
Exactitud	IC debe ser del 90 - 110%
Precisión	Repetibilidad Sr Coeficiente de variación CV o desviación estándar relativa RSD $\leq$ 2.00 % (0.2) en todos los niveles
	Reproducibilidad SR Coeficiente de variación CV o desviación estándar relativa RSD $\leq$ 2.00 % (0.2) en todos los niveles
Selectividad / Especificidad	No debe presentar interferencias con otros analitos
Límite de Detección	3SD
Límite de cuantificación	10SD
Linealidad	Coeficiente de determinación $r^2 \geq$ 0.995
Incertidumbre	$\leq$ 5% en todos los niveles
Intervalo	5 a 15 mg (50.0 % - 150.0 %)
Robustez	Variación de envases: <ul style="list-style-type: none"><li>• Ámbar</li><li>• Transparentes</li></ul> Variación del tiempo, con lecturas a las: <ul style="list-style-type: none"><li>• 0 horas (Inmediata)</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"><li>• 24 horas</li><li>• 48 horas</li><li>• 72 horas</li></ul> <p>Variación de temperatura, a:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Temperatura ambiente</li><li>• Refrigeración</li></ul> <p>Variación de la concentración del ácido clorhídrico:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Concentración mayor (1M)</li><li>• Concentración de trabajo (0.1M)</li><li>• Concentración menor (0.01M)</li></ul>
--	--

# CAPÍTULO 4

## 4. RESULTADOS

Una vez que se finalizó la verificación del método analítico, se procedió a describir el cumplimiento de cada uno de los objetivos, en base a los resultados obtenidos:

1. Cumplimiento de las especificaciones establecidas en el método alterno del laboratorio de referencia.
2. Metodología analítica desarrollada para la cuantificación de metoclopramida clorhidrato en inyectables por espectrofotometría.
3. Cumplimiento con los parámetros de desempeño en la verificación del método para la cuantificación de metoclopramida clorhidrato en inyectables.

### 4.1. Exactitud

La exactitud se evaluó realizando una curva de calibración del estándar de metoclopramida clorhidrato en el rango de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL, incluyendo un punto adicional cuya concentración conocida correspondió a 0.018 mg/mL, de la cual, con la lectura de la absorbancia se calculó el porcentaje de la concentración obtenida; en la tabla 4.1, se muestra la data de la evaluación de la exactitud del método de estudio.

**TABLA 4. 1.** Evaluación de la exactitud del método en estudio

Muestra	Absorbancia	Concentración conocida de la muestra(mg)	Concentración obtenida (mg)	Porcentaje (%)
1	0,547	0,018	9,11	91,11
2	0,555	0,018	9,13	91,34
			<b>Promedio</b>	<b>91,22</b>



Tal como se puede observar en la tabla 4.1, el promedio del porcentaje obtenido fue de 91,22 %, con este dato se puede concluir, que se cumple con el criterio de aceptación propuesto, en otras palabras, está dentro del Intervalo de Confianza del 90 al 110 %.

## 4.2. Precisión del método

### 4.2.1. Repetibilidad

La precisión expresada por la repetibilidad, se la efectuó en tres niveles de trabajo; el nivel alto y bajo, con un estándar primario USP de metoclopramida HCl, y el nivel medio con muestras reales de metoclopramida HCl inyectable de 10 mg/2mL; cada nivel se ejecutó con 10 réplicas por nivel y por analista, en condiciones de repetibilidad. Este ensayo se lo analizó con 3 analistas.

Las muestras fueron analizadas y se les calculó la concentración detectada en cada muestra. Al mismo tiempo se les calculó los datos estadísticos como promedio de la concentración, desviación estándar, porcentaje de coeficiente de variación y varianza. Estos datos estadísticos implican en que no debe existir diferencia significativa en el ensayo bajo las mismas condiciones.

En las tablas 4.2, 4.3, 4.4, se muestran los datos estadísticos de los tres niveles trabajados en tres días diferentes.

**TABLA 4. 2.** Datos estadísticos nivel alto día 1 por tres analistas

Día 1				
Analista	Nivel	Absorbancia	Concentración esperada (mg)	Concentración obtenida (mg)
1	Nivel alto 15 mg	0,914	15,00	14,85
		0,916	15,00	14,89
		0,908	15,00	14,76
		0,910	15,00	14,79
		0,923	15,00	15,00
		0,924	15,00	15,02

		0,925	15,00	15,03
		0,924	15,00	15,02
		0,924	15,00	15,02
		0,925	15,00	15,03
2	Nivel alto 15 mg	0,915	15,00	15,07
		0,912	15,00	15,02
		0,902	15,00	14,85
		0,891	15,00	14,67
		0,913	15,00	15,03
		0,915	15,00	15,07
		0,913	15,00	15,03
		0,907	15,00	14,94
		0,908	15,00	14,95
		0,916	15,00	15,08
3	Nivel alto 15 mg	0,931	15,00	15,15
		0,926	15,00	15,07
		0,917	15,00	14,92
		0,901	15,00	14,66
		0,923	15,00	15,02
		0,926	15,00	15,07
		0,922	15,00	15,00
		0,918	15,00	14,94
		0,920	15,00	14,97
		0,927	15,00	15,08

**TABLA 4. 3.** Datos estadísticos nivel medio día 2 por tres analistas

Día 2				
Analista	Nivel	Absorbancia	Concentración esperada (mg)	Concentración obtenida (mg)
1	Nivel Medio 10 mg	0,651	10,00	10,57
		0,653	10,00	10,60

		0,654	10,00	10,62
		0,649	10,00	10,54
		0,650	10,00	10,56
		0,652	10,00	10,59
		0,644	10,00	10,46
		0,646	10,00	10,49
		0,648	10,00	10,52
		0,650	10,00	10,56
2	Nivel Medio 10 mg	0,633	10,00	10,54
		0,634	10,00	10,56
		0,634	10,00	10,56
		0,635	10,00	10,57
		0,636	10,00	10,59
		0,636	10,00	10,59
		0,635	10,00	10,57
		0,635	10,00	10,57
		0,637	10,00	10,60
		0,638	10,00	10,62
3	Nivel Medio 10 mg	0,651	10,00	10,65
		0,652	10,00	10,67
		0,648	10,00	10,60
		0,649	10,00	10,62
		0,644	10,00	10,54
		0,645	10,00	10,55
		0,643	10,00	10,52
		0,643	10,00	10,52
		0,645	10,00	10,55
		0,646	10,00	10,57

**TABLA 4. 4.** Datos estadísticos nivel bajo día 3 por tres analistas

---

**Día 3**

---

<b>Analista</b>	<b>Nivel</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración esperada (mg)</b>	<b>Concentración obtenida (mg)</b>
1	Nivel bajo 5mg	0,313	5,00	5,15
		0,320	5,00	5,27
		0,319	5,00	5,25
		0,316	5,00	5,20
		0,321	5,00	5,28
		0,316	5,00	5,20
		0,319	5,00	5,25
		0,323	5,00	5,32
		0,321	5,00	5,28
		0,320	5,00	5,27
2	Nivel bajo 5mg	0,314	5,00	5,21
		0,318	5,00	5,27
		0,318	5,00	5,27
		0,317	5,00	5,26
		0,318	5,00	5,27
		0,317	5,00	5,26
		0,318	5,00	5,27
		0,315	5,00	5,22
		0,317	5,00	5,26
		0,314	5,00	5,21
3	Nivel bajo 5mg	0,323	5,00	5,23
		0,325	5,00	5,26
		0,328	5,00	5,31
		0,323	5,00	5,23
		0,324	5,00	5,24
		0,325	5,00	5,26
		0,321	5,00	5,20
		0,321	5,00	5,20
		0,322	5,00	5,21
		0,324	5,00	5,24

#### 4.2.1.1. Análisis estadístico ANOVA del nivel alto de concentración al 150 %

El cálculo del análisis de varianza de un factor (ANOVA) nos permitió de una forma eficiente obtener estimaciones de repetibilidad y precisión intermedia con un número adecuado de grados de libertad [30]. Considerando de esta manera evaluar la ausencia o presencia de diferencias significativas.

En la tabla 4.5., se detalla la data de los cálculos estadísticos de la muestra del nivel alto (150 %).

**TABLA 4. 5.** Data estadística del nivel alto de concentración al 150 %.

Concentración esperada (%)	Concentración obtenida (%)		
	ANALISTA 1 día 1	ANALISTA 2 día 1	ANALISTA 3 día 1
150,0	148,5	150,7	151,5
150,0	148,9	150,2	150,7
150,0	147,6	148,5	149,2
150,0	147,9	146,7	146,6
150,0	150,0	150,3	150,2
150,0	150,2	150,7	150,7
150,0	150,3	150,3	150,0
150,0	150,2	149,4	149,4
150,0	150,2	149,5	149,7
150,0	150,3	150,8	150,8
<b>Promedio</b>	<b>149,40</b>	<b>149,72</b>	<b>149,87</b>
<b>Promedio Total</b>	<b>149,66</b>		
<b>Desviación Estándar</b>	<b>1,08</b>	<b>1,27</b>	<b>1,35</b>
<b>Coeficiente de Variación</b>	<b>0,72</b>	<b>0,85</b>	<b>0,90</b>
<b>Varianza</b>	<b>1,17</b>	<b>1,62</b>	<b>1,82</b>

En la tabla 4.6., se muestran los cálculos estadísticos realizados mediante el ANOVA a las muestras de concentración al 150 %.

**TABLA 4. 6.** *Análisis de varianza de un factor de la concentración al 150 %*

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>Valor F calculado</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Valor crítico para F</b>
<b>Entre grupos</b>	1,11884658	2	0,55942329	<b>0,3634794</b>	0,69860324	<b>3,354131</b>
<b>Dentro de los grupos</b>	41,5551112	27	1,539078191			
<b>Total</b>	42,6739577	29				

Considerando lo antes mencionado en el nivel alto trabajado a 150 %, se puede demostrar que no hay diferencias estadísticamente significativas con diferentes analistas, ya que la F calculada es menor que la F crítica, demostrando que en este punto el método es preciso.

#### **4.2.1.2. Análisis estadístico ANOVA del nivel medio de concentración al 100 %**

El cálculo del análisis de varianza de un factor (ANOVA) nos permitió de una forma eficiente obtener estimaciones de repetibilidad y precisión intermedia con un número adecuado de grados de libertad [30]. Considerando de esta manera evaluar la ausencia o presencia de diferencias significativas.

En la tabla 4.7, se detalla la data de los cálculos estadísticos de la muestra del nivel medio (100 %).

**TABLA 4. 7.** *Data estadística del nivel medio de concentración al 100 %.*

	<b>Concentración obtenida (%)</b>
--	-----------------------------------

<b>Concentración esperada (%)</b>	<b>ANALISTA 1 día 2</b>	<b>ANALISTA 2 día 2</b>	<b>ANALISTA 3 día 2</b>
100,0	105,7	105,4	106,5
100,0	106,0	105,6	106,7
100,0	106,2	105,6	106,1
100,0	105,4	105,7	106,2
100,0	105,6	105,9	105,4
100,0	105,9	105,9	105,5
100,0	104,6	105,7	105,2
100,0	104,9	105,7	105,2
100,0	105,2	106,0	105,6
100,0	105,6	106,2	105,7
<b>Promedio</b>	<b>105,51</b>	<b>105,77</b>	<b>105,80</b>
<b>Promedio Total</b>	<b>105,69</b>		
<b>Desviación Estándar</b>	<b>0,50</b>	<b>0,25</b>	<b>0,54</b>
<b>Coeficiente de Variación</b>	<b>0,48</b>	<b>0,23</b>	<b>0,51</b>
<b>Varianza</b>	<b>0,25</b>	<b>0,06</b>	<b>0,29</b>

En la tabla 4.8., se muestra los cálculos estadísticos realizados mediante el ANOVA a las muestras de concentración al 100 %.

**TABLA 4. 8. Análisis de varianza de un factor de la concentración al 100 %**

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>Valor F calculado</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Valor crítico para F</b>
<b>Entre grupos</b>	0,4970463	2	0,248523152	<b>1,2329008</b>	0,307336618	<b>3,354131</b>
<b>Dentro de los grupos</b>	5,44255076	27	0,201575954			
<b>Total</b>	5,93959707	29				

Tomando como referencia los datos obtenidos en el nivel medio trabajado a 100 % se puede demostrar que no hay diferencias estadísticamente significativas con diferentes analistas, ya que la F calculada es menor que la F crítica, demostrando que en este punto el método es preciso.

#### 4.2.1.3. Análisis estadístico ANOVA del nivel bajo de concentración al 50 %

El cálculo del análisis de varianza de un factor (ANOVA) nos permitió de una forma eficiente obtener estimaciones de repetibilidad y precisión intermedia con un número adecuado de grados de libertad [30]. Considerando de esta manera evaluar la ausencia o presencia de diferencias significativas.

En la tabla 4.9., se detalla la data de los cálculos estadísticos de la muestra del nivel bajo (50 %).

**TABLA 4. 9.** Data estadística del nivel bajo de concentración al 50 %.

Concentración esperada (%)	Concentración obtenida (%)		
	ANALISTA 1 día 3	ANALISTA 2 día 3	ANALISTA 3 día 3
50,0	51,5	52,1	52,3
50,0	52,7	52,7	52,6
50,0	52,5	52,7	53,1
50,0	52,0	52,6	52,3
50,0	52,8	52,7	52,4
50,0	52,0	52,6	52,6
50,0	52,5	52,7	52,0
50,0	53,2	52,2	52,0
50,0	52,8	52,6	52,1
50,0	52,7	52,1	52,4
<b>Promedio</b>	<b>52,48</b>	<b>52,49</b>	<b>52,38</b>
<b>Promedio Total</b>	<b>52,45</b>		
<b>Desviación Estándar</b>	<b>0,49</b>	<b>0,27</b>	<b>0,34</b>



<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>0,93</b>	<b>0,52</b>	<b>0,65</b>
<b>Varianza</b>	<b>0,24</b>	<b>0,07</b>	<b>0,12</b>

En la tabla 4.10., se muestra los cálculos estadísticos realizados mediante el ANOVA a las muestras de concentración al 50 %.

**TABLA 4. 10.** Análisis de varianza de un factor de la concentración al 50 %

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>						
<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>Valor F calculado</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Valor crítico para F</b>
<b>Entre grupos</b>	0,07145905	2	0,035729523	<b>0,2496721</b>	0,780835018	<b>3,354131</b>
<b>Dentro de los grupos</b>	3,86385682	27	0,143105808			
<b>Total</b>	3,93531586	29				

En base a los datos obtenidos en el nivel bajo trabajado a 50 % se puede demostrar que no hay diferencias estadísticamente significativas con diferentes analistas, ya que la F calculada es menor que la F crítica, demostrando que en este punto el método es preciso.

En la tabla 4.11., se muestra el cálculo estadístico del porcentaje de repetibilidad de los tres niveles de concentración.

**TABLA 4. 11.** Cálculo del porcentaje de repetibilidad (Sr)

<b>Nivel</b>	<b>Promedio (%)</b>	<b>Sr</b>	<b>CV<sub>r</sub> %</b>
<b>Nivel alto</b>	149,66	0,75	0,50
<b>Nivel medio</b>	105,69	0,50	0,47
<b>Nivel bajo</b>	52,45	0,19	0,36

Finalmente, con el cálculo del coeficiente de variación (CV) de cada nivel trabajado, se puede verificar que los resultados obtenidos, cumplen con el criterio de aceptación establecido para el coeficiente de variación  $\leq 2.00$  % en cada nivel.

#### 4.2.2. Reproducibilidad

La precisión expresada por la reproducibilidad, se la efectuó en tres niveles de trabajo; el nivel alto y bajo, con un estándar primario USP de metoclopramida HCl, y el nivel medio con muestras reales de metoclopramida HCl inyectable de 10 mg/2mL; cada nivel se ejecutó con 10 réplicas por nivel y por analista, en condiciones de reproducibilidad. Este ensayo se lo analizó con 3 analistas.

Las muestras fueron analizadas y se les calculó la concentración detectada en cada muestra. Al mismo tiempo se calculó los datos estadísticos como promedio de la concentración, desviación estándar, porcentaje de coeficiente de variación y varianza. Estos datos estadísticos implican en que no debe existir diferencia significativa en el ensayo bajo las mismas condiciones.

La data estadística para obtener la reproducibilidad, corresponde a la misma información detallada en el punto 4.2.1 Repetibilidad.

En la tabla 4.12., se muestra el cálculo estadístico del porcentaje de reproducibilidad de los tres niveles de concentración.

**TABLA 4. 12.** Cálculo del porcentaje de reproducibilidad (SR)

Nivel	Promedio (%)	SR	CV <sub>R</sub> %
Nivel alto	149,66	1,20	0,80
Nivel medio	105,69	0,45	0,43
Nivel bajo	52,45	0,36	0,69

Finalmente, con el cálculo del coeficiente de variación de cada nivel trabajado, se puede verificar que los resultados obtenidos, cumplen con el criterio de aceptación, establecido para el coeficiente de variación  $\leq 2.00$  % en cada nivel.

### 4.3. Selectividad

La selectividad se evaluó considerando o evaluando la concentración del principio activo clorhidrato de metoclopramida, en un medicamento genérico de origen extranjero, y un medicamento de marca de origen nacional, se realizó el análisis bajo las mismas condiciones experimentales, para verificar si el medicamento genérico tiene la misma potencia que el medicamento de marca, a su vez comprobar si la variabilidad por diferentes procedencias de las materias primas en la formulación de los medicamentos es significativa [31].

Se buscó información del medicamento cuyo principio activo corresponde a clorhidrato de metoclopramida en su forma farmacéutica inyectable, y se comprobó que no se comercializa combinado, la información referida con la que se verificó se encuentra en el listado de medicamentos que se comercializan en el país de la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria [32].

En la tabla 4.13, se muestran datos generales comparativos del clorhidrato de metoclopramida inyectable; genérico y marca.

**TABLA 4. 13.** Datos comparativos del clorhidrato de metoclopramida inyectable como medicamentos; genérico y marca.

<b>Muestra</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Información del producto declarada en etiqueta.</b>
Medicamento Genérico	Extranjero	Solución inyectable Composición: Cada 2mL contiene clorhidrato metoclopramida 10mg Excipientes c.s.p. Consérvese a una temperatura no mayor a 30°C
Medicamento Marca	Nacional	Solución inyectable Composición: Cada ampolla contiene el equivalente a 10 mg de metoclopramida base

		Consérvese a una temperatura no mayor a 30°C
--	--	--

En la tabla 4.14., se muestran datos estadísticos del clorhidrato de metoclopramida inyectable, del medicamento genérico.

**TABLA 4. 14.** Datos estadísticos del clorhidrato de metoclopramida inyectable en medicamento genérico

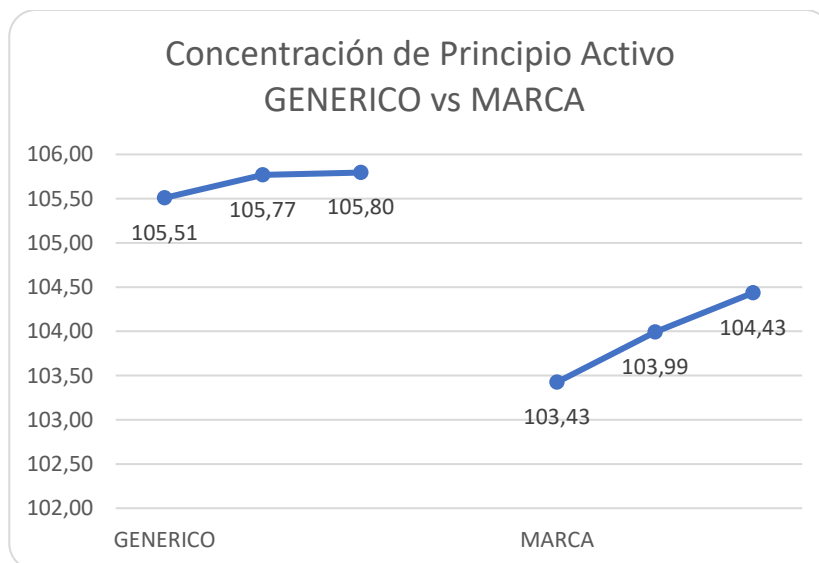
Muestra	Analista 1	Analista 2	Analista 3
	Concentración obtenida (mg)	Concentración obtenida (mg)	Concentración obtenida (mg)
Genérico	105,72	105,39	106,50
	106,05	105,55	106,70
	106,21	105,55	106,05
	105,40	105,72	106,20
	105,56	105,88	105,35
	105,88	105,88	105,50
	104,58	105,72	105,20
	104,91	105,72	105,20
	105,23	106,05	105,55
	105,56	106,21	105,70
<b>Promedio</b>	<b>105,51</b>	<b>105,77</b>	<b>105,80</b>
<b>Promedio Total</b>	<b>105,69</b>		
<b>Desviación Estándar</b>	<b>0,50</b>	<b>0,25</b>	<b>0,54</b>
<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>0,48</b>	<b>0,23</b>	<b>0,51</b>
<b>Varianza</b>	<b>0,23</b>	<b>0,06</b>	<b>0,29</b>

En la tabla 4.15., se muestran datos generales comparativos del clorhidrato de metoclopramida inyectable, del medicamento de marca.

**TABLA 4. 15.** Datos estadísticos del clorhidrato de metoclopramida inyectable en medicamento de marca

Muestra	Analista 1	Analista 2	Analista 3
	Concentración obtenida (mg)	Concentración obtenida (mg)	Concentración obtenida (mg)
Marca	102,46	104,56	105,70
	102,79	104,72	105,87
	102,79	104,72	103,40
	103,12	103,89	103,40
	102,95	104,22	104,22
	102,95	103,89	104,39
	103,12	104,39	104,06
	103,28	104,39	104,39
	105,23	102,40	104,39
	105,56	102,73	104,55
<b>Promedio</b>	<b>103,43</b>	<b>103,99</b>	<b>104,43</b>
<b>Promedio Total</b>	<b>103,95</b>		
<b>Desviación Estándar</b>	<b>1,06</b>	<b>0,81</b>	<b>0,82</b>
<b>Coefficiente de Variación</b>	<b>1,03</b>	<b>0,78</b>	<b>0,78</b>
<b>Varianza</b>	<b>1,02</b>	<b>0,66</b>	<b>0,67</b>

A continuación, se muestra en la Fig. 4.1, la gráfica de la concentración obtenida del medicamento genérico vs el medicamento de marca.



**Fig. 4. 1.** Gráfica de concentración de medicamento genérico vs medicamento de marca

Con el cálculo estadístico se comprueba que, pese a que ambos medicamentos tienen una distinta formulación, así como, una procedencia diferente, no se observó interferencias durante el ensayo analítico.

Resumiendo lo planteado, sin duda alguna ambos medicamentos muestran una concentración del principio activo dentro del límite de especificación, concluyendo que el método aplicable es el indicado para la determinación del principio activo.

#### 4.4. Límite de detección

Para obtener el límite de detección, se preparó una solución de ácido clorhídrico 0.1M, la cual se utilizó como blanco reactivo, en donde se obtuvo el promedio y desviación estándar de las mediciones; y se calculó el límite de detección, mediante la ecuación referenciada de la Eurachem:

$$\text{LOD} = 3 \times S'_0$$

El resultado de la aplicación de la ecuación para la obtención del límite de detección se muestra en la tabla 4.16.

**TABLA 4. 16.** Límite de detección.

LIMITE DE DETECCIÓN (LOD)					
Lectura	Absorbancia del BLK (x)	Promedio ( $\bar{x}$ )	Desviación estándar ( $S_0$ )	Desviación estándar ( $S'_0$ )	LOD ( $3xS'_0$ )
1	0,000	0,00180	0,00114	0,00036	0,00108
2	0,000				
3	0,002				
4	0,002				
5	0,002				
6	0,002				
7	0,004				
8	0,002				
9	0,002				
10	0,002				

Los valores que se muestran en la tabla 4.16, indican que el límite de detección es 0,00108, encontrándose muy por debajo del primer punto de concentración de la curva, el cual corresponde a 0.010 mg/mL. Lo que demuestra que el valor obtenido es la concentración mínima del analito en la matriz de la muestra que puede detectarse.

#### 4.5. Límite de cuantificación

Para obtener el límite de cuantificación, se preparó una solución de ácido clorhídrico 0.1M, la cual se utilizó como blanco reactivo, en donde se obtuvo el promedio y desviación estándar de las mediciones, y se calculó el límite de cuantificación, mediante la ecuación referenciada de la Eurachem:

$$LOQ = k_Q \times S'_0$$

Donde  $k_Q$  usualmente es 10.

El resultado de la aplicación de la ecuación para la obtención del límite de cuantificación se muestra en la tabla 4.17.

**TABLA 4. 17. Límite de cuantificación**

LIMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)					
Lectura	Absorbancia del BLK (x)	Promedio ( $\bar{x}$ )	Desviación estándar ( $S_0$ )	Desviación estándar ( $S'_0$ )	LOQ ( $10 \times S'_0$ )
1	0,000	0,0018	0,0011	0,0004	0,00359
2	0,000				
3	0,002				
4	0,002				
5	0,002				
6	0,002				
7	0,004				
8	0,002				
9	0,002				
10	0,002				

Los valores que se exponen en la tabla 4.17, indican que el límite de cuantificación es 0,00359, encontrándose muy por debajo del primer punto de concentración de la curva, el cual corresponde a 0.010 mg/mL. Lo que demuestra que el resultado obtenido corresponde al valor de la concentración mínima que puede obtenerse con una imprecisión aceptable.

#### 4.6. Linealidad

La linealidad del método se determinó al realizar 10 curvas de calibración del estándar de metoclopramida clorhidrato en el rango de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL, en donde se evaluó en cada una de ellas, el coeficiente de correlación ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), la pendiente ( $m$ ), y el intercepto; además se determinó el análisis residual para cada curva. Estos datos se tomaron para el criterio de aceptación o rechazo para cada curva de calibración analizada.

En la tabla 4.18, se detallan los datos de las absorbancias para cada curva de calibración.

**TABLA 4. 18.** Absorbancias de las curvas de calibración en el rango de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.



Concentración (mg/mL)	Absorbancias obtenidas con estándar primario USP de metoclopramida clorhidrato para construir la curva de calibración									
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	Curva 8	Curva 9	Curva 10
<b>0,000</b>	0,000	0,001	-0,001	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000
<b>0,010</b>	0,304	0,305	0,307	0,304	0,303	0,298	0,303	0,307	0,318	0,313
<b>0,016</b>	0,489	0,486	0,485	0,489	0,491	0,479	0,486	0,485	0,495	0,498
<b>0,020</b>	0,611	0,608	0,611	0,611	0,603	0,602	0,613	0,604	0,621	0,622
<b>0,024</b>	0,736	0,732	0,733	0,736	0,725	0,727	0,728	0,730	0,745	0,744
<b>0,030</b>	0,921	0,912	0,921	0,921	0,906	0,911	0,913	0,911	0,935	0,929

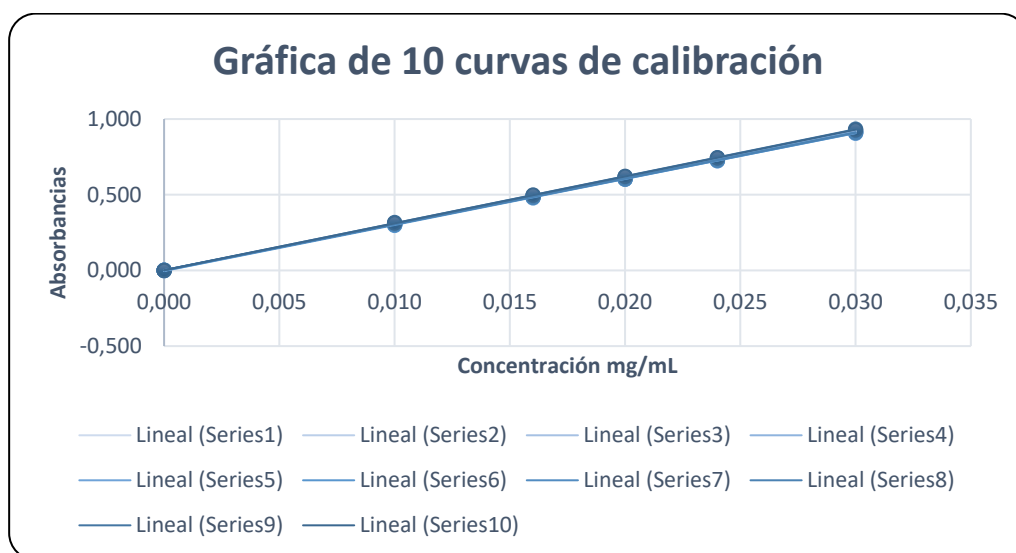
En la tabla 4.19, se presentan los datos de la estimación lineal de las 10 curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.

**TABLA 4. 19.** Estimación lineal de las curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL

Estimación lineal										
Variable	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	Curva 8	Curva 9	Curva 10
Pendiente (m)	30,70 99056 6	30,39 03301 9	30,669 81132	30,709 90566	30,14 62264 2	30,386 79245	30,41 50943 4	30,29 48113 2	31,04 36320 8	30,95 04717
Intercepto (a)	- 0,001 66509 4	0,000 82783	- 0,0018 30189	- 0,0016 65094	0,002 39622 6	- 0,0036 13208	0,000 41509 4	0,001 41981 1	0,001 60613 2	0,001 82547 2
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0,999 98138 6	0,999 99004	0,9999 44156	0,9999 81386	0,999 90513 2	0,9999 11398	0,999 94660 8	0,999 95721 8	0,999 89308 2	0,999 98040 3
Error de estimación de Y (Sy,x)	0,001 57516 1	0,001 14022 7	0,0027 24799	0,0015 75161	0,003 49089 1	0,0034 00541	0,002 64218 3	0,002 35574 4	0,003 81631 6	0,001 62889 6

Desviación estándar de la pendiente $S_b$	0,066 24798 1	0,047 95557 2	0,1145 99345	0,0662 47981	0,146 81959	0,1430 19654	0,111 12470 7	0,099 07765 9	0,160 50628 7	0,068 50796
Desviación estándar del intercepto $S_a$	0,001 27774 5	0,000 92493 4	0,0022 10312	0,0012 77745	0,002 83175 4	0,0027 58463	0,002 14329 6	0,001 91094 1	0,003 09573 3	0,001 32133 4

En la Fig. 4.2, se muestra la gráfica de las 10 curvas de calibración en el rango de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.



**Fig. 4. 2.** Grafica de las 10 curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL

En la tabla 4.20, se muestran datos del promedio de las absorbancias de las 10 curvas de calibración en el rango de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL. para la determinación de la linealidad del método.

**TABLA 4. 20.** Promedio de absorbancias de 10 curva de calibración en el rango de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.

Promedio de 10 curvas de calibración	
Concentración (mg/mL)	Absorbancia (ABS)
0,000	0,000

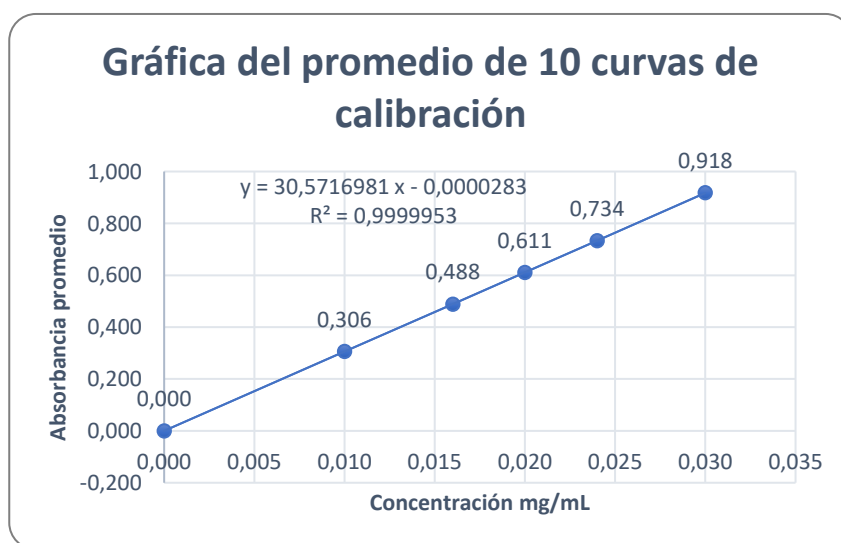
0,010	0,306
0,016	0,488
0,020	0,611
0,024	0,734
0,030	0,918

En la tabla 4.21, se muestran los datos de la estimación lineal del promedio de las 10 curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.

**TABLA 4. 21.** Estimación lineal del promedio de las curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL.

Estimación lineal del promedio de 10 curvas de calibración	
Variable	Resultado
Pendiente (m)	30,5716981
Intercepto (a)	-2,83019E-05
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0,99999533
Error de estimación de Y ( $S_{y,x}$ )	0,000785361
Desviación estándar de la pendiente $S_b$	0,03303066
Desviación estándar del intercepto $S_a$	0,000637072

En la Fig. 4.3, se observa la gráfica del promedio de las absorbancias de las 10 curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL



**Fig. 4. 3.** Grafica del promedio absorbancias de 10 curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL

El análisis de residuales de la curva de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL., se presenta en la Fig. 4.4.



**Fig. 4. 4.** Gráfico de análisis de residuales de la curva de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL

En la Fig. 4.3, gráfica del promedio de las 10 curvas de calibración de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL, se observa que tiene linealidad, esto debido a que su coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es cercano a 1. Al mismo tiempo, se puede evidenciar en la Fig. 4.4, el gráfico del análisis de los residuales de la curva de calibración; en este se muestra que los residuales positivos son aproximadamente iguales al número de residuales negativos y se encuentran distribuidos de manera aleatoria.

Finalmente, los resultados referentes a la curva de calibración, demuestran que se cumplen con la linealidad, esto debido a que el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es  $\geq 0.995$ , por lo que esto manifiesta que existe una correlación entre la concentración y la señal analítica; por lo tanto, se comprueba que la linealidad obtenida es aceptable, y se cumple con el objetivo de validación planteado y la ley de Lambert y Beer.

#### 4.7. Incertidumbre

Para el obtener la incertidumbre asociada a la medición se realizó el cálculo estadístico de todas las fuentes que influyeron durante la verificación del método analítico. [33]. Se calculó la Incertidumbre estándar combinada ( $\mu$ ), mediante la ecuación referenciada en la guía Eurachem:

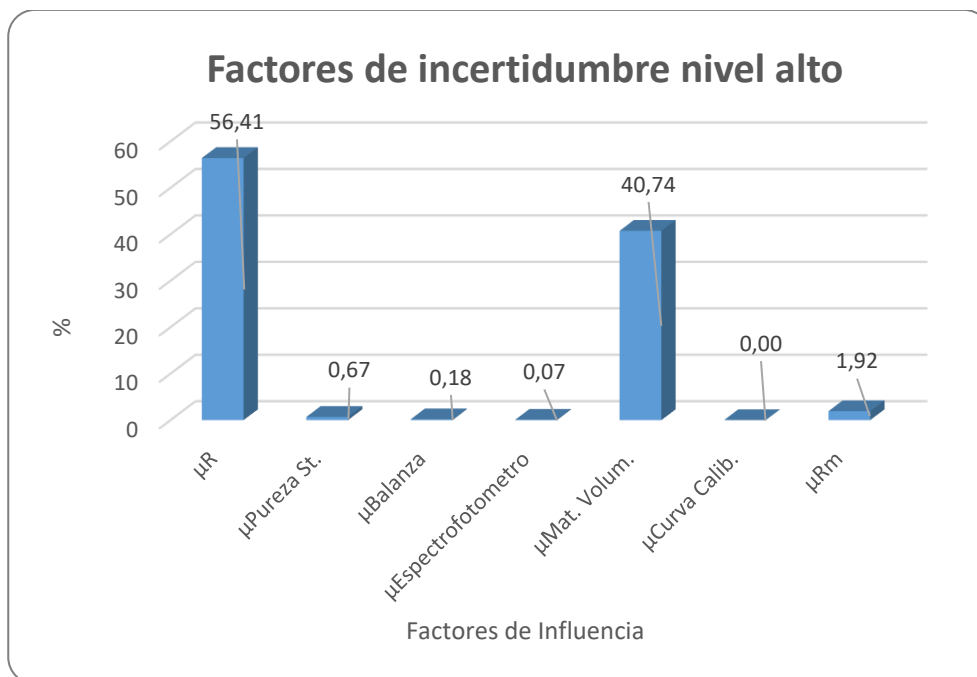
$$\mu_{combinada} = \sqrt{\mu_R^2 + \mu_{Pureza\ St}^2 + \mu_{Balanza}^2 + \mu_{espectrofotometro.}^2 + \mu_{Mat. Volum.}^2 + \mu_{Curva Calib.}^2 + \mu_{Rm}^2}$$

Seguidamente, se calculó la incertidumbre expandida ( $U$ ), multiplicando por el factor de cobertura  $k=2$ . En la tabla 4.22, se presentan los valores de cada una de los componentes de incertidumbre considerados del nivel alto a 150 %.

**TABLA 4. 22. Data estadística de la incertidumbre del nivel alto a 150 %**

VALOR DEL NIVEL ALTO OBTENIDO (%)		149,66	
Factores de Influencia	$u_i$	$u_i^2$	%
$\mu$ reproducibilidad	0,008021	0,00006	56,41
$\mu$ pureza estándar	0,000877	0,00000	0,67
$\mu$ balanza	0,000448	0,00000	0,18
$\mu$ espectrofotómetro	0,000289	0,00000	0,07
$\mu$ material volumétrico	0,006817	0,00005	40,74
$\mu$ curva calibración	0,000002	0,00000	0,00
$\mu$ Rm	0,001480	0,000002	1,92
	Total	0,00011	100,0
	<b>u</b>	<b>0,01068</b>	
	<b>X(u)</b>	<b>1,598</b>	
	<b>U</b>	<b>3,197</b>	
	<b>%</b>	<b>2,14</b>	

A continuación, se encuentra la Fig. 4.5, donde se muestra la gráfica en porcentaje de los factores de fuente de incertidumbre en el nivel alto.



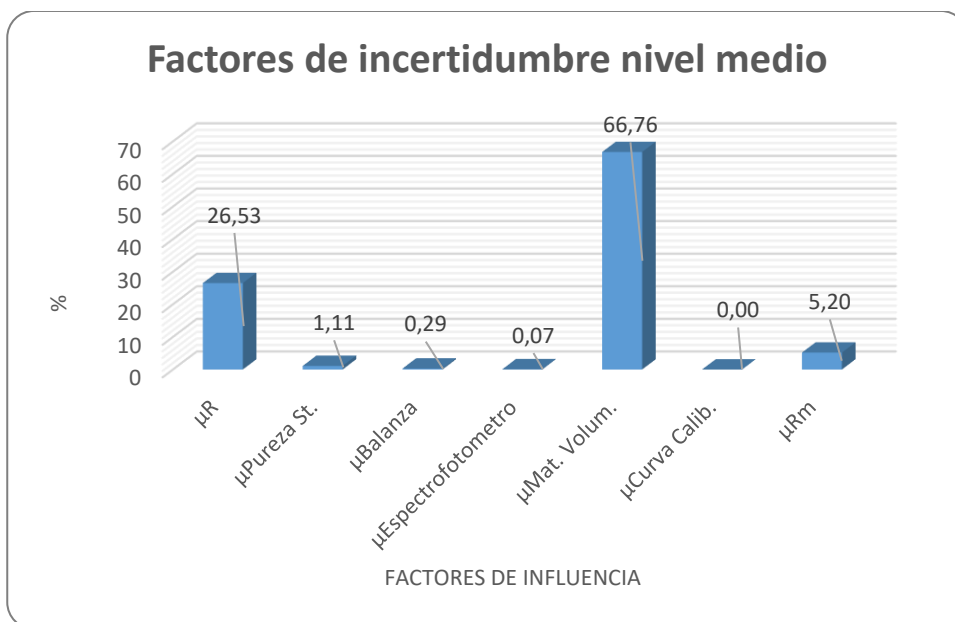
**Fig. 4. 5 .** Gráfico de factores de incertidumbre expresado en porcentaje del nivel alto

En la tabla 4.23, se presentan los valores de cada una de los componentes de incertidumbre considerados del nivel medio a 100 %.

**TABLA 4. 23.** Data estadística de la incertidumbre del nivel medio a 100 %

VALOR DEL NIVEL MEDIO OBTENIDO (%)		105,69	
Factores de Influencia	$u_i$	$u_i^2$	%
<b>μ reproducibilidad</b>	0,004297	0,00002	26,53
<b>μ pureza estándar</b>	0,000877	0,00000	1,11
<b>μ balanza</b>	0,000448	0,00000	0,29
<b>μ espectrofotómetro</b>	0,000289	0,00000	0,07
<b>μ material volumétrico</b>	0,006817	0,00005	66,76
<b>μ curva calibración</b>	0,000002	0,00000	0,00
<b>μ Rm</b>	0,001902	0,000004	5,20
	<b>Total</b>	<b>0,00007</b>	<b>100,0</b>
	<b>u</b>	<b>0,00834</b>	
	<b>X(u)</b>	<b>0,882</b>	
	<b>U</b>	<b>1,764</b>	
	<b>%</b>	<b>1,67</b>	

A continuación, se encuentra la Fig. 4.6, donde se muestra la gráfica en porcentaje de los factores de fuente de incertidumbre en el nivel medio.



**Fig. 4. 6.** Gráfico de factores de incertidumbre expresado en porcentaje del nivel medio

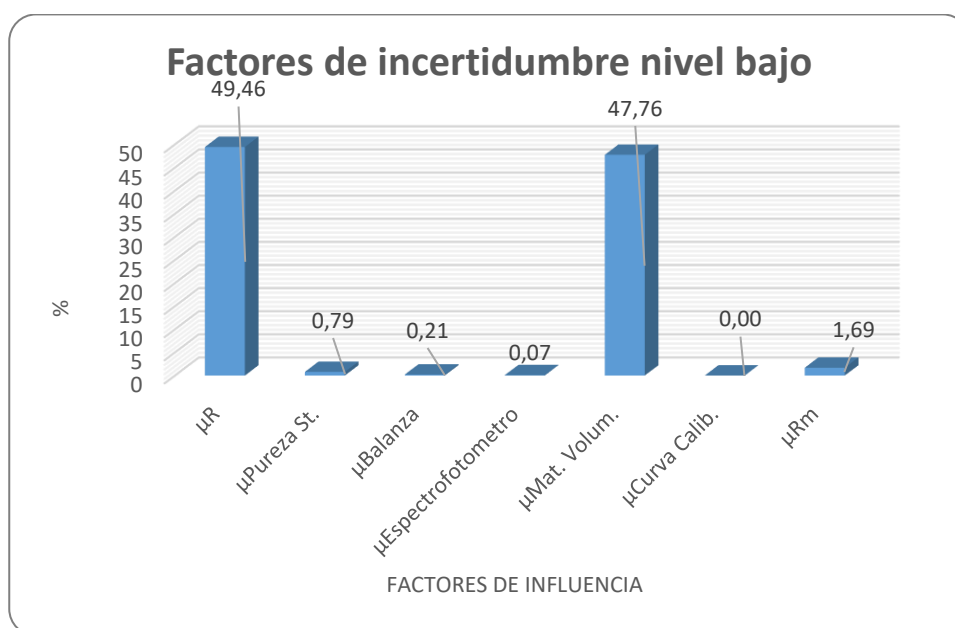
En la tabla 4.24, se presentan los valores de cada una de los componentes de incertidumbre considerados del nivel bajo a 50 %.

**TABLA 4. 24.** Data estadística de la incertidumbre del nivel bajo a 50 %

VALOR DEL NIVEL BAJO OBTENIDO (%)		52,45	
Factores de Influencia	$u_i$	$u_i^2$	%
$\mu$ reproducibilidad	0,006937	0,000048	49,46
$\mu$ pureza estándar	0,000877	0,000001	0,79
$\mu$ balanza	0,000448	0,000000	0,21
$\mu$ espectrofotómetro	0,000289	0,000000	0,07
$\mu$ material volumétrico	0,006817	0,000046	47,76
$\mu$ curva calibración	0,000002	0,000000	0,00
$\mu Rm$	0,001282	0,000002	1,69
	<b>Total</b>	<b>0,00010</b>	<b>100,0</b>
	<b>u</b>	<b>0,00986</b>	

	<b>X(u)</b>	<b>0,517</b>	
	<b>U</b>	<b>1,035</b>	
	<b>%</b>	<b>1,97</b>	

A continuación, se encuentra la Fig. 4.7, donde se muestra la gráfica en porcentaje de los factores de fuente de incertidumbre en el nivel bajo.



**Fig. 4. 7.** Gráfico de factores de incertidumbre expresado en porcentaje del nivel bajo

Con los cálculos estadísticos se obtuvieron los resultados de la incertidumbre en cada nivel; siendo 2,14 % el nivel alto, 1,67 % el nivel medio, y 1,97 % el nivel bajo; por lo tanto, se demuestra que cada nivel es  $\leq 5$  %, concluyendo que se cumple con el objetivo de la validación propuesto.

#### 4.8. Robustez

La robustez se evaluó, con los datos estadísticos del nivel alto al 150 % (Estándar USP primario de metoclopramida HCl) y del nivel medio al 100 % (metoclopramida HCl en Inyectable 10 mg/2mL), en condiciones diferentes al del método habitual; se realizó el análisis con la variación del color de los envases ámbar y transparente, variación de la temperatura de conservación al ambiente y en refrigeración, y el tiempo de lectura cada 24



horas hasta las 72 horas; y finalmente se efectuó la variación de la concentración del solvente (ácido clorhídrico).

A partir de los resultados se calculó la desviación estándar, el coeficiente de variación y varianza.

#### 4.8.1. Variación del color de los envases, de la temperatura de conservación y del tiempo de lectura.

En la tabla 4.25, se observa la data estadística del nivel alto a 150 %, del envase color ámbar, con variación de la temperatura de conservación entre ambiente y refrigeración; además de la variación del tiempo de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas.

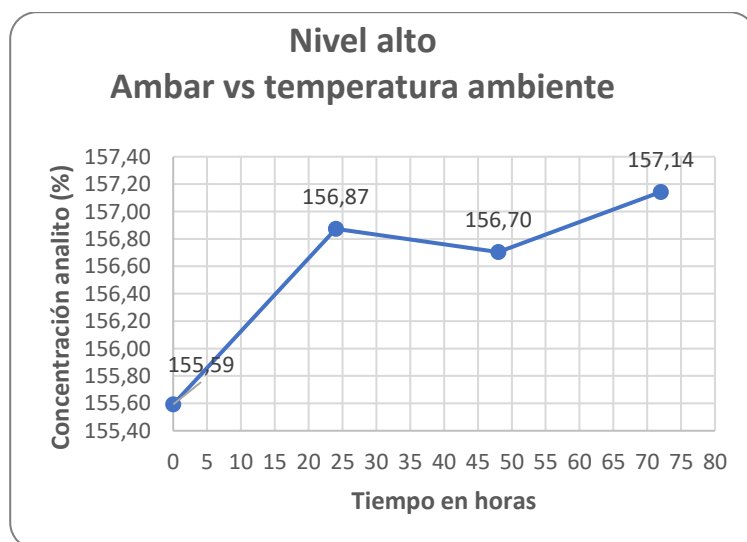
**TABLA 4. 25** Data estadística en envases de color ámbar, con variación de temperatura y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto.

ENVASE AMBAR					ENVASE AMBAR				
NIVEL	Temperatura ambiente				NIVEL	Refrigeración			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas		0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
<b>ALTO ST 150% (15mg)</b>	154,56	155,74	155,58	155,91	<b>ALTO ST 150% (15mg)</b>	152,54	151,70	151,87	152,88
	154,56	156,08	155,74	156,08		156,92	156,25	156,42	156,42
	156,76	157,26	157,77	158,27		156,25	155,74	156,08	156,59
	156,92	157,43	157,94	158,44		156,42	155,74	156,25	156,59
	155,24	156,76	157,77	158,27		154,90	155,07	155,41	155,74
	155,24	156,92	157,94	158,44		154,73	155,41	156,08	156,08
	154,73	157,60	155,74	156,25		156,08	156,25	156,42	157,09
	154,73	157,94	155,74	156,42		156,76	155,41	156,76	156,42
	156,59	156,42	156,25	156,59		155,74	155,24	156,08	156,25
	156,59	156,59	156,59	156,76		155,58	155,74	155,91	156,42
<b>Promedio</b>	<b>155,59</b>	<b>156,87</b>	<b>156,70</b>	<b>157,14</b>	<b>Promedio</b>	<b>155,59</b>	<b>155,25</b>	<b>155,73</b>	<b>156,05</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>1,00</b>	<b>0,69</b>	<b>1,03</b>	<b>1,07</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>1,29</b>	<b>1,31</b>	<b>1,40</b>	<b>1,17</b>

<b>C.V.</b>	<b>0,64</b>	<b>0,44</b>	<b>0,66</b>	<b>0,68</b>	<b>C.V.</b>	<b>0,83</b>	<b>0,84</b>	<b>0,90</b>	<b>0,75</b>
<b>varianza</b>	<b>0,99</b>	<b>0,48</b>	<b>1,06</b>	<b>1,15</b>	<b>varianza</b>	<b>1,67</b>	<b>1,71</b>	<b>1,97</b>	<b>1,36</b>

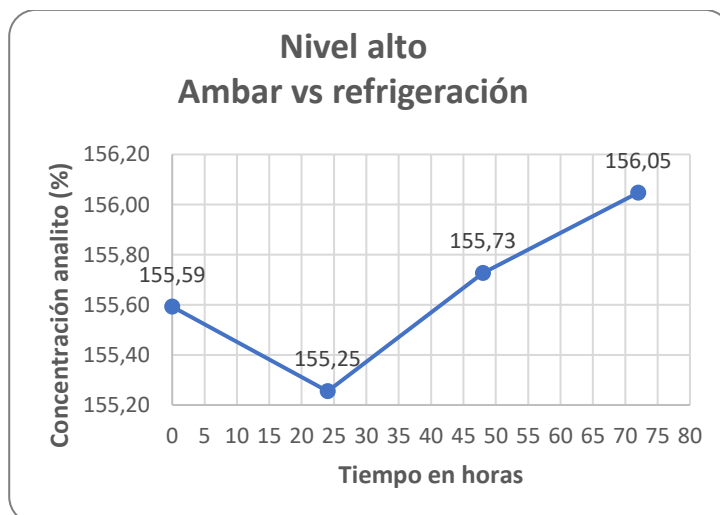
Conforme a los datos obtenidos en el nivel alto, se puede demostrar que en el envase ámbar, la variación de la temperatura de conservación tanto al ambiente como en refrigeración, con lecturas cada 24 horas hasta las 72 horas reflejan un coeficiente de variación  $\leq 2.00\%$ .

En la Fig. 4.8, se muestra la gráfica de la concentración del analito en porcentaje, obtenida del análisis ejecutado en envases de color ámbar, conservadas a temperatura ambiente y tiempos de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto.



**Fig. 4. 8.** Gráfico de envases de color ámbar vs temperatura ambiente y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto

En la Fig. 4.9, se muestra la gráfica de la concentración del analito en porcentaje, obtenida del análisis ejecutado en envases de color ámbar, conservadas en refrigeración y tiempos de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto.



**Fig. 4. 9.** Gráfico de envases de color ámbar vs temperatura refrigeración y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto

En la tabla 4.26, se observa la data estadística del nivel alto a 150 %, del envase transparente, con variación de la temperatura de conservación entre ambiente y refrigeración; además de variación del tiempo de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas.

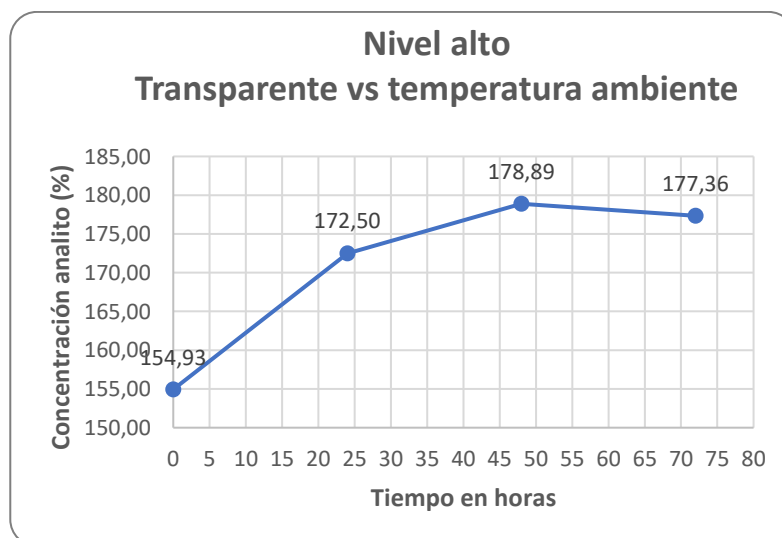
**TABLA 4. 26** Data estadística en envases transparentes, con variación de temperatura y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto.

ENVASE TRANSPARENTE					ENVASE TRANSPARENTE				
NIVEL	Temperatura ambiente				NIVEL	Refrigeración			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas		0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
<b>ALTO ST 150% (15mg)</b>	151,87	153,38	153,89	154,23	<b>ALTO ST 150% (15mg)</b>	150,35	151,36	151,87	152,71
	152,03	153,55	154,23	154,40		154,90	155,24	155,74	156,42
	156,25	170,24	173,61	173,11		155,07	155,74	155,91	156,42
	156,42	170,41	173,95	173,11		155,24	155,74	156,08	156,42
	155,07	195,36	200,08	199,74		153,55	154,06	154,56	154,90
	155,24	195,70	200,25	199,91		155,07	156,08	156,25	156,92
	154,73	165,69	185,58	178,67		157,09	157,09	157,60	159,45
	154,73	166,03	185,41	178,50		155,24	156,59	156,76	157,77
156,08	177,15	180,86	180,86	154,73	156,76	156,42	157,26		

	156,92	177,49	181,03	181,03		154,73	156,08	156,42	157,77
<b>Promedio</b>	<b>154,93</b>	<b>172,50</b>	<b>178,89</b>	<b>177,36</b>	<b>Promedio</b>	<b>154,60</b>	<b>155,47</b>	<b>155,76</b>	<b>156,60</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>1,74</b>	<b>14,64</b>	<b>15,94</b>	<b>15,41</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>1,72</b>	<b>1,68</b>	<b>1,57</b>	<b>1,81</b>
<b>C.V.</b>	<b>1,12</b>	<b>8,49</b>	<b>8,91</b>	<b>8,69</b>	<b>C.V.</b>	<b>1,12</b>	<b>1,08</b>	<b>1,01</b>	<b>1,16</b>
<b>varianza</b>	<b>3,02</b>	<b>214,39</b>	<b>254,07</b>	<b>237,46</b>	<b>varianza</b>	<b>2,97</b>	<b>2,82</b>	<b>2,47</b>	<b>3,28</b>

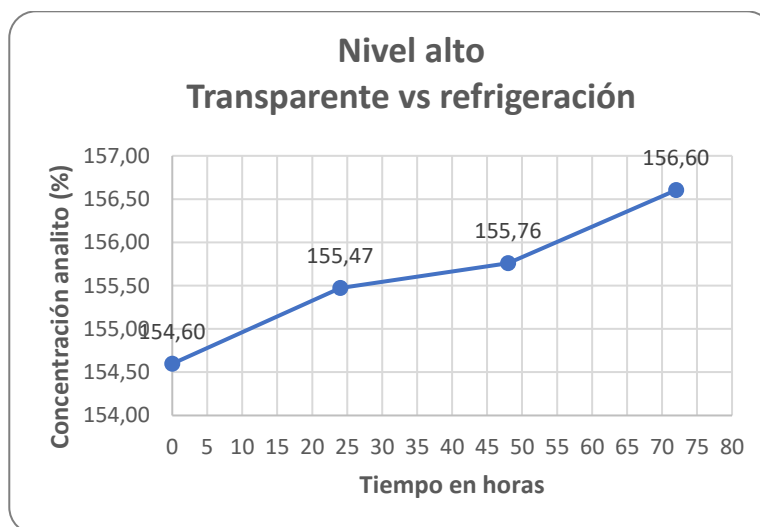
De acuerdo a los datos obtenidos en el nivel alto se puede demostrar que, en el envase transparente, la variación de la temperatura de conservación y el tiempo de lectura cada 24 horas hasta las 72 horas, reflejan que en la conservación de las diluciones en refrigeración el coeficiente de variación es  $\leq 2.00\%$ . Sin embargo, en conservación a temperatura ambiente a partir de las 24 horas hasta las 72 horas, se observa un coeficiente de variación  $\geq 2.00\%$ , lo cual demuestra que el método bajo esas condiciones se ve afectado a través del tiempo.

En la Fig. 4.10, se muestra la gráfica de la concentración del analito en porcentaje, obtenida del análisis ejecutado en envases transparentes, conservadas a temperatura ambiente y tiempos de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto.



**Fig. 4. 10.** Gráfico de envases transparentes vs temperatura ambiente y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto

En la Fig. 4.11, se muestra la gráfica de la concentración del analito en porcentaje, obtenida del análisis ejecutado en envases transparentes, conservadas en refrigeración y tiempos de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto.



**Fig. 4. 11.** Gráfico de envases transparentes vs temperatura de refrigeración y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel alto

En cuanto al análisis ejecutado a la metoclopramida clorhidrato, en inyectables (nivel medio), se muestra en la tabla 4.27, la data estadística del envase color ámbar, con variación de la temperatura de conservación entre ambiente y refrigeración; además de variación del tiempo de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas.

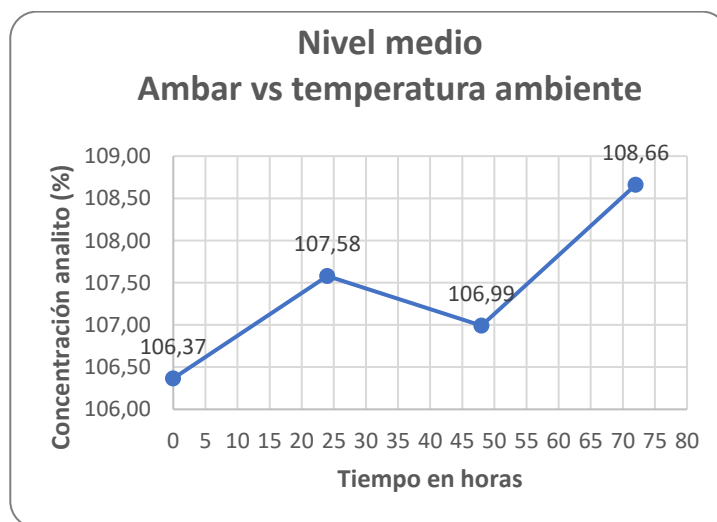
**TABLA 4. 27** Data estadística en envases de color ámbar, con variación de temperatura y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio.

ENVASE AMBAR					ENVASE AMBAR				
NIVEL	Temperatura ambiente				NIVEL	Refrigeración			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas		0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
<b>MEDIO 100% (10mg)</b>	105,67	107,19	106,18	108,04	<b>MEDIO 100% (10mg)</b>	106,01	106,18	107,19	107,70
	105,84	107,19	106,35	108,04		106,35	106,01	107,53	107,70
	107,36	107,36	107,19	108,54		107,19	107,02	107,87	108,04
	107,70	107,53	107,19	108,88		106,69	106,35	107,53	107,70
	106,85	107,02	106,85	108,20		106,52	106,18	107,36	107,53

	107,02	107,19	107,02	108,54		106,69	106,52	107,87	107,87
	106,85	108,20	107,70	109,55		106,52	106,01	106,85	107,19
	103,82	108,37	107,87	109,55		106,35	105,67	106,52	107,02
	105,67	108,20	106,69	108,54		106,69	106,18	107,02	107,53
	106,85	107,53	106,85	108,71		101,12	108,04	108,54	109,22
<b>Promedio</b>	<b>106,37</b>	<b>107,58</b>	<b>106,99</b>	<b>108,66</b>	<b>Promedio</b>	<b>106,01</b>	<b>106,42</b>	<b>107,43</b>	<b>107,75</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>1,14</b>	<b>0,50</b>	<b>0,53</b>	<b>0,55</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>1,74</b>	<b>0,67</b>	<b>0,58</b>	<b>0,59</b>
<b>C.V.</b>	<b>1,07</b>	<b>0,46</b>	<b>0,50</b>	<b>0,50</b>	<b>C.V.</b>	<b>1,65</b>	<b>0,63</b>	<b>0,54</b>	<b>0,55</b>
<b>varianza</b>	<b>1,29</b>	<b>0,25</b>	<b>0,28</b>	<b>0,30</b>	<b>varianza</b>	<b>3,04</b>	<b>0,45</b>	<b>0,34</b>	<b>0,35</b>

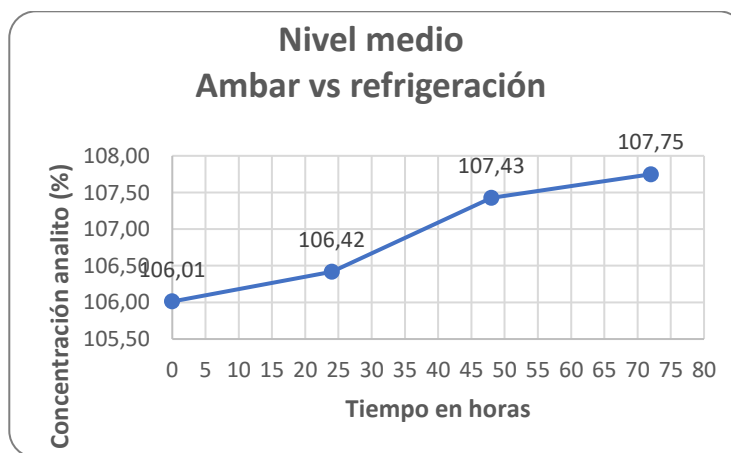
Acorde a los datos obtenidos en el nivel medio se puede demostrar que en el envase ámbar, la variación de la temperatura de conservación y el tiempo de lectura cada 24 horas hasta las 72 horas reflejan un coeficiente de variación  $\leq 2.00\%$ .

En la Fig. 4.12, se muestra la gráfica de la concentración del analito en porcentaje, obtenida del análisis ejecutado en envases de color ámbar, conservadas a temperatura ambiente y tiempos de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio.



**Fig. 4. 12.** Gráfico de envases de color ámbar vs temperatura de ambiente y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio

En la Fig. 4.13, se muestra la gráfica de la concentración del analito en porcentaje, obtenida del análisis ejecutado en envases de color ámbar, conservadas en refrigeración y tiempos de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio.



**Fig. 4. 13.** Gráfico de envases de color ámbar vs temperatura de refrigeración y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio

Al mismo tiempo, en la tabla 4.28, se observa la data estadística del nivel medio a 100 %, del envase transparente, con variación de la temperatura de conservación entre ambiente y refrigeración; además de variación del tiempo de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas.

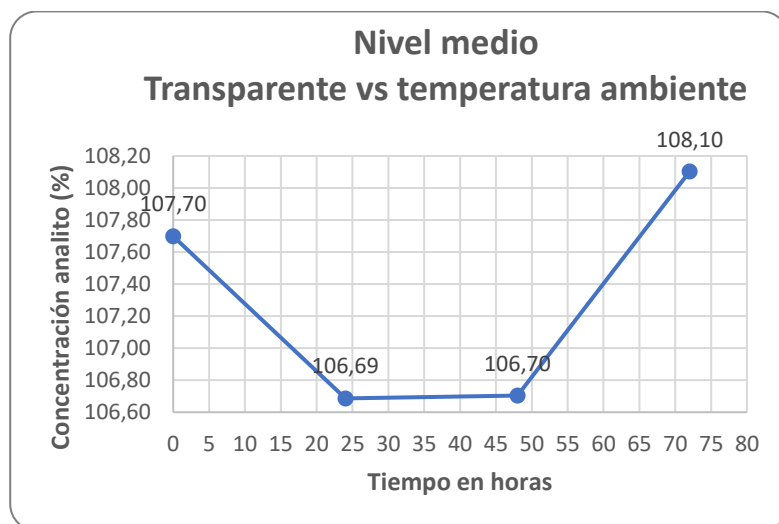
**TABLA 4. 28** Data estadística en envases transparentes, con variación de temperatura y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio.

ENVASE TRANSPARENTE					ENVASE TRANSPARENTE				
NIVEL	Temperatura ambiente				NIVEL	Refrigeración			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas		0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
<b>MEDIO 100% (10mg)</b>	106,69	106,85	107,02	108,54	<b>MEDIO 100% (10mg)</b>	101,12	100,62	101,46	102,13
	106,85	106,85	107,19	108,71		107,02	106,18	106,35	108,04
	107,36	106,01	106,35	107,70		106,69	106,01	106,18	107,36
	107,53	106,18	106,52	107,87		107,19	106,01	106,18	107,53
	107,36	106,85	106,69	108,20		107,36	106,69	107,02	108,20
	107,53	106,85	107,02	108,20		106,69	106,35	106,85	107,87
	108,54	107,02	107,02	108,54		107,19	106,35	106,52	108,04

	108,54	107,19	107,36	108,71		106,35	106,69	106,69	108,04
	108,20	107,36	105,84	107,19		106,35	106,18	106,18	107,53
	108,37	105,67	106,01	107,36		106,35	105,84	105,67	107,02
<b>Promedio</b>	<b>107,70</b>	<b>106,69</b>	<b>106,70</b>	<b>108,10</b>	<b>Promedio</b>	<b>106,23</b>	<b>105,69</b>	<b>105,91</b>	<b>107,18</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>0,68</b>	<b>0,54</b>	<b>0,51</b>	<b>0,55</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>1,83</b>	<b>1,80</b>	<b>1,61</b>	<b>1,81</b>
<b>C.V.</b>	<b>0,63</b>	<b>0,51</b>	<b>0,48</b>	<b>0,51</b>	<b>C.V.</b>	<b>1,73</b>	<b>1,71</b>	<b>1,52</b>	<b>1,69</b>
<b>varianza</b>	<b>0,46</b>	<b>0,30</b>	<b>0,26</b>	<b>0,30</b>	<b>varianza</b>	<b>3,37</b>	<b>3,26</b>	<b>2,60</b>	<b>3,27</b>

Considerando los datos que anteceden en el nivel medio, se puede demostrar que, en el envase transparente, la variación de la temperatura de conservación y el tiempo de lectura cada 24 horas hasta las 72 horas reflejan un coeficiente de variación  $\leq 2.00\%$ .

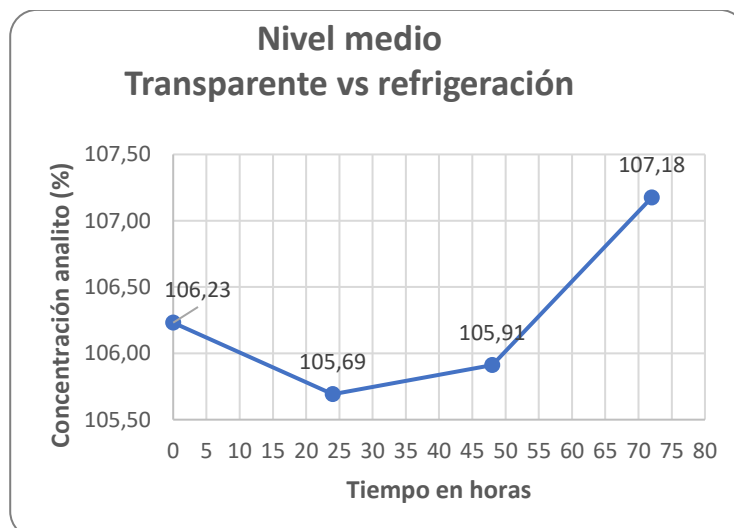
En la Fig. 4.14, se muestra la gráfica de la concentración del analito en porcentaje, obtenida del análisis ejecutado en envases transparentes, conservadas a temperatura ambiente y tiempos de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio.



**Fig. 4. 14.** Gráfico de envases transparentes vs temperatura ambiente y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio

En la Fig. 4.15, se muestra la gráfica de la concentración del analito en porcentaje, obtenida del análisis ejecutado en envases transparentes, conservadas en refrigeración y tiempos de lecturas a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio.





**Fig. 4. 15.** Gráfico de envases transparentes vs temperatura de refrigeración y tiempo de lectura a 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas en el nivel medio

Finalmente, conforme a los datos obtenidos en el nivel alto y medio, se puede concluir que el método no se ve afectado, bajo las diferentes situaciones aplicadas, a excepción del análisis ejecutado en el nivel alto en envases transparentes, el cual se ve afectado al pasar el tiempo.

#### 4.8.2. Variación de la concentración del disolvente ácido clorhídrico.

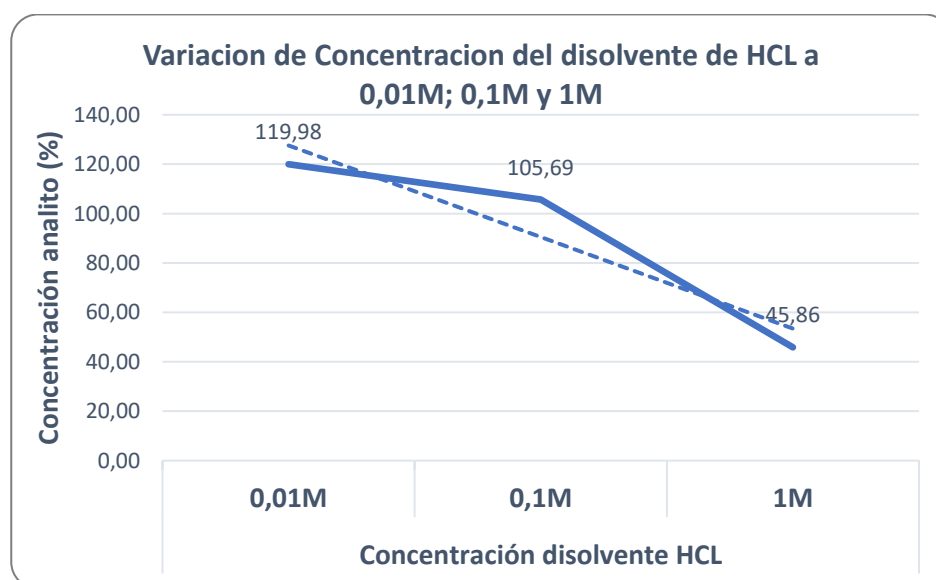
En la tabla 4.29, se observa la data estadística del nivel medio a 100 %, en la cual se efectuó la variación de la concentración del solvente (ácido clorhídrico) a 0.01M, 0.1M y 1M. A partir de los resultados se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación.

**TABLA 4. 29** Variación de concentración del disolvente de HCL a 0,01M; 0,1M y 1M

Concentración (%) del analito a distintas concentraciones (M) del disolvente HCL			
Analista	Concentración disolvente HCL		
	0,01M	0,1M	1M
1	116,01	105,51	45,07
2	122,17	105,77	47,35
3	121,74	105,80	45,17

<b>Promedio</b>	<b>119,98</b>	<b>105,69</b>	<b>45,86</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>3,44</b>	<b>0,16</b>	<b>1,29</b>
<b>Coefficiente de variación (C.V)</b>	<b>2,87</b>	<b>0,15</b>	<b>2,81</b>

En la Fig. 4.16, se muestra la gráfica de la concentración en porcentajes, de la variación de la concentración del disolvente ácido clorhídrico.



**Fig. 4. 16.** Gráfico de variación de concentración del disolvente ácido clorhídrico.

En cuanto a los resultados de la variación de la concentración del solvente ácido clorhídrico, se denota que en el análisis ejecutado a 0.01M, la concentración del analito expresada en porcentaje es 119.98 % la cual señala una concentración alta en comparación con la concentración teórica del 100 %, con un coeficiente de variación de 2,87 %, considerando que la metoclopramida clorhidrato es muy soluble en agua.

En cuanto al análisis ejecutado a 0.1M, misma que corresponde a las condiciones normales del método, manifiesta una concentración de 105.69 %, con un coeficiente de variación de 0,15 %, el cual está dentro de la aceptabilidad del método.

Finalmente, en el análisis realizado a 1M, la concentración real obtenida del analito es 45.86 % la cual señala que es muy baja en comparación con la concentración teórica del 100 %, con un coeficiente de variación de 2,81 %, con lo cual se demuestra que el analito no se disuelve en su totalidad, lo que ocasiona que la concentración disminuya.

Como resumen, se detalla que el analito es estable bajo las condiciones normales establecidas en el método.

En conclusión, los resultados obtenidos en los dos niveles de estudio, demuestran que el método no se ve afectado por los pequeños cambios de los parámetros operativos, proporcionando una indicación de confiabilidad.

#### **4.9. Discusión**

El estudio de exactitud descarta la presencia de errores sistemáticos, obteniendo datos cercanos al valor real con un porcentaje de recuperación cercano o igual al 100 %, es decir, dentro del intervalo de confianza del 90 al 110 % [30] .

En cuanto al estudio de precisión, el método es preciso en tres niveles de trabajo con diferentes concentraciones; el nivel alto y bajo, con un estándar primario USP de metoclopramida HCl, y el nivel medio con muestras reales de metoclopramida HCl inyectable de 10 mg/2mL; ineludibles para la determinación de los parámetros aplicables, con mediciones realizadas en tres días diferentes; al mismo tiempo de presentar coeficientes de variación menores al 2.00 % en cada nivel, y una desviación estándar menor a 2, considerada como aceptable para los métodos espectrofotométricos.

En términos de repetibilidad, los resultados demuestran la existencia de precisión por no mostrar diferencias significativas en las muestras ensayadas durante el mismo día por el mismo analista, bajo las mismas condiciones.

Los resultados de la selectividad, denotan que el principio activo clorhidrato de metoclopramida, de un medicamento genérico de origen extranjero, y de un medicamento de marca de origen nacional, en inyectables, poseen una potencia equivalente; siendo que, se comprueba que el medicamento genérico tiene una potencia similar a la del medicamento de marca, y esto a su vez demuestra que la variabilidad por diferentes procedencias de las materias primas en la formulación de los medicamentos no es significativa [31].

Para el estudio de la selectividad, se comprobó que el analito metoclopramida clorhidrato en forma farmacéutica inyectable, no es comercializada en combinación con otros analitos; por lo tanto, se concluye que el método aplicable es el indicado para la determinación del principio activo.

Los valores del límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), demuestran una detección del equipo espectrofotométrico a partir de 0,00108 y una cuantificación a partir de 0,00359, encontrándose muy por debajo del primer punto de concentración de la curva, el cual corresponde a 0.010 mg/ml, lo cual demuestra la factibilidad del método.

La linealidad del método evaluado en el intervalo de la concentración teórica del estándar de metoclopramida clorhidrato, comprendido en el rango de 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL, con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,999 (cercano a la unidad), indica la existencia de una correlación entre la concentración y la señal analítica, con un grado de probabilidad del 95 %; con la cual se comprueba que la linealidad obtenida es aceptable, y se cumple con el objetivo de validación planteado y la ley de Lambert y Beer.

Los cálculos estadísticos de la incertidumbre en cada nivel; mostraron resultados de medición aceptables, siendo 2,14 % el nivel alto, 1,67 % el nivel medio, y 1,97 % el nivel bajo; por lo tanto, se demuestra que cada nivel es  $\leq 5$  %, los cuales aseguran grado de confianza, concluyendo que se cumple con el objetivo de la validación propuesto.

En el estudio de robustez los análisis del coeficiente de variación que se realizaron a las diferentes condiciones, demostraron que la concentración de la metoclopramida clorhidrato, conservada en refrigeración hasta las 72 horas es más estable en envases de color ámbar que los de envases transparentes; lo cual demuestra la fiabilidad del método espectrofotométrico en las condiciones descritas.

Al mismo tiempo se demuestra que la variación del color de envase y la temperatura de conservación de las soluciones no altera las lecturas de absorbancia de la metoclopramida, pero sí la variación de la concentración observando variabilidad en la disolución del analito.

Por lo tanto, el método descrito para la cuantificación de la metoclopramida clorhidrato mediante espectrofotometría UV-VIS, aplicado de la forma descrita en la cuantificación, es efectivo para la determinación del analito, debido a que posee una precisión y exactitud adecuada, una relación lineal con un coeficiente de correlación cercano a uno, entre 0.010 mg/mL a 0.030 mg/mL, además es selectivo para detectar concentraciones mayores a 0,00108 y cuantificar con precisión y exactitud concentraciones del analito superiores a 0,00359.

# CAPÍTULO 5

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Los resultados alcanzados permiten la aplicación del método espectrofotométrico para cuantificar el ingrediente activo clorhidrato de metoclopramida en medicamentos inyectables que lo contienen, puesto que se logró cumplir con los objetivos de validación fijados:

- Se demostró el cumplimiento de las especificaciones establecidas en el método alternativo del laboratorio de referencia.
- Se estableció una metodología analítica desarrollada para la cuantificación de metoclopramida clorhidrato en inyectables por espectrofotometría.
- Se comprobó el cumplimiento de los parámetros de desempeño en la verificación del método para la cuantificación de metoclopramida clorhidrato en inyectables.

Con el uso de las herramientas y el tratamiento estadístico adecuado de los resultados analíticos obtenidos, se logró demostrar mediante el análisis de varianza ANOVA, que no existía diferencias significativas en los análisis ejecutados por diferentes analistas, demostrando ser un método preciso.

Se demostró la linealidad del método, con un coeficiente de determinación de 0.999, cercano a la unidad, cumpliendo con la ley de Lambert y Beer.

Se realizó el cálculo de la incertidumbre para la técnica analítica, y se estableció de acuerdo a los resultados obtenidos que las contribuciones al método son aceptables, siendo que la incertidumbre final del método es: 2,14 % en el nivel alto; 1,67 % en el nivel medio; y 1,97 % en el nivel bajo.

Se comprobó que el método es robusto, puesto que, bajo las diferentes condiciones dadas, el analito no presentó una varianza significativa, lo cual demuestra la fiabilidad del método espectrofotométrico.

Finalmente, se acota que los criterios de aceptabilidad establecidos para la técnica de referencia, se ajustan y completan la validación del método propuesto, con ventajas en cuanto a costos, rapidez de análisis y cumpliendo con los requerimientos establecidos por las Farmacopeas vigentes.

## **5.2. Recomendaciones**

- Para futuras investigaciones, se recomienda realizar estudios de robustez frente a otros solventes, considerando la solubilidad que posee el analito; muy soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol; poco soluble en cloroformo; prácticamente insoluble en éter.
- Tener presente ajustar la pureza del estándar de referencia, si esta es menor al 100%.
- Ampliar la validación del método para las formas farmacéuticas no cubiertas en la presente tesis.
- Realizar periódicamente la verificación del método con el propósito de controlar la estabilidad de este al transcurrir el tiempo.

## 6. Referencias

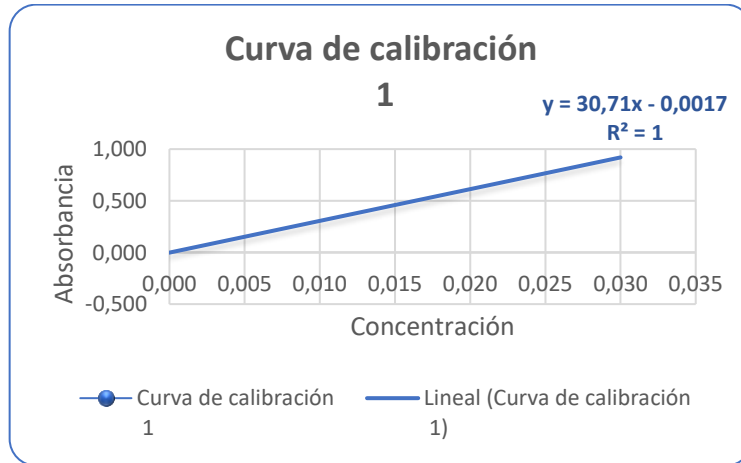
- [1] Centro Colaborador de la OMS para la Metodología de las Estadísticas de Medicamentos, “Índice WHOCC - ATC/DDD.” [https://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/?code=A03FA01](https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=A03FA01) (accessed May 25, 2022).
- [2] “FICHA TECNICA PRIMPERAN 10 mg /2 ml SOLUCION INYECTABLE.” <https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/40256> (accessed Jun. 04, 2022).
- [3] USP ONLINE 2022 VOLUMEN 1, “<1225> VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS FARMACOPEICOS,” VOLUMEN 1., Estados Unidos de América: 2022. [Online]. Available: [https://online.uspnf.com/uspnf/document/4\\_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E72964\\_4\\_es-ES](https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E72964_4_es-ES)
- [4] G.- Marron and J. Rodriguez, “Validación del Método Analítico para Analisis de Disolución y contenido de Clorhidrato de Cetirizina en Cápsulas Blandas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución,” Arequipa - Perú, 2018.
- [5] “Práctica 9.docx - UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Metrología y Validación Practica No. 9 VALIDACIÓN DE UN MÉTODO | Course Hero.” <https://www.coursehero.com/file/105913513/Pr%C3%A1ctica-9docx/> (accessed Jun. 11, 2022).
- [6] “Espectroscopia ultravioleta-visible: conceptos básicos | METTLER TOLEDO.” [https://www.mt.com/es/es/home/applications/Application\\_Browse\\_Laboratory\\_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html](https://www.mt.com/es/es/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytics/uv-vis-spectroscopy/uvvis-spectroscopy-explained.html) (accessed Jun. 11, 2022).
- [7] J.- Mosquera and L. Cabrera, “Validación y las buenas prácticas de fabricación en la producción de ingredientes farmacéuticos activos no esteriles de origen natural.,” 2005. Accessed: Jun. 10, 2022. [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181220525046.pdf>
- [8] L. JUSTIN-BESANCON, C. LAVILLE, and M. THOMINET, “LE M'ETOCLOPRAMIDE ET SES HOMOLOGUES. INTRODUCTION 'A LEUR 'ETUDE BIOLOGIQUE.,” *C R Hebd Seances Acad Sci*, vol. 258, pp. 4384–4386, Apr. 1964.
- [9] A. S. Rao and M. Camilleri, “Review article: metoclopramide and tardive dyskinesia,” *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 31, no. 1, pp. 11–19, Jan. 2010, doi: 10.1111/J.1365-2036.2009.04189.X.
- [10] D. Chiriboga Allnutt, *REGLAMENTO DE REGISTRO SANITARIO PARA MEDICAMENTOS EN GENERAL*. Ecuador, 2021. [Online]. Available: [www.lexis.com.ec](http://www.lexis.com.ec)
- [11] María Guillermina Volonté and Pablo Quiroga, *Análisis farmacéutico*, Primera Edición. Buenos Aires, Argentina : Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata, 2013.
- [12] USP-NF En Línea, “Clorhidrato de Metoclopramida,” 2022. [Online]. Available: [https://online.uspnf.com/uspnf/document/4\\_GUID-EE46DBF9-B185-48F7-8826-31682903A169\\_2\\_es-ES](https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-EE46DBF9-B185-48F7-8826-31682903A169_2_es-ES)
- [13] L.- Brunton L, R.- Hilal-Dandan, and B. Knollmann C, *THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS*, Thirteenth Edition. Estados Unidos de Norte América, 2018.
- [14] “(PDF) ENSAYO ULTRAVIOLETA DE METOCLOPRAMIDA. APLICACIÓN DE HCL EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS A PRUEBAS DE UNIFORMIDAD DE CONTENIDO.” [https://www.researchgate.net/publication/338293826\\_ULTRAVIOLET\\_ASSAY\\_OF\\_METOCLOPRAMIDE\\_HCL\\_IN\\_PHARMACEUTICAL\\_FORMULATIONS\\_APPLICATION\\_TO\\_CONTENT\\_UNIFORMITY\\_TESTING?enrichId=rgreq-6d285654e42014690bd4c955e2f6026c-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzMzODI5MzgyNjBUzo4NDI0NTA0NDQ3Nj](https://www.researchgate.net/publication/338293826_ULTRAVIOLET_ASSAY_OF_METOCLOPRAMIDE_HCL_IN_PHARMACEUTICAL_FORMULATIONS_APPLICATION_TO_CONTENT_UNIFORMITY_TESTING?enrichId=rgreq-6d285654e42014690bd4c955e2f6026c-XXX&enrichSource=Y292ZXJQYWdlOzMzODI5MzgyNjBUzo4NDI0NTA0NDQ3Nj)

- MxMzZAMTU3Nzg2NzI0NjUzMw%3D%3D&el=1\_x\_2&\_esc=publicationCoverPdf (accessed Jun. 07, 2022).
- [15] *Norma ISO/IEC 17025*. 2017. [Online]. Available: [www.iso.org](http://www.iso.org)
- [16] F. Brasileira, "Farmacopea Brasileña, Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária," Sexta Edición., vol. I, Brasil: 2019, 2019. [Online]. Available: <http://portal.anvisa.gov.br>
- [17] Japanese Pharmacopeia, "2399 2399 Japanese Pharmacopeia XVIII Ultraviolet-visible Reference Spectra".
- [18] "USP-NF (1225) Validación de Procedimientos Farmacopeicos." [https://online.uspnf.com/uspnf/document/4\\_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E72964\\_4\\_es-ES?source=Search%20Results&highlight=linealidad](https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E72964_4_es-ES?source=Search%20Results&highlight=linealidad) (accessed Sep. 03, 2022).
- [19] "Página 447 - FARMACOPEA." [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip\\_pages/Farmacopea\\_Vol\\_I/files/assets/basic-html/page440.html](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/basic-html/page440.html) (accessed Sep. 03, 2022).
- [20] J. Vinagre, "CALIDAD DE METODOS ANALITICOS." <https://www.fao.org/3/ah833s/Ah833s15.htm> (accessed Sep. 03, 2022).
- [21] Anmat, "Página 448 - FARMACOPEA." [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip\\_pages/Farmacopea\\_Vol\\_I/files/assets/basic-html/page441.html](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/basic-html/page441.html) (accessed Sep. 03, 2022).
- [22] *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. 2005.
- [23] T. de Grado and L. V. Savina, "VALIDACION E INCERTIDUMBRE DEL METODO NORMALIZADO PARA ION NITRITO EN AGUA", Accessed: Sep. 03, 2022. [Online]. Available: [www.inti.gob.ar](http://www.inti.gob.ar)
- [24] G. A. Coy, R. Del, P. Bojaca, and B. Quimica, "Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales REVISADO POR," 2006.
- [25] J. M. Fernández, C. Minuesa, and A. Índice, "ESTADÍSTICA BÁSICA PARA CIENCIAS DE LA SALUD".
- [26] Cohen Nestor - Gómez Gabriela, *Metodología de la investigación, ¿para qué?* Buenos Aires: Editorial Teseo, 2019. Accessed: Jun. 27, 2022. [Online]. Available: [http://biblioteca.clacso.edu.ar/clacso/se/20190823024606/Metodologia\\_para\\_que.pdf](http://biblioteca.clacso.edu.ar/clacso/se/20190823024606/Metodologia_para_que.pdf)
- [27] F. Brasileira, *Farmacopea Brasileña, Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária*, Sexta edición., vol. II, monografías. 2019.
- [28] D. A. Skoog, Fj. Holler, and S. R. Crouch, *Principios de análisis instrumental*, Sexta edición. México, D.F., 2008. [Online]. Available: [www.FreeLibros.me](http://www.FreeLibros.me)
- [29] S. M. Abbas, J. M. S. Jamur, and A. M. Nasif, "Spectrophotometric Method for the Determination of Metoclopramide in Pharmaceutical Forms," *J Appl Spectrosc*, vol. 88, no. 2, pp. 433–440, May 2021, doi: 10.1007/s10812-021-01191-7.
- [30] Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores, *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados.*, vol. 1ª edición. 2016.
- [31] "Medicamentos Genéricos: Preguntas y Respuestas | FDA." <https://www.fda.gov/drugs/generic-drugs/medicamentos-genericos-preguntas-y-respuestas> (accessed Sep. 02, 2022).
- [32] "Bienvenidos al Sistema." <https://aplicaciones.controlsanitario.gob.ec/publico/consultas/lista> (accessed Sep. 03, 2022).
- [33] "Vista de Validación y estimación de incertidumbre de un método analítico para cuantificar hierro total por el método colorimétrico de la fenantrolina en agua potable y natural | Revista Científica de FAREM-Estelí," 2020. doi: <https://doi.org/10.5377/farem.v0i34.10014>.

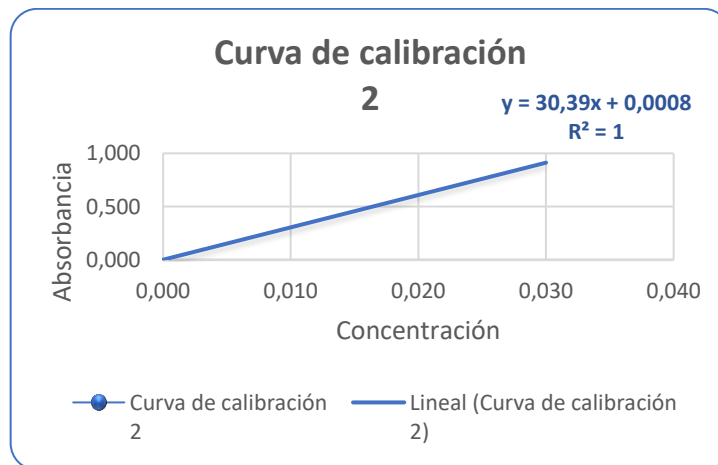


## 7. Anexos y apéndices

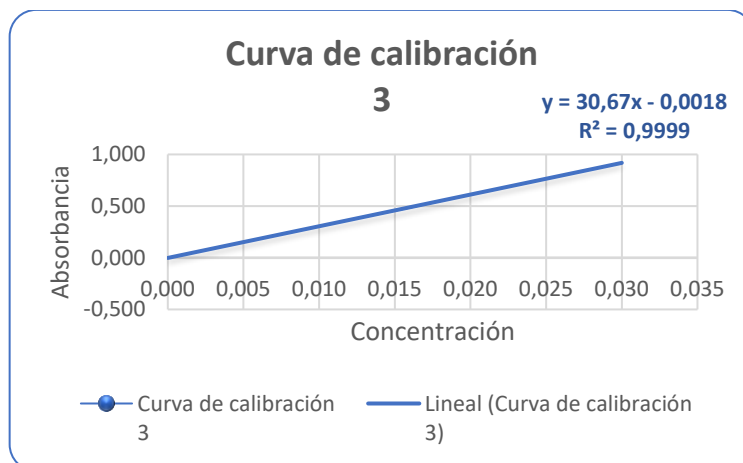
### Anexo 1 Curvas de calibración



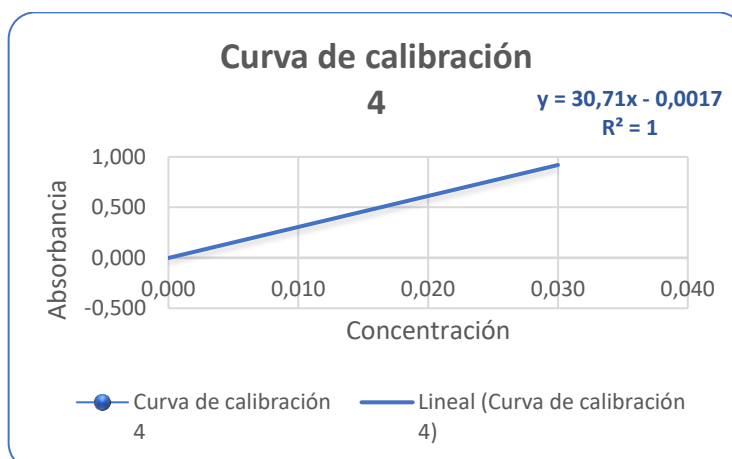
**Fig. A 1.** Curva de calibración analista 1 día 1



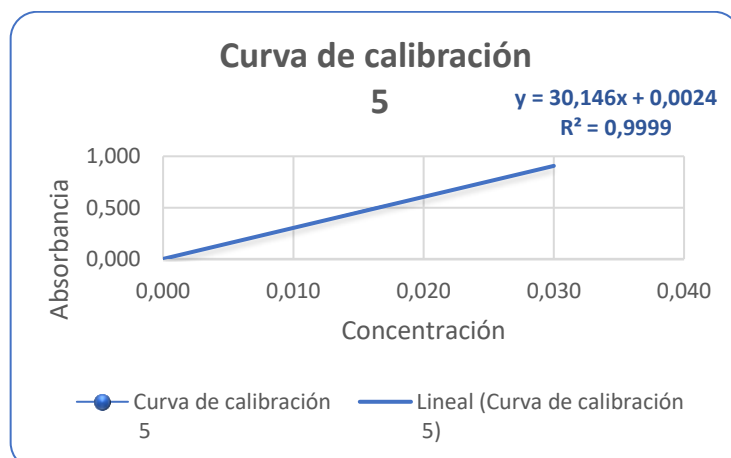
**Fig. A2.** Curva de calibración analista 2 día 1



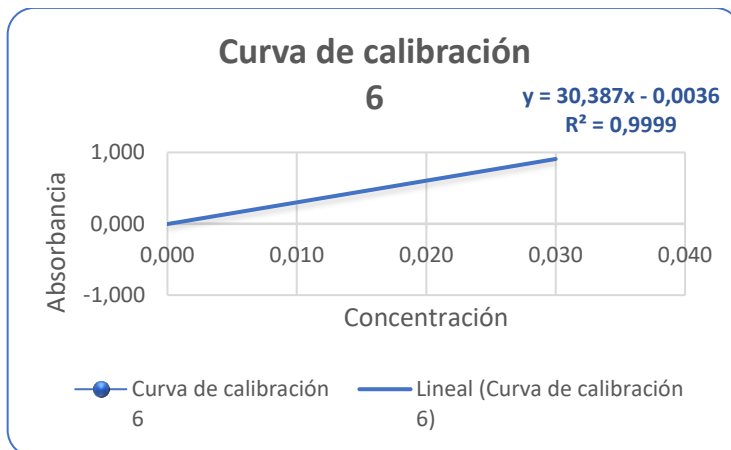
**Fig. A3.** Curva de calibración analista 3 día 1



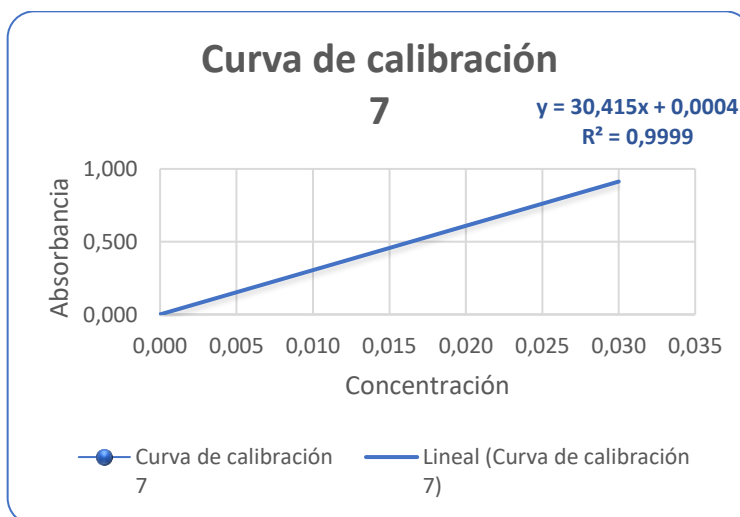
**Fig. A4.** Curva de calibración analista 1 día 2



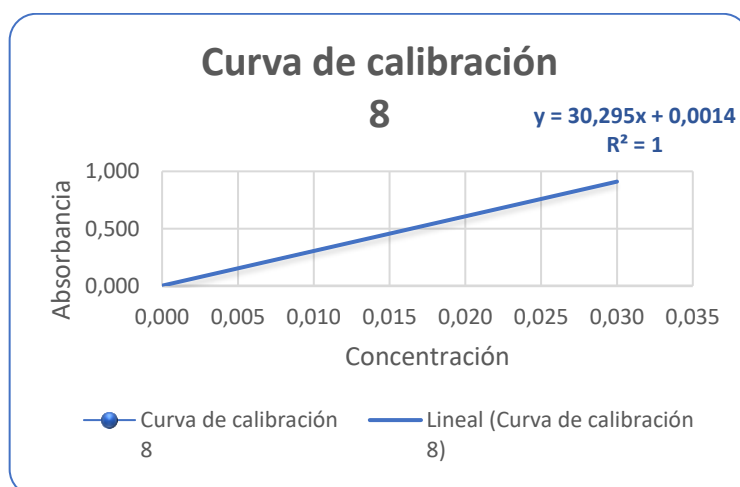
**Fig. A5.** Curva de calibración analista 2 día 2



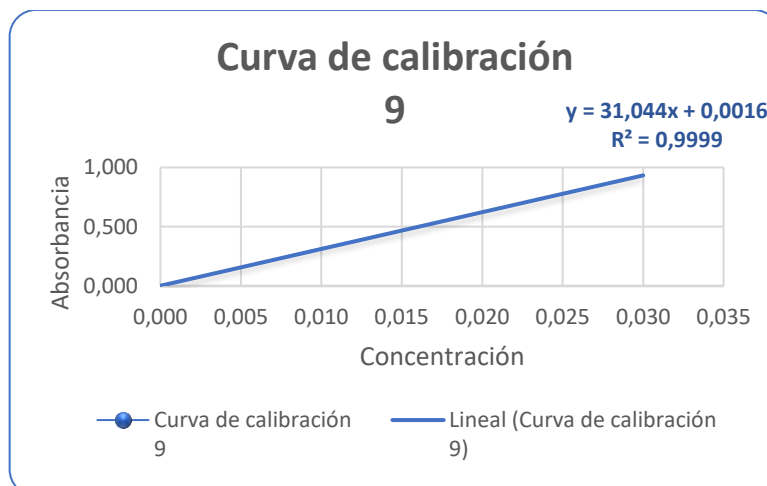
**Fig. A6.** Curva de calibración analista 3 día 2



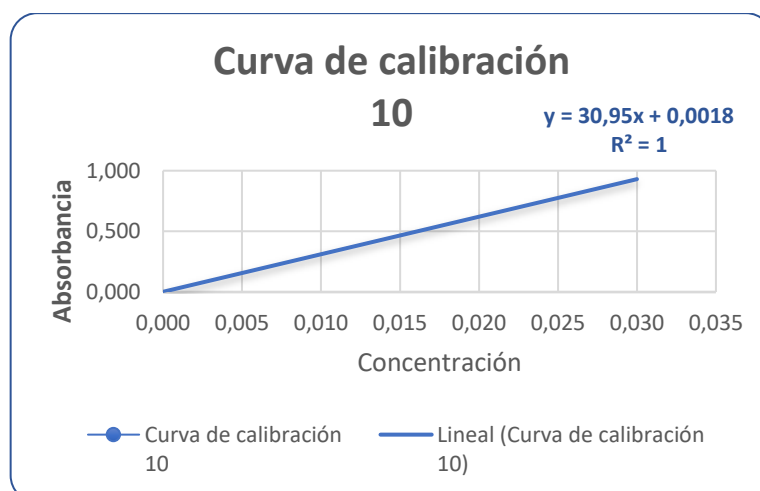
**Fig. A7.** Curva de calibración analista 1 día 3



**Fig. A8.** Curva de calibración analista 2 día 3



**Fig. A9.** Curva de calibración analista 3 día 3



**Fig. A10.** Curva de calibración analista 1 día 4

## Anexo 2 Evidencias fotográficas



Fig. A11. Estándar primario USP de clorhidrato de metoprolol

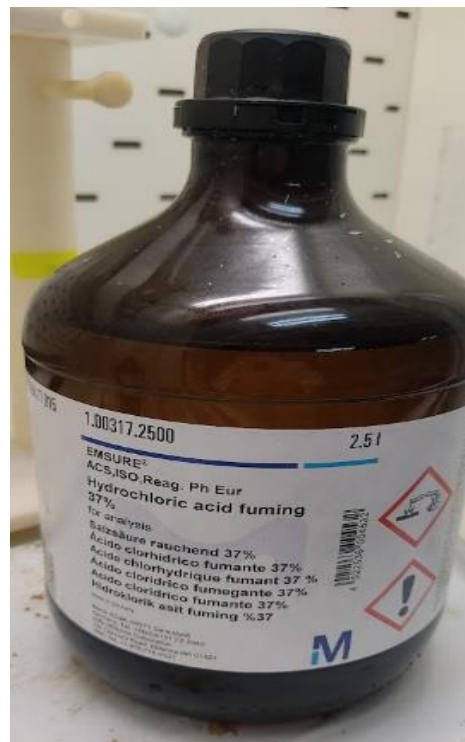


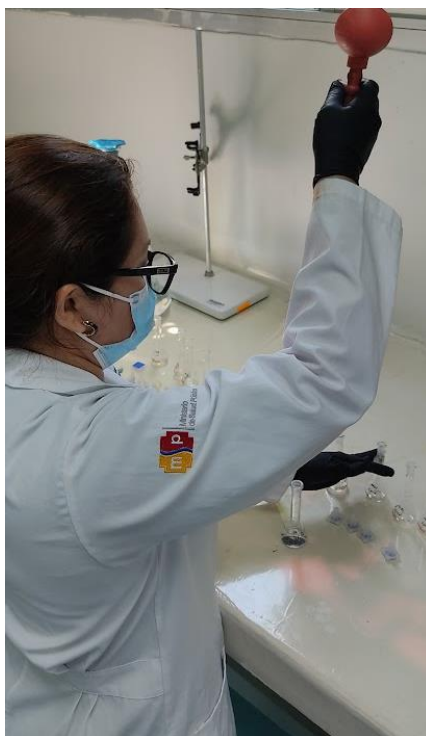
Fig. A12. Reactivo ácido clorhídrico



**Fig. A13.** Pesada de estándar clorhidrato de metoclopramida para nivel alto.



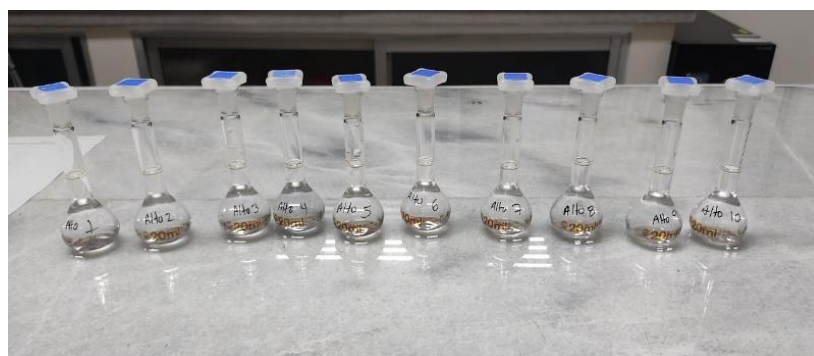
**Fig. A14.** Homogenización del estándar clorhidrato de metoclopramida.



**Fig. A15.** Dilución de la muestra.



**Fig. A1.** Muestra metoclopramida inyectable 2mg/mL



**Fig. A17.** Dilución muestra nivel medio analista 1

## Apéndice A

### Resumen de resultados de validación de metoclopramida HCl en inyectables 10mg/2mL


PARÁMETRO DE DESEMPEÑO		CRITERIO DE ACEPTACIÓN		RESULTADO	CUMPLIMIENTO
Exactitud		Intervalo de Confianza	El IC debe ser del 90 - 110%	91,22 %	cumple
Precisión	Repetibilidad Sr	Coeficiente de variación CV o desviación estándar relativa	RSD $\leq$ 2.00 % (0.2) en todos los niveles	Nivel alto: 0,50% Nivel medio: 0,47% Nivel bajo: 0,36%	Cumple
	Reproducibilidad SR	Coeficiente de variación CV o desviación estándar relativa	RSD $\leq$ 2.00 % (0.2) en todos los niveles	Nivel alto: 0,80% Nivel medio: 0,43% Nivel bajo: 0,69%	Cumple
Selectividad / Especificidad		No debe presentar interferencias con otros analitos		Método es selectivo para el analito	Cumple
Límite de Detección		3SD		0.00108	Cumple
Límite de cuantificación		10SD		0,00359	Cumple
Linealidad		Coeficiente de determinación	$r^2 \geq 0.995$	$r^2 \geq 0,999$	Cumple
Incertidumbre		$\leq 5\%$ en todos los niveles		Nivel alto: 2.14% Nivel medio: 1.67% Nivel bajo: 1.97%	Cumple
Intervalo		5 a 15 mg (50.0 % - 150.0 %)		5 a 15 mg (50.0 % - 150.0 %)	Cumple
Robustez		Variación de envases: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ámbar</li> <li>• Transparentes</li> </ul> Variación del tiempo, con lecturas a: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 horas (Inmediata)</li> <li>• 24 horas</li> <li>• 48 horas</li> <li>• 72 horas</li> </ul> Variación de temperatura, a: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura ambiente</li> </ul>		Cumple	Cumple



	<ul style="list-style-type: none"><li>• Refrigeración</li></ul> Variación de la concentración del ácido clorhídrico: <ul style="list-style-type: none"><li>• Concentración mayor (1M)</li><li>• Concentración de trabajo (0.1M)</li><li>• Concentración menor (0.01M)</li></ul>		
--	---	--	--

# Apéndice B

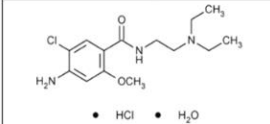
## Certificado de análisis del estándar primario de clorhidrato de metoclopramida



### Certificate

**METOCLOPRAMIDE HYDROCHLORIDE**  
(4-Amino-5-chloro-N-[2-(diethylamino)ethyl]-o-anisamide monohydrochloride monohydrate)

USP Catalog No.: 1440808
USP Lot No.: R09580



• HCl • H<sub>2</sub>O


CAS No.: 54143-57-6

Molecular Formula: C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·HCl·H<sub>2</sub>O


Molecular Weight: 354.27

Copyright 2017 The United States Pharmacopoeial Convention. All rights reserved.  
USP Certificate  
Page 1 of 3

Certificate Date: 24May2018  
USP Template No. CERT1-05



**LABEL TEXT**

 **REFERENCE STANDARD**

**METOCLOPRAMIDE HYDROCHLORIDE 500 mg**

Danger! Harmful if swallowed.  
May cause respiratory irritation. Causes damage to organs (neurological system) through prolonged or repeated exposure.

This is the monohydrate form. For quantitative applications, use a value of 0.900 mg of metoclopramide hydrochloride (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)·HCl/1 mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from light.

USP 12827 Tablets Phcy, Rockville, MD, +1 301 881 0866  
Cat No. 1440808 Material only in 500g

Wash thoroughly after handling. Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapors/spray. Use only outdoors or in a well-ventilated area. If swallowed: Call a poison center/doctor if you feel unwell. Rinse mouth. If inhaled: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a poison center/doctor if you feel unwell. Get medical advice/attention if you feel unwell. Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed. Store locked up. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

*Juri L. Joth*

Quality Assurance





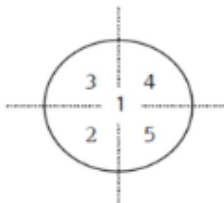
Copyright 2017 The United States Pharmacopoeial Convention. All rights reserved.  
USP Certificate  
Page 2 of 3

Certificate Date: 24May2018  
USP Template No. CERT1-05

# Apéndice C

## Certificado de calibración de la balanza




CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No: CC-5342-004-21

							
IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE							
NOMBRE:		AGENCIA NACIONAL DE REGULACION CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA - ARCSA DOCTOR LEOPOLDO IZQUIETA PEREZ					
DIRECCIÓN:		CALLE JULIÁN CORONEL # 905 ENTRE ESMERALDAS Y JOSÉ MASCOTE					
TELÉFONO:		043727440					
IDENTIFICACIÓN DEL ÍTEM DE CALIBRACIÓN							
ÍTEM:	BALANZA ANALÍTICA	UNIDAD DE MEDIDA:	Gramos (g)				
MARCA:	METTLER TOLEDO	DIVISIÓN DE ESCALA REAL (d):	0,00001				
MODELO:	MS 205 DU	DIVISIÓN DE ESCALA DE VERIFICACIÓN (e):	0,001				
SERIE:	B443190805	CAPACIDAD MÁXIMA (Máx):	220				
CÓDIGO <sup>(1)</sup> :	BA-157	CAPACIDAD MÍNIMA (Min):	0,1				
CLASE:	(f) ESPECIAL	COEFICIENTE DE TEMPERATURA (K <sub>T</sub> ):	0,000010 / °C				
UBICACIÓN <sup>(1)</sup> :	AAFQG (ÁREA ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO GUAYAQUIL)						
EQUIPAMIENTO UTILIZADO							
CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	VENCE CAL.	N° CERTIFICADO	
EL.PT.004	JUEGO DE PESAS 50 mg - 200 g CLASE E2	KERN	313-04	G1213057	2022-01-19	CC-007-069-21	
EL.PT.598	BAROMETRO	CONTROL COMPANY	1081	160727915	2022-07-21	CC-2920-024-21	
EL.PT.046	TERMOHIGROMETRO	ELICROM	EC-900	NO ESPECIFICA	2022-01-02	CC-2920-002-21	
DECLARACIÓN DE TRAZABILIDAD METROLÓGICA							
Los resultados de calibración contenidos en este certificado son trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) por medio de una cadena ininterrumpida de calibraciones a través del PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt - Alemania) o de otros Institutos Nacionales de Metrología (INMs).							
CALIBRACIÓN							
MÉTODO:	COMPARACIÓN DIRECTA CON MASAS PATRÓN CERTIFICADAS						
DOCUMENTO DE REFERENCIA:	EURAMET CALIBRATION GUIDE No. 18 - VERSION 4.0 (11/2015)						
PROCEDIMIENTO:	PEC.EL.01						
LUGAR DE CALIBRACIÓN:	AREA DE PESADA						
TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA:	25,3 °C	±0,1 °C					
HUMEDAD RELATIVA MEDIA:	56,2 %HR	±0,1 %HR					
PRESIÓN ATMOSFÉRICA MEDIA:	1010 hPa	±1 hPa					
DENSIDAD MEDIA DEL AIRE:	1,179 kg/m <sup>3</sup>	±0,003 kg/m <sup>3</sup>					
PRUEBA DE EXCENTRICIDAD					PRUEBA DE REPETIBILIDAD		
Posición	Indicación	emp	± 0,00200 g		No. Pesada	Indicación	
No. 1	75,00000 g	$\Delta_{ecc}$	Cumplimiento		No. 1	110,00000 g	
No. 2	75,00000 g	0,00000 g	Cumple		No. 2	110,00000 g	
No. 3	75,00000 g	0,00000 g	Cumple		No. 3	110,00000 g	
No. 4	75,00000 g	0,00000 g	Cumple		No. 4	110,00000 g	
No. 5	75,00000 g	0,00000 g	Cumple		No. 5	110,00000 g	
$ \Delta_{ecc,media} $		0,00000 g		emp	± 0,00200 g		
				Máx - Min	0,00000 g		
				Cumplimiento	Cumple		
PRUEBA DE ERRORES DE INDICACIÓN (PRUEBA DE PESAJES)							
Nominal	Lectura ítem	Valor Patrón	Error de Medición	Incertidumbre	Factor de Cobertura (k)	emp	Cumplimiento
[g]	[g]	[g]	[g]	[g]		[+/-] g	
0	0,00000	0,0000000	0,0000000	0,0000068	2,00	0,00100	Cumple
0,1	0,10000	0,100000	0,000000	0,000011	2,00	0,00100	Cumple
20	20,00000	20,000020	-0,000020	0,000039	2,00	0,00100	Cumple
45	45,00000	45,000002	-0,000002	0,000010	2,00	0,00100	Cumple
70	70,00000	69,999990	0,000010	0,000084	2,00	0,00200	Cumple
90	90,00000	90,000001	-0,000001	0,000012	2,00	0,00200	Cumple
110	110,00000	109,999998	0,000002	0,000011	2,00	0,00200	Cumple
130	130,00000	130,000000	0,000000	0,000015	2,00	0,00200	Cumple
150	150,00000	149,999994	0,000006	0,000012	2,00	0,00200	Cumple
180	180,00000	179,999998	0,000002	0,000019	2,00	0,00200	Cumple
200	200,00000	200,000004	-0,000004	0,000015	2,00	0,00200	Cumple
220	220,00000	220,000006	-0,000006	0,000019	2,00	0,00300	Cumple

## Apéndice D

### Certificado de calibración del espectrofotómetro

CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN No: CC-5342-083-21

		 Acreditación N° SAE LC 10-009 LABORATORIO DE CALIBRACIÓN		 ACCREDITED Calibration Laboratory Cert. No. 4298.01		
<b>IDENTIFICACIÓN DEL CLIENTE</b>						
NOMBRE:	AGENCIA NACIONAL DE REGULACION CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA - ARCSA DOCTOR LEOPOLDO IZQUIETA PEREZ					
DIRECCIÓN:	CALLE JULIÁN CORONEL # 905 ENTRE ESMERALDAS Y JOSÉ MASCOTE					
TELÉFONO:	043727440					
<b>IDENTIFICACIÓN DEL ÍTEM DE CALIBRACIÓN</b>						
ÍTEM:	ESPECTROFOTOMETRO	RESOLUCIÓN (nm):	1			
MARCA:	THERMO SCIENTIFIC	INTERVALO DE MEDIDA <sup>(1)</sup> (nm):	NO ESPECIFICA			
MODELO:	EVOLUTION 300 UV	ANCHO DE BANDA ESPECTRAL <sup>(2)</sup> (nm):	2			
SERIE:	EVOL 354001	RESOLUCIÓN (ESCALA FOTOMÉTRICA):				
CÓDIGO <sup>(1)</sup> :	EF-104	ABSORBANCIA (1):	0,001	TRANSMITANCIA (%):	0,1	
TIPO:	UV-VISIBLE	INTERVALO DE MEDIDA (ESCALA FOTOMÉTRICA) <sup>(2)</sup> :				
UBICACIÓN <sup>(1)</sup> :	ABRG ( AREA DE BROMATOLOGIA GUAYAQUIL)	ABSORBANCIA (1):	4	TRANSMITANCIA (%):	0-100	
<b>MATERIALES DE REFERENCIA UTILIZADOS</b>						
CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	VENCE CERT.	N° CERTIFICADO
EL.MRC-240	SET DE FILTROS PARA ESPECTROFOTOMETROS	HACH	LZV537	0254	2022-06-07	CC-2371-024-21
<b>EQUIPAMIENTO UTILIZADO</b>						
CÓDIGO	NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	VENCE CAL.	N° CERTIFICADO
EL.PT.002	TERMOHIGROMETRO	ELICROM	EC900	NO ESPECIFICA	2022-01-14	CC-2920-018-21
<b>DECLARACIÓN DE TRAZABILIDAD METROLÓGICA</b>						
Los resultados de calibración contenidos en este certificado son trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) por medio de una cadena ininterrumpida de calibraciones a través del CENAM (Centro Nacional de Metrología - México) o de otros Institutos Nacionales de Metrología (INMs).						
<b>CONDICIONES DE REFERENCIA</b>						
MÉTODO:	COMPARACIÓN DIRECTA MEDIANTE MATERIALES DE REFERENCIA CERTIFICADOS					
DOCUMENTO DE REFERENCIA:	GUÍA TÉCNICA PARA LA CALIBRACIÓN DE ESPECTROFOTÓMETROS UV-VIS (CENAM). REV 0. 2014					
PROCEDIMIENTO:	PEC.EL.15					
LUGAR DE CALIBRACIÓN:	ABRG ( AREA DE BROMATOLOGIA GUAYAQUIL)					
TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA:	24,6 °C	±0,5 °C	HUMEDAD RELATIVA MEDIA:		55,1 %HR	±2,1 %HR
<b>OBSERVACIONES</b>						
La incertidumbre reportada en el presente certificado es la incertidumbre expandida de medición (intervalo de confianza), la cual se evaluó con base en el documento JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections) "Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement", multiplicando la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura k, que para una distribución t (de Student) corresponde a un nivel de confianza de aproximadamente el 95,45%. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad sin la aprobación escrita del laboratorio Elicrom-Calibración. Los resultados contenidos en este certificado son válidos únicamente para el ítem aquí descrito, en el momento y bajo las condiciones en que se realizó la calibración.						
<b>NUMERO DE INVENTARIO 141.01.07.5385</b>						
<b>NOTA 1:</b> La lectura del MRC y el error de medición (mejor estimación del valor verdadero) se muestran con la misma cantidad de decimales que la incertidumbre reportada (véase 7.2.6 de la GUM).						
<b>NOTA 2:</b> La Unidad coherente del Sistema Internacional para la Absorbancia Regular Espectral es la unidad, cuyo símbolo es (1).						
<sup>(1)</sup> Información proporcionada por el cliente. Elicrom no es responsable de dicha información.						
<sup>(2)</sup> Información tomada de las especificaciones del ítem de calibración (proporcionada por el fabricante).						
CALIBRACIÓN REALIZADA POR:	Alex Ubilla					
FECHA DE RECEPCIÓN DEL ÍTEM:	2021-11-22			FECHA DE EMISIÓN:	2021-11-23	
FECHA DE CALIBRACIÓN:	2021-11-22			FECHA PRÓXIMA DE CALIBRACIÓN:	2022-11	