

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:

Verificación del método analítico por HPLC para la valoración de Nitazoxanida en materia prima farmacéutica.

AUTOR:

HELEN ELLINOR BERRÚS JIMÉNEZ

Guayaquil - Ecuador

2026

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la verificación del método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la valoración cuantitativa de nitaxozanida en materia prima farmacéutica, conforme a los lineamientos de la ICH Q2(R1), la USP <1225> y la guía EURACHEM. El desempeño del método fue evaluado mediante los parámetros de repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, especificidad y linealidad.

La repetibilidad mostró un coeficiente de variación (%RSD) de 0,589 %, mientras que la precisión intermedia presentó un %RSD de 1,13 %, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos. La exactitud, evaluada por estudios de recuperación a niveles del 80, 100 y 120 %, arrojó valores promedio entre 98,94 % y 99,60 %, sin diferencias estadísticamente significativas entre niveles ($p > 0,05$). La especificidad fue confirmada mediante estudios de estrés térmico y análisis de pureza de pico con detector PDA, demostrando ausencia de interferencias. La linealidad fue adecuada en el rango de 0,062 a 0,145 mg/mL, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9990$.

Adicionalmente, la estimación de la incertidumbre de medición mostró un resultado de $99,37 \% \pm 0,95 \%$ ($k = 2$), confirmando la confiabilidad metrológica del método. En conclusión, el método verificado es preciso, exacto, específico y apto para su aplicación en control de calidad farmacéutico.

ABSTRACT

In this study, the analytical method by high-performance liquid chromatography (HPLC) for the quantitative assay of nitazoxanide in pharmaceutical raw material was verified in accordance with ICH Q2(R1), USP <1225>, and EURACHEM guidelines. The method performance was evaluated through the parameters of repeatability, intermediate precision, accuracy, specificity, and linearity.

Repeatability showed a relative standard deviation (%RSD) of 0.589%, while intermediate precision presented a %RSD of 1.13%, meeting the established acceptance criteria. Accuracy was assessed by recovery studies at 80%, 100%, and 120% concentration levels, yielding average recoveries between 98.94% and 99.60%, with no statistically significant differences among levels ($p > 0.05$). Specificity was demonstrated using thermal stress studies and peak purity analysis with a photodiode array (PDA) detector, confirming the absence of interference from degradation products or matrix components. Linearity was verified over a concentration range of 0.062 to 0.145 mg/mL, with a coefficient of determination (R^2) of 0.9990.

Additionally, measurement uncertainty estimation resulted in a final value of $99.37\% \pm 0.95\%$ ($k = 2$), confirming the method's metrological reliability. In conclusion, the verified HPLC method is precise, accurate, specific, and suitable for routine quality control of nitazoxanide pharmaceutical raw material.

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía, mi fortaleza y mi refugio en cada etapa de este camino, por darme la fe y la perseverancia para no rendirme.

A mi mami Annabella, por su amor infinito, su paciencia y su apoyo incondicional, por ser mi mayor inspiración y el motor que me impulsa a seguir adelante.

A mi papá Bolívar, por su esfuerzo, su ejemplo y sus enseñanzas, que han sido fundamentales para alcanzar este logro.

AGRADECIMIENTO

Expreso mi sincero agradecimiento al Dr. César Araque, por su valiosa orientación, apoyo académico y acompañamiento constante durante el desarrollo de este trabajo de investigación. Asimismo, agradezco al Laboratorio Químico Farmacéutico, por facilitar las instalaciones y recursos necesarios que hicieron posible la realización del presente estudio.

Declaración Expresa

Yo Helen Ellinor Berrús Jiménez acuerdo y reconozco que: La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. El o los estudiantes deberán procurar en cualquier caso de cesión de sus derechos patrimoniales incluir una cláusula en la cesión que proteja la vigencia de la licencia aquí concedida a la ESPOL.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, secreto empresarial, derechos patrimoniales de autor sobre software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autores/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 19 de marzo del 2026.

Q.F Helen Ellinor Berrús Jiménez

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

César Augusto Araque Molina, Ph.D
TUTOR

Michael Guillermo Rendón Morán, MS.c..
EVALUADOR

Joel Vielma Puente, Ph.D.
PRESIDENTE

ABREVIATURAS O SIGLAS

- **ANVISA:** Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).
- **BPF / GMP:** Buenas Prácticas de Fabricación (Good Manufacturing Practices).
- **BPL / GLP:** Buenas Prácticas de Laboratorio (Good Laboratory Practices).
- **CAPA:** Acciones Correctivas y Preventivas (Corrective and Preventive Actions).
- **ChP:** Farmacopea China (Chinese Pharmacopoeia).
- **COVID-19:** Enfermedad por Coronavirus 2019 (Coronavirus Disease 2019).
- **DoE:** Diseño de Experimentos (Design of Experiments).
- **GC-MS:** Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (Gas Chromatography–Mass Spectrometry).
- **HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (High Performance Liquid Chromatography).
- **ICH:** Consejo Internacional de Armonización (International Council for Harmonisation).
- **ICH Q2(R1):** Guía para la validación de procedimientos analíticos (Validation of Analytical Procedures).
- **ICH Q8:** Desarrollo Farmacéutico (Pharmaceutical Development).
- **ICH Q9:** Gestión de Riesgos de Calidad (Quality Risk Management).
- **ICH Q10:** Sistema de Calidad Farmacéutica (Pharmaceutical Quality System).
- **ISO/IEC 17025:** Norma internacional para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración.
- **LC-MS:** Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (Liquid Chromatography–Mass Spectrometry).
- **NTZ:** Nitazoxanida.
- **OOS:** Resultados Fuera de Especificación (Out of Specification).
- **QA:** Aseguramiento de la Calidad (Quality Assurance).
- **QC:** Control de Calidad (Quality Control).
- **QbD:** Calidad por Diseño (Quality by Design).
- **TQM:** Gestión de Calidad Total (Total Quality Management).
- **UEEA:** Unión Económica Euroasiática.
- **USP:** Farmacopea de los Estados Unidos (United States Pharmacopoeia).

- **UV / UV-Vis:** Ultravioleta / Ultravioleta-Visible.
- **WHO / OMS:** Organización Mundial de la Salud (World Health Organization).

ÍNDICE

CAPÍTULO 1.....	1
-----------------	---

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 Descripción del problema	3
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo General.....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Hipótesis.....	5
1.5 Alcance.....	5
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Introducción a la Calidad en la Industria Farmacéutica	7
2.2 Importancia del Control de Calidad en Materias Primas.....	8
2.3 Rol de los Métodos Analíticos en la Garantía de Calidad.....	9
2.4 Normativas Internacionales que Rigen el Análisis Farmacéutico	10
2.5 Caracterización de la nitaxozanida como Principio Activo.....	13
2.6 Formas Farmacéuticas y Relevancia del Análisis en Materia Prima	15
2.7 Fundamentos de la técnica HPLC	17
2.8 Aplicaciones de la HPLC en el análisis de nitazoxanida	18
2.9 Ventajas y limitaciones del método cromatográfico.....	19
2.10 Parámetros críticos en el desarrollo y verificación de métodos	20
2.11 Verificación de métodos analíticos: conceptos y alcance	21
2.11.1 Diferencias entre validación y verificación	21
2.11.2 Requisito de verificación.....	23
2.12 Condiciones específicas de laboratorio y su impacto	24
2.12.1 Estimación de la incertidumbre de medición	26
2.12.2 Fundamentos metrológicos de la incertidumbre	26
2.12.3 Fuentes de incertidumbre en los métodos cromatográficos	27
2.12.4 Modelos de cálculo	29

2.12.5 Interpretación y aplicación de la incertidumbre en los laboratorios farmacéuticos	30
CAPÍTULO 3.....	32
3. METODOLOGÍA.....	32
3.1 Enfoque de la investigación.....	32
3.1.1 Tipo de investigación.....	32
3.1.2 Diseño de la investigación.....	32
3.2 Metodología.....	33
3.2.1 Variables.....	33
3.2.2 Diseño experimental.....	33
3.2.3 Recolección de datos.....	34
3.3 Métodos y técnicas.....	34
3.3.1 Reactivos y soluciones.....	34
3.3.2 Condiciones cromatográficas.....	35
3.3.3 Columna cromatográfica.....	35
3.3.4 Preparación del buffer fosfato monobásico de sodio pH 3,00.....	35
3.3.5 Preparación de las soluciones de trabajo.....	36
3.4 Verificación de método analítico.....	40
3.4.1 Precisión intermedia.....	40
3.4.2 Evaluación de la correlación.....	41
3.4.3 Análisis de varianza (ANOVA) de la curva de calibración.....	41
3.4.4 Exactitud.....	42
3.4.5 Linealidad.....	43
3.4.6 Especificidad.....	44
3.4.7 Repetibilidad.....	45
3.5 Recursos.....	47
3.6 Análisis estadístico.....	48
CAPÍTULO 4.....	50

4. RESULTADOS	50
4.1 Evaluación del desempeño analítico del método HPLC conforme a la USP	50
4.1.1 Repetibilidad	50
4.1.2 Precisión intermedia	52
4.1.3 Exactitud.....	55
4.1.4 Especificidad	57
4.1.5 Linealidad	61
4.2 Estimación y análisis de la incertidumbre de medición del método HPLC.....	62
4.3 Comparación del método con los criterios de la USP y su aplicabilidad en el laboratorio.....	67
4.3.1 Comparación del método con los criterios de la USP <1225> e ICH Q2(R1).....	67
4.3.2 Evaluación de la incertidumbre y confiabilidad metrológica del método	69
4.3.3 Aplicabilidad del método en el laboratorio de control de calidad	69
CAPÍTULO 5.....	71
5. Conclusiones	71
5.1 Recomendaciones	72
6. Referencias	73
APÉNDICES.....	80
APÉNDICE A: REPETIBILIDAD	80
APÉNDICE B: PRECISIÓN INTERMEDIA	82
APÉNDICE C: Exactitud	85
APÉNDICE D: LINEALIDAD.....	88
APÉNDICE E: Certificado de estándar utilizado	89
APÉNDICE F: Reactivos, soluciones, estándar, muestra, columna utilizados en análisis.	91

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1 Mecanismo de acción farmacológica de la nitaxozanida como principio activo
..... 14

Figura 3.1 Diagrama de flujo correspondiente al procedimiento analítico utilizado para la determinación cuantitativa de nitazoxanida por HPLC.	39
Figura 4.1 Cromatograma correspondiente al blanco antes de la estufa	59
Figura 4.2 Cromatograma correspondiente al estándar antes de la estufa	59
Figura 4.3 Cromatogramas correspondiente a la muestra antes de la estufa	59
Figura 4.4 Cromatograma correspondiente al blanco después de la estufa	60
Figura 4.5 Cromatograma correspondiente al estándar después de la estufa	60
Figura 4.6 Cronograma correspondiente a la muestra después de la estufa	60
Figura 4.7 Curva de calibración de Nitazoxanida	61
Figura 4.8 Diagrama de Ishikawa para la identificación de fuentes de incertidumbre en la valoración de nitazoxanida por HPLC.	64
Fig. A1, Parámetros de identificación y preparación de estándar en el software Empower	80
Fig. A2, Secuencia cromatográfica empleada en el estudio de repetibilidad del método analítico	80
Fig. A3, Cromatogramas superpuestos de Nitazoxanida correspondientes al análisis de repetibilidad	80
Fig. A4, Datos y cálculos del estudio de repetibilidad del método para Nitazoxanida ...	81
Fig. B1, Resultados del estándar de Nitazoxanida obtenidos en tres días de análisis para la evaluación de la precisión intermedia	82
Fig. B2, Resultados experimentales del estudio de precisión intermedia en tres días de análisis	82
Fig. B3, Análisis de varianza (ANOVA) de un factor para la evaluación de la precisión intermedia del método	83
Fig. B4, Parámetros de identificación y preparación de estándar en el software Empower correspondiente al día 1.	83
Fig. B5, Cromatogramas superpuestos y secuencia de Nitazoxanida correspondientes al análisis de precisión intermedia correspondiente al día 1.	83
Fig. B6, Parámetros de identificación y preparación de estándar en el software Empower correspondiente al día 2.	84
Fig. B7, Cromatogramas superpuestos y secuencia de Nitazoxanida correspondientes al análisis de precisión intermedia correspondiente al día 2.	84

Fig. B8, Cromatogramas superpuestos y secuencia de Nitazoxanida correspondientes al análisis de precisión intermedia correspondiente al día 3.	84
Fig. C1, Resultados del estudio de exactitud (recuperación) el método HPLC para la cuantificación de nitazoxanida a los niveles 80, 100 y 120 %	85
Fig. C2, Datos de preparación y evaluación del estándar de nitazoxanida para el análisis por HPLC.....	86
Fig. C3, Evaluación estadística de la exactitud del método mediante ANOVA	86
Fig. C4, Cromatogramas superpuestos y secuencia de Nitazoxanida correspondientes al análisis de exactitud	87
Fig. D1, Cromatogramas superpuestos y secuencia de Nitazoxanida correspondientes al análisis de linealidad	88
Fig. D2, Datos experimentales y resultados del estudio de linealidad del método HPLC para la cuantificación de nitazoxanida	88
Fig. F1 Reactivos.....	91
Fig. F2 Estándar	92
Fig. F3, Columna cromatográfica	92
Fig. F4, Soluciones.....	92
Fig. F5, Materia prima	93

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Análisis comparativo de estudios sobre directrices internacionales en la validación de métodos analíticos.....	11
Tabla 2.2 Análisis de Estudios Clave sobre la Armonización Regulatoria y la Validación de Métodos Analíticos	12
Tabla 2.3 Métodos de Caracterización de la Nitazoxanida.....	16
Tabla 2.4 Diferencias Clave entre Validación y Verificación de Métodos según Normativas ICH y USP	22
Tabla 3.1 Resumen de los parámetros de verificación del método analítico para Nitazoxanida.....	46
Tabla 4.1 Comparación de la repetibilidad del método analítico para Nitazoxanida respecto a métodos reportados en la literatura.	51
Tabla 4.2 Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión intermedia del método HPLC para la determinación de nitazoxanida.	54
Tabla 4.3 Resultados del estudio de exactitud del método HPLC para la determinación de nitazoxanida a los niveles de concentración 80, 100 y 120%.....	57
Tabla 4.4 Resultado de especificidad.....	58
Tabla 4.5 Cálculo de incertidumbre del método analítico por HPLC para la valoración de Nitazoxanida.....	66
Tabla 4.6 Comparación de los parámetros de validación del método HPLC con los criterios de la USP <1225> e ICH Q2(R1).....	68

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La calidad y seguridad de los productos farmacéuticos dependen en gran parte del control estricto de sus ingredientes farmacéuticos activos (API). La nitazoxanida, un compuesto de tiazolida con propiedades antiparasitarias y antivirales de amplio espectro, es un API importante que se usa para tratar varias infecciones gastrointestinales y sistémicas (Fox y Saravolatz, 2005). Para asegurar su eficacia y seguridad, es fundamental medir con precisión la nitazoxanida en su forma de materia prima durante la fabricación. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utiliza como método estándar para este análisis, ya que ofrece alta precisión, exactitud y permite separar el API de impurezas y productos de degradación (Skoog et al., 2017). Un método de HPLC para nitazoxanida generalmente involucra una columna C18 de fase inversa con una fase móvil que consiste en una mezcla de un tampón acuoso y un solvente orgánico como acetonitrilo, junto con la detección UV en una longitud de onda específica, a menudo alrededor de 340-350 nm donde la nitazoxanida exhibe una fuerte absorbancia (Shah et al., 2008). Si bien existen métodos robustos de HPLC para nitazoxanida en farmacopeas y literatura científica, un laboratorio farmacéutico no puede simplemente adoptar un método publicado sin confirmar su idoneidad bajo sus propias condiciones, equipos y personal específicos. Este proceso de confirmación se conoce formalmente como verificación de métodos.

Es importante diferenciar entre la verificación y la validación de métodos. La validación consiste en demostrar formalmente que un nuevo procedimiento analítico cumple con su propósito y define sus características desde el inicio (ICH Expert Working Group, 2005). En cambio, la verificación confirma que un método ya validado, como los de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) o de un proveedor, funciona correctamente en un laboratorio diferente (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos, 2023). La verificación es menos extensa que la validación, pero sigue siendo un requisito obligatorio para asegurar que el laboratorio puede realizar la prueba de manera competente.

La verificación de un método de HPLC para la materia prima de nitazoxanida requiere evaluar algunos parámetros de validación para asegurar su buen desempeño. Según el Capítulo General <1225> de la USP, los parámetros clave incluyen exactitud, precisión y especificidad. La exactitud se comprueba con estudios de recuperación, añadiendo cantidades conocidas de nitazoxanida a una matriz de placebo y calculando el porcentaje recuperado. La precisión se evalúa haciendo varias inyecciones repetidas de una muestra (repetibilidad) y analizando la misma muestra en diferentes días, con distintos analistas o equipos (precisión intermedia). La especificidad se demuestra mostrando que el método puede medir la nitazoxanida claramente, incluso si hay impurezas, productos de degradación o componentes de la matriz, asegurando que el pico de interés sea puro y bien separado (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos, 2023).

Verificar un método de HPLC para el análisis de nitazoxanida es una medida clave de control de calidad que asegura que un procedimiento validado funcione bien en la práctica diaria. Esta verificación demuestra con documentación que el laboratorio puede medir de forma confiable y constante la pureza del API de nitazoxanida, lo que protege la calidad de los productos farmacéuticos y garantiza el cumplimiento de normas internacionales como las de la FDA y la EMA.

1.1 Antecedentes

La nitazoxanida es un antiparasitario de amplio espectro que actúa contra varios protozoos intestinales, helmintos y bacterias anaeróbicas (Malesuik et al., 2012; Ornaf & Dong, 2005). Se presenta en comprimidos y suspensiones orales, y está aprobada para tratar infecciones por *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* (Reynoso & Clinton White, 2017).

Saleh et al. (2014) propusieron un enfoque moderno usando el ciclo de vida analítico y simulación Monte Carlo para desarrollar un método HPLC robusto para la Nitazoxanida. Identificaron variables clave como el porcentaje de acetonitrilo, el pH y el flujo (Ornaf & Dong, 2005). Este método resultó confiable y reproducible, en línea con los principios de calidad por diseño (QbD).

Panda y Bera desarrollaron un método RP-HPLC para tabletas, validando la linealidad (5–25 µg/mL), precisión y exactitud, con un coeficiente de correlación de 0.9948 (Panda et al., 2019). De manera similar, Derbouz et al. aplicaron un método para suspensiones orales y lograron resultados consistentes en recuperación y precisión (Derbouz et al., 2025). Gély C et al. propusieron un método para evaluar la estabilidad, analizando la degradación de la Nitazoxanida bajo estrés hidrolítico, térmico, fotolítico y oxidativo, lo que ayuda a verificar la especificidad del método (Gély et al., 2024). Marques et al. desarrollaron un método para estimar Nitazoxanida y Ofloxacina al mismo tiempo, mostrando su utilidad en formulaciones combinadas (Marques et al., 2023). Kurien et al. validaron un método para polvo para suspensión, confirmando su precisión y robustez (Kurien & Jayasekhar, 2014).

La guía ecuatoriana G-DAL-03 indica que la verificación de métodos no modificados debe incluir la evaluación de precisión, exactitud y linealidad en el laboratorio que los usa. Esto es importante al adoptar métodos validados por fabricantes o la literatura científica (Jadhav et al., 2007; Narayana et al., 2006; Ornaf & Dong, 2005). La guía ICH Q2(R1) ofrece lineamientos internacionales para validar y verificar métodos analíticos, con criterios para especificidad, linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación. Estudios como el de Santosh et al. han mostrado que los métodos validados para Nitazoxanida en suspensión oral tienen coeficientes de correlación mayores a 0.999 y valores de RSD menores al 1%. Hao et al. estudiaron cómo la temperatura de la columna y la composición de la fase móvil afectan la selectividad de HILIC, lo que puede ser útil para adaptar el método a matrices más complejas (Glisoni & Sosnik, 2014; Kalta et al., 2008; Nakamoto et al., 2010; Reddy & Subbareddy, 2012). Así, esta investigación busca cerrar esa brecha técnica, verificando un método cromatográfico validado para cuantificar Nitazoxanida en materia prima e incorporando la evaluación de la incertidumbre metrológica como indicador de confiabilidad en los resultados.

1.2 Descripción del problema

En la industria farmacéutica, la calidad de las materias primas es fundamental para garantizar la seguridad, eficacia y conformidad de los medicamentos. La Nitazoxanida,

es un principio activo con propiedades antiparasitarias de amplio espectro que actúa inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos en los parásitos y resulta útil en el tratamiento de céstodos, tremátodos, nemátodos y protozoarios, la cual debe ser cuantificada mediante métodos analíticos confiables que aseguren resultados precisos y reproducibles. Por otro lado, las farmacopeas oficiales, como la USP, establecen metodologías validadas que sirven como referencia normativa para el control de calidad. Sin embargo, estas metodologías no pueden ser implementadas directamente sin una verificación previa por parte del laboratorio que las aplica.

La verificación del método analítico es una exigencia regulatoria contemplada en normativas internacionales como la USP <1225>, la guía ICH Q2(R1) y la norma ISO/IEC 17025. Esta verificación busca demostrar que un método previamente validado mantiene su desempeño bajo las condiciones específicas del laboratorio: personal, equipos, reactivos y entorno. También se revela que la estimación de la incertidumbre de medición se ha convertido en un requisito clave para evaluar la confiabilidad de los resultados, permitiendo cuantificar el grado de confianza asociado a cada medición ya que refleja la calidad del sistema metrológico completo.

Ignorar estos procesos puede comprometer la trazabilidad metrológica, generar resultados analíticos poco confiables y poner en riesgo el cumplimiento regulatorio, afectando directamente la calidad del producto final. En este contexto, surge la necesidad de verificar formalmente el método cromatográfico por HPLC para la valoración de Nitazoxanida en materia prima farmacéutica, conforme a los criterios establecidos por la USP, e incorporar la estimación de la incertidumbre como parte integral del proceso.

Es por esto por lo que, en base a lo planteado se tiene la siguiente interrogante:

¿Puede el método analítico por HPLC para la valoración de Nitazoxanida en materia prima farmacéutica ser verificado satisfactoriamente bajo las condiciones operativas del laboratorio, cumpliendo con los parámetros de desempeño establecidos por la USP y con una incertidumbre de medición aceptable?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Verificar el método analítico por HPLC para la valoración cuantitativa de Nitazoxanida en materia prima farmacéutica, evaluando su cumplimiento con los parámetros de desempeño establecidos por la USP, incluyendo precisión, exactitud, linealidad, especificidad y estimación de la incertidumbre de medición bajo condiciones reales del laboratorio de control de calidad.

1.3.2 Objetivos específicos

- Evaluar los parámetros de desempeño analítico del método por HPLC, incluyendo precisión, exactitud, linealidad y especificidad, conforme a lo establecido en la USP.
- Estimar la incertidumbre de medición asociada al procedimiento analítico, identificando y cuantificando las principales fuentes de variabilidad siguiendo los lineamientos establecidos en la norma aplicable.
- Comparar los resultados obtenidos con los criterios de aceptación establecidos por la USP y otras normativas, validando la aplicabilidad del método en el entorno operativo del laboratorio.

1.4 Hipótesis

El método analítico por HPLC para la valoración de Nitazoxanida en materia prima farmacéutica puede ser verificado satisfactoriamente bajo las condiciones operativas del laboratorio de control de calidad, cumpliendo con los parámetros de desempeño establecidos por la USP y presentando una incertidumbre de medición dentro de límites aceptables para su aplicación rutinaria.

1.5 Alcance

Este estudio se enfoca en la verificación del método analítico por HPLC para la valoración cuantitativa de Nitazoxanida en materia prima farmacéutica, conforme a los criterios establecidos por la USP. La verificación se realizará bajo las condiciones

reales del laboratorio de control de calidad, considerando el personal, los equipos, los reactivos y el entorno operativo.

Se evaluarán los parámetros de desempeño analítico (precisión, exactitud, linealidad y especificidad) y se estimará la incertidumbre de medición asociada al procedimiento. El estudio no contempla el desarrollo ni la validación inicial del método, ni el análisis de formas farmacéuticas terminadas o matrices distintas a la materia prima y tendrá un periodo de duración de 6 meses.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción a la Calidad en la Industria Farmacéutica

El aseguramiento de la calidad (QA) y el control de calidad (QC) constituyen pilares esenciales en la fabricación farmacéutica, ya que garantizan la seguridad, eficacia y confiabilidad de los medicamentos a lo largo de todo el ciclo de vida del producto (Jadhav et al., 2025). La gestión de la calidad farmacéutica ha evolucionado desde controles básicos hasta metodologías integrales de Gestión de Calidad Total (TQM), impulsadas por exigencias regulatorias y avances tecnológicos (Adulapuram Aroon et al., 2024).

Los marcos regulatorios fundamentales, como las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y las directrices del Consejo Internacional de Armonización (ICH), constituyen la base de los sistemas de calidad (Jadhav, 2025; Rumane, 2018). La Gestión de Calidad Total (TQM) implica un enfoque integral que abarca todas las etapas de la fabricación farmacéutica, desde el desarrollo inicial hasta la seguridad de los medicamentos comercializados, e incorpora conceptos contemporáneos como la Calidad por Diseño y la gestión de riesgos de calidad (Kadam y Bhavsar, 2022). Los sistemas de gestión de calidad son para la gestión de calidad resulta especialmente crítica en el sector farmacéutico, dado que los medicamentos se destinan directamente a los consumidores. Esto exige una adhesión rigurosa a los estándares de identidad, pureza y calidad, además de favorecer la uniformidad global necesaria para el comercio internacional (Rumane, 2018). como un enfoque proactivo y sistemático para el desarrollo farmacéutico, centrado en objetivos predefinidos, la comprensión exhaustiva del proceso y una gestión rigurosa del riesgo (Mohurle, 2019; Sreelekha, 2023). A diferencia de los métodos tradicionales, que dependen en gran medida de las pruebas finales, QbD promueve una estrategia más científica que se alinea con las directrices del Consejo Internacional de Armonización (ICH), específicamente las guías Q8 (Desarrollo Farmacéutico), Q9 (Gestión de Riesgos de Calidad) y Q10 (Sistema de Calidad Farmacéutica). Esta metodología no solo optimiza

la eficiencia y reduce los costos, sino que también eleva la calidad, seguridad y eficacia de los productos finales (Sreelekha et al., 2023).

La implementación de QbD se integra de manera efectiva en el sistema de gestión de calidad farmacéutica, un marco que abarca el Aseguramiento de Calidad (QA), el Control de Calidad (QC) y las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF). Estos elementos resultan esenciales para garantizar la identidad, potencia, pureza y seguridad de los medicamentos (Sontakke, 2023).

En este sistema, la documentación de procesos críticos como las desviaciones, las investigaciones de resultados fuera de especificación (OOS) y las Acciones Correctivas y Preventivas (CAPA) es fundamental. Estos procedimientos permiten identificar y mitigar riesgos para la calidad del producto y la seguridad del paciente, además de establecer las causas raíz de los problemas, lo que impulsa la mejora continua del sistema y del proceso de fabricación (Khan, 2024).

2.2 Importancia del Control de Calidad en Materias Primas

La fabricación farmacéutica requiere la aplicación de pruebas analíticas exhaustivas para garantizar la seguridad, la eficacia y el cumplimiento normativo estricto de los medicamentos. El análisis farmacéutico contemporáneo combina tecnologías tradicionales y avanzadas, lo que asegura un control de calidad integral (Ting Wang et al., 2024). En particular, los comprimidos deben cumplir con estrictos estándares de identidad, potencia, calidad, pureza y estabilidad, conforme a lo establecido por las farmacopeas internacionales.

El control de calidad comprende todas las etapas del proceso de producción, desde la inspección inicial de las materias primas y el monitoreo continuo de los procesos de fabricación hasta la evaluación final de los productos terminados. Durante estas fases, las unidades de control de calidad determinan si un lote cumple con los criterios establecidos para su aprobación o debe ser rechazado.

Aunque las técnicas establecidas han demostrado eficacia, la industria farmacéutica está incorporando tecnologías analíticas emergentes, como los métodos de atributos múltiples, las pruebas microbianas rápidas y la espectroscopia Raman, que ofrecen

mayor eficiencia y capacidad de análisis. Sin embargo, la adopción generalizada de estas innovaciones se ve limitada por la ausencia de expectativas regulatorias armonizadas a nivel global, lo que genera incertidumbre respecto a su validación y aceptación por parte de las diferentes agencias de salud (Ting Wang et al., 2024).

Esta situación resalta la necesidad de colaboración internacional para desarrollar directrices claras que faciliten la integración de herramientas analíticas avanzadas y permitan a la industria farmacéutica mejorar continuamente sus estándares de calidad y seguridad.

2.3 Rol de los Métodos Analíticos en la Garantía de Calidad

Los métodos analíticos son esenciales para la garantía de calidad en la industria farmacéutica, ya que aseguran que los medicamentos sean seguros, eficaces y consistentes. Estos métodos confirman la identidad y pureza de los ingredientes, miden su potencia y detectan contaminantes o impurezas, cumpliendo con las normas del sector.

La espectroscopia de absorción UV es una técnica fundamental y muy utilizada. Ofrece resultados rápidos, precisos y exactos en el control de calidad de medicamentos y formulaciones, y es clave para detectar impurezas y realizar análisis cuantitativos (Urooj y Rizwana, 2021).

La cromatografía ha cambiado el análisis farmacéutico. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es muy versátil porque puede conectarse a detectores como la espectroscopia UV-Visible, la espectrometría de masas (MS) y la detección de fluorescencia. Esto permite analizar los principios activos sin que los excipientes interfieran (Parys, 2022).

Además de la HPLC, la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) se ha vuelto una herramienta clave en el análisis farmacéutico, sobre todo en los últimos años. Se usa para descubrir nuevos fármacos, caracterizar productos, hacer estudios metabólicos e identificar impurezas y productos de degradación (Beccaria y Cabooter, 2020).

Existen otros métodos cromatográficos que complementan estas técnicas. La cromatografía de capa fina con densitometría se usa para identificar sustancias biológicamente activas, y la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) es muy útil para analizar compuestos volátiles como los aceites esenciales (Parys, 2022). Estas técnicas avanzadas ayudan a mejorar los tiempos de retención y a determinar el peso molecular, lo que amplía el análisis farmacéutico y refuerza los estándares de calidad (Beccaria y Cabooter, 2020).

2.4 Normativas Internacionales que Rigen el Análisis Farmacéutico

La armonización de las directrices regulatorias internacionales ha influido mucho en la validación de métodos analíticos en el control de calidad farmacéutico. Un análisis comparativo muestra diferencias importantes entre los requisitos de la ICH, la USP, la Farmacopea China y ANVISA, lo que representa desafíos para las compañías farmacéuticas y las autoridades sanitarias (Selvaraja Elumalai, 2024).

La revisión de la ICH Q2(R1) y la creación de la nueva guía ICH Q14 buscan mejorar la comunicación regulatoria y evitar el trabajo duplicado. Esto ayuda a la armonización global y facilita la aprobación de medicamentos (Chaursiya y Dumpala, 2020). La validación de métodos sigue siendo esencial para las presentaciones regulatorias, y las directrices de la ICH son la base para la armonización en mercados como la Comunidad Europea, Japón y Estados Unidos (Shabir, 2004).

La adopción de conceptos de gestión del ciclo de vida para métodos analíticos, apoyada por organismos como la ICH y la USP, fomenta enfoques de calidad por diseño. Esto mejora la robustez del método y, al mismo tiempo, reduce los costos y la carga regulatoria (Parr y Schmidt, 2018).

La armonización de las directrices regulatorias internacionales es clave para estandarizar los procesos de control de calidad farmacéutica en todo el mundo. Sin embargo, todavía hay diferencias importantes entre las regulaciones de organismos como el ICH, la USP, la Farmacopea China (ChP) y ANVISA. Estas diferencias representan un reto para las compañías farmacéuticas y las autoridades sanitarias, ya

que la validación de métodos analíticos sigue siendo esencial para aprobar medicamentos. Según la tabla 2.1 resume estudios clave sobre los enfoques regulatorios y las limitaciones en la validación de métodos analítico.

Tabla 2.1 Análisis comparativo de estudios sobre directrices internacionales en la validación de métodos analíticos.

Tema	Metodología	Limitaciones	Referencia
Enfoques del Ciclo de Vida Analítico	Análisis crítico de directrices (ICH Q14) y consulta a expertos.	Falta de debate y proyectos piloto. Necesidad de capacitación. Se requiere modificar las regulaciones de la UEEA.	Fetisova, 2024
Armonización Bioanalítica Global	Debates colaborativos en reuniones internacionales para mejorar las pautas de validación.	Diferencias en la interpretación regional. Riesgo de nuevos estándares. Múltiples regulaciones no optimizan la generación de datos.	Timmerman, 2010
Análisis Comparativo de Requisitos Regulatorios	Comparación detallada de los requisitos de validación en ICH, USP, ChP y ANVISA.	Falta de armonización entre organismos. Desacuerdos entre reguladores y organizaciones. Directrices no uniformes.	Elumalai, 2024
Nuevas Tendencias en la Calidad por Diseño (QbD)	Aplicación de los principios de QbD y Diseño de Experimentos (DoE) en el desarrollo de métodos.	QbD no es obligatorio, lo que limita su adopción. Falta de investigación y recursos. Poca familiaridad con los enfoques basados en riesgos.	Orlandini, 202

Nota: La tabla presenta un análisis comparativo de estudios clave que abordan las directrices internacionales para la validación de métodos analíticos, enfocándose en los desafíos regulatorios y las nuevas tendencias metodológicas. El año de la referencia Orlandini et al. se muestra incompleto en la fuente original.

La United States Pharmacopeia (USP) y la ICH Q2(R1) constituyen las directrices más influyentes para la validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica. La USP presenta un enfoque prescriptivo, con monografías específicas y valores numéricos fijos que proporcionan un marco claro para el cumplimiento normativo. En contraste, la ICH Q2(R1), reconocida en Europa, Japón y Estados Unidos, adopta un enfoque basado en el riesgo, lo que otorga a las compañías mayor flexibilidad y la posibilidad de aplicar juicio científico, especialmente en la justificación de los criterios de aceptación (Selvaraja Elumalai, 2024).

La norma ISO/IEC 17025 se enfoca en la competencia técnica de los laboratorios. Aunque no es obligatoria para la industria farmacéutica, su acreditación representa un complemento valioso a las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP). Esta norma proporciona un marco de gestión de calidad que garantiza la fiabilidad y trazabilidad de los resultados de laboratorio, lo que fortalece la confianza de los clientes. Los informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y sus directrices, como las Buenas Prácticas para Laboratorios de Control de Calidad Farmacéutica (GPL), establecen un marco global, especialmente relevante para países con recursos regulatorios limitados. La OMS prioriza la estandarización de procedimientos y la capacitación, abarcando desde el muestreo y la manipulación de muestras hasta la validación de métodos y los estudios de estabilidad, lo que contribuye a garantizar la calidad de los medicamentos a nivel mundial (WHO, 2020).

En la tabla 2.2 tenemos un análisis de estudios claves y recientes sobre la armonización regulatoria y la validación de métodos analíticos.

Tabla 2.2 Análisis de Estudios Clave sobre la Armonización Regulatoria y la Validación de Métodos Analíticos

Estándar	Enfoque Principal	Aplicación y Rol	Relación con otros Estándares
ICH Q2(R1)	Validación basada en el riesgo y el ciclo de vida. La directriz se enfoca en la validación de los métodos analíticos para su uso previsto.	Aplicable a métodos para impurezas, ensayos y tests de identificación. Es la base para la armonización global.	Complementa a ICH Q14 y Q8 a Q12, integrándose en el sistema de calidad farmacéutica global.
USP	Enfoque prescriptivo con monografías fijas. Establece los requisitos de calidad y pureza para medicamentos y excipientes.	Proporciona estándares de cumplimiento claros y directos para el mercado de EE. UU. y otros mercados que la adoptan.	A menudo se compara con ICH, ofreciendo un camino más claro, pero con menos flexibilidad. La adopción de QbD está en aumento, lo que alinea sus prácticas con los principios de la ICH.
ISO/IEC 17025	Competencia y gestión de calidad del laboratorio.	Acreditación voluntaria que demuestra la	No es un sustituto de las GMP, pero su implementación fortalece

	Asegura que un laboratorio puede producir resultados válidos y confiables.	competencia técnica de un laboratorio. Es un complemento a las GMP.	el sistema de calidad, ya que cubre aspectos como la incertidumbre de la medición y la trazabilidad (ISO/IEC, 2017).
Informes de la OMS	Guía de Buenas Prácticas para el control de calidad. Proporciona directrices prácticas y generales para asegurar la calidad de los medicamentos.	Utilizada por agencias reguladoras de todo el mundo para establecer sus propios estándares nacionales y programas de control de calidad.	La OMS colabora con otras organizaciones como la ICH y la PAHO para armonizar protocolos y metodologías a nivel regional y global.

Nota: Se presenta un resumen conciso de los hallazgos de estudios recientes que exploran estos retos y los enfoques para superarlos, destacando la metodología de investigación y las limitaciones identificadas.

2.5 Caracterización de la nitaxozanida como Principio Activo

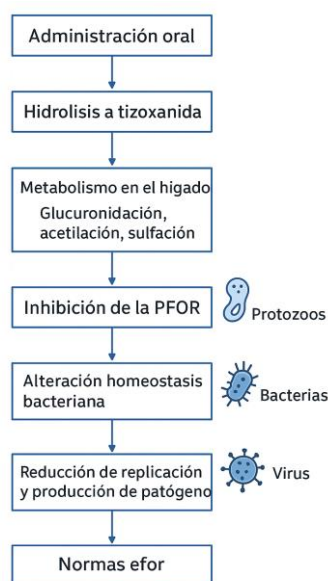
La nitaxozanida (NTZ) es un derivado del nitrotiazol benzamida conocido por su amplio espectro de acción contra protozoos intestinales, helmintos, bacterias anaerobias grampositivas y gramnegativas, y varios virus que afectan a humanos y animales. Es un agente antiinfeccioso versátil porque puede interferir en procesos biológicos clave de muchos patógenos.

La nitazoxanida está aprobada para tratar la giardiasis y la criptosporidiosis, sobre todo en pacientes inmunocompetentes. En los últimos años, también se ha estudiado para tratar enfermedades infecciosas emergentes y crónicas como la hepatitis B, hepatitis C, infecciones por *Helicobacter pylori*, rotavirus y, más recientemente, COVID-19, donde ha mostrado resultados prometedores como medicamento reposicionado (Aslam & Musher, 2007; Bharti, 2021).

Una característica importante de la nitazoxanida es que, después de administrarse por vía oral, se transforma rápidamente en su metabolito activo, la tizoxanida, que produce la mayoría de sus efectos farmacológicos. Este metabolito pasa por reacciones de fase II como glucuronidación, acetilación y sulfación, generando productos como tizoxanida glucurónido, tizoxanida sulfato e hidroxil-tizoxanida. Estas diferencias metabólicas entre especies explican las variaciones en farmacocinética y eficacia terapéutica en distintos modelos (Huang, 2015).

La nitazoxanida actúa inhibiendo la enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductasa (PFOR), que es esencial para el metabolismo anaerobio de protozoos como *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* spp. Al bloquear este sistema, impide la transferencia de electrones necesaria para que los parásitos produzcan energía, lo que interrumpe su ciclo vital y lleva a su eliminación (Bharti, 2021).

Figura 2.1 Mecanismo de acción farmacológica de la nitazoxanida como principio activo



Nota: La nitazoxanida se convierte en tizoxanida tras su administración oral. Este metabolito inhibe la enzima PFOR en protozoos, altera la homeostasis bacteriana y bloquea la replicación y maduración viral, lo que explica su amplio espectro frente a parásito.

Estudios recientes han demostrado que la NTZ y su metabolito tizoxanida tienen efectos antivirales importantes. Actúan en varias etapas de la replicación viral, como la maduración de proteínas, la formación de complejos de replicación y la modulación de la respuesta inmune del huésped. Estos mecanismos han sido eficaces contra virus de ARN y ADN, incluyendo rotavirus, coronavirus, hepatitis B y hepatitis C (Korba, 2008).

Las investigaciones también han sugerido que la nitazoxanida puede tener un papel inmunomodulador, ya que potencia respuestas antivirales innatas al activar vías celulares como la fosforilación de $Ei F2\alpha$, lo que ayuda a inhibir la síntesis de proteínas virales. En la práctica clínica, su seguridad está bien documentada, con más de 75 millones de tratamientos administrados en todo el mundo. Es un fármaco bien tolerado

y, en la mayoría de los casos, los efectos adversos se limitan a síntomas gastrointestinales leves y temporales, como náuseas o dolor abdominal (Aslam & Musher, 2007) (Bharti, 2021).

2.6 Formas Farmacéuticas y Relevancia del Análisis en Materia Prima

Se han creado diferentes métodos analíticos para determinar la nitazoxanida en formulaciones a granel y farmacéuticas. Se propusieron dos métodos espectrofotométricos visibles usando p-dimetilaminocinamaldehído y el reactivo de folin-ciocalteu, con rangos de linealidad de 6-30 y 2-10 µg/mL, respectivamente, a 390 y 765 nm.

(Pandey, 2009) establecieron métodos espectrofotométricos UV para el análisis de nitazoxanida en formas farmacéuticas individuales y combinadas con ofloxacino, utilizando máximos de absorción a 268 nm para nitazoxanida y 302 nm para ofloxacino. También se informaron dos métodos de HPLC Jadhav. (2008) desarrollaron un método RP-HPLC utilizando una columna C18 con acetonitrilo y sulfato de hidrógeno de tetrabutilamonio como fase móvil, logrando una linealidad de 5,0-30,0 µg/mL con recuperaciones medias de 100,19-100,26%. Saleh (2014) validaron un ensayo HPLC utilizando dos columnas diferentes con acetonitrilo:agua (90:10 v/v) como fase móvil, demostrando capacidades de indicación de estabilidad y rangos de linealidad de 20-200 µg/mL para aplicaciones de control de calidad.

Sood,(2020) estudiaron la nitazoxanida (NTZ), un agente antiparasitario, antibacteriano y antiviral de amplio espectro con solubilidad acuosa muy baja (0,00755 mg/mL) y baja biodisponibilidad (1%). Lograron mejorar la solubilidad al crear dispersiones sólidas usando la técnica de fusión en caliente, y el análisis XRD confirmó la formación de fármacos amorfos y una mejor disolución en medio gástrico simulado.

Los estudios de citotoxicidad en las líneas celulares HEK-293 y A-549 mostraron que la nitazoxanida es segura, y los estudios de estabilidad no detectaron cambios físicos después de seis meses. Maundrell (2021) estudió las impurezas de nitrosamina, compuestos mutagénicos que se forman cuando aminas secundarias o terciarias reaccionan con agentes nitrosantes, como la N-nitrosodimetilamina (NDMA) y la N-

nitrosodietilamina (NDEA). El autor destacó la importancia de los métodos analíticos para detectar estas impurezas en materias primas y productos terminados.

Según Akram (2022) desarrollaron un método RP-HPLC para analizar simultáneamente clorhidrato de ambroxol y nitaxozanida en formulaciones farmacéuticas. En este contexto, la tabla 2.3 presenta información clave sobre varios métodos analíticos importantes para la caracterización y el control de calidad de la nitaxozanida.

Tabla 2.3 Métodos de Caracterización de la Nitaxozanida

Tema	Papel	Metodología	Principales hallazgos	Cita
Análisis por HPLC	Ensayo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) validado para nitazoxanida	Uso de columnas Poroshell 120 EC-C18 y Pursuit 5PPF; fase móvil acetonitrilo:agua (90:10, pH 2,5); detector UV a 320 nm	Método validado con alta linealidad (20–200 µg/mL), exactitud, sensibilidad y precisión; apto para control de calidad farmacéutico	Saleh, O. A., (2014).
Métodos voltamperométricos	Estudio electroquímico y cuantificación de nitazoxanida	Métodos voltamperométricos con electrodo de goteo de mercurio colgante (HMDE); validación analítica de picos	La NTZ se adsorbe y sufre una reducción irreversible en HMDE; condiciones optimizadas para análisis cuantitativo fiable	Krishnaiah, V., (2012).
Impurezas de nitrosamina	Evaluación de impurezas en productos farmacéuticos	LC-UV, GC-MS/MS, LC-MS/MS y HPLC-MS de alta resolución; uso de Xevo TQ-XS y Waters ACQUITY UPLC H-Class	Identificación de nitrosaminas como impurezas mutagénicas; necesidad de métodos sensibles; guías regulatorias de FDA y EMA	Maudrell, N. (2021).

Nota: La tabla resume los métodos analíticos clave utilizados para la caracterización y el control de calidad de la Nitazoxanida (NTZ), incluyendo técnicas cromatográficas (HPLC), electroquímicas (voltamperometría) y de detección de impurezas mutagénicas (nitrosaminas) mediante espectrometría de masas.

2.7 Fundamentos de la técnica HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica utilizada para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla compleja. Su principio básico consiste en que las moléculas del analito se distribuyen de manera diferente entre una fase móvil, que es un disolvente líquido o una mezcla de disolventes, y una fase estacionaria, que es un sólido o un líquido fijado sobre un soporte sólido dentro de una columna (Skoog, 2017). Cuando la fase móvil pasa por la columna a alta presión, los componentes de la muestra interactúan con la fase estacionaria en distintos grados. Los que tienen interacciones más fuertes permanecen más tiempo en la columna y salen después, mientras que los que interactúan menos se eluyen antes, permitiendo así la separación.

El tipo de HPLC más usado en análisis farmacéutico es el de fase inversa (RP-HPLC). En este método, la fase estacionaria es no polar y suele estar formada por hidrocarburos de cadena larga, como el octadecil (C18 u ODS), unidos a un soporte de sílice. La fase móvil es más polar, normalmente una mezcla de agua o un tampón acuoso y un solvente orgánico como acetonitrilo o metanol (Snyder y Kirkland, 2019). Los analitos se separan según su hidrofobicidad: los compuestos no polares interactúan más con la fase estacionaria y permanecen más tiempo en la columna, mientras que los compuestos más polares se eluyen antes.

La composición de la fase móvil es clave para controlar la separación. La fuerza de la fase móvil depende de la cantidad de disolvente orgánico. Si se aumenta el porcentaje de disolvente orgánico, los analitos hidrófobos pasan más rápido por la columna porque disminuye su afinidad por la fase estacionaria. La fase móvil puede mantenerse constante (modo isocrático) o cambiar durante el análisis (modo de gradiente). Los gradientes son especialmente útiles para separar mezclas complejas con diferentes polaridades (Skoog, 2017). Además, el pH del componente acuoso es importante porque determina el estado de ionización de los grupos ácidos o básicos del analito, lo

que influye mucho en su polaridad y en cómo se retiene en la columna (Lunn y Maswadeh, 2021).

Después de separar los analitos, es necesario detectarlos. El detector más usado en HPLC farmacéutica es el detector ultravioleta-visible (UV-Vis), que mide la cantidad de luz absorbida a una longitud de onda específica. Muchas moléculas de medicamentos, como la nitazoxanida, tienen grupos cromofóricos que absorben fuertemente en la región UV. Un detector más avanzado es el Photodiode Array (PDA), que registra el espectro UV completo de cada pico, lo que ayuda a evaluar la pureza y a identificar los compuestos (Skoog, 2017). Para mayor sensibilidad y especificidad, se puede acoplar un espectrómetro de masas (MS) al sistema HPLC, lo que permite obtener información estructural y detectar analitos en concentraciones muy bajas, incluso en muestras biológicas complejas (Gross, 2017).

2.8 Aplicaciones de la HPLC en el análisis de nitazoxanida

La HPLC es la técnica principal para analizar la nitazoxanida durante todo su ciclo de vida, desde las pruebas de materias primas hasta los estudios clínicos. Se usa principalmente para medir el ingrediente farmacéutico activo (API) en materias primas y productos terminados, como tabletas y suspensiones. Un método RP-HPLC validado permite cuantificar la nitaxozanida de forma precisa, asegurando que cada dosis tenga la cantidad correcta del fármaco, lo que es clave para su eficacia terapéutica (Shah et al., 2008).

Un requisito importante es desarrollar un método de indicación de estabilidad (SIM). Este método debe separar la nitaxozanida de sus productos de degradación y de las impurezas relacionadas. Estas impurezas pueden aparecer durante la fabricación o por la degradación del fármaco bajo condiciones de estrés como calor, luz, humedad o ambientes ácidos y básicos (Grupo de Trabajo de Expertos de la ICH, 2003). Los investigadores han creado SIM de RP-HPLC para nitaxozanida realizando estudios de degradación forzada y demostrando que el pico del fármaco es puro y está bien separado de los picos de degradación (Rane et al., 2016; Yadav y Dhaneshwar, 2013). Esta capacidad es clave para definir la vida útil y las condiciones de almacenamiento de los productos de nitaxozanida.

La HPLC es esencial para identificar y cuantificar impurezas orgánicas o inorgánicas en el API o en el producto farmacéutico. Las agencias reguladoras, como la FDA, exigen que las impurezas que superan cierto nivel sean identificadas, cuantificadas y evaluadas toxicológicamente (Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU., 2023). Los métodos de HPLC, a menudo con detectores PDA o MS, ayudan a rastrear estas impurezas y así asegurar la seguridad y calidad del producto.

En la investigación farmacéutica, la HPLC, especialmente combinada con espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), es el método principal para estudios farmacocinéticos y de bioequivalencia. Estos métodos permiten medir la concentración de nitazoxanida y su metabolito activo, tizoxanida, en fluidos biológicos como plasma y orina. Estos datos son esenciales para entender el perfil de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) del fármaco en el cuerpo humano (Stockis et al., 2002).

2.9 Ventajas y limitaciones del método cromatográfico

El uso generalizado de HPLC en el análisis farmacéutico, como en el caso de la nitazoxanida, se debe a sus muchas ventajas. Su mayor fortaleza es la alta resolución y especificidad, que permite separar mezclas complejas de fármacos, impurezas y productos de degradación con estructuras químicas muy parecidas (Skoog, 2017). Los métodos de HPLC también destacan por su exactitud y precisión, lo que ayuda a obtener datos cuantitativos confiables, fundamentales para el control de calidad y el cumplimiento de normas. Además, la técnica es muy versátil porque existen muchas opciones de columnas, fases móviles y detectores, lo que permite adaptar el método a casi cualquier tipo de analito, desde moléculas polares pequeñas hasta grandes fármacos no polares. Los sistemas modernos de HPLC también son muy automatizados, lo que mejora el procesamiento de muestras y reduce el riesgo de errores humanos (Snyder y Kirkland, 2019).

Aunque la HPLC tiene muchas ventajas, también presenta algunas limitaciones. La inversión inicial para adquirir un sistema de HPLC, especialmente si incluye detectores avanzados como PDA o MS, puede ser alta. Además, los costos operativos son importantes, ya que se necesitan solventes, columnas y otros consumibles de alta

pureza de forma continua (Lunn y Maswadeh, 2021). Desarrollar métodos puede ser complicado, lento y requiere que un analista capacitado ajuste varios parámetros para lograr la separación adecuada. Por último, los sistemas de HPLC necesitan mantenimiento regular y personal calificado para operarlos, resolver problemas e interpretar los datos, lo que aumenta el costo y la complejidad de gestionar un laboratorio de control de calidad farmacéutico (Skoog, 2017).

2.10 Parámetros críticos en el desarrollo y verificación de métodos

Para desarrollar y verificar con éxito un método de HPLC para nitaxozanida, es necesario controlar y optimizar varios parámetros clave. Estos factores afectan cómo se comporta el analito en la cromatografía y el desempeño general del método.

- **pH de la fase móvil:** La nitaxozanida tiene un grupo amida que puede ionizarse. El pH de la fase móvil influye directamente en su estado de ionización, lo que afecta su polaridad y retención en una columna de fase inversa. Si el pH no es adecuado, puede haber mala forma de pico, menor retención o coelución con impurezas. Por eso, es importante controlar el pH con un tampón apropiado para asegurar que el analito tenga una forma constante y predecible, lo que permite una cromatografía reproducible (Snyder y Kirkland, 2019).
- **Composición de la fase móvil y caudal:** La proporción entre el tampón acuoso y el disolvente orgánico, como el acetonitrilo, determina principalmente el tiempo de retención. Si hay más disolvente orgánico, la retención disminuye. El caudal influye tanto en el tiempo de análisis como en la eficiencia cromatográfica. Un caudal adecuado logra un equilibrio entre un tiempo de análisis razonable y picos bien definidos, como indica la ecuación de Van Deemter. Al verificar el método, se suelen evaluar los efectos de pequeñas variaciones en el caudal como parte de un estudio de robustez (Grupo de Trabajo de Expertos del ICH, 2005).
- **Tipo de columna (fase estacionaria):** Elegir la columna adecuada es clave. La columna C18 (ODS) suele ser la opción principal para medicamentos no polares o moderadamente polares como la nitaxozanida. También se pueden probar

otras opciones, como C8 (cadena más corta, menos retención), fenil-hexilo (para interacciones π - π) o fases polares incrustadas (que pueden mejorar la forma del pico en compuestos básicos) para resolver problemas de separación. Además, las dimensiones de la columna, como la longitud, el diámetro interno y el tamaño de partícula, influyen directamente en la resolución, el tiempo de análisis y la contrapresión (Skoog, 2017).

- **Temperatura de la columna:** La temperatura es un factor importante que afecta la viscosidad de la fase móvil, la transferencia de masa y la interacción entre el analito y la fase estacionaria. Mantener la temperatura constante es esencial para obtener tiempos de retención reproducibles. Además, cambiar la temperatura puede ayudar a mejorar la selectividad o la eficiencia del método, y su impacto es un aspecto clave al evaluar la robustez durante la verificación del método (Lunn y Maswadeh, 2021).

2.11 Verificación de métodos analíticos: conceptos y alcance

La generación de datos analíticos confiables, precisos y reproducibles es la base de la garantía de calidad farmacéutica, el cumplimiento normativo y la investigación científica. Un procedimiento analítico, por muy sofisticado que sea, sólo es útil si se demuestra que es adecuado para el propósito previsto. Esta demostración de aptitud se logra a través de un proceso estructurado regido por pautas y estándares internacionales. Si bien el desarrollo de un nuevo método analítico requiere una evaluación integral conocida como validación, la aplicación rutinaria de métodos establecidos en un entorno de laboratorio requiere un proceso distinto, pero igualmente crítico, conocido como verificación.

2.11.1 Diferencias entre validación y verificación

En química analítica, los términos "validación" y "verificación" suelen usarse como sinónimos, pero en realidad son conceptos diferentes con distintos alcances, objetivos e implicaciones regulatorias. Entender esta diferencia es clave para crear un laboratorio de control de calidad eficiente y conforme a las normas.

La validación del método es un proceso formal y experimental que demuestra si un procedimiento analítico sirve para su propósito. Normalmente se realiza durante el desarrollo del método y requiere un estudio detallado de sus características de rendimiento. Según la directriz Q2(R1) del Consejo Internacional de Armonización (ICH), la validación consiste en comprobar mediante estudios de laboratorio que el método cumple los requisitos para su uso previsto (Grupo de Trabajo de Expertos del ICH, 2005). Este proceso evalúa parámetros como especificidad, linealidad, exactitud, precisión, rango, límite de detección, límite de cuantificación y robustez. El desarrollador del método debe demostrar que funciona correctamente en diferentes condiciones.

En cambio, la verificación del método consiste en confirmar que un método ya validado funciona correctamente en un laboratorio específico. Esto ocurre cuando un laboratorio adopta un método de una farmacopea, como la de Estados Unidos [USP], o recibe un método de otro laboratorio, como una organización de investigación por contrato o una empresa matriz. El Capítulo General de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) <1225> indica que, aunque los métodos de compendio ya están validados, los usuarios deben verificar que sean adecuados en sus propias condiciones de uso (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos, 2023). Así, la verificación es parte de la validación. No busca repetir todas las pruebas, sino documentar que el laboratorio puede aplicar el método y obtener resultados confiables. Normalmente, la verificación se centra en los parámetros más importantes, como la idoneidad, exactitud y precisión del sistema, para demostrar competencia (Ermer y Nethercote, 2015), Las diferencias principales se resumen a continuación en la tabla 2.4:

Tabla 2.4 Diferencias Clave entre Validación y Verificación de Métodos según Normativas ICH y USP

Aspecto	Validación de métodos	Verificación del método
Propósito	Para probar que un método funciona para su uso previsto.	Para confirmar que un método probado funciona en *su* laboratorio.
Alcance	Compreensivo; evalúa todas las características de rendimiento.	Centrado; evalúa un subconjunto de características críticas.
Cuándo se	Durante el desarrollo del método y antes	Antes del uso rutinario de un método

realiza	del uso rutinario.	establecido y transferido.
Quién actúa	Desarrollador del método o laboratorio de origen.	El laboratorio del usuario final.
Base Regulatoria	ICH Q2 (R1)	USP <1225>, ISO/IEC 17025

Nota: La tabla ilustra las distinciones fundamentales entre la validación y la verificación de métodos analíticos. La validación establece el rendimiento del método en general, mientras que la verificación confirma que el laboratorio usuario puede lograr un rendimiento aceptable con un método ya establecido.

2.11.2 Requisito de verificación

La verificación del método no es solo una buena práctica, sino una obligación regulatoria establecida en los principales estándares internacionales que regulan el análisis farmacéutico y la competencia de los laboratorios.

En Estados Unidos, la principal guía para la verificación es el Capítulo General de la USP <1225> "Validación de procedimientos compendiales". Este capítulo diferencia claramente entre validación y verificación, y señala que el usuario de un método compendial no necesita volver a validarlo, sino verificar que sea adecuado. Además, el capítulo indica de forma explícita las características que deben demostrarse durante la verificación, como:

- **Idoneidad del sistema:** Asegura que el sistema HPLC funcione correctamente durante el análisis.
- **Especificidad:** Demuestra que el método puede medir el analito con precisión incluso si hay posibles interferencias.
- **Precisión:** Confirma que el método da resultados cercanos al valor real, normalmente usando estudios de recuperación.
- **Precisión:** Demuestra que el método produce resultados consistentes, incluyendo la repetibilidad (dentro del mismo ensayo) y la precisión intermedia (entre días o diferentes analistas) (Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos, 2023).

Aunque la ICH Q2(R1) sobre validación de procedimientos analíticos es la guía principal para validar métodos, sus principios también se aplican a la verificación.

Q2(R1) ofrece definiciones claras y métodos experimentales para las características de rendimiento, como probar la exactitud o la precisión, que los laboratorios usan en la verificación. Así, Q2(R1) es el modelo básico que orienta cómo cumplir los requisitos de verificación de la USP <1225> (Grupo de Trabajo de Expertos del ICH, 2005).

La norma ISO/IEC 17025 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración" establece el marco general para la gestión de calidad en los laboratorios. Exige que los laboratorios usen métodos validados y, si emplean métodos estándar como los de la USP, confirmen que pueden aplicarlos correctamente antes de usarlos de forma rutinaria (Organización Internacional de Normalización, 2017). ISO/IEC 17025 se enfoca en la competencia global del laboratorio, incluyendo al personal, los equipos y los sistemas de calidad. También pide que los laboratorios tengan procedimientos documentados para validar o verificar métodos y asegurar la validez de los resultados, integrando así la verificación en un sistema de gestión de calidad más amplio. Para obtener la acreditación, un laboratorio debe demostrar un programa sólido de verificación de métodos.

2.12 Condiciones específicas de laboratorio y su impacto

La razón de ser de la verificación del método radica en el reconocimiento de que el rendimiento de un método analítico no es una propiedad intrínseca del procedimiento por sí solo, sino que también está influenciado por el entorno y las condiciones específicas en las que se ejecuta. La verificación está diseñada para capturar y controlar la variabilidad introducida por estos factores. Las principales fuentes de variabilidad específica del laboratorio incluyen el personal, el equipo, los reactivos y el medio ambiente.

- **Personal:** La habilidad, la capacitación y la competencia del analista son variables críticas. Las diferencias en la técnica de preparación de muestras (por ejemplo, pesaje, sonicación, filtración), integración de datos y funcionamiento del sistema pueden introducir una variabilidad significativa. Un analista experimentado puede integrar consistentemente un pico mal resuelto de manera diferente a un novato. ISO/IEC 17025 exige que los laboratorios tengan programas formales de capacitación y evaluaciones de competencias para todo el personal que realiza pruebas analíticas (Organización Internacional de

Normalización, 2017). Los estudios de verificación, en particular los que evalúan la precisión intermedia (diferentes analistas), están diseñados para demostrar que el método es lo suficientemente robusto como para soportar estas variaciones menores inducidas por el hombre.

- **Equipo:** Incluso los sistemas de HPLC del mismo fabricante pueden tener sutiles diferencias de rendimiento. Factores como la precisión del caudal de la bomba, la precisión del volumen del inyector, la estabilidad de la temperatura del horno de columna y la precisión de la longitud de onda del detector pueden variar entre los instrumentos. Además, la antigüedad y el historial de mantenimiento de un instrumento pueden afectar su rendimiento. Un método desarrollado en un sistema de HPLC nuevo y de última generación puede exhibir diferentes tiempos de precisión o retención en un instrumento más antiguo y bien utilizado. La calificación del equipo (Calificación de la instalación, Calificación operativa, Calificación del rendimiento) es un requisito previo para la verificación, ya que establece que el equipo es capaz de operar dentro de sus parámetros especificados (Schofield, 2019). La verificación confirma que el método funciona aceptablemente en ese equipo calificado específico.
- **Reactivos:** La calidad y el origen de los reactivos, incluido el estándar de referencia API, los disolventes y las sales tampón, pueden afectar significativamente a los resultados analíticos. Un cambio en el proveedor de un estándar de referencia o el uso de un grado diferente de acetonitrilo puede alterar la forma o retención del pico. La preparación de los tampones es un paso particularmente crítico; ligeras variaciones en el pH, la fuerza iónica o el procedimiento de preparación pueden conducir a cambios importantes en el comportamiento cromatográfico, especialmente para compuestos ionizables (Skoog, 2017). La verificación confirma implícitamente que los procedimientos del laboratorio para el manejo, la preparación y el almacenamiento de reactivos son adecuados para respaldar el rendimiento del método.
- **Medio ambiente:** El entorno físico del laboratorio, incluida la temperatura, la humedad y la exposición a la luz, también puede influir en un método analítico. Las fluctuaciones de temperatura del laboratorio pueden afectar la viscosidad de

la fase móvil y el rendimiento del termostato de la columna de HPLC, lo que provoca variaciones en el tiempo de retención. Algunos analitos o reactivos pueden ser sensibles a la luz y pueden degradarse si no se protegen de la luz ambiental, lo que lleva a resultados de ensayo inexactos. Los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), que se ven reforzados por la norma ISO/IEC 17025, exigen la vigilancia y el control de estos factores ambientales cuando puedan afectar a la calidad de los datos (Organización Mundial de la Salud, 2009). La verificación proporciona la evidencia de que estos controles ambientales son suficientes para garantizar la confiabilidad del método.

2.12.1 Estimación de la incertidumbre de medición

En el análisis farmacéutico contemporáneo, un solo resultado numérico para un ensayo es insuficiente para caracterizar completamente la calidad de un producto. La variabilidad inherente en cualquier medición significa que el resultado es solo una estimación del valor real. Para proporcionar una imagen completa y significativa de la calidad de los datos, la ciencia metrológica moderna requiere la estimación y el informe de la incertidumbre de medición. La incertidumbre de medición es un parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores de cantidad que podrían atribuirse razonablemente al mensurando (la cantidad que se mide) (JCGM, 2008).

2.12.2 Fundamentos metrológicos de la incertidumbre

El concepto de incertidumbre de medición está definido formalmente por el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM) y operacionalizado en la Guía para la Expresión de la Incertidumbre en la Medición (GUM). Es crucial distinguir la incertidumbre del error. Un error es la diferencia única y desconocida entre un valor medido y el valor real del mensurando. Por el contrario, la incertidumbre cuantifica nuestra falta de conocimiento completo sobre este error y se expresa como un rango de valores dentro del cual se cree que se encuentra el verdadero valor, con un nivel declarado de confianza (JCGM, 2012). Informar una incertidumbre reconoce las limitaciones del proceso de medición y proporciona una base estadística para la toma de decisiones basada en el riesgo.

El GUM establece un marco universalmente aceptado para evaluar y expresar la incertidumbre. Clasifica los métodos de evaluación de los componentes de incertidumbre en dos tipos:

- **Evaluación tipo A:** Componentes evaluados por métodos estadísticos a partir de una serie de observaciones repetidas. El ejemplo más común es calcular la desviación estándar de la media de las mediciones replicadas, que cuantifica los efectos aleatorios o la repetibilidad del proceso de medición (Menditto, 2020).
- **Evaluación tipo B:** Componentes evaluados por medios distintos al análisis estadístico de mediciones repetidas. Por lo general, se basan en el juicio científico utilizando toda la información disponible, como datos de certificados de calibración, especificaciones del fabricante (por ejemplo, tolerancias de cristalería volumétrica), datos publicados o datos de mediciones anteriores. Por ejemplo, la incertidumbre asociada a la pureza de un patrón de referencia, extraída de su certificado de análisis, es una incertidumbre de tipo B (Theodorakopoulou, 2021).

Los componentes individuales de incertidumbre, ya sea Tipo A o Tipo B, se expresan como incertidumbres estándar (denotadas u), que son equivalentes a desviaciones estándar. Estas incertidumbres estándar individuales se combinan para dar una incertidumbre estándar combinada (u_c), que representa la desviación estándar estimada del resultado. Para expresar el resultado con un mayor nivel de confianza, la incertidumbre estándar combinada se multiplica por un factor de cobertura (k) para obtener una incertidumbre expandida (U). Lo más comúnmente utilizado es un factor de cobertura de $k = 2$, que proporciona un intervalo con un nivel aproximado de confianza del 95% (JCGM, 2008).

2.12.3 Fuentes de incertidumbre en los métodos cromatográficos

En un ensayo típico de HPLC de una materia prima farmacéutica como la nitazoxanida, el resultado final informado está influenciado por numerosos pasos individuales, cada uno de los cuales contribuye a la incertidumbre general. Un enfoque sistemático para identificar estas fuentes es fundamental para construir un presupuesto integral de incertidumbre (Gonçalves, 2021).

- **Preparación de la solución:** Esta es una fuente importante de incertidumbre.

- **Pesaje:** La incertidumbre surge de la calibración de la balanza, su legibilidad (repetibilidad) y la incertidumbre de las pesas de calibración utilizadas. Para masas pequeñas, las correcciones de flotabilidad también pueden ser un factor importante (Santana et al., 2022).

- **Medición de volumen:** El uso de matraces volumétricos, pipetas y cilindros graduados introduce incertidumbre a partir de su tolerancia de fabricación, la repetibilidad del llenado/entrega del volumen y el efecto de la temperatura en la densidad del líquido y las dimensiones de la cristalería (Ríos y Zúñiga, 2020).

- **Calibración y estándares de referencia**
 - Pureza estándar: La incertidumbre asociada con el valor de pureza certificado del estándar de referencia de nitazoxanida contribuye directamente a la incertidumbre del resultado final del ensayo.

 - Curva de calibración: El proceso de construcción de una curva de calibración introduce incertidumbre del modelo de regresión lineal, incluida la incertidumbre en la pendiente y la intersección, y la dispersión de puntos de datos alrededor de la línea de regresión (de Souza et al., 2021).

- **Introducción instrumental y de muestra**
 - Volumen de inyección: La precisión del muestreador automático para inyectar repetidamente exactamente el mismo volumen es un contribuyente aleatorio clave (Tipo A).

 - Respuesta del detector: El ruido del detector y la deriva de la línea de base contribuyen a la incertidumbre en la medición del área o la altura del pico.

 - Integración: El método utilizado para integrar los picos cromatográficos (por ejemplo, ajustes manuales frente a automáticos para la línea de base, el ancho del pico) puede introducir una incertidumbre subjetiva o

sistemática, especialmente para picos mal resueltos o de cola (Kollipara y Venkatesh, 2021).

- **Parámetros específicos del método**

- Recuperación: En un ensayo de una materia prima, esto a menudo se considera 100%, pero si se realiza un estudio de recuperación, se debe incluir la incertidumbre del valor medio de recuperación.
- Repetibilidad: La precisión de todo el método, a menudo medida como la desviación estándar relativa (RSD) de múltiples preparaciones replicadas de la misma muestra, captura el efecto acumulativo de muchas fuentes pequeñas y aleatorias y es un componente crítico (a menudo Tipo A) (Gonçalves et al., 2021).

2.12.4 Modelos de cálculo

Se utilizan dos enfoques principales para combinar los componentes de incertidumbre identificados en un valor final para la incertidumbre expandida.

El enfoque de abajo hacia arriba (enfoque GUM): Este modelo, detallado en el GUM, implica la construcción de un modelo matemático de todo el proceso de medición. Los pasos son:

- ❖ Definir el mensurando: Escriba la ecuación utilizada para calcular el resultado final.
- ❖ Identifique todas las fuentes: Enumere cada cantidad de entrada en la ecuación y otros factores que influyen en ella.
- ❖ Cuantificar incertidumbres estándar: Determine la incertidumbre estándar (u) para cada cantidad de entrada, utilizando métodos de evaluación de tipo A o tipo B.
- ❖ Combinar incertidumbres: Las incertidumbres estándar individuales se combinan utilizando la ley de propagación de la incertidumbre. Esto implica calcular la derivada parcial de la ecuación de medición con respecto a cada cantidad de

entrada (el coeficiente de sensibilidad) y combinarlas matemáticamente para tener en cuenta cómo la incertidumbre de cada entrada contribuye a la incertidumbre del resultado final (JCGM, 2008). Si bien es integral, este enfoque puede ser complejo y llevar mucho tiempo para el análisis de rutina (Theodorakopoulou, 2021).

- ❖ El enfoque empírico o de arriba hacia abajo: Este enfoque utiliza datos de validación de métodos o control de calidad continuo para estimar la incertidumbre general. A menudo es más práctico para el análisis farmacéutico de rutina. El método descendente más común es utilizar la precisión intermedia (también conocida como reproducibilidad o varianza entre días) obtenida durante la validación del método como estimación primaria de la incertidumbre estándar combinada (u_c) (Menditto, 2020). Este valor único captura eficazmente la variación aleatoria acumulada de múltiples fuentes (pesaje, preparación, inyección, etc.) observada a lo largo del tiempo en condiciones normales de funcionamiento. Los componentes individuales no se cuantifican por separado. La incertidumbre expandida se calcula simplemente como $U = k \times u_c$, donde u_c es la desviación estándar del estudio de precisión intermedio. Este enfoque se ve cada vez más favorecido por su practicidad y alineación con los principios de la Gestión de Riesgos de Calidad.

2.12.5 Interpretación y aplicación de la incertidumbre en los laboratorios farmacéuticos

El cálculo de la incertidumbre de medición no es simplemente un ejercicio académico; Tiene profundas implicaciones prácticas para la toma de decisiones y la garantía de calidad en la industria farmacéutica.

- Cumplimiento de especificaciones y pruebas de liberación: La aplicación más crítica es determinar si un lote de materia prima o producto terminado cumple con sus límites de especificación. El resultado no se considera de forma aislada sino como un intervalo: Resultado \pm Incertidumbre expandida. Se debe establecer una regla de decisión. Por ejemplo, si la especificación para el ensayo de nitaxozanida es del 99,0% al 101,0% y un resultado de laboratorio es

del 98,9% con una incertidumbre ampliada del $\pm 0,2\%$ ($k=2$), el intervalo de resultados es del 98,7% al 99,1%. Dado que este intervalo se extiende más allá del límite inferior de especificación, el lote fallaría, aunque la estimación de un solo punto esté muy cerca del límite. Este enfoque, conocido como uso de una banda de protección, proporciona un alto grado de confianza en la decisión de aprobado/reprobado y protege tanto al fabricante como al consumidor (Nethercote y Ermer, 2019).

- Rendimiento y mejora del método: Al realizar un presupuesto de incertidumbre de abajo hacia arriba, un laboratorio puede identificar a los mayores contribuyentes a la incertidumbre general. Si se descubre que la incertidumbre del pesaje es dominante, los esfuerzos pueden centrarse en mejorar la calibración de la balanza o capacitar a los analistas en las técnicas de pesaje adecuadas. Esto hace que la estimación de la incertidumbre sea una herramienta poderosa para la optimización de métodos específicos y la mejora de la calidad (Gonçalves, 2021).
- Demostración de competencia de laboratorio: La capacidad de estimar e informar la incertidumbre de medición es un requisito obligatorio para la acreditación de laboratorio bajo estándares como ISO/IEC 17025:2017. Demuestra un profundo conocimiento del proceso de medición y proporciona pruebas tangibles de la competencia de un laboratorio para producir datos fiables y defendibles (Acreditación Europea, 2021).
- Comparabilidad de resultados: La incertidumbre facilita la comparación de los resultados obtenidos por diferentes laboratorios, en diferentes momentos o utilizando diferentes métodos. Dos resultados se consideran estadísticamente indistinguibles si sus intervalos de incertidumbre se superponen. Esto es esencial para resolver disputas, transferir métodos entre sitios y realizar estudios de validación cruzada (Santana, 2022).

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1 Enfoque de la investigación

3.1.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo aplicada y experimental, ya que se orienta a la verificación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la valoración de nitaxozanida en materia prima farmacéutica, con aplicación directa en el laboratorio de control de calidad.

Asimismo, corresponde a una investigación documental, basada en el uso de farmacopeas oficiales y guías técnicas para la evaluación de los parámetros de desempeño analítico y la estimación de la incertidumbre de medición.

Además, es una investigación de campo y de laboratorio, debido a que los datos se obtienen mediante análisis experimentales realizados directamente en el laboratorio, utilizando equipos y materiales calibrados.

En cuanto al nivel de conocimiento, es una investigación descriptiva y explicativa, ya que describe y explica el desempeño del método analítico mediante la evaluación de parámetros como precisión, exactitud, linealidad y especificidad, apoyándose en el análisis cuantitativo y estadístico de los resultados.

3.1.2 Diseño de la investigación

El diseño de la investigación es de tipo experimental, debido a que se fundamenta en la ejecución de ensayos analíticos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) bajo condiciones controladas de laboratorio, donde se manipulan de manera intencional variables analíticas específicas, tales como la concentración del analito, la preparación de soluciones patrón y muestra, y las condiciones instrumentales, con el fin de evaluar su efecto sobre la respuesta analítica del método.

El estudio se desarrolló bajo un muestreo no probabilístico, empleando materia prima farmacéutica y un estándar certificado de nitaxozanida, seleccionados conforme a los requerimientos técnicos y criterios establecidos en el método analítico.

La evaluación del desempeño del método se realizó mediante la comparación de los resultados experimentales con los criterios de aceptación definidos en farmacopeas oficiales y guías técnicas, sin la necesidad de un grupo control externo, ya que la validación se basa en parámetros analíticos normalizados.

Asimismo, el diseño experimental permitió la obtención de datos cuantitativos, los cuales fueron analizados estadísticamente para determinar parámetros como precisión, exactitud, linealidad, especificidad y estimación de la incertidumbre de medición, garantizando la confiabilidad y reproducibilidad del método analítico.

3.2 Metodología

3.2.1 Variables

De acuerdo con el tipo de investigación y el método analítico empleado, se definieron las siguientes variables:

La variable independiente corresponde a la concentración de nitaxozanida preparada en las soluciones estándar y muestras, expresada en mg/mL. Esta variable es manipulada por el investigador y se representa en el eje X de los gráficos de calibración.

La variable dependiente corresponde a la respuesta analítica obtenida mediante el sistema HPLC, expresada como el área del pico cromatográfico y el contenido porcentual de nitaxozanida, representándose en el eje Y del plano cartesiano.

3.2.2 Diseño experimental

El diseño experimental se estructuró para la verificación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la valoración de nitaxozanida en materia prima farmacéutica. La evaluación del desempeño analítico se realizó conforme a los lineamientos establecidos en farmacopeas oficiales y guías técnicas vigentes,

considerando los parámetros de precisión intermedia, exactitud, linealidad y repetibilidad. El método fue ejecutado bajo condiciones operativas controladas del laboratorio de control de calidad, empleando equipos debidamente calibrados, reactivos de grado analítico y una columna cromatográfica adecuada para el análisis del compuesto. Adicionalmente, se llevó a cabo la estimación de la incertidumbre de medición asociada al procedimiento analítico, tomando en cuenta las principales fuentes de variabilidad del método.

3.2.3 Recolección de datos

La recolección de datos se realizó mediante un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipado con detector UV. Las soluciones estándar y las muestras de materia prima fueron preparadas conforme a los procedimientos establecidos, asegurando homogeneidad y representatividad.

Los parámetros analíticos se ejecutaron siguiendo el siguiente esquema general:

- Preparación de soluciones estándar de nitaxozanida.
- Preparación de muestras de materia prima a la concentración de trabajo.
- Verificación del sistema cromatográfico.
- Análisis de blanco, estándar y muestras.
- Registro de tiempos de retención y áreas de pico.
- Evaluación de precisión, exactitud, linealidad, repetibilidad y especificidad.
- Estimación de la incertidumbre de medición.
- Análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Las concentraciones de trabajo utilizadas para el estándar y la muestra fueron de 0,100 mg/mL de nitaxozanida.

3.3 Métodos y técnicas

3.3.1 Reactivos y soluciones

Diluyente: Se emplearon como diluyentes acetonitrilo y dimetilformamida, ambos de grado cromatográfico.

Agua de sellos: Se preparó una mezcla de agua tipo 1 y acetonitrilo en proporción 30:70 (v/v).

Fase móvil: La fase móvil estuvo constituida por una mezcla de acetonitrilo y buffer fosfato monobásico de sodio ajustado a pH 3,00, en una proporción 55:45 (v/v).

3.3.2 Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico se realizó bajo las siguientes condiciones:

- Modo de elución: Isocrático
- Flujo: 1,000 mL/min
- Temperatura de la columna: 25 °C ± 3 °C
- Temperatura del automuestreador: 20 °C ± 5 °C
- Detector: UV
- Longitud de onda: 240 nm
- Ancho de banda: 1,2 nm
- Velocidad de muestreo: 10 puntos por segundo
- Volumen de inyección: 15 µL
- Tiempo total de corrida: 13 minutos

3.3.3 Columna cromatográfica

El análisis se llevó a cabo utilizando una columna cromatográfica con las siguientes características: Phenomenex Luna C18 5µm x 4,6mm x 250mm

3.3.4 Preparación del buffer fosfato monobásico de sodio pH 3,00

Para la preparación del buffer fosfato monobásico de sodio pH 3,00, se colocaron 900 mL de agua tipo 1 en un recipiente adecuado, a los cuales se añadieron 1,410 g de fosfato monobásico de sodio. La solución fue agitada hasta su completa disolución y posteriormente se ajustó el pH a 3,00 mediante la adición de ácido fosfórico concentrado. Finalmente, la solución se llevó a un volumen final de 1000 mL con agua tipo 1 y se homogenizó.

3.3.5 Preparación de las soluciones de trabajo

Preparación de solución madre de estándar de nitazoxanida:

Concentración aproximada: 0,400 mg/mL de nitazoxanida.

Se pesaron aproximadamente 10mg de estándar nitazoxanida y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL. Se añadieron 1 mL de dimetilformamida (DMF) y 10 mL de acetonitrilo, sometiendo la mezcla a baño ultrasónico hasta lograr la disolución completa. Finalmente, se enrasó el matraz con acetonitrilo y se mezcló adecuadamente.

▪ **Preparación de solución estándar de Nitazoxanida:**

- **Concentración aproximada:** 0,060mg/mL de Nitazoxanida

Se tomaron 1,50 mL de solución madre de estándar de nitazoxanida y se llevaron a un volumen final de 10 mL con acetonitrilo en un matraz volumétrico, mezclando posteriormente la solución.

- **Concentración aproximada:** 0,080mg/mL de Nitazoxanida

Se tomaron 2,00 mL de solución madre de estándar de nitazoxanida y se llevaron a un volumen final de 10 mL con acetonitrilo en un matraz volumétrico, mezclando posteriormente la solución.

- **Concentración aproximada:** 0,100mg/mL de Nitazoxanida

Se tomaron 2,50 mL de solución madre de estándar de nitazoxanida y se llevaron a un volumen final de 10 mL con acetonitrilo en un matraz volumétrico, mezclando posteriormente la solución.

- **Concentración aproximada:** 0,120mg/mL de Nitazoxanida

Se tomaron 3,00 mL de solución madre de estándar de nitazoxanida y se llevaron a un volumen final de 10 mL con acetonitrilo en un matraz volumétrico, mezclando posteriormente la solución.

- **Concentración aproximada:** 0,140mg/mL de Nitazoxanida

Se tomaron 3,50 mL de solución madre de estándar de nitazoxanida y se llevaron a un volumen final de 10 mL con acetonitrilo en un matraz volumétrico, mezclando posteriormente la solución.

Solución de aptitud del sistema: Solución estándar concentración 0,100mg/mL

Preparación de la muestra:

Se preparó por triplicado.

▪ **Preparación de solución madre de muestra de Nitazoxanida:**

- **Concentración aproximada:** 0,400 mg/mL de Nitazoxanida.

Se pesaron aproximadamente 10mg de materia prima nitazoxanida y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL. Se añadieron 1 mL de dimetilformamida (DMF) y 10 mL de acetonitrilo, sometiendo la mezcla a baño ultrasónico hasta lograr la disolución completa. Finalmente, se enrasó el matraz con acetonitrilo y se mezcló adecuadamente.

▪ **Preparación de solución estándar de Nitaxozanida:**

- **Concentración aproximada:** 0,060mg/mL de Nitazoxanida

Se tomaron 1,50 mL de solución madre de muestra de nitazoxanida y se llevaron a un volumen final de 10 mL con acetonitrilo en un matraz volumétrico, mezclando posteriormente la solución.

- **Concentración aproximada:** 0,080mg/mL de Nitazoxanida

Se tomaron 2,00 mL de solución madre de muestra de nitazoxanida y se llevaron a un volumen final de 10 mL con acetonitrilo en un matraz volumétrico, mezclando posteriormente la solución.

- **Concentración aproximada:** 0,100mg/mL de Nitazoxanida

Se tomaron 2,50 mL de solución madre de muestra de nitazoxanida y se llevaron a un volumen final de 10 mL con acetonitrilo en un matraz volumétrico, mezclando posteriormente la solución.

- **Concentración aproximada:** 0,120mg/mL de Nitazoxanida

Se tomaron 3,00 mL de solución madre de muestra de nitazoxanida y se llevaron a un volumen final de 10 mL con acetonitrilo en un matraz volumétrico, mezclando posteriormente la solución.

- **Concentración aproximada:** 0,140mg/mL de Nitazoxanida

Se tomaron 3,50 mL de solución madre de muestra de nitazoxanida y se llevaron a un volumen final de 10 mL con acetonitrilo en un matraz volumétrico, mezclando posteriormente la solución.

Procedimiento:

Se filtró estándar y muestras por filtro celulosa regenerada 0,22 µm

Se inyectó volúmenes de 15 µL de los estándares y de la muestra por separado.

Requisitos de aptitud del sistema:

Platos teóricos: No menor a 1700

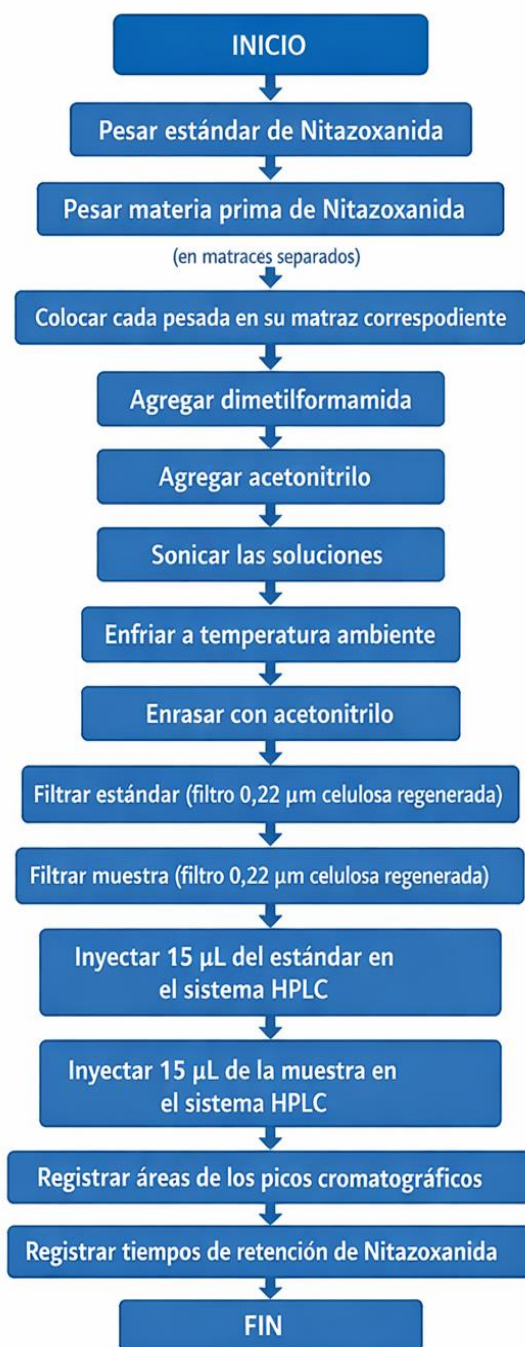
Tailing: No más de 2

DSR (%): No más de 2%

El procedimiento analítico empleado para la valoración de nitazoxanida en materia prima farmacéutica mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se desarrolló siguiendo una secuencia lógica y estandarizada de etapas, desde la preparación de las soluciones hasta la obtención de la respuesta cromatográfica.

Con el fin de facilitar la comprensión del método y asegurar su correcta reproducibilidad, el flujo general del procedimiento se presenta de manera esquemática mediante un diagrama de flujo expresado en la figura 3.1 el cual resume las principales operaciones analíticas involucradas en la preparación del estándar y de la muestra, así como las condiciones previas a la inyección cromatográfica.

Figura 3.1 Diagrama de flujo correspondiente al procedimiento analítico utilizado para la determinación cuantitativa de nitazoxanida por HPLC.



3.4 Verificación de método analítico

3.4.1 Precisión intermedia

La precisión del método se evaluó como precisión intermedia, mediante el análisis de una misma muestra a la concentración nominal del 100 %, bajo condiciones operativas diferentes, en tres días distintos. Para ello, se prepararon dos soluciones estándar stock independientes y, a partir de estas, se obtuvieron las diluciones correspondientes de estándar y muestra.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico mediante el cálculo del promedio y la desviación estándar que se calcularon mediante las ecuaciones (1) y (2), mientras que la desviación estándar relativa (%RSD) se expresó como porcentaje según la ecuación (3).

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

Adicionalmente, con el objetivo de evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los distintos días de análisis, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, considerando como factor el día de trabajo. Este análisis permitió determinar si las variaciones observadas se deben al efecto del día o corresponden únicamente a la variabilidad aleatoria del método.

Se consideró que no existen diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de p sea mayor a 0,05.

Se estableció como criterio de aceptación un valor de %RSD menor o igual al 2,0 %, lo cual permitió evidenciar la confiabilidad y reproducibilidad del método dentro del mismo laboratorio. Asimismo, la ausencia de diferencias significativas en el ANOVA confirmó la adecuada precisión intermedia del método.

3.4.2 Evaluación de la correlación

Se evaluó el coeficiente de correlación (r) obtenido a partir de la curva de calibración, con el objetivo de confirmar la relación lineal entre la concentración del analito y la respuesta del detector dentro del rango de trabajo del método. El coeficiente de correlación se calculó mediante la ecuación (4), donde x_i corresponde a la concentración del analito y y_i a la respuesta instrumental.

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad (4)$$

3.4.3 Análisis de varianza (ANOVA) de la curva de calibración

Asimismo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) asociado a la curva de calibración, en donde se evaluó la significancia estadística de la regresión y verificó que la variabilidad de los resultados son atribuible al modelo lineal. Para ello, se calcularon los siguientes parámetros:

Suma de cuadrados de la regresión (SSR):

$$SCR = \sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (5)$$

Suma de cuadrados del error (SSE):

$$SCE = \sum(y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (6)$$

Cuadrado medio de la regresión (MSR):

$$CMR = \frac{SCR}{gl_{reg}} \quad (7)$$

Cuadrado medio del error (MSE):

$$CME = \frac{SCE}{gl_{error}} \quad (8)$$

Estadístico F calculado:

$$F = \frac{CMR}{CME} \quad (9)$$

El valor del estadístico F calculado, obtenido mediante la ecuación (9), fue comparado con el F crítico, considerando que la regresión es estadísticamente significativa cuando *F calculado* sea mayor que *F crítico*. Este criterio permitió confirmar la validez del modelo lineal y la adecuación del método analítico para su aplicación, donde y_i corresponde a la respuesta experimental, \hat{y}_i a la respuesta estimada por el modelo lineal, \bar{y} al promedio de las respuestas y n al número de puntos de la curva de calibración.

3.4.4 Exactitud

La exactitud del método analítico se evaluó determinando la proximidad entre los valores experimentales obtenidos y el valor de referencia, mediante el análisis de muestras de Nitazoxanida preparadas en tres niveles de concentración dentro del rango del método, correspondientes a 0,080 mg/mL, 0,100 mg/mL y 0,120 mg/mL.

Cada nivel de concentración se preparó por triplicado, a partir de pesadas independientes, y se analizó por duplicado, siguiendo un orden creciente de concentración.

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante el cálculo del porcentaje de recuperación, el promedio, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (%RSD) para cada nivel de concentración. El porcentaje de recuperación se calculó de acuerdo con la ecuación (10), mientras que el promedio, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (%RSD) se determinaron utilizando las ecuaciones (1), (2) y (3), respectivamente.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración encontrada}}{\text{Concentración teórica}} \times 100 \quad (10)$$

Se consideraron como criterio de aceptación una recuperación comprendida entre 98,0 % y 102,0 %, con una desviación estándar relativa no mayor al 2,0 %, lo que permitió confirmar que el método presenta adecuada exactitud.

Adicionalmente, los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), con el fin de evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de concentración analizados y verificando la homogeneidad de la exactitud a lo largo del rango del método.

3.4.5 Linealidad

La linealidad del método se evaluó demostrando la proporcionalidad entre la respuesta analítica y la concentración del analito dentro del intervalo comprendido entre el 60 % y el 140 % de la concentración nominal, correspondiente a concentraciones de 0,060 mg/mL, 0,080 mg/mL, 0,100 mg/mL, 0,120 mg/mL y 0,140 mg/mL de Nitazoxanida. Cada concentración fue analizada por triplicado, a partir de pesadas independientes.

A partir de los resultados obtenidos se construyó la curva de calibración y se realizó el análisis estadístico de regresión lineal, evaluándose la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación, los cuales debieron presentar valores cercanos a la unidad.

La ecuación de la recta se obtuvo mediante el modelo de regresión lineal, expresado en la ecuación (11)

$$y = mx + b \quad (11)$$

donde y corresponde a la respuesta analítica, x a la concentración del analito, m a la pendiente y b al intercepto.

La pendiente (m) se calculó mediante la ecuación (12)

$$m = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (12)$$

El intercepto (b) se determinó utilizando la ecuación (13)

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n} \quad (13)$$

El coeficiente de correlación (r) se calculó de acuerdo con la ecuación (14)

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad (14)$$

El coeficiente de determinación (r^2) se obtuvo a partir del cuadrado del coeficiente de correlación, según la ecuación (15)

$$r^2 = r^2 \quad (15)$$

Asimismo, se calculó el factor de respuesta (FR) para cada nivel de concentración, definido en la ecuación (16):

$$FR = \frac{\text{Respuesta analítica}}{\text{Concentración}} \quad (16)$$

A partir de los valores de factor de respuesta se calculó el promedio y la desviación estándar relativa (%RSD) empleando las ecuaciones (1) y (3), respectivamente.

Se estableció como criterio de aceptación un %RSD menor o igual al 2,0 %, confirmando un comportamiento lineal adecuado del método para la valoración de Nitazoxanida.

3.4.6 Especificidad

La especificidad se evaluó demostrando la capacidad del método para identificar y cuantificar Nitazoxanida en presencia de posibles interferencias, tales como impurezas o productos de degradación. Para ello, se analizaron el blanco, la materia prima activa a la concentración del 100 % y las muestras sometidas a condiciones de estrés térmico antes y después de su exposición en estufa. El análisis se realizó utilizando detector PDA en el rango espectral de 190 a 400 nm, permitiendo evaluar la identidad y pureza espectral del pico cromatográfico del analito. Como criterios de aceptación se consideraron la correcta identificación del pico, la ausencia de coelución y la confirmación de que el pico cromatográfico corresponde a una única especie química.

3.4.7 Repetibilidad

La repetibilidad se evaluó preparando una solución muestra de Nitazoxanida a la concentración del método, la cual fue inyectada diez (10) veces consecutivas en el sistema HPLC, manteniendo constantes las condiciones analíticas, tales como el equipo, el analista, el método cromatográfico y el intervalo de tiempo.

Se registraron las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a la Nitazoxanida y, a partir de los resultados obtenidos, se calcularon la media aritmética y la desviación estándar mediante las ecuaciones (1) y (2), respectivamente. Con estos valores se determinó el coeficiente de variación (CV), utilizando la ecuación (17):

$$CV(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (17)$$

El coeficiente de variación obtenido fue comparado con criterios comúnmente aceptados para métodos analíticos por HPLC, considerándose que el método es repetible cuando el CV es menor o igual a 2,0 %.

Tabla 3.1 Resumen de los parámetros de verificación del método analítico para Nitazoxanida

Parámetro	Evaluación realizada	Ecuaciones utilizadas	Criterios de aceptación (ICH / USP)
Precisión intermedia	Análisis de una misma muestra al 100 % en tres días distintos. Cálculo de media, desviación estándar y %RSD. ANOVA de un factor considerando el día de análisis.	Media (1); Desviación estándar (2); %RSD (3)	%RSD \leq 2,0 % y $p > 0,05$ en el ANOVA (sin diferencias estadísticamente significativas entre días).
Correlación	Evaluación del coeficiente de correlación (r) obtenido a partir de la curva de calibración.	Coeficiente de correlación (4)	$r \geq 0,99$ (valor cercano a la unidad), indicando adecuada relación lineal.
ANOVA de la curva de calibración	Evaluación de la significancia estadística de la regresión mediante ANOVA. Cálculo de SSR, SSE, MSR, MSE y estadístico F .	SSR (5); SSE (6); MSR (7); MSE (8); F calculado (9)	F calculado $>$ F crítico, confirmando regresión estadísticamente significativa.
Exactitud	Análisis de muestras a tres niveles de concentración (0,080; 0,100 y 0,120 mg/mL). Cálculo de recuperación, media y %RSD.	% Recuperación (10); Media (1); Desviación estándar (2); %RSD (3)	Recuperación entre 98,0 % y 102,0 % y %RSD \leq 2,0 %.
Linealidad	Construcción de curva de calibración entre 60 % y 140 %. Evaluación de la ecuación de la recta, pendiente, intercepto, r , r^2 y factor de respuesta.	Ecuación de la recta (11); Pendiente (12); Intercepto (13); r (14); r^2 (15); FR (16); Media (1); %RSD (3)	r y $r^2 \geq 0,99$ y %RSD del FR \leq 2,0 %.
Especificidad	Análisis de blanco, estándar y muestras sometidas a estrés térmico. Evaluación mediante detector PDA (190–400 nm).	N/A	Identificación correcta del pico, ausencia de coelución y confirmación de pureza espectral del analito.
Repetibilidad	Diez inyecciones consecutivas de una misma solución muestran bajo condiciones constantes. Cálculo de media, desviación estándar y CV.	Media (1); Desviación estándar (2); CV (17)	CV \leq 2,0 %.

3.5 Recursos

Para la ejecución del estudio se emplearon los siguientes recursos

Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC marca JT Backer.
- Dimetilformamida marca JT Backer.
- Ácido fosfórico 85 % marca Merck
- Fosfato monobásico de sodio marca JT Backer.
- Agua tipo I obtenida de una unidad de purificación Milli-QbType 1 Ultrapure Water Systems.

Sustancia patrón / material de referencia:

El estándar de trabajo utilizado es: Nitazoxanide 99,9% de USP, como patrón certificado.

Materia prima: Nitazoxanida grado farmacéutico (NGL Fine – Chem Limited)

Equipos

- Balanza Mettler Toledo.
- Microbalanza Sartorius modelo MCA/255-2500-1
- Baño ultrasónico.
- Potenciómetro Mettler Toledo.
- Pipeta de pistón Transferpette.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Waters Alliance
- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Waters ARC modelo 2414 RI.
- Estufa Memmert modelo V029

Materiales:

- Matraces volumétricos.
- Pipetas volumétricas.
- Beakers.

Columna cromatográfica:

Clasificación USP L1, Phenomenex Luna C18, tamaño de partícula 5 μm , diámetro interno 4,6 mm y longitud 250 mm.

3.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos durante la ejecución del método fueron procesados mediante el software estadístico Microsoft Excel. Se aplicó estadística descriptiva para el cálculo de la media aritmética, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (%RSD) en los estudios de precisión, exactitud y repetibilidad.

Para la evaluación de la precisión intermedia, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, considerando como factor el día de análisis, con un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0,05$). La hipótesis nula (H_0) estableció que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en los distintos días de análisis, mientras que la hipótesis alternativa (H_1) indicó la existencia de diferencias significativas. La aceptación de H_0 ($p > 0,05$) confirmó la adecuada precisión intermedia del método.

En el estudio de exactitud, los porcentajes de recuperación obtenidos para los distintos niveles de concentración fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA), con el objetivo de determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los niveles analizados. La hipótesis nula (H_0) planteó que no existen diferencias significativas entre los niveles de concentración, mientras que la hipótesis alternativa (H_1) indicó lo contrario. La aceptación de H_0 evidenció una exactitud homogénea a lo largo del rango del método.

La linealidad del método se evaluó mediante análisis de regresión lineal, determinándose la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y la desviación estándar relativa de los factores de respuesta. Adicionalmente, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de la regresión para evaluar la significancia estadística del modelo lineal, considerándose que la regresión es significativa cuando el estadístico F calculado es mayor que el F crítico.

La repetibilidad del método se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV) a partir de inyecciones repetidas bajo condiciones analíticas constantes, comparándose con los criterios de aceptación establecidos para métodos analíticos por HPLC.

La estimación de la incertidumbre de medición se realizó siguiendo las recomendaciones de la Guía EURACHEM/CITAC, obteniéndose la incertidumbre estándar combinada y la incertidumbre expandida con un nivel de confianza del 95 % y un factor de cobertura $k = 2$.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación del desempeño analítico del método HPLC conforme a la USP

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos durante la verificación del método analítico por HPLC para la valoración de nitaxozanida en materia prima farmacéutica, considerando los parámetros de repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, especificidad y linealidad, de acuerdo con los criterios establecidos en las guías de validación de métodos analíticos.

Los resultados se muestran de manera ordenada mediante tablas y figuras, y se evalúan en función de los criterios de aceptación definidos previamente, con el propósito de demostrar el adecuado desempeño, confiabilidad y aplicabilidad del método analítico propuesto.

4.1.1 Repetibilidad

En esta sección se presentan los resultados obtenidos para la evaluación de la repetibilidad del método, determinada mediante el análisis de múltiples inyecciones de una misma muestra bajo las mismas condiciones operativas.

La cuantificación de Nitazoxanida se realizó mediante comparación directa con un estándar de referencia. El valor de repetibilidad obtenido en este estudio $\%RSD = 0,589 \%$ es comparable con los resultados reportados por otros autores para métodos RP-HPLC aplicados a la cuantificación de Nitazoxanida.

En un método RP-HPLC simultáneo para Nitazoxanida y Ofloxacino, se reportaron valores de $\%RSD$ de repetibilidad intradía en el rango de 0,26–0,57 % para Nitazoxanida, los cuales se encuentran por debajo del criterio de aceptación general de $\leq 2,0 \%$, evidenciando una adecuada precisión del método analítico (S. Sharma, et al 2011).

De manera similar, otro estudio de desarrollo y validación de un método RP-HPLC para Nitazoxanida reportó valores de %RSD cercanos a 0,4% para repetibilidad, así como valores de precisión intermedia menores a 0,5%, confirmando la alta consistencia del método bajo condiciones controladas de análisis (Nayakam Vandana, et al 2025)

En este contexto, el %RSD obtenido en la presente validación se encuentra en el mismo orden de magnitud que los valores reportados en la literatura, lo que demuestra que el método desarrollado presenta una precisión adecuada, reproducible y comparable con métodos previamente validados para la determinación de Nitazoxanida.

Tabla 4.1 Comparación de la repetibilidad del método analítico para Nitazoxanida respecto a métodos reportados en la literatura.

Estudio	Método analítico	Parámetro evaluado	%RSD reportado	Criterio de aceptación	Comparación con el estudio
Estudio actual	HPLC para Nitazoxanida	Repetibilidad	0,59%	≤ 2,0 %	Cumple con el criterio de aceptación y demuestra adecuada precisión del método.
Sharma et al., 2011	HPLC simultáneo para Nitazoxanida y Ofloxacino	Repetibilidad intradía	0,26 – 0,57 %	≤ 2,0 %	Valores muy cercanos al obtenido en el presente estudio.
Nayakam Vandana et al., 2025	HPLC para Nitazoxanida	Repetibilidad	≈ 0,4 %	≤ 2,0 %	Se encuentra dentro del mismo orden de magnitud que el resultado obtenido.

Los registros correspondientes a la preparación del estándar, incluyendo los parámetros de identificación, el peso utilizado, la secuencia de inyecciones y los cromatogramas obtenidos tanto para el estándar como para las muestras analizadas en la evaluación de la repetibilidad, se presentan en el apéndice A. En particular, se incluyen los parámetros de identificación y preparación del estándar en el software Empower, se muestra la secuencia cromatográfica empleada en el estudio de

repetibilidad del método analítico; cromatogramas superpuestos de Nitazoxanida correspondientes al análisis de repetibilidad; y se detallan los datos experimentales y los cálculos estadísticos del estudio de repetibilidad del método para Nitazoxanida.

4.1.2 Precisión intermedia

La precisión intermedia del método para la determinación de nitazoxanida se evaluó conforme a lo establecido en la guía ICH Q2 (R1). Para ello, se analizaron nueve determinaciones independientes, correspondientes a tres muestras analizadas durante tres días diferentes, manteniendo constantes las demás condiciones experimentales.

Los resultados se expresaron como porcentaje de nitazoxanida (% Nitazoxanida), dado que este parámetro representa el resultado final del método analítico e integra las etapas de pesada, preparación de la muestra, dilución e inyección cromatográfica.

El valor promedio obtenido fue de 99,37 %, con una desviación estándar de 1,13, lo que corresponde a un coeficiente de variación (%RSD) de 1,13 %. Este valor se encuentra dentro de los criterios de aceptación comúnmente establecidos para métodos de determinación de contenido, los cuales generalmente no deben exceder el 2,0 %, demostrando una adecuada precisión intermedia del método

El estándar de nitazoxanida fue preparado diariamente a partir de una cantidad pesada aproximada de 10 mg, considerando su pureza certificada (99,9 %) y un factor de dilución de 100 mL, obteniéndose concentraciones reales comprendidas entre 0,1003 y 0,1020 mg/mL.

Con el fin de evaluar la repetibilidad instrumental y garantizar la confiabilidad de los resultados empleados en la cuantificación, cada solución estándar fue inyectada seis veces consecutivas en el sistema cromatográfico durante cada día de análisis. Para cada serie de inyecciones se determinó el área promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%RSD). Los valores de %RSD fueron inferiores al 1,0 % para los tres días de análisis, lo que demuestra una adecuada repetibilidad del sistema cromatográfico y confirma la idoneidad del estándar para el cálculo de la concentración de las muestras de nitazoxanida.

Adicionalmente, con el objetivo de evaluar estadísticamente la variabilidad interdiaria de los resultados y determinar si existían diferencias significativas entre los días de análisis, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. En este análisis se planteó como hipótesis nula (H_0) que no existen diferencias significativas entre los promedios de % Nitazoxanida obtenidos en los tres días de análisis, mientras que la hipótesis alternativa (H_1) establece que al menos uno de los promedios difiere significativamente.

Los resultados del ANOVA mostraron un valor de F calculado inferior al valor crítico de F y una probabilidad (p-valor) mayor a 0,05, por lo que no se rechaza la hipótesis nula. Esto indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en los distintos días de análisis, confirmando que la variabilidad observada corresponde únicamente a fluctuaciones normales del método y no a un efecto sistemático del día de análisis. Estos resultados respaldan la adecuada precisión intermedia del método analítico.

En un estudio de validación de un método RP-HPLC para la estimación simultánea de nitazoxanida y ofloxacino, Patel et al. (2011) reportaron valores de precisión intermedia con %RSD inferiores al 2,0 %, cumpliendo con los criterios establecidos por la guía ICH Q2(R1). De manera similar, Chauhan y Patel (2013) desarrollaron y validaron un método HPLC para nitazoxanida en forma farmacéutica, en el cual los estudios de precisión intermedia mostraron valores de %RSD cercanos a 1,0 %, confirmando una adecuada consistencia del método frente a variaciones de día, analista y preparación de soluciones.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo, se observa que el %RSD de 1,13 % se encuentra dentro del mismo rango reportado en la literatura y por debajo del límite máximo de aceptación del 2,0 %. Esto indica que el método desarrollado presenta un nivel de precisión intermedia comparable al de métodos previamente validados y publicados, lo que respalda su confiabilidad para la determinación cuantitativa de nitazoxanida.

Los registros correspondientes a la preparación del estándar, los resultados obtenidos en los tres días de análisis, así como el tratamiento estadístico aplicado, se presentan en los anexos. En particular, se incluyen el apéndice B los resultados del estándar de nitazoxanida obtenidos en tres días de análisis para la evaluación de la precisión intermedia; también se muestra los resultados experimentales del estudio de precisión intermedia en tres días de análisis; y el análisis de varianza (ANOVA) de un factor aplicado para la evaluación de la precisión intermedia del método.

Tabla 4.2 Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión intermedia del método HPLC para la determinación de nitazoxanida.

Parámetro evaluado	Condiciones del estudio	Resultado obtenido	Criterio de aceptación	Interpretación
Precisión intermedia	9 determinaciones independientes (3 muestras analizadas durante 3 días diferentes)	Promedio: 99,37 % Nitazoxanida	—	El valor promedio se encuentra cercano al 100 %, indicando exactitud en la cuantificación.
Desviación estándar	Resultados obtenidos en tres días de análisis	1,13	—	Variabilidad baja entre las determinaciones realizadas.
Coefficiente de variación (%RSD)	Cálculo a partir de los resultados de % Nitazoxanida	1,13%	≤ 2,0 % (ICH Q2 R1)	Cumple con el criterio de aceptación para métodos de determinación de contenido.
Repetibilidad del sistema cromatográfico	6 inyecciones consecutivas del estándar por día	%RSD < 1,0 %	≤ 2,0 %	Demuestra adecuada estabilidad y funcionamiento del sistema cromatográfico.
ANOVA (variabilidad interdiaria)	Comparación de resultados entre tres días de análisis	F calculado < F crítico; p > 0,05	—	No existen diferencias significativas entre los días de análisis.
Conclusión	Evaluación global de precisión intermedia	Método preciso y consistente	≤ 2,0 %	El método presenta adecuada precisión intermedia para la cuantificación de nitazoxanida.

4.1.3 Exactitud

La exactitud del método cromatográfico para la determinación de nitazoxanida se evaluó mediante estudios de recuperación por adición de estándar a tres niveles de concentración: 80, 100 y 120 %. En cada nivel se analizaron tres muestras preparadas de manera independiente, las cuales fueron inyectadas por duplicado.

Los resultados obtenidos, expresados como porcentaje de recuperación, se presentan en los anexos correspondientes. En el apéndice C se muestran los resultados del estudio de exactitud a los tres niveles evaluados, se presentan los datos de preparación y evaluación del estándar de nitazoxanida empleado como referencia. Los valores promedio de recuperación obtenidos fueron de 99,60 %, 99,22 % y 98,94 % para los niveles 80, 100 y 120 %, respectivamente. Los coeficientes de variación (%RSD) fueron inferiores al 2,0 % en todos los niveles evaluados, lo que evidencia una adecuada precisión durante el estudio de exactitud.

De acuerdo con los criterios de aceptación establecidos en la guía ICH Q2(R1) para métodos de determinación de contenido, los resultados obtenidos demuestran que el método cromatográfico es exacto, confiable y adecuado para la cuantificación de nitazoxanida en el rango de concentración evaluado. El porcentaje de recuperación fue calculado utilizando como referencia el estándar de nitazoxanida preparado a la concentración nominal del método (100 %). Cada muestra fue preparada de manera independiente y analizada por duplicado, garantizando la confiabilidad de los resultados.

Con el fin de evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de concentración estudiados, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, considerando como variable de respuesta el porcentaje de recuperación obtenido en los niveles 80, 100 y 120 %, con un nivel de significancia de 0,05.

Para el análisis estadístico se plantearon las siguientes hipótesis: la hipótesis nula (H_0), que establece que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de recuperación obtenidos en los distintos niveles de concentración

evaluados, y la hipótesis alternativa (H_1), que indica que al menos uno de los niveles presenta un porcentaje de recuperación significativamente diferente.

Los resultados del ANOVA mostraron un valor de probabilidad $p = 0,794$, superior al nivel de significancia establecido ($\alpha = 0,05$), por lo que no se rechaza la hipótesis nula. Esto indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de recuperación correspondientes a los niveles 80, 100 y 120 %, confirmando que la exactitud del método es uniforme a lo largo del rango de concentración analizado.

Estos resultados son consistentes con los reportados por otros autores para métodos HPLC aplicados a la cuantificación de nitazoxanida. Sharma et al. (2011) reportaron porcentajes de recuperación comprendidos entre 98,5 % y 101,2 %, con valores de %RSD inferiores al 2,0 %, mientras que Chauhan y Patel (2013) informaron recuperaciones promedio cercanas al 99 %, confirmando una adecuada exactitud del método. En este contexto, los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro del mismo orden de magnitud que los reportados en la literatura y respaldan la confiabilidad del método analítico desarrollado.

En conjunto, la concordancia entre los resultados experimentales, el cumplimiento de los criterios de aceptación internacionales y la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los niveles evaluados confirman que el método cromatográfico es exacto, reproducible y adecuado para su aplicación rutinaria en la determinación cuantitativa de nitazoxanida.

Tabla 4.3 Resultados del estudio de exactitud del método HPLC para la determinación de nitazoxanida a los niveles de concentración 80, 100 y 120%.

(%)	Número de muestras	Número de inyecciones	Recuperación promedio (%)	%RSD	Criterio de aceptación	Evaluación
80%	3	Duplicado	99,60%	< 2,0 %	98–102 % / %RSD ≤ 2,0 %	Cumple
100%	3	Duplicado	99,22%	< 2,0 %	98–102 % / %RSD ≤ 2,0 %	Cumple
120%	3	Duplicado	98,94%	< 2,0 %	98–102 % / %RSD ≤ 2,0 %	Cumple

4.1.4 Especificidad

La especificidad del método cromatográfico se evaluó mediante la inyección de un blanco, una solución estándar y muestras por triplicado de la materia prima, analizadas antes y después de ser sometidas a un estudio de estrés térmico. Las muestras fueron expuestas a condiciones de 45 °C durante 3 días, con el fin de evaluar la capacidad del método para distinguir el analito de posibles productos de degradación y componentes de la matriz.

El cromatograma del blanco no mostró señales interferentes en el tiempo de retención del analito, mientras que la solución estándar permitió establecer claramente su tiempo de retención característico. En las muestras analizadas tanto antes como después del tratamiento térmico, el pico correspondiente al analito presentó el mismo tiempo de retención que el estándar y cumplió con el criterio de pureza de pico, confirmando su homogeneidad espectral y la ausencia de coelución con impurezas o productos de degradación.

La evaluación de la pureza de pico se realizó empleando un detector de arreglo de diodos (PDA), mediante un barrido espectral en el rango de 190 a 400 nm. En todos los casos, el ángulo de pureza fue inferior al límite de pureza establecido por el sistema,

cumplíendose el criterio de aceptación de pico puro. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.4

Estos resultados son consistentes con lo reportado por Hegazy y Abdelkawy (2014), quienes desarrollaron y validaron un método RP-HPLC indicativo de estabilidad para nitazoxanida, demostrando la especificidad del método mediante la ausencia de interferencias en el tiempo de retención del analito y la evaluación de la pureza de pico utilizando un detector PDA. De manera similar, Patel et al. (2011) confirmaron la especificidad de un método RP-HPLC para nitazoxanida en materia prima y formas farmacéuticas, evidenciando que el cromatograma del blanco no presenta señales interferentes y que el analito mantiene un pico bien definido y selectivo. Asimismo, Sultana et al. (2013) reportaron resultados concordantes al verificar la pureza espectral del pico de nitazoxanida mediante análisis con detector de arreglo de diodos, cumpliendo los criterios de aceptación establecidos en la guía ICH Q2(R1).

En consecuencia, la concordancia entre los resultados experimentales obtenidos en el presente estudio y los reportados en la literatura científica confirma que el método cromatográfico desarrollado es específico para la determinación de la nitazoxanida en la matriz evaluada, incluso bajo condiciones de estrés térmico.

Tabla 4.4 Resultado de especificidad

Angulo de pureza < Limite de pureza		
Activo	Nitaxozanida NF	Nitaxozanida NF
Parámetro	Selectividad antes de la estufa	Selectividad después de la estufa (45°C x 3 días)
Angulo de pureza	0,209	0,199
Límite de Pureza	0,233	0,234
Criterio	Pico puro	Pico puro

En las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3 se presentan los cromatogramas correspondientes al blanco, al estándar y a las muestras analizadas antes y después del estudio de estrés térmico. En el cromatograma del blanco no se observan señales en el tiempo de retención del analito, mientras que el estándar y las muestras muestran un pico bien

definido en el mismo tiempo de retención, sin interferencias ni picos adicionales, lo que respalda la especificidad del método.

Figura 4.1 Cromatograma correspondiente al blanco antes de la estufa

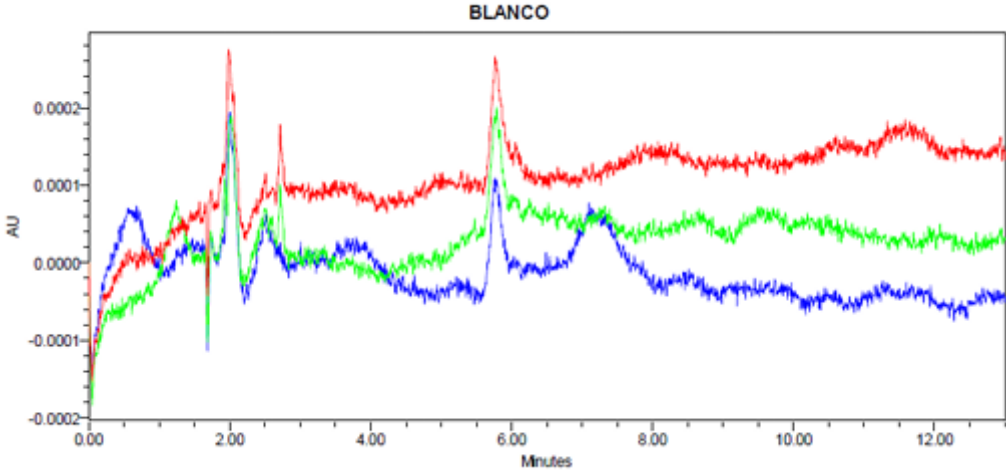


Figura 4.2 Cromatograma correspondiente al estándar antes de la estufa

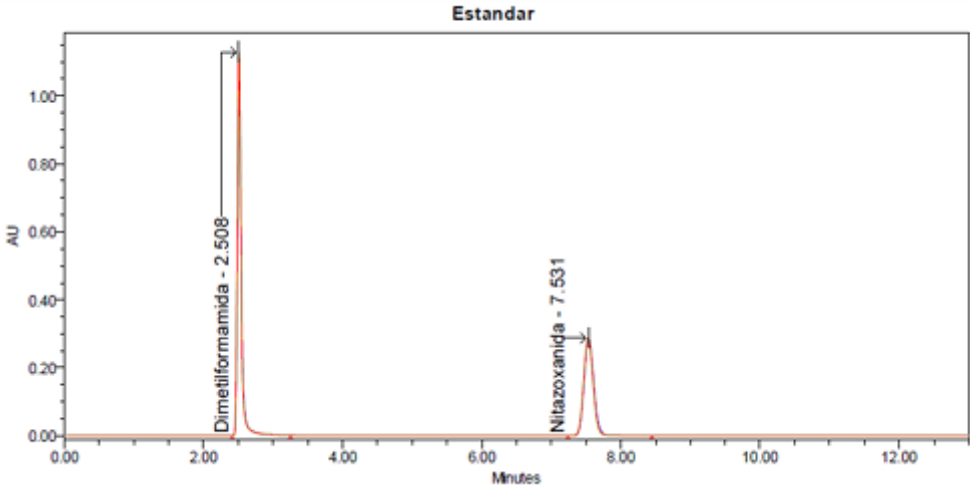


Figura 4.3 Cromatogramas correspondiente a la muestra antes de la estufa

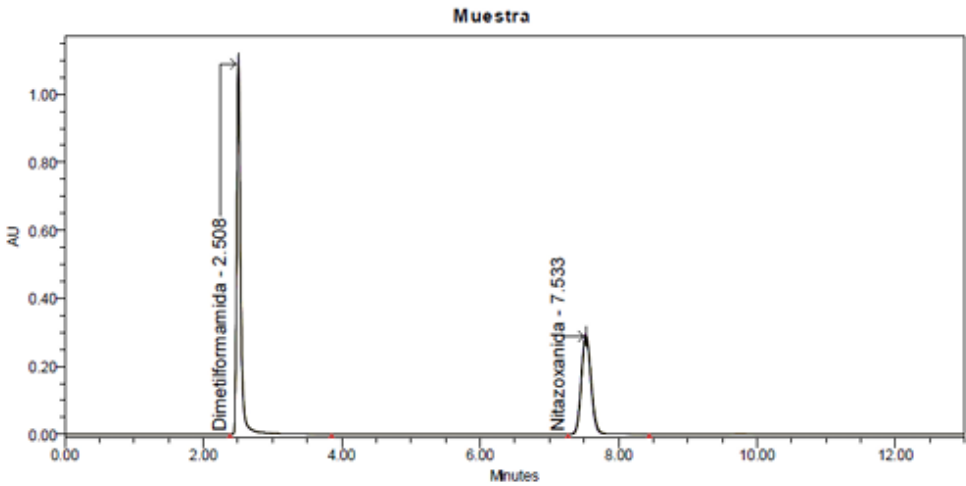


Figura 4.4 Cromatograma correspondiente al blanco después de la estufa

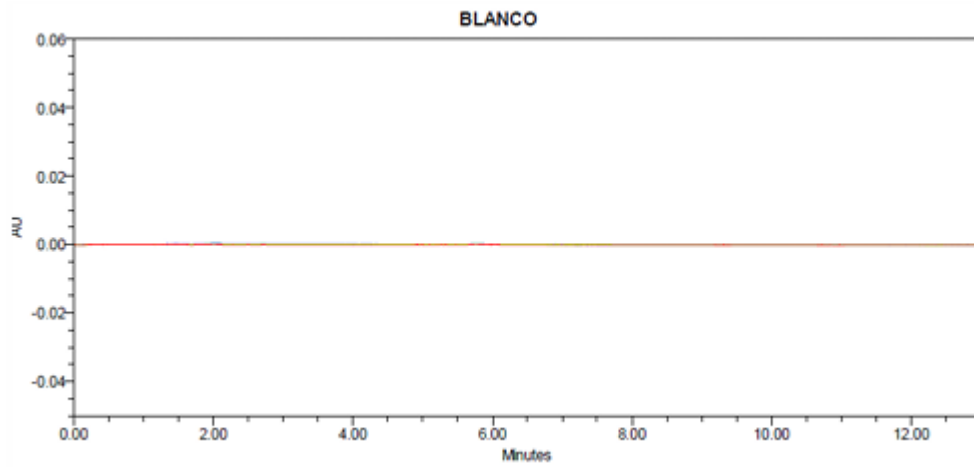


Figura 4.5 Cromatograma correspondiente al estándar después de la estufa

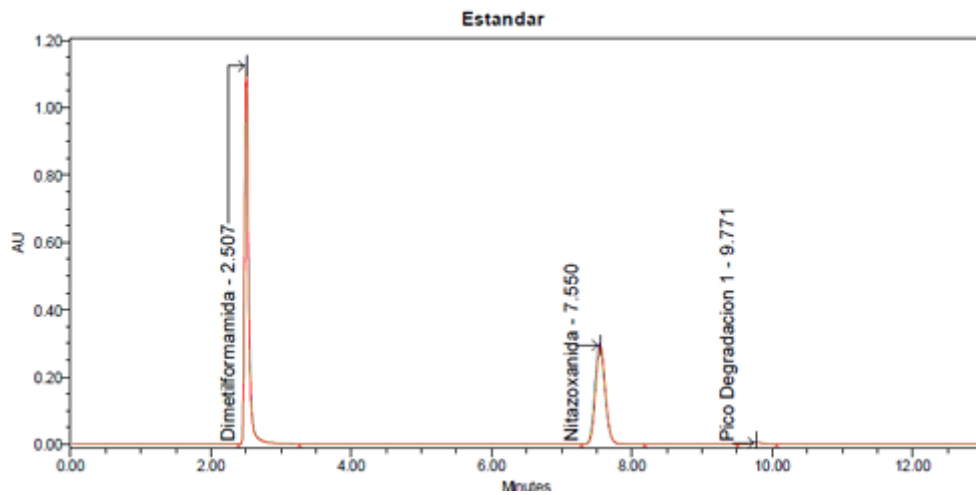
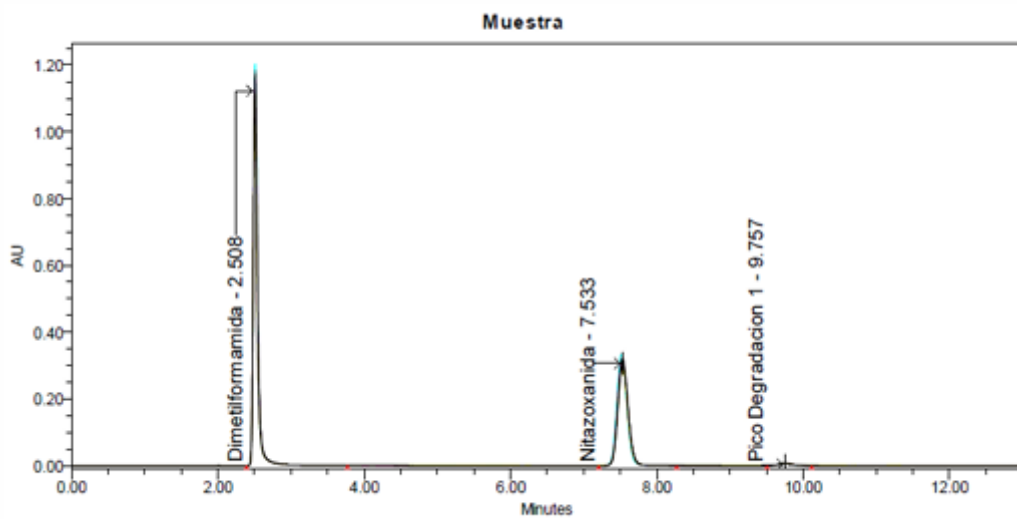


Figura 4.6 Cronograma correspondiente a la muestra después de la estufa



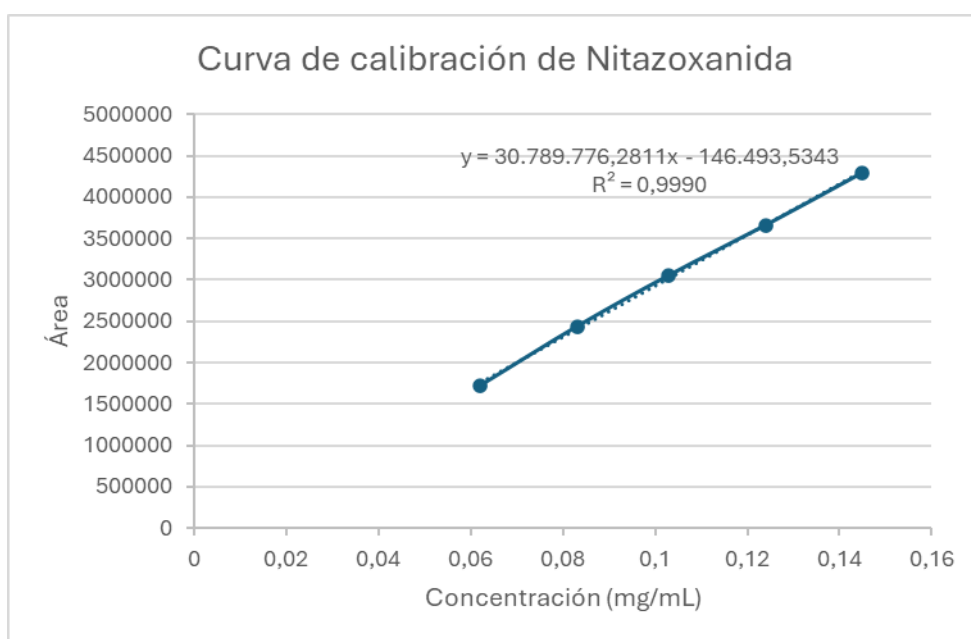
4.1.5 Linealidad

La linealidad del método analítico se evaluó mediante la construcción de una curva de calibración empleando cinco niveles de concentración preparados por triplicado, dentro de un rango teórico de 0,060 a 0,140 mg/mL, con concentraciones reales calculadas a partir del peso exacto de nitazoxanida y del factor de dilución aplicado, con el fin de representar fielmente las condiciones de análisis.

Como resultado de ligeras variaciones en la masa pesada propias del proceso de pesada analítica, el rango real de concentraciones evaluado fue de 0,062 a 0,145 mg/mL. Estas variaciones no constituyen errores del método, sino que reflejan la variabilidad inherente al trabajo analítico en laboratorio.

En la Figura 4.7 se observa la curva de calibración obtenida, en la que la relación entre la concentración de nitazoxanida y el área cromatográfica mostró un comportamiento lineal, describiéndose mediante la ecuación de la recta, donde y corresponde al área del pico cromatográfico y x a la concentración en mg/mL. Los datos experimentales utilizados para la construcción de la curva de calibración, así como los valores promedio, parámetros de regresión y resultados estadísticos del estudio de linealidad, se presentan en el apéndice D.

Figura 4.7 Curva de calibración de Nitazoxanida



El coeficiente de determinación obtenido fue $R^2 = 0,9990$, lo que evidencia una excelente correlación lineal en el rango estudiado y cumple con los criterios establecidos por las guías internacionales para la validación de métodos analíticos, tales como ICH Q2(R1).

Resultados similares han sido reportados por otros autores en métodos HPLC para nitazoxanida. Por ejemplo, Hegazy y Abdelkawy (2014) desarrollaron y validaron un método HPLC para nitazoxanida lineal en el rango de 0,8–50 $\mu\text{g/mL}$ con un coeficiente de correlación de 0,9999, demostrando la adecuada relación lineal en métodos cromatográficos aplicados a esta molécula (Maha Hegazy, 2014). Asimismo, se reportó una relación lineal con un R^2 de 0,9976 en el rango de 10–50 $\mu\text{g/mL}$, con valores de %RSD inferiores al 2 %, indicativos de una adecuada precisión analítica (Patel et al, 2014).

La precisión en cada nivel de concentración, evaluada mediante el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) de las áreas cromatográficas, presentó valores entre 1,115 % y 3,578 %, considerados aceptables dentro de los criterios de validación analítica. La mayor variabilidad se observó en los niveles de menor concentración, comportamiento consistente con lo reportado en la literatura de validación cromatográfica, donde se describe que, a concentraciones cercanas al límite inferior del rango analítico, la relación señal/ruido disminuye y la variación relativa de la respuesta instrumental tiende a ser mayor (Maha Hegazy, 2014).

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el método es lineal, preciso y adecuado para la cuantificación de nitazoxanida en el rango de concentración evaluado, y comparables con los niveles de desempeño analítico reportados en otros trabajos científicos.

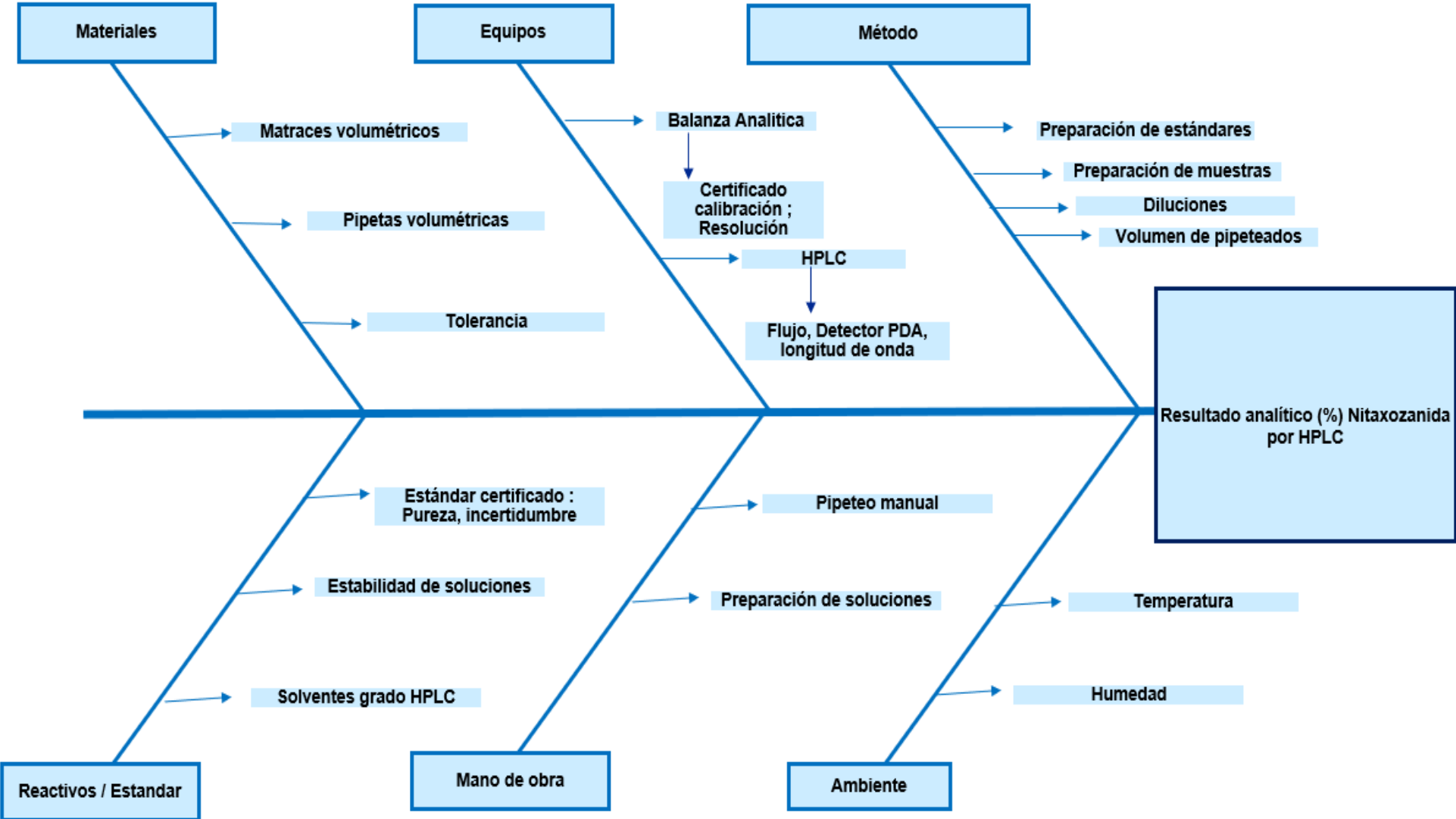
4.2 Estimación y análisis de la incertidumbre de medición del método HPLC

Con el fin de identificar de manera estructurada las principales fuentes de incertidumbre asociadas al método analítico por HPLC para la valoración cuantitativa de nitazoxanida en materia prima farmacéutica, se elaboró un diagrama de Ishikawa o causa–efecto, el cual se presenta en la Figura 4.8. Este diagrama permitió visualizar de forma

sistemática las variables que pueden influir en el resultado analítico final y facilitó la identificación de las etapas críticas del procedimiento.

Tal como se observa en la Figura 4.8, se analizaron seis categorías principales: materiales, equipos, método, reactivos/estándar, mano de obra y ambiente. En la categoría de materiales se identificó la influencia del material volumétrico (matraces y pipetas volumétricas), cuya tolerancia contribuye directamente a la incertidumbre asociada a la preparación de soluciones. En la categoría de equipos, se consideraron la balanza analítica, su resolución y calibración, así como el sistema HPLC, incluyendo parámetros como el flujo, el detector PDA y la longitud de onda empleada.

Figura 4.8 Diagrama de Ishikawa para la identificación de fuentes de incertidumbre en la valoración de nitazoxanida por HPLC.



Asimismo, el método analítico incluyó etapas críticas como la preparación de estándares y muestras, las diluciones sucesivas y los volúmenes pipeteados, las cuales representan fuentes potenciales de variabilidad. En cuanto a los reactivos y el estándar, se identificaron como factores relevantes la pureza del estándar certificado de nitazoxanida, la incertidumbre asociada a dicha pureza, la estabilidad de las soluciones y el uso de solventes grado HPLC. Finalmente, se consideraron factores asociados a la mano de obra (pipeteo manual y preparación de soluciones) y al ambiente (temperatura y humedad).

A partir del análisis cualitativo presentado en la Figura 4.8, se seleccionaron aquellas fuentes consideradas significativas para su cuantificación e inclusión en el presupuesto de incertidumbre del método, el cual se muestra en la Tabla 4.5. De acuerdo con las recomendaciones de la guía EURACHEM/CITAC, estas fuentes fueron clasificadas en contribuciones de tipo A y tipo B.

Como se detalla en la Tabla 4.5, la contribución de tipo A estuvo asociada a la precisión intermedia del método, evaluada a partir de nueve determinaciones independientes realizadas en diferentes días de análisis, constituyendo la principal fuente de incertidumbre relativa. Las contribuciones de tipo B incluyeron la incertidumbre de la balanza analítica, del material volumétrico empleado y de la pureza del estándar certificado de nitazoxanida, estimada a partir del certificado del material de referencia.

La incertidumbre estándar combinada, calculada como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las incertidumbres relativas individuales incluidas en la Tabla 4.5, fue de 0,0047. Posteriormente, la incertidumbre expandida se estimó empleando un factor de cobertura $k = 2$, correspondiente a un nivel de confianza aproximado del 95 %, obteniéndose un valor de 0,0095. En consecuencia, el resultado final del método se expresó como $99,37 \% \pm 0,95 \% (k = 2)$.

Tabla 4.5 Cálculo de incertidumbre del método analítico por HPLC para la valoración de Nitazoxanida

Fuente	Tipo	Valor /DS	n/Divisor	ui relativa
Precisión intermedia	A	1,125	9	0,0038
Balanza	B	0,00031	-	0,0003
Material volumétrico	B	0,00175	-	0,0018
Estandar certificado	B	0,00225	-	0,0023
Incertidumbre combinada				0,0047
Incertidumbre combinada (k=2)				0,0095
Promedio				99,372
Resultado absoluto				0,9419
Resultado				99,37 % ± 0,95 % (k = 2)

La magnitud de la incertidumbre obtenida es coherente con lo esperado para métodos cromatográficos de valoración de principios activos farmacéuticos y permite una adecuada toma de decisiones analíticas en control de calidad, tales como la aprobación o rechazo de materia prima. En concordancia con lo propuesto por Barwick y Ellison (1998), la precisión intermedia suele representar la contribución dominante en métodos instrumentales, mientras que la guía EURACHEM/CITAC establece que incertidumbres expandidas inferiores al 2 % son aceptables para ensayos de contenido, siempre que se garantice la trazabilidad metrológica del resultado.

Adicionalmente, Hegazy y Abdelkawy (2014) reportaron que, en métodos HPLC para la cuantificación de nitazoxanida, la variabilidad del método y la pureza del estándar constituyen factores críticos para la confiabilidad del resultado, lo cual concuerda con las fuentes de incertidumbre identificadas en la Figura 4.8.

En conjunto, la integración del análisis cualitativo mediante el diagrama de Ishikawa y la evaluación cuantitativa del presupuesto de incertidumbre demuestran que el método analítico desarrollado es confiable, metrológicamente trazable y adecuado para su aplicación rutinaria en el control de calidad farmacéutico de nitazoxanida.

Los resultados obtenidos durante la verificación del método analítico por HPLC para la valoración de nitazoxanida en materia prima farmacéutica evidencian un desempeño adecuado del método, cumpliendo con los criterios de aceptación establecidos en las

guías ICH Q2(R1) y USP <1225>, las cuales constituyen el marco de referencia internacional para la evaluación de métodos analíticos de determinación de contenido.

4.3 Comparación del método con los criterios de la USP y su aplicabilidad en el laboratorio

4.3.1 Comparación del método con los criterios de la USP <1225> e ICH Q2(R1)

El desempeño del método cromatográfico por HPLC desarrollado para la cuantificación de nitazoxanida fue evaluado mediante la confrontación sistemática de los parámetros de validación obtenidos con los criterios establecidos en la USP <1225> y en la guía ICH Q2(R1), las cuales son de referencia para métodos de valoración empleados en el control de calidad farmacéutico.

En relación con la repetibilidad, el método presentó un coeficiente de variación (%RSD) de 0,589 %, valor considerablemente inferior al límite máximo del 2,0 % recomendado por la ICH Q2(R1). Este resultado evidencia una variabilidad mínima cuando el análisis se realiza bajo condiciones constantes, lo que confirma la estabilidad del sistema cromatográfico y la uniformidad de la respuesta instrumental, cumpliendo satisfactoriamente con los requerimientos normativos.

Por su parte, la precisión intermedia fue evaluada mediante análisis efectuados en distintos días, incluyendo la preparación independiente de soluciones. El %RSD global obtenido fue de 1,13 %, valor que se encuentra dentro de los rangos aceptables para métodos cuantitativos según lo indicado en la USP <1225>. Este parámetro permite valorar la reproducibilidad del método frente a variaciones normales propias del entorno del laboratorio, demostrando que el método mantiene un comportamiento consistente bajo condiciones reales de operación.

En cuanto a la exactitud, los ensayos de recuperación realizados a niveles del 80, 100 y 120 % mostraron valores promedio comprendidos entre 98,94 % y 99,60 %, con coeficientes de variación inferiores al 2,0 %. Estos resultados se ajustan al intervalo recomendado por la ICH Q2(R1) para métodos de valoración (98–102 %), lo que indica la ausencia de un sesgo significativo en el rango de concentración evaluado. Asimismo,

el análisis estadístico mediante ANOVA evidenció que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles estudiados ($p > 0,05$), lo que confirma la uniformidad del comportamiento del método a lo largo del rango analítico.

La especificidad del método fue comprobada mediante el análisis de pureza de pico utilizando un detector de arreglo de diodos (PDA), herramienta reconocida por la ICH Q2(R1) para la evaluación de interferencias cromatográficas. Tanto en las muestras analizadas antes como después del estudio de estrés térmico (45 °C durante 3 días), el ángulo de pureza se mantuvo por debajo del límite establecido, cumpliéndose el criterio de pico puro. Estos resultados demuestran que el método es capaz de diferenciar adecuadamente la nitazoxanida de posibles productos de degradación y de otros componentes presentes en la matriz.

Respecto a la linealidad, el método evidenció una relación lineal adecuada entre la concentración de nitazoxanida y la respuesta cromatográfica en el intervalo de 0,062 a 0,145 mg/mL, obteniéndose un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9990. De acuerdo con la ICH Q2(R1), valores de R^2 superiores a 0,99 son indicativos de una correlación lineal apropiada para métodos de valoración. Aunque se observó una mayor dispersión relativa en los niveles de menor concentración, este comportamiento es característico de los análisis cuantitativos y no compromete la linealidad global del método.

Tabla 4.6 Comparación de los parámetros de validación del método HPLC con los criterios de la USP <1225> e ICH Q2(R1)

Parámetro	Resultado obtenido	Criterio USP <1225> / ICH Q2(R1)	Cumplimiento
Repetibilidad (%RSD)	0,589 %	$\leq 2,0$ % (ICH Q2(R1))	Cumple
Precisión intermedia (%RSD)	1,13 %	$\leq 2,0$ % (USP <1225>)	Cumple
Exactitud (recuperación)	98,94 – 99,60 %	98 – 102 % (ICH Q2(R1))	Cumple
Variabilidad de exactitud (%RSD)	< 2,0 %	$\leq 2,0$ % (ICH Q2(R1))	Cumple

Especificidad	Pico puro (PDA) antes y después de estrés térmico	Ausencia de interferencias / pico puro (ICH Q2(R1))	Cumple
Condiciones de estrés	45 °C durante 3 días	Recomendado para demostrar especificidad	Cumple
Linealidad (R²)	0,9990	≥ 0,99 (ICH Q2(R1))	Cumple
Rango lineal	0,062 – 0,145 mg/mL	Definido según el uso del método	Cumple

4.3.2 Evaluación de la incertidumbre y confiabilidad metrológica del método

La estimación de la incertidumbre de medición se llevó a cabo siguiendo los lineamientos de la guía EURACHEM, considerando las principales fuentes de variabilidad identificadas mediante el uso de un diagrama de Ishikawa. La precisión intermedia fue considerada como una contribución de tipo A, mientras que la incertidumbre asociada a la balanza analítica, al material volumétrico y a la pureza del estándar certificado de nitazoxanida (99,9 %) fue tratada como contribuciones de tipo B.

El valor de la incertidumbre expandida obtenido fue de $\pm 0,95$ %, empleando un factor de cobertura $k = 2$, correspondiente a un nivel de confianza aproximado del 95 %. Este resultado es coherente con los requisitos establecidos para métodos de valoración de contenido en el ámbito del control de calidad farmacéutico. La magnitud de la incertidumbre calculada refleja una adecuada confiabilidad metrológica del método y permite la toma de decisiones analíticas con un riesgo controlado, reduciendo la probabilidad de errores en la aceptación o rechazo de la materia prima.

4.3.3 Aplicabilidad del método en el laboratorio de control de calidad

A partir de los resultados obtenidos en los estudios de repetibilidad, precisión intermedia, exactitud, especificidad, linealidad e incertidumbre de medición, se puede afirmar que el método analítico desarrollado presenta un desempeño estable, reproducible y confiable bajo las condiciones normales de operación del laboratorio. La

baja variabilidad observada, junto con la adecuada exactitud alcanzada, confirma la aptitud del método para su uso rutinario en la determinación de nitazoxanida como materia prima farmacéutica.

Asimismo, la incertidumbre final calculada es consistente con los criterios habituales exigidos en el control de calidad, lo que respalda la robustez del método frente a las variaciones normales del proceso analítico. En este sentido, no se identificó la necesidad de realizar modificaciones sustanciales al método, más allá de la aplicación de los controles rutinarios del sistema cromatográfico y la verificación periódica del material volumétrico y del estándar de referencia.

En conclusión con la comparación normativa la evaluación comparativa del método con los criterios establecidos en la USP <1225>, la guía ICH Q2(R1) y la guía EURACHEM demuestra que el método cumple de manera satisfactoria con todos los requisitos normativos aplicables a métodos de valoración de contenido. La concordancia observada entre los resultados experimentales y los criterios regulatorios respalda la verificación del método y confirma que este es adecuado, robusto y confiable para su aplicación rutinaria en el laboratorio de control de calidad farmacéutico.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

El método cromatográfico por HPLC demostró un desempeño analítico adecuado bajo las condiciones operativas del laboratorio. Esto se evidenció a través de una repetibilidad con %RSD = 0,589 % y una precisión intermedia con %RSD = 1,13 %, ambos valores inferiores al límite del 2,0 % establecido por las guías ICH Q2(R1) y USP <1225>. Asimismo, el método presentó una exactitud adecuada, con recuperaciones comprendidas entre 98,94 % y 99,60 % y valores de %RSD inferiores al 2,0 %; la linealidad fue confirmada en el rango de 0,062–0,145 mg/mL, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9990$, cumpliendo los criterios establecidos para métodos de valoración. La especificidad se demostró mediante el análisis de pureza de pico por detector de arreglo de diodos (PDA), sin evidencia de interferencias cromatográficas, incluso bajo condiciones de estrés térmico. En conjunto, estos resultados verifican que el método es preciso, exacto, lineal y específico para la valoración de nitazoxanida en materia prima farmacéutica, siendo apto para su aplicación rutinaria.

La incertidumbre expandida del método fue estimada en $\pm 0,95$ %, utilizando un factor de cobertura $k = 2$, correspondiente a un nivel de confianza aproximado del 95 %, de acuerdo con los lineamientos de la guía EURACHEM. Este valor integra las principales fuentes de variabilidad identificadas, siendo la precisión intermedia la contribución dominante, junto con los aportes asociados a la balanza analítica, el material volumétrico y la pureza del estándar certificado de nitazoxanida; la magnitud de la incertidumbre obtenida es compatible con los requisitos habituales de los ensayos de valoración de contenido en control de calidad farmacéutico, lo que confirma la confiabilidad metrológica del método y respalda la toma de decisiones analíticas basadas en intervalos de confianza trazables.

La comparación sistemática de los resultados obtenidos con los criterios establecidos en la USP <1225> y la guía ICH Q2(R1) evidenció el cumplimiento integral de los requisitos normativos para los parámetros de precisión, exactitud, linealidad y especificidad, así como una incertidumbre de medición adecuada. En consecuencia, el

método cromatográfico verificado puede considerarse fiable, robusto y plenamente aplicable para su implementación rutinaria en el laboratorio de control de calidad farmacéutico, bajo condiciones reales de operación.

5.1 RECOMENDACIONES

Se recomienda la implementación del método verificado para la valoración rutinaria de nitazoxanida en materia prima farmacéutica en laboratorios de control de calidad, debido a su adecuado desempeño analítico y cumplimiento con los criterios establecidos por la USP.

Se sugiere complementar este estudio con una estimación formal y documentada de la incertidumbre de medición, integrando los datos obtenidos de precisión, exactitud y linealidad, de acuerdo con los lineamientos de la ISO/IEC 17025 o guías equivalentes. Para aplicaciones futuras, se recomienda ampliar la verificación del método mediante la evaluación de otros parámetros, como robustez, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), especialmente si el método es aplicado a otras matrices o formulaciones farmacéuticas.

Se recomienda mantener controles estrictos durante la preparación del estándar y las muestras, así como una adecuada calibración y mantenimiento del sistema cromatográfico, con el fin de minimizar las fuentes de variabilidad que contribuyen a la incertidumbre del método.

Para futuros estudios, se sugiere evaluar la influencia de otras fuentes potenciales de variabilidad, como las condiciones ambientales y la robustez del método, con el fin de optimizar el control del proceso analítico y reducir la incertidumbre global del resultado.

Finalmente, se sugiere evaluar el comportamiento del método frente a otros estudios de degradación forzada (oxidativa, ácida y básica), con el propósito de fortalecer la demostración de especificidad y ampliar su aplicabilidad regulatoria.

6. REFERENCIAS

Adulapuram Aroon, A. K. (20 de Febrero de 2024). World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences. Obtenido de https://wjbphs.com/sites/default/files/fulltext_pdf/WJBPHS-2024-0937.pdf

Aslam, S., & Musher, D. M. (2007). Nitazoxanide: Clinical studies of a broad-spectrum anti-infective agent. *Future Microbiology*, 2(6), 583–590. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.6.583>

Bharti, C., Sharma, S., Goswami, N., Sharma, H., Rabbani, S. A., & Kumar, S. (2021). Role of nitazoxanide as a repurposed drug in the treatment and management of various diseases. *Drugs of Today*, 57(7), 455–473. <https://doi.org/10.1358/dot.2021.57.7.3235211>

Bergmann, A. J., Points, G. L., Scott, R. P., Wilson, G., & Anderson, K. A. (2018). Development of quantitative screen for 1550 chemicals with GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(13), 3101–3110. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0997-7>

Barwick, V. J., & Ellison, S. L. R. (1998). Estimating measurement uncertainty using a cause and effect and reconciliation approach. *Analyst*, 123(6), 1155–1161. <https://doi.org/10.1039/A806576D>

Devshree Yashwantbhai Patel, Javesh Kashinath Patil, Harsha Vasudev Chaudhari, Ruchita M Kothari. Desarrollo y validación de nitazoxanida mediante el método RP-HPLC en formas dosificadas API y tabletas. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2024; 14(4):211-6. doi: 10.52711/2231-5675.2024.00038

Ermer, J., & Nethercote, P. (2015). *Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice* (2nd ed.). Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/9783527672202>

European Accreditation. (2021). EA-4/02 M: 2021 Evaluation of the uncertainty of measurement in calibration. European Cooperation for Accreditation.

Ellison, S. L. R., & Williams, A. (Eds.). (2012). EURACHEM/CITAC guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement (3rd ed.). EURACHEM.

Fetisova, A. V., Aladysheva, Zh. I., Pyatigorskaya, N. V., Zyryanov, O. A., & Marshalova, M. M. (2024). International approaches to the development, validation, and change management of analytical procedures (Review). *Regulatory Research and Medicine Evaluation*, 14(5), 561–571. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-660>

Fox, L. M., & Saravolatz, L. D. (2005). Nitazoxanide: A new thiazolide antiparasitic agent. *Clinical Infectious Diseases*, 40(8), 1173–1180. <https://doi.org/10.1086/429120>

Hegazy, M. A., & Abdelkawy, M. (2014). Validated stability-indicating RP-HPLC method for determination of nitazoxanide in the presence of its degradation products. *Journal of Chromatographic Science*, 52(9), 1071–1081. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt153>

Huang, X., Guo, C., Chen, Z., Liu, Y., He, L., Zeng, Z., Yan, C., Pan, G., & Li, S. (2015). Metabolism of nitazoxanide in rats, pigs, and chickens: Application of liquid chromatography coupled to hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer. *Journal of Chromatography B*, 1000, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.05.025>

ICH Expert Working Group. (2003). Q1A(R2) Stability testing of new drug substances and products. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use.

ICH Expert Working Group. (2005). Q2(R1) Validation of analytical procedures: Text and methodology. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use.

International Organization for Standardization. (2017). ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO.

Jadhav, P., Kadam, V., & Jadhav, S. (2025). Importance of quality assurance and quality control in pharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 20(1), 45–52.

JCGM. (2008). JCGM 100:2008, Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM). Joint Committee for Guides in Metrology.

JCGM. (2012). JCGM 200:2012, International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM) (3rd ed.). Joint Committee for Guides in Metrology.

Kadam, A., & Bhavsar, D. (2022). Total quality management in pharmaceutical industry: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 14(4), 1–6.

Khan, A. Z., Sadiq, M. U., & Ahmad, S. (2024). Importance of corrective and preventive actions (CAPA) and out of specification (OOS) investigations in pharmaceutical quality management system. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(2), 158–164.

Kollipara, S., & Venkatesh, G. (2021). A practical guide to analytical method validation and uncertainty estimation in pharmaceutical industry. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 68(1), 38–45.

Korba, B. E., Montero, A. B., Farrar, K., Gaye, K., Mukerjee, S., Ayers, M. S., & Rossignol, J.-F. (2008). Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication. *Antiviral Research*, 77(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.08.005>

Lunn, G., & Maswadeh, H. (2021). *HPLC: A practical guide* (3rd ed.). CRC Press.

Marco Beccaria, D. C. (2020). *Desarrollos actuales en LC-MS para análisis farmacéutico*. <https://doi.org/10.1039/C9AN02145K>.

Menditto, A., Patriarca, M., & Magnusson, B. (2020). Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision. *Accreditation and Quality Assurance*, 25(3), 163–169. <https://doi.org/10.1007/s00769-020-01413-z>

Mohurle, S. M., Bais, V. S., & Pagar, V. P. (2019). Quality by Design (QbD): An emerging trend in improving quality & development of pharmaceuticals. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 5(12), 1132–1138.

Md Sarowar Jahan, M. J. (18 de Noviembre de 2014). *National Library of Medicine*. Obtenido de <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4237153/>

Gross, J. H. (2017). *Mass spectrometry: A textbook* (3rd ed.). Springer International Publishing.

Maha Hegazy, A. K. (2014). Validación de la estabilidad indicando RP-HPLC para la cuantificación de nitazoxanida en presencia de sus productos de degradación alcalina y su caracterización mediante espectrometría de masas HPLC-Tándem. *Journal of Chromatographic Science*, 1071–1081.

Nethercote, P., & Ermer, J. (2019). Quality risk management and the application of uncertainty in pharmaceutical analysis. In *Pharmaceutical quality by design: A practical approach* (pp. 267–293). John Wiley & Sons.

Orlandini, S., Innocenti, A., Pazzi, V., Napoli, M., Fanti, R., & Mancini, M. (2022). New trends in the quality control of enantiomeric drugs: Quality by design-compliant development of chiral capillary electrophoresis methods. *Molecules*, 27(20), 6960. <https://doi.org/10.3390/molecules27206960>

Parr, M. K., & Schmidt, A. H. (2018). The life cycle of an analytical procedure: A new approach for analytical development, validation, and quality control. *Analytical and*

Parys, A., Woźniakiewicz, M., & Woźniakiewicz, A. (2022). Comprehensive review of chromatographic techniques in the analysis of active pharmaceutical ingredients and their impurities. *Molecules*, 27(12), 3745. <https://doi.org/10.3390/molecules27123745>

Patel, N. B., Patel, J. K., & Patel, M. P. (2011). Analytical method development and validation of nitazoxanide by RP-HPLC method in API and tablet dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(12), 3141–3147.

Rane, V. P., Patil, K. R., Sangshetti, J. N., & Shinde, D. B. (2016). Stability-indicating RP-HPLC method for determination of nitazoxanide in tablet dosage form. *Journal of Chromatographic Science*, 54(5), 822–828. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw040>

Ríos, A., & Zúñiga, M. (2020). Uncertainty in volumetric measurements: A guide for analytical chemists. *Journal of Chemical Education*, 97(9), 2470–2477. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c00543>

Rumane, A. (2018). *Quality management in the pharmaceutical industry*. Academic Press.

Santana, F. B., de Souza, R. L., & de Souza, S. V. C. (2022). Estimation of the uncertainty of measurement in the determination of pesticides in water by solid-phase extraction and HPLC-DAD. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 33(5), 938–948. <https://doi.org/10.1016/j.jbchs.2022.03.005>

S. Sharma, A. B. (19 de Enero de 2011). *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Obtenido de https://www.ijpsonline.com/articles/rphplc-method-for-simultaneous-estimation-of-nitazoxanide-and-ofloxacin-in-tablets.html?utm_source

Schofield, T. (2019). *Pharmaceutical quality system and GMP regulations: A practical guide*. Routledge.

Selvaraja Elumalai, S. M., Ramamoorthi, K., & Arumugam, K. (2024). A comparative review on regulatory requirements of analytical method validation in different pharmacopoeias and regulatory bodies. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.09.006>

Shah, R., Doshi, R., & Shrivastav, P. (2008). Stability-indicating RP-HPLC method for the determination of nitazoxanide. *Journal of Chromatographic Science*, 46(7), 629–633. <https://doi.org/10.1093/chromsci/46.7.629>

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis* (7th ed.). Cengage Learning.

Snyder, L. R., & Kirkland, J. J. (2019). *Introduction to modern liquid chromatography* (3rd ed.). John Wiley & Sons.

Sontakke, S., Bais, V. S., & Khairnar, S. S. (2023). Quality management in pharmaceutical industry: A comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 8(1), 814–819.

Sreelekha, S., Gayathri, S., & Revathi, S. (2023). Quality by Design (QbD) in pharmaceutical product and process development. *International Journal of Research and Review*, 10(2), 195–201.

Sultana, N., Arayne, M. S., & Shamshad, H. (2013). RP-HPLC method development and validation for nitazoxanide in powder for suspension dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(6), 2285–2291.

Stockis, A., Deroubaix, X., Lins, R., Jeanbaptiste, B., & Calderon, P. (2002). Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 40(4), 158–163.

Theodorakopoulou, A., Voulgaridou, D., & Tsimenidis, C. (2021). A practical approach for the estimation of measurement uncertainty in HPLC analysis of pharmaceuticals. *Journal of Analytical Science and Technology*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00302-4>

Timmerman, P., Lame, J., van Turenhout, M., & van der Schaar, S. (2010). Towards a global nitazoxanide of bioanalytical method validation guidelines. *Bioanalysis*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.4155/bio.10.3>

Ting Wang, P., Weng, H., & Zhou, R. (2024). Navigating the future of pharmaceutical analysis: From traditional methods to emerging technologies. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 14(2), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.12.001>

U.S. Food and Drug Administration. (2023). Guidance for industry: Impurities: Residual solvents. U.S. Department of Health and Human Services.

United States Pharmacopeial Convention. (2023). <1225> Validation of compendial procedures. In *United States pharmacopeia and national formulary (USP 45–NF 40)*. USP.

Urooj, S., & Rizwana, K. (2021). UV-Visible spectroscopic method development and validation for the estimation of a drug. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 66(1), 163–169. <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2021.v66i01.026>

World Health Organization. (2009). *Good laboratory practices (GLP): Handbook for the establishment and maintenance of a GLP compliance programme*. WHO Press.

Yadav, D., & Dhaneshwar, S. R. (2013). Validated stability-indicating HPLC method for determination of nitazoxanide in bulk drug and pharmaceutical dosage form. *Chronicles of Young Scientists*, 4(2), 115–119. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.115011>

Nayakam Vandana, N. M. (04 de Abril de 2025). *International Journal of Creative Research Thoughts (IJCRT)*. Obtenido de https://ijcrt.org/papers/IJCRT25A4383.pdf?utm_source=.

APÉNDICES

APÉNDICE A: REPETIBILIDAD

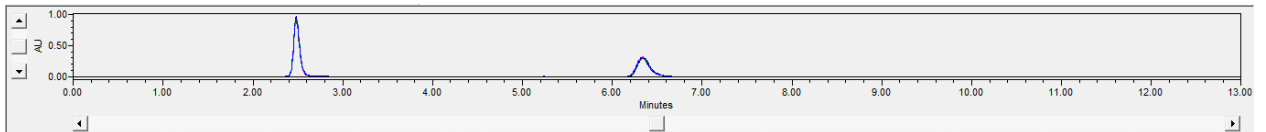
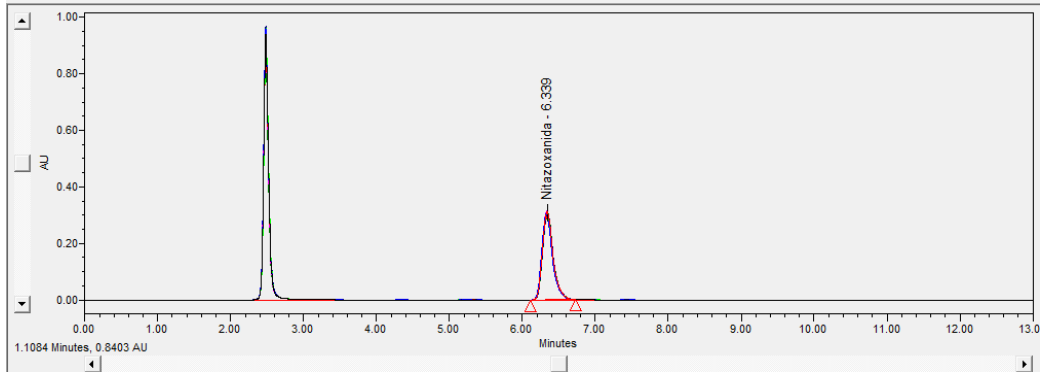
Fig. A1, Parámetros de identificación y preparación de estándar en el software Empower

Current Vial					Current Vial				
Row : 2 Vial : 1:A,2 Level :					Row : 7 Vial : 1:A,3 Level :				
Sample Name : Estándar					Sample Name : Estándar check				
Type :Standard					Type :Control				
Components					Components				
E	Component	Value	Purity (Vial)	FDST	E	Component	Value	Purity (Vial)	FDST
1	Nitazoxanida	10.040000	99.900	100.000	1	Nitazoxanida	10.070000	99.900	100.000

Fig. A2, Secuencia cromatográfica empleada en el estudio de repetibilidad del método analítico

E	Blank	Vial	Inj Vol (uL)	# of Injs	Label	Producto	SampleName	Ensayo	SampleWeight	Dilution	DIM1	AIM1	DIM2	Column Name	Column Serial Number
1	<input checked="" type="checkbox"/>	1:A,1	15.0	1	BV	Blanco	Blanco	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
2	<input type="checkbox"/>	1:A,2	15.0	1	SSV	Estándar	Estándar	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
3	<input type="checkbox"/>	1:A,2	15.0	1	SSV	Estándar	Estándar	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
4	<input type="checkbox"/>	1:A,2	15.0	1	SSV	Estándar	Estándar	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
5	<input type="checkbox"/>	1:A,2	15.0	1	SSV	Estándar	Estándar	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
6	<input type="checkbox"/>	1:A,2	15.0	1	SSV	Estándar	Estándar	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
7	<input type="checkbox"/>	1:A,3	15.0	1	SVCH	Estándar check	Estándar check	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
8	<input type="checkbox"/>	1:A,3	15.0	1	SVCH	Estándar check	Estándar check	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
9	<input type="checkbox"/>	1:A,4	15.0	1	V1	Nitazoxanida CF	Muestra 1	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
10	<input type="checkbox"/>	1:A,5	15.0	1	V1	Nitazoxanida CF	Muestra 2	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
11	<input type="checkbox"/>	1:A,6	15.0	1	V1	Nitazoxanida CF	Muestra 3	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
12	<input type="checkbox"/>	1:A,7	15.0	1	V1	Nitazoxanida CF	Muestra 4	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
13	<input type="checkbox"/>	1:A,8	15.0	1	V1	Nitazoxanida CF	Muestra 5	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
14	<input type="checkbox"/>	1:B,1	15.0	1	V1	Nitazoxanida CF	Muestra 6	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
15	<input type="checkbox"/>	1:B,2	15.0	1	V1	Nitazoxanida CF	Muestra 7	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
16	<input type="checkbox"/>	1:B,3	15.0	1	V1	Nitazoxanida CF	Muestra 8	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
17	<input type="checkbox"/>	1:B,4	15.0	1	V1	Nitazoxanida CF	Muestra 9	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
18	<input type="checkbox"/>	1:B,6	15.0	1	V1	Nitazoxanida CF	Muestra 10	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050
19	<input type="checkbox"/>	1:A,2	15.0	1	SCONV	Estándar control	Estándar control	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Luna C18 5um x 250mm x 4.6mm	H19-156050

Fig. A3, Cromatogramas superpuestos de Nitazoxanida correspondientes al análisis de repetibilidad



Visible	Project Name	Injection Volume (uL)	Vial	Label	Producto	Ensayo	SampleWeight	Dilution	DIM1	AIM1	DIM2	Sample Type	Column Name	Channel	Data End (Minutes)	
1	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.1	BV	Blanco	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
2	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.2	SSV	Estándar	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Standard	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
3	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.2	SSV	Estándar	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Standard	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
4	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.2	SSV	Estándar	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Standard	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
5	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.2	SSV	Estándar	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Standard	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
6	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.2	SSV	Estándar	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Standard	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
7	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.3	SVCH	Estándar check	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Control	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
8	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.3	SVCH	Estándar check	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Control	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
9	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.4	V1	Nitazoxanida CF	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
10	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.5	V1	Nitazoxanida CF	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
11	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.6	V1	Nitazoxanida CF	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
12	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.7	V1	Nitazoxanida CF	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
13	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.8	V1	Nitazoxanida CF	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
14	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:B.1	V1	Nitazoxanida CF	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
15	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:B.2	V1	Nitazoxanida CF	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
16	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:B.3	V1	Nitazoxanida CF	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
17	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:B.4	V1	Nitazoxanida CF	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
18	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:B.6	V1	Nitazoxanida CF	Valoración	10.0140	100.0000	25	2.500	10	Unknown	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa
19	FQ2025MPNitazoxanida CF	15.00	1:A.2	SCONV	Estándar control	Aptitud del Sistema	1.0000	1.0000	1	1.000	1	Control	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	Empower 3 Softwa

Fig. A4, Datos y cálculos del estudio de repetibilidad del método para Nitazoxanida

Resultados de repetibilidad del método		
Muestra	Área de muestra	Concentración calculada (mg/mL)
1	2953356	0,095
2	2947896	0,095
3	2936548	0,094
4	2984563	0,096
5	2947123	0,095
6	2958634	0,095
7	2954871	0,095
8	2954869	0,095
9	2936548	0,094
10	2987546	0,096
Promedio	2956195,4	0,095
DS	17411,147	0,001
%RSD	0,589	0,589

Absorvancia estandar	3112497
	3117022
	3117949
	3116776
	3122461
Peso del estándar (mg)	10,04
Pureza del estándar (%)	99,9
Factor de dilución (mL)	100
Numero de Inyecciones	5
Área promedio del estándar	3117341
Desviación estándar del área	3552,090
%RSD del área	0,114
Concentración real st (mg/mL)	0,1003

APENDICE B: PRECISIÓN INTERMEDIA

Fig. B1, Resultados del estándar de Nitazoxanida obtenidos en tres días de análisis para la evaluación de la precisión intermedia

DIA 1		DIA 2		DIA 3	
Peso estándar (mg)	10,04	Peso estándar (mg)	10,21	Peso estándar (mg)	10,14
Pureza (%)	99,9	Pureza (%)	99,9	Pureza (%)	99,9
Factor de Dilucion (mL)	100	Factor de Dilucion (mL)	100	Factor de Dilucion (mL)	100
Concentración real (mg/mL)	0,1003	Concentración real (mg/mL)	0,1020	Concentración real (mg/mL)	0,1013
Resultado del estándar de Nitazoxanida		Resultado del estándar de Nitazoxanida		Resultado del estándar de Nitazoxanida	
Inyección	Área	Inyección	Área	Inyección	Área
ST-1	3112497	ST-1	3123653	ST-1	3116326
ST-2	3117022	ST-2	3126554	ST-2	3123183
ST-3	3117949	ST-3	3125752	ST-3	3107973
ST-4	3116776	ST-4	3124066	ST-4	3107973
ST-5	3122461	ST-5	3124066	ST-5	3109572
ST-6	3121880	ST-6	3161338	ST-6	3100949
Promedio	3118098	Promedio	3130905	Promedio	3110996
DS	3678	DS	14952	DS	7722
%RSD	0,118	%RSD	0,478	%RSD	0,248

Fig. B2, Resultados experimentales del estudio de precisión intermedia en tres días de análisis

Resultados de precision intermedia						
Dia	Muestra	Peso (mg)	FD	Concentracion calculada (mg/mL)	Area muestra	% Nitazoxanida
1	M1	10,35	100	0,104	3197035	99,361
1	M2	10,35	100	0,104	3233350	100,490
1	M3	10,13	100	0,101	3101376	98,481
2	M1	10,02	100	0,100	3017268	98,100
2	M2	10,05	100	0,101	3040475	98,559
2	M3	10,23	100	0,102	3133069	99,774
3	M1	10,14	100	0,101	3057314	98,176
3	M2	10,61	100	0,106	3300050	101,277
3	M3	10,27	100	0,103	3158211	100,132
Promedio						99,372
DS						1,125
%RSD						1,132

Fig. B3, Análisis de varianza (ANOVA) de un factor para la evaluación de la precisión intermedia del método

RESUMEN					Día 1	Día 2	Día 3
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	99,361	98,100	98,176
Día 1	3	298,332	99,444	1,013	100,490	98,559	101,277
Día 2	3	296,432	98,811	0,748	98,481	99,774	100,132
Día 3	3	299,585	99,862	2,458			

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1,680	2	0,840	0,597	0,580	5,143
Dentro de los grupos	8,439	6	1,407			
Total	10,119	8				

Fig. B4, Parámetros de identificación y preparación de estándar en el software Empower correspondiente al día 1.

Current Vial					Current Vial				
Row :	2	Vial :	1:A,2	Level :	Row :	8	Vial :	1:A,3	Level :
Sample Name :	Estándar				Sample Name :	Estándar check			
Type :	Standard				Type :	Control			

Components					Components				
Component	Value	Purity (Vial)	FDST		Component	Value	Purity (Vial)	FDST	
1 Nitazoxanida	10.040000	99.900	100.000		1 Nitazoxanida	10.070000	99.900	100.000	

Fig. B5, Cromatogramas superpuestos y secuencia de Nitazoxanida correspondientes al análisis de precisión intermedia correspondiente al día 1.

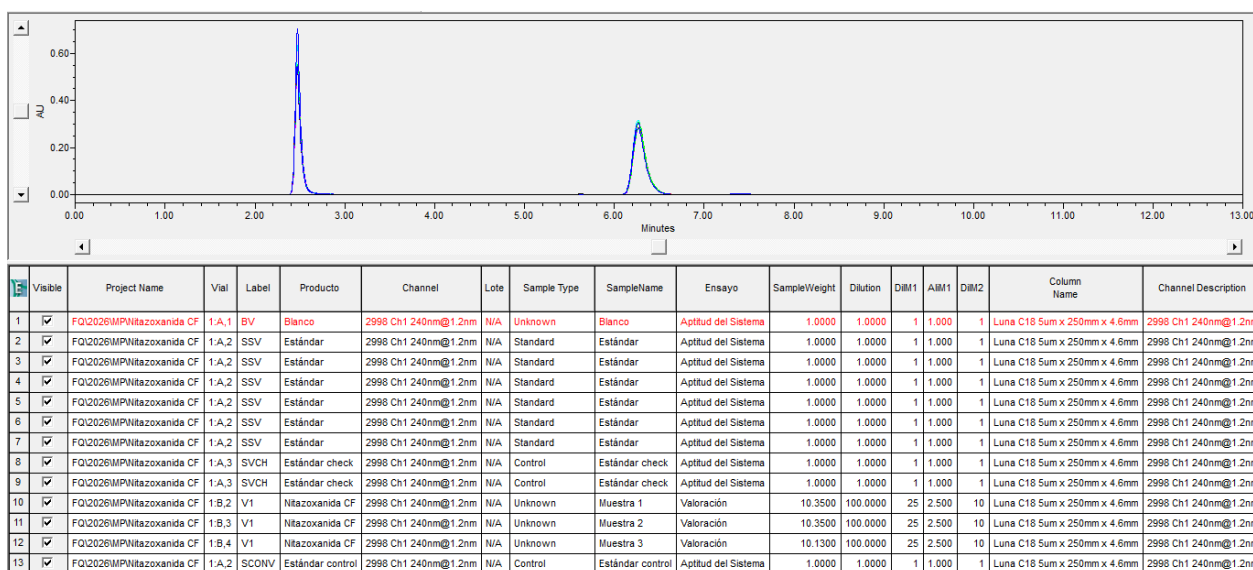


Fig. B6, Parámetros de identificación y preparación de estándar en el software Empower correspondiente al día 2.

Current vial				Current vial			
Row : 7	Vial : 1:A,2	Level :		Row : 5	Vial : 1:A,3	Level :	
Sample Name : Estándar				Sample Name : Estándar check			
Type :Standard				Type :Control			
Components				Components			
Component	Value	Purity (Vial)	FDST	Component	Value	Purity (Vial)	FDST
1 Nitazoxanida	10.210000	99.900	100.000	1 Nitazoxanida	10.170000	99.900	100.000

Fig. B7, Cromatogramas superpuestos y secuencia de Nitazoxanida correspondientes al análisis de precisión intermedia correspondiente al día 2.

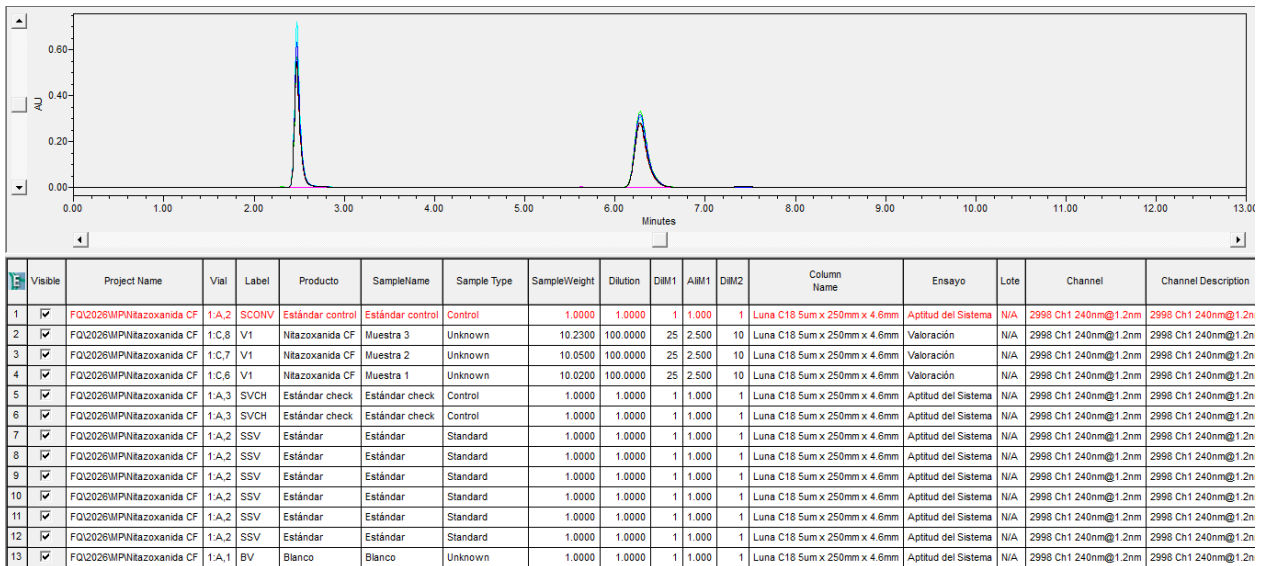
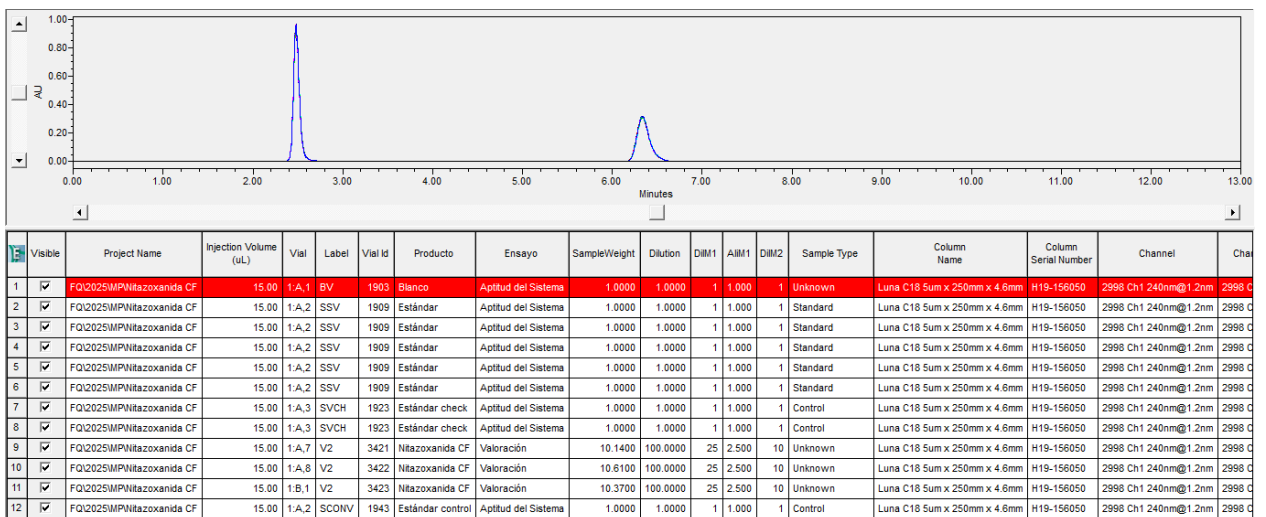


Fig. B8, Cromatogramas superpuestos y secuencia de Nitazoxanida correspondientes al análisis de precisión intermedia correspondiente al día 3.



APÉNDICE C: Exactitud

Fig. C1, Resultados del estudio de exactitud (recuperación) el método HPLC para la cuantificación de nitazoxanida a los niveles 80, 100 y 120 %

Nivel 80%							
Muestra	Peso (mg)	FD	Concentracion real (mg/mL)	Area D1	Area D2	Area promedio	Recuperacion (%)
M1	10,14	125	0,081	2551679	2555956	2553818	101,292
M2	10,34	125	0,083	2472680	2569937	2521309	98,069
M3	10,51	125	0,084	2555250	2641913	2598582	99,439
						Promedio	99,600
						DS	1,618
						%RSD	1,624

Nivel 100%							
Muestra	Peso (mg)	FD	Concentracion real (mg/mL)	Area D1	Area D2	Area promedio	Recuperacion (%)
M1	10,14	100	0,101	3196503	2996438	3096471	98,253
M2	10,34	100	0,103	3221598	3153712	3187655	99,189
M3	10,51	100	0,105	3231033	3316425	3273729	100,220
						Promedio	99,221
						DS	0,984
						%RSD	0,992

Nivel 120%							
Muestra	Peso (mg)	FD	Concentracion real (mg/mL)	Area D1	Area D2	Area promedio	Recuperacion (%)
M1	10,14	83,333	0,122	3708709	3833233	3770971	99,712
M2	10,34	83,333	0,124	3896348	3725359	3810854	98,817
M3	10,51	83,333	0,126	3901789	3804475	3853132	98,298
						Promedio	98,942
						DS	0,715
						%RSD	0,723

Fig. C2, Datos de preparación y evaluación del estándar de nitazoxanida para el análisis por HPLC

Absorbancia estandar	3112497
	3117022
	3117949
	3116776
	3122461
Peso del estandar (mg)	10,04
Pureza del estandar (%)	99,9
Factor de dilucion (mL)	100
Numero de Inyecciones	5
Area promedio del estandar	3117341
Desviacion estandar del area	3552,090
%RSD del area	0,114
Concentracion real st (mg/mL)	0,1003

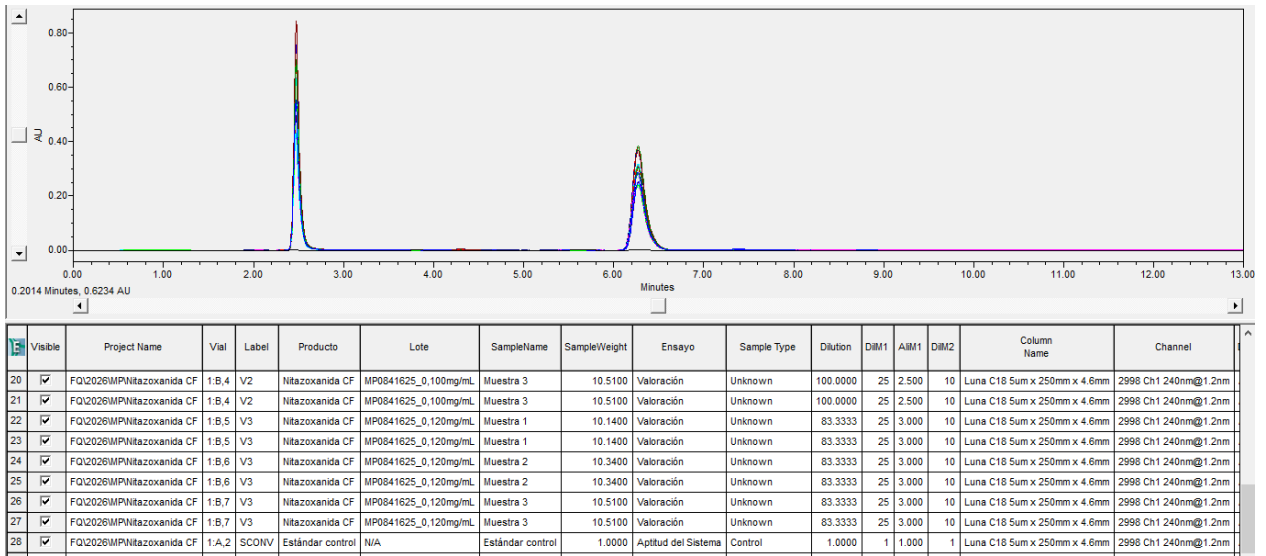
Fig. C3, Evaluación estadística de la exactitud del método mediante ANOVA

A (Nivel 80%)	B (Nivel 100%)	C (Nivel 120%)
101,292	98,253	99,712
98,069	99,189	98,817
99,439	100,220	98,298

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
A (Nivel 80%)	3	298,8004798	99,60016	2,6174449
B (Nivel 100%)	3	297,6621682	99,220723	0,9685488
C (Nivel 120%)	3	296,8270169	98,942339	0,5117586

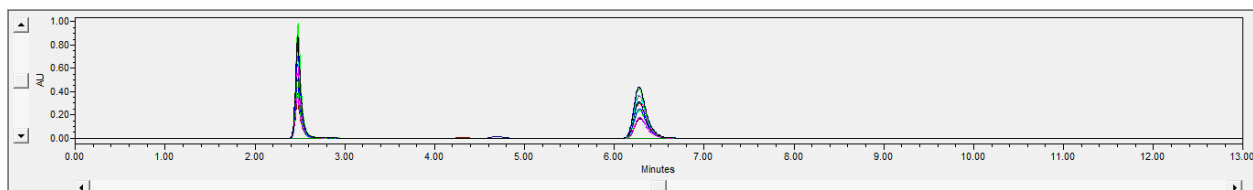
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,654198499	2	0,3270992	0,2394722	0,794220316	5,14325
Dentro de los grupos	8,195504515	6	1,3659174			
Total	8,849703014	8				

Fig. C4, Cromatogramas superpuestos y secuencia de Nitazoxanida correspondientes al análisis de exactitud



APÉNDICE D: LINEALIDAD

Fig. D1, Cromatogramas superpuestos y secuencia de Nitazoxanida correspondientes al análisis de linealidad



Visible	Project Name	Vial	Label	Producto	Sample Type	Lote	SampleName	SampleWeight	Dilution	DIM1	AIM1	DIM2	Column Name	Ensayo	Channel	Data End (Minutes)	Channel
1	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.C.2	V5	Nitazoxanida CF	Unknown	0,140mg/mL	Muestra 3	10.5100	71.4286	25	3,500	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
2	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.C.1	V5	Nitazoxanida CF	Unknown	0,140mg/mL	Muestra 2	10.3400	71.4286	25	3,500	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
3	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.B.8	V5	Nitazoxanida CF	Unknown	0,140mg/mL	Muestra 1	10.1400	71.4286	25	3,500	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
4	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.B.7	V4	Nitazoxanida CF	Unknown	0,120mg/mL	Muestra 3	10.5100	83.3333	25	3,000	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
5	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.B.6	V4	Nitazoxanida CF	Unknown	0,120mg/mL	Muestra 2	10.3400	83.3333	25	3,000	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
6	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.B.5	V4	Nitazoxanida CF	Unknown	0,120mg/mL	Muestra 1	10.1400	83.3333	25	3,000	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
7	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.B.4	V3	Nitazoxanida CF	Unknown	0,100mg/mL	Muestra 3	10.5100	100.0000	25	2,500	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
8	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.B.3	V3	Nitazoxanida CF	Unknown	0,100mg/mL	Muestra 2	10.3400	100.0000	25	2,500	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
9	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.B.2	V3	Nitazoxanida CF	Unknown	0,100mg/mL	Muestra 1	10.1400	100.0000	25	2,500	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
10	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.B.1	V2	Nitazoxanida CF	Unknown	0,080mg/mL	Muestra 3	10.5100	125.0000	25	2,000	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
11	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.A.8	V2	Nitazoxanida CF	Unknown	0,080mg/mL	Muestra 2	10.3400	125.0000	25	2,000	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
12	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.A.7	V2	Nitazoxanida CF	Unknown	0,080mg/mL	Muestra 1	10.1400	125.0000	25	2,000	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
13	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.A.6	V1	Nitazoxanida CF	Unknown	0,060mg/mL	Muestra 3	10.5100	166.6667	25	1,500	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
14	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.A.5	V1	Nitazoxanida CF	Unknown	0,060mg/mL	Muestra 2	10.3400	166.6667	25	1,500	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
15	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.A.4	V1	Nitazoxanida CF	Unknown	0,060mg/mL	Muestra 1	10.1400	166.6667	25	1,500	10	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Valoración	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2
16	FQ2026MPNItazoxanida CF	1.A.1	BV	Blanco	Unknown	N/A	Blanco	1.0000	1.0000	1	1,000	1	Luna C18 Sum x 250mm x 4.6mm	Aptitud del Sistema	2998 Ch1 240nm@1.2nm	13.0	2998 Ch1.2

Fig. D2, Datos experimentales y resultados del estudio de linealidad del método HPLC

Nivel	Replica	Peso (mg)	FD	Conc. Real (mg/mL)	Area
1	1	10,14	166,666	0,061	1661077
1	2	10,34	166,666	0,062	1727810
1	3	10,51	166,666	0,063	1784343
2	1	10,14	125,000	0,081	2424788
2	2	10,34	125,000	0,083	2365011
2	3	10,51	125,000	0,084	2528002
3	1	10,14	100,000	0,101	2987742
3	2	10,34	100,000	0,103	3054662
3	3	10,51	100,000	0,105	3134936
4	1	10,14	83,333	0,122	3619136
4	2	10,34	83,333	0,124	3674568
4	3	10,51	83,333	0,126	3698800
5	1	10,14	71,429	0,142	4193509
5	2	10,34	71,429	0,145	4405044
5	3	10,51	71,429	0,147	4298112

Nivel	Conc. Prom. Real (mg/mL)	Promedio (Area)
1	0,062	1724410
2	0,083	2439267
3	0,103	3059113
4	0,124	3664168
5	0,145	4298888
Pendiente (m)		30789776,3
Intercepto (b)		-146493,534
Coefficiente de determinacion (r2)		0,9990

Nivel 1	
SD	61703
%RSD	3,578
Nivel 2	
SD	82455
%RSD	3,380
Nivel 3	
SD	73698
%RSD	2,409
Nivel 4	
SD	40838
%RSD	1,115
Nivel 5	
SD	105770
%RSD	2,460

APÉNDICE E: Certificado de estándar utilizado



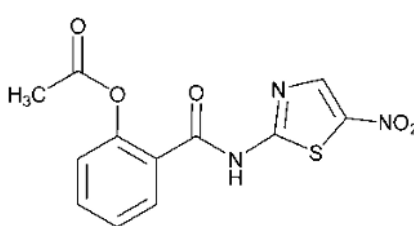
Certificate

NITAZOXANIDE

(2-(Acetyloxy)-N-(5-nitro-2-thiazolyl)benzamide)

USP Catalog No.: 1463960

USP Lot No.: R112D0

	CAS No.: 55981-09-4
	Molecular Formula: C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅ S
	Molecular Weight: 307.28



LABEL TEXT

For use with specified USP compendial tests.
Not for use as a drug. See SDS prior to use
at www.usp.org/sds.

usp REFERENCE STANDARD

NITAZOXANIDE 200 mg

For quantitative applications, use a value of 0.999 mg of nitazoxanide per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Protect from light. Store in a refrigerator.

See certificate for any additional information.
USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0666
Cat. No. 1463960 Material mfd. in India

LOT: R112D0



Jeri L. Ioth

Quality Assurance

**Assigned Value**

Please refer to the USP Reference Standard label for the assigned value of the specific lot. If the lot was developed for qualitative use, it will not have an assigned value.

Valid Use Date

It is the responsibility of the user to ascertain that a particular lot of a USP Reference Standard has official status either as a "Current lot" or as a "Previous lot" within the assigned valid use date. The online USP Reference Standards Catalog and the online USP Store at www.usp.org are updated daily. USP recommends referring to one of these sources prior to using a USP Reference Standard to make sure the lot is valid for use.

Storage

Storage conditions are lot-specific and may change from one lot to another. If no specific directions or limitations are provided on the USP Reference Standard label, the conditions of storage shall include storage at room temperature and protection from moisture, light, freezing, and excessive heat.

Instructions for Use

Follow the instructions provided on this Certificate, on the label of the USP Reference Standard, and in the associated USP documentary standard(s). Please refer to General Chapter <11> for additional information.

Non-USP Compendial Use

USP Reference Standards are for use in analytical or laboratory applications as specified in USP compendia. They are not for use in humans or animals as drugs or medical devices. It is the responsibility of the user to determine the suitability of the USP Reference Standard for non-USP compendial uses.

LEGAL NOTICE

USP WARRANTS GOOD TITLE TO USP REFERENCE STANDARDS ON DISPATCH FROM USP. THE FOREGOING WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION ANY WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR ANY WARRANTY THAT THE PRODUCTS, INCLUDING THIS CERTIFICATE, ARE OF MERCHANTABILITY QUALITY. USP'S LIABILITY ARISING OUT OF OR RELATING TO THE SUPPLY OF USP REFERENCE STANDARDS AND THIS CERTIFICATE SHALL IN NO EVENT INCLUDE LOSS OF PROFITS, COST OF PROCURING SUBSTITUTE GOODS OR SERVICES, OR ANY INCIDENTAL, INDIRECT, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OF ANY KIND, EVEN IF USP IS AWARE OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. WITHOUT LIMITING THE GENERALITY OF THE FOREGOING, USP DOES NOT WARRANT THAT THE USE OR RESALE OF USP REFERENCE STANDARDS, INCLUDING THEIR USE TO PERFORM TESTS AND ASSAYS PUBLISHED BY USP, WILL NOT INFRINGE UNITED STATES OR ANY OTHER PATENTS.

USP Reference Standards are not intended for use as drugs, dietary supplements, or as medical devices.

This certificate may not be reproduced without the express written permission of USP.

APÉNDICE F: Reactivos, soluciones, estándar, muestra, columna utilizados en análisis.

Fig. F1 Reactivos

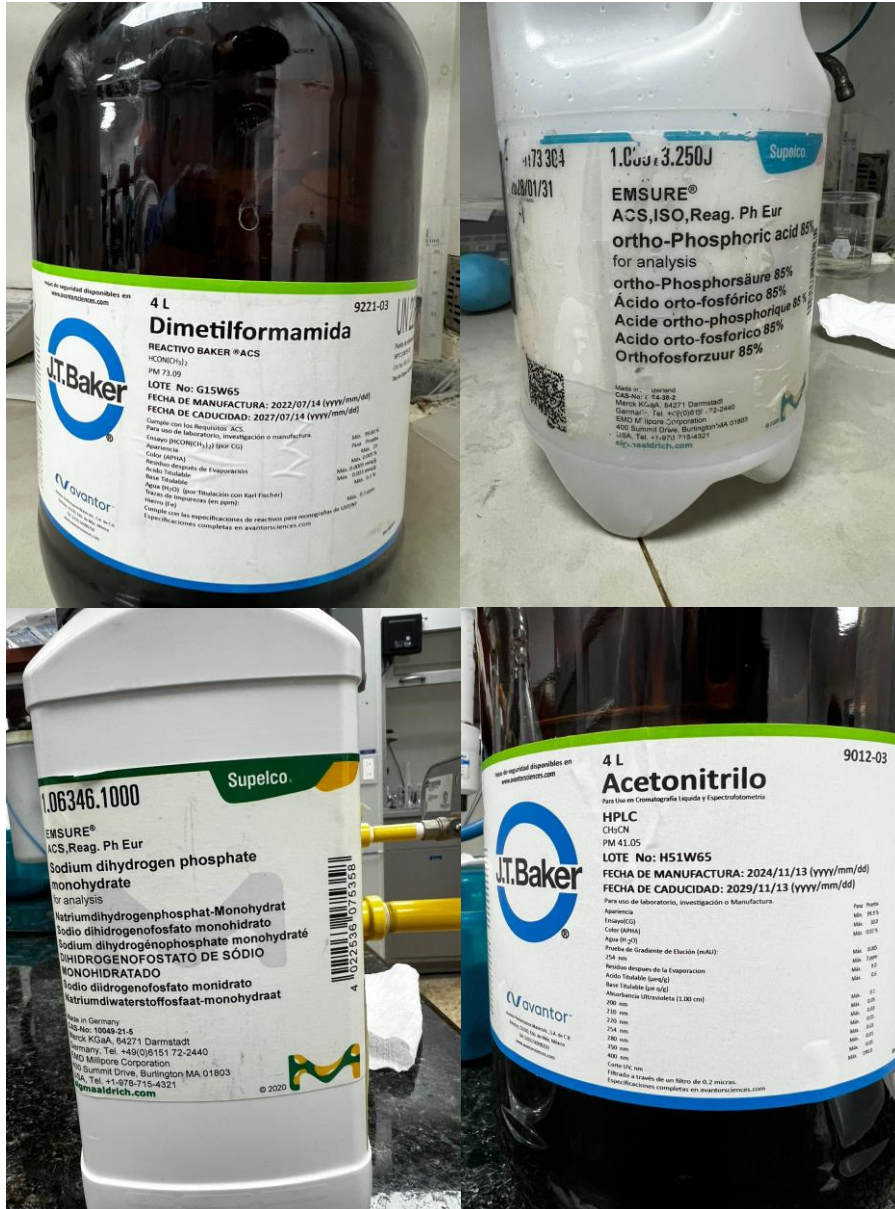


Fig. F2 Estándar



Fig. F3, Columna cromatográfica



Fig. F4, Soluciones



33 Fig. F5, Materia prima

