

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES**

**PROYECTO DE TITULACIÓN**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

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

**TEMA:**

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA  
CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE ACETAMINOFÉN, ÁCIDO  
ACETILSALICÍLICO Y BROMHEXINA EN UN PRODUCTO FARMACÚTICO EN  
SOLUCIÓN ORAL POR CROMATOGRFIA LÍQUIDA HPLC

**AUTOR:**

**JIMENA LISSETTE TORO MAYORGA**

**Guayaquil - Ecuador**

**2024**

## RESUMEN

Con el desarrollo de un nuevo producto farmacéutico es ineludible utilizar un método analítico específico que permita identificar y cuantificar los principios activos en la nueva formulación, y, para asegurar su confiabilidad y reproducibilidad es necesario validarlo. En este trabajo, se desarrolló y validó un método analítico que permitió identificar y cuantificar simultáneamente acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina en solución oral, sin interferencias entre ellos ni con los excipientes. El método es reproducible, confiable, rápida y de bajo costo que puede ser aplicado en análisis de rutina. El desarrollo de la metodología fue mediante cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC en la cual se ensayaron variaciones tanto en fase móvil, solventes, longitudes de onda, volúmenes de inyección, temperatura, flujo, etc., hasta obtener la metodología definitiva. Para demostrar la idoneidad del método, este fue sometido a validación bajo los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez. Los resultados pasaron finalmente a una evaluación estadística que nos permitió demostrar que el método es selectivo, lineal, exacto y preciso y que aseguran la calidad, eficacia del fármaco.

## **ABSTRACT**

When the development of a new pharmaceutical product, it is mandatory to use a specific analytical method that allows the identification and quantification of the active ingredients in the new formulation, in order to ensure its reliability and reproducibility it is necessary to validate it. In this work, an analytical method was developed and validated to allow the simultaneous identification and quantification of acetaminophen, acetylsalicylic acid and bromhexine in oral solution, without interference between them or with the excipients. The method is reproducible, reliable, fast and low-cost manner can be applied in routine analysis. The development of the methodology was through high-performance liquid chromatography (HPLC) in which variations in mobile phase, solvents, wavelengths, injection volumes, temperature, flow, etc. were tested until the definitive methodology was obtained. To demonstrate the suitability of the method, it was subjected to validation under the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, precision and robustness. The results were finally subjected to a statistical evaluation that demonstrate that the method is selective, linear, exact, precise and that it ensures the quality and effectiveness of the drug.

## **DEDICATORIA**

A Dios por las infinitas bendiciones recibidas; a Mitchell por su impulso, confianza y ánimo constante; Emma y Javier por ser mi inspiración y gran apoyo.

## **AGRADECIMIENTO**

A IFAVET S.A. por permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral por la formación recibida y de manera especial al Dr. Joan Vera, por su tiempo y sus muy valiosos aportes en el desarrollo de este trabajo.

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

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

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

---

Jimena Lissette Toro Mayorga

# TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

---

Joel Vielma Puente Ph.D.  
PRESIDENTE

---

Joan Vera Villalobos Ph.D.  
TUTOR

---

César Araque Molina Ph.D.  
DOCENTE EVALUADOR

## ABREVIATURAS O SIGLAS

|         |  |
|---------|--|
| AAS     | Ácido acetilsalicílico                         |
| ACN     | Acetonitrilo                                   |
| AINES   | Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos   |
| ANOVA   | Análisis de varianza                           |
| CV      | Coefficiente de variación                      |
| DS      | Desviación estándar                            |
| HPLC    | High performance liquid chromatography         |
| ICH     | International Conference on Harmonization      |
| LOD     | Límite de detección                            |
| LOQ     | Límite de cuantificación                       |
| mg      | Miligramo                                      |
| ml      | Mililitro                                      |
| MRC     | Material de referencia certificado             |
| ODS     | Octadecilsilano o C18                          |
| PDA     | Detector de arreglo de fotodiodos              |
| pH      | Potencial de Hidrógeno.                        |
| ppm     | Partes por millón                              |
| SD      | Desviación estándar                            |
| R       | Recobro  |
| RSD     | Desviación estándar relativa                   |
| St      | Estándar                                       |
| Tailing | Efecto de cola. Término usado en cromatografía |
| TEA     | Trietilamina                                   |
| TR      | Tiempo de retención                            |
| USP     | United States Pharmacopoeia                    |
| UA      | Unidades de absorbancia                        |
| UV      | Ultravioleta                                   |
| VIS     | Visible  |

# TABLA DE CONTENIDO

|  |   |
|--|---|
| CAPÍTULO 1 .....   | 1 |
| 1.INTRODUCCION .....   | 1 |
| 1.1 Antecedentes .....   | 1 |
| 1.2 Descripción del problema .....   | 2 |
| 1.3 Objetivos .....  | 3 |
| 1.3.1 Objetivo General.....  | 3 |
| 1.3.2 Objetivos Específicos .....  | 3 |
| 1.4 Hipótesis .....  | 3 |
| 1.5 Alcance .....  | 4 |
| CAPÍTULO 2 .....   | 5 |
| 2.MARCO TEÓRICO .....  | 5 |
| 2.1 Medicamentos en solución oral.....                                       | 5 |
| 2.2 Componentes de productos farmacéuticos .....                             | 5 |
| 2.2.1 Principios activos .....   | 5 |
| 2.2.2 Excipientes .....  | 5 |
| 2.3 Cromatografía .....  | 5 |
| 2.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución HPLC. ....                    | 5 |
| 2.3.1.1 Fase estacionaria.....   | 5 |
| 2.3.1.2 Recipientes para la fase móvil .....                                 | 5 |
| 2.3.1.3 Sistemas de bombeo.....  | 5 |
| 2.3.1.4 Sistemas de inyección de muestra.....                                | 5 |
| 2.3.1.5 Columnas .....   | 5 |
| 2.3.1.6 Detectores.....  | 5 |
| 2.3.2 Aplicabilidad cromatografía líquida en la Industria farmacéutica. .... | 5 |
| 2.4 Validación de métodos analíticos .....                                   | 5 |
| 2.4.1 Especificidad / Selectividad .....                                     | 6 |
| 2.4.2 Límite de detección LOD .....  | 6 |
| 2.4.3 Límite de cuantificación LOQ.....                                      | 6 |
| 2.4.4 Linealidad .....   | 6 |
| 2.4.5 Exactitud .....  | 7 |
| 2.4.6 Precisión .....  | 7 |
| 2.4.7 Robustez.....  | 8 |
| 2.5 Principios activos componentes de la formulación .....                   | 9 |
| 2.5.1 Acetaminofén.....  | 9 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| 2.5.2      | Ácido acetilsalicílico.....                                       | 10 |
| 2.5.3      | Bromhexina.....   | 12 |
| CAPÍTULO 3 | .....   | 14 |
| 3.1        | Enfoque de la investigación .....                                 | 14 |
| 3.1.1      | Tipo de investigación .....                                       | 14 |
| 3.1.2      | Diseño de investigación .....                                     | 14 |
| 3.2        | Metodología .....   | 14 |
| 3.2.1      | Diseño experimental .....   | 14 |
| 3.2.2      | Recolección de datos .....  | 15 |
| 3.2.2.1    | Métodos y técnicas .....  | 15 |
| 3.2.2.1.1  | Desarrollo de la metodología .....                                | 15 |
| 3.2.2.2    | Validación del método analítico.....                              | 15 |
| 3.2.2.2.1  | Especificidad .....   | 16 |
| 3.2.2.2.2  | Linealidad y rango de trabajo .....                               | 17 |
| 3.2.2.2.3  | Efecto matriz.....  | 18 |
| 3.2.2.2.4  | Límite de detección LOD .....                                     | 18 |
| 3.2.2.2.5  | Límite de cuantificación LOQ.....                                 | 19 |
| 3.2.2.2.6  | Exactitud .....   | 19 |
| 3.2.2.2.7  | Precisión.....  | 19 |
| 3.2.2.2.8  | Robustez .....  | 20 |
| 3.2.2.3    | Recursos .....  | 21 |
| 3.2.2.3.1  | Equipos, materiales y reactivos .....                             | 21 |
| 3.2.2.3.2  | Sistema cromatográfico y condiciones de equipo.....               | 22 |
| 3.2.2.4    | Preparación de fase móvil, muestras, estándares y cálculos.....   | 23 |
| 3.2.3      | Análisis estadístico .....  | 25 |
| CAPÍTULO 4 | .....   | 28 |
| 4.         | RESULTADOS.....   | 28 |
| 4.1        | Desarrollo del método .....                                       | 28 |
| 4.1.1      | Parámetros cromatográficos para desarrollo de la metodología..... | 28 |
| 4.1.2      | Desarrollo de la metodología .....                                | 28 |
| 4.2        | Pretratamiento de la muestra .....                                | 38 |
| 4.3        | Validación del método .....                                       | 38 |
| 4.3.1      | Especificidad.....  | 38 |
| 4.3.2      | Linealidad .....  | 40 |
| 4.3.3      | Efecto Matriz.....  | 44 |
| 4.3.4      | Límite de detección.....  | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 4.3.5 Límite de cuantificación .....    | 46 |
| 4.3.6 Exactitud .....                   | 46 |
| 4.3.7 Repetibilidad .....               | 47 |
| 4.3.8 Robustez.....                     | 50 |
| CAPÍTULO 5 .....                        | 55 |
| 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ..... | 55 |
| 5.1 CONCLUSIONES.....                   | 55 |
| 5.2 RECOMENDACIONES .....               | 56 |
| 6. REFERENCIAS.....                     | 57 |
| 7. APÉNDICES Y ANEXOS .....             | 61 |

## LISTADO DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Fig. 2.1. Estructura molecular de acetaminofén .....  | 10 |
| Fig. 2.2. Estructura molecular ácido acetilsalicílico .....   | 11 |
| Fig. 2.3. Estructura molecular bromhexina .....   | 13 |
| Fig. 2.4. Esquema general para desarrollo y validación del método .....   | 15 |
| Fig. 4.1 Cromatograma de la muestra con la técnica acetaminofén, aspirina tabletas USP .....  | 29 |
| Fig. 4.2: Cromatograma de la muestra con la variante en el solvente para la técnica acetaminofén, aspirina tabletas USP. ....                           | 30 |
| Fig. 4.3 Estándar de bromhexina en fase móvil original .....  | 30 |
| Fig. 4.4 Solución del estándar madre de bromhexina en fase móvil original 50% y 50% ACN.....  | 31 |
| 31  |    |
| Fig. 4.5 Solución del estándar madre de bromhexina en fase móvil original 50% y 50%metanol .....  | 32 |
| Fig. 4.6 Muestra en fase móvil buffer fosfatos, metanol, acetonitrilo .....   | 32 |
| Fig. 4.7 Muestra en fase móvil buffer fosfatos, metanol, acetonitrilo ajustado pH 5.5   | 33 |
| 33  |    |
| Fig. 4.8 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.015M y acetonitrilo (57:43).....  | 33 |
| Fig. 4.9 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.007M y acetonitrilo (57:43).....  | 34 |
| Fig. 4.10 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.015M y acetonitrilo (65:35)..... | 34 |
| Fig. 4.11 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH 3 0.015M y acetonitrilo (65:35) | 35 |
| Fig. 4.12 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH3 0.015M y acetonitrilo (60:40)  | 35 |

|   |    |
|---|----|
| Fig. 4.13 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH3 0.015M y acetonitrilo (60:40)    | 36 |
| Fig. 4.14 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico, fase móvil: buffer trietilamina pH3 0.05 M y acetonitrilo (50:50) | 36 |
| Fig. 4.15 Cromatograma de la muestra, fase móvil: buffer trietilamina pH3 0.05 M y acetonitrilo (50:50)   | 36 |
| Fig. 4.16 Cromatograma de a.) estándar b.) muestra en fase móvil de trietilamina pH3 0.007M y acetonitrilo (60:40)  | 37 |
| Fig. 4.17 Cromatograma UV/VIS de muestra  | 37 |
| Fig. 4.18 Cromatograma del solvente/fase móvil.   | 38 |
| Fig. 4.19 Cromatograma sin presentar interferencias entre los tres principios activos   | 39 |
| Fig. 4.20 Cromatograma sin presentar interferencias en la muestra   | 39 |
| Fig. 4.21 Curvas de regresión lineal para acetaminofén  | 41 |
| Fig.4.22 Curvas de regresión lineal para ácido acetilsalicílico   | 41 |
| Fig. 4.23 Curvas de regresión lineal para bromhexina  | 42 |
| Fig. 4.24 Análisis de residuales de acetaminofén  | 43 |
| Fig. 4.25 Análisis de residuales de ácido acetilsalicílico  | 43 |
| Fig. 4.26 Análisis de residuales de ácido acetilsalicílico  | 44 |

## LISTADO DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| TABLA 2.1 Características de desempeño vs tipos de aplicación analítica .....                                    | 5  |
| TABLA 2.2 Información química acetaminofén .....   | 9  |
| TABLA 2.4 Información química bromhexina .....   | 12 |
| TABLA 3.1 Criterios de aceptación para validación .....  | 16 |
| TABLA 3.2 Parámetros de prueba para análisis de robustez de Younden y Steiner .....                              | 20 |
| TABLA 3.3 Esquema Younden y Steiner para robustez.....   | 20 |
| TABLA 3.4 Esquema de prueba para ensayo de robustez del método .....   | 21 |
| TABLA 4.1 Ensayo 1 de variantes en gradiente al método 1 .....   | 31 |
| TABLA 4.2 Datos de evaluación de la adaptabilidad del sistema.....   | 39 |
| TABLA 4.3 Concentración final teórica utilizada para linealidad del sistema ...                                  | 40 |
| TABLA 4.4 Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración de acetaminofén.....        | 42 |
| TABLA 4.5 Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración ácido acetilsalicílico..... | 42 |
| TABLA 4.6 Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración de bromhexina.....          | 43 |
| TABLA 4.7 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz para acetaminofén.....                         | 44 |
| TABLA 4.8 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz para ácido acetilsalicílico .....              | 45 |
| TABLA 4.9 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz para bromhexina                                | 45 |
| TABLA 4.10 Porcentaje de recuperación para acetaminofén, ácido acetilsalicílico y aspirina.....                  | 47 |

|  |    |
|--|----|
| TABLA 4.11 Resultados de repetibilidad para acetaminofén .....                                 | 48 |
| TABLA 4.12 Resultados de repetibilidad para ácido acetilsalicílico .....                       | 48 |
| TABLA 4.13 Resultados de repetibilidad para bromhexina .....                                   | 50 |
| TABLA 4.14 Esquema Youden y Steiner establecido para análisis de robustez                      | 51 |
| TABLA 4.15 Resultados de ensayo de robustez .....  | 51 |
| TABLA 4.16 Resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para acetaminofén                 | 52 |
| TABLA 4.17 Resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para ácido acetilsalicílico ..... | 53 |
| TABLA 4.18 Tabla resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para bromhexina.....        | 53 |

## CAPÍTULO 1

### 1.INTRODUCCION

#### 1.1 Antecedentes

El uso apropiado de los métodos analíticos permite identificar y cuantificar si los principios activos dentro de un medicamento cumplen con los límites de aceptación establecidos. La validación de los métodos analíticos, que son utilizados en el control de calidad de medicamentos, tiene una función muy importante, ya que de ellos depende la determinación confiable y reproducible de la calidad de las materias primas y productos terminados, lo que contribuye de manera notable al aseguramiento de calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos.

Las características de desempeño o los parámetros de validación del método determinan la idoneidad para el uso previsto. Ellos definen qué puede hacer el método en condiciones optimizadas de solución matriz, aislamiento de analitos, ajustes instrumentales y otras características experimentales. La inclusión de parámetros particulares de validación en un protocolo de validación depende de la aplicación, muestras de prueba, el objetivo del método y las directrices o reglamentos nacionales o internacionales, según corresponda. Estas características son exploradas y optimizadas en el laboratorio que inicialmente propone, desarrolla y perfecciona el procedimiento analítico, es entonces cuando el método puede ser probado en el estudio inter-laboratorio por un grupo de colaboradores. Si la prueba es exitosa, el método se adopta como método oficial.

El proceso de desarrollo de un nuevo medicamento en un laboratorio farmacéutico nacional demanda la implementación de una metodología analítica que permita determinar la concentración de tres principios activos; acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina, presentes en un único producto en solución oral.

Las monografías oficiales existentes sugieren abordar el análisis de cada principio activo mediante metodologías separadas, utilizando insumos, reactivos y solventes diferentes para cada uno, lo cual resulta un aumento de los costos y tiempo de análisis.

En el análisis bibliográfico existe disponibilidad de metodologías para el análisis de acetaminofén y aspirina en tabletas [1], algunas de ellas incluyen los principios activos mencionados junto con otros distintos, como validación simultánea de paracetamol y tramadol HCl en tabletas por HPLC [2], la estimación simultánea de paracetamol y etoricoxib en tabletas por HPLC [3], validación de paracetamol e ibuprofeno por HPLC [4], análisis de bromhexina HCl [5], [6], determinación simultánea de bromhexina clorhidrato y metil y propil hidroxibenzoato en jarabe por cromatografía líquida de alta resolución [7], tesis validación de un método de análisis cuantitativo de bromhexina tabletas por HPLC [8], validación por HPLC para determinar niveles de bromhexina HCl, clorfeniramina maleato, dextrometorfano bromhidrato y guaifenesina en sus formas farmacéuticas [9], desarrollo y validación por RP-HPLC método de determinación simultánea de amoxicilina trihidrato y bromhexina HCl en suspensión oleosa [10], desarrollo y validación de un método HPLC para la determinación simultánea de paracetamol, ácido acetilsalicílico y cafeína en productos farmacéuticos [1]; en ninguna se encuentra técnica analítica para la determinación de estos tres principios activos de manera simultánea y en solución, lo cual requiere el desarrollo de esta nueva metodología.

Actualmente en el medio no existe un producto con estas características y concentración, lo cual le otorga a este producto una mayor especialización en lo que el mercado para uso veterinario requiere y mediante el desarrollo de una metodología validada se brinda al medio pecuario un nuevo medicamento que cumpla con la concentración, calidad, eficacia requerida para lo que fue formulado.

## **1.2 Descripción del problema**

Evaluar al nuevo medicamento, mediante ensayos en el laboratorio para asegurar que el producto terminado, contiene las mismas cantidades de principios activos y parámetros fisicoquímicos con el que fue formulado, es fundamental, por lo cual, es imperativo contar con un método analítico específico, exacto y confiable. Este método debe determinar con precisión la presencia de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y aspirina, asegurando que no haya pérdidas, degradación, interacciones o interferencias. Sin cumplir con estos requisitos, el medicamento no

puede ser lanzado al mercado, lo que no solo representa pérdidas económicas para el laboratorio en términos de la inversión en desarrollo y equipamiento de laboratorio, sino que también afecta a la comunidad, que se ve privada de un medicamento que cumple con la composición, forma farmacéutica y concentración requerida.

Según lo expuesto, se plantea esta pregunta: ¿Cómo se puede desarrollar un método analítico que garantice la presencia no comprometida de los principios activos, asegurando así su calidad y cumplimiento con los requisitos regulatorios antes de su entrada al mercado?

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Validar el método analítico mediante cromatografía líquida para cuantificación simultánea de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina en un producto farmacéutico en solución oral.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

Desarrollar un método cromatográfico que permita el análisis simultáneo de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina en solución oral.

Demostrar mediante validación que el método se encuentra dentro del cumplimiento de requisitos de desempeño según la guía ICH Q2 (R2).

Comprobar que el método desarrollado permita la determinación cualitativa y cuantitativa simultánea de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina de una manera efectiva, rápida y de bajo costo para ser aplicado en el análisis de rutina.

### **1.4 Hipótesis**

El método desarrollado por HPLC para cuantificación simultánea de acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina permite identificar y cuantificar de manera precisa, ofreciendo resultados rápidos, confiables y reproducibles. La fiabilidad de los resultados de la validación asegurara un alto nivel de confianza del método para la

aprobación del medicamento por parte del laboratorio de control de calidad.

### **1.5 Alcance**

- Se recopiló suficiente información bibliográfica de metodologías con principios activos similares para facilitar su desarrollo.
- Se definió reactivos y materiales requeridos para el desarrollo de la metodología.
- Se solicitó a un proveedor certificado la verificación de la calibración de los equipos e instrumentos de mediada a emplearse en la validación.
- Se evaluó los resultados obtenidos en las pruebas del desarrollo del método.
- Se estableció criterios para la ejecución de cada uno de los parámetros de validación y sus resultados.
- Se validó la metodología desarrollada a través de pruebas de Especificidad, Linealidad, Exactitud, Precisión y Robustez.
- Se realizó análisis estadístico de los resultados.
- Se evaluó si la metodología ha cumplido con los requisitos particulares a los que se ha sometido el método para garantizar la utilización específica prevista.

## CAPÍTULO 2

**TABLA 2.1 Características de desempeño vs tipos de aplicación analítica**

| Tipo de medida<br>atributo del<br>producto  | IDENTIDAD   | IMPUREZAS (PUREZA)<br>Otras medidas cuantitativas (1) |             | ENSAYO<br>contenido/potencia<br>Otras medidas<br>cuantitativas (1) |
|---|-------------|---|-------------|--|
|   |             | Cuantificación  | Límite      |  |
| Procedimiento<br>Analítico<br>Desempeño<br>Características a ser<br>demostradas (2)                 |             |   |             |  |
| Especificidad (3)<br>Prueba de especificidad  | +           | +   | +           | +  |
| Rango de trabajo<br>Idoneidad del modelo<br>de calibración<br>Límite rango inferior<br>Verificación | -           | +<br><br>QL (DL)                                      | -<br><br>DL | +<br><br>-   |
| Exactitud (4)<br>Ensayo de exactitud  | -           | +   | -           | +  |
| Precisión (4)<br>Repetibilidad<br>Precisión intermedia  | -<br>-<br>- | +<br><br>+( 5)  | -<br>-<br>- | +<br><br>+( 5)   |

**Nota:** Características de rendimiento típicas y pruebas de validación relacionadas para los atributos medidos del producto.[23]

- Significa que este ensayo normalmente no es evaluado
  - + Significa que este ensayo es normalmente evaluado.
  - ( ) Significa que este ensayo normalmente no es evaluado, pero en algunos casos complejos es recomendado.
- QL, DL: Límite de cuantificación, límite de detección.
- (1) Otras mediciones cuantitativas pueden seguir el esquema de prueba de impurezas, si el rango de trabajo está cerca de los límites de detección o cuantificación de la tecnología; de lo contrario, se recomienda seguir el esquema de ensayo.
  - (2) Algunas características de desempeño pueden ser sustituidas con justificación inherente a la tecnología o calificación en el caso de ciertos procedimientos analíticos para propiedades fisicoquímicas.
  - (3) Se puede utilizar un enfoque combinado como alternativa a la evaluación de la exactitud y la precisión por separado.
  - (4) La falta de especificidad de un procedimiento analítico podría compensarse con uno o más procedimientos analíticos de apoyo.
  - (5) La reproducibilidad y la precisión intermedia se pueden realizar como un solo conjunto de experimentos.

A lo largo del estudio de validación, se deben utilizar materiales de referencia adecuadamente caracterizados, con identidad y pureza documentadas o cualquier otra característica que sea necesaria. El grado de pureza necesario para el material

de referencia depende del uso previsto.

#### **2.4.1 Especificidad / Selectividad**

De acuerdo a la Guía Eurachem la selectividad analítica se relaciona con “el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar” [21, p. 19]

La selectividad podría demostrarse cuando el procedimiento analítico no es específico. Sin embargo, la prueba para identificar o cuantificar un analito en presencia de una posible interferencia debe minimizar esa interferencia y demostrar que la prueba es adecuada para el propósito.

La especificidad/ selectividad se puede mostrar demostrando que la identificación y/o cuantificación de un analito no se ve afectada por la presencia de otras sustancias (p. ej. impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas, matriz u otros compuestos presentes en el medioambiente del proceso operativo) [23, p.7]

#### **2.4.2 Límite de detección LOD**

De acuerdo a la ICH, “el límite de detección (DL)son las concentraciones mínimas a las que el analito puede detectarse de forma fiable, una relación, señal ruido de 3:1 generalmente se considera aceptable para estimar el límite de detección.” [23]

#### **2.4.3 Límite de cuantificación LOQ**

La Guía Eurachem define LOQ como el mínimo nivel de analito que puede ser determinado con desempeño aceptable. [21, p. 21]

La ICH define al límite de cuantificación (QL) como la cantidad más baja del analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas. El límite de cuantificación es un parámetro utilizado para ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y en particular, se utiliza para la determinación de impurezas y/o productos de degradación.[23, p. 19]

#### **2.4.4 Linealidad**

Debe evaluarse una relación lineal entre la concentración del analito y la respuesta a lo largo del rango de trabajo del procedimiento analítico para confirmar la idoneidad del procedimiento para el uso previsto.

Inicialmente, la linealidad se puede evaluar con un gráfico de señales en función de la concentración o el contenido del analito. Los resultados de las pruebas deben evaluarse mediante métodos estadísticos apropiados (p. ej., mediante el cálculo de una línea de regresión mediante el método de los mínimos cuadrados). [23, p. 9]

“La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio”. [22, p.28]

Para el establecimiento de la linealidad, es recomendable el uso de mínimo cinco concentraciones adecuadamente distribuidas a lo largo del rango; sin embargo, es posible que se requieran concentraciones adicionales para modelos más complejos.

#### **2.4.5 Exactitud**

La exactitud es el grado de concordancia entre el valor de referencia y el valor del resultado en el ensayo.

“El término “exactitud”, esta aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo”.

Cuando se aplica a un método de ensayo el término “exactitud” se refiere a la combinación de veracidad y precisión. “[...]” Entre más veraz y preciso sea un resultado analítico, es más exacto. [22, p. 37].

#### **2.4.6 Precisión**

La precisión es una medida de cuan cerca están los resultados entre sí. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados, típicamente la desviación estándar (o desviación estándar relativa), calculada a partir de los resultados obtenidos mediante la realiza con de mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas. [21, p. 35]

“La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El

grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados”. [22, p. 42]

La precisión debe establecerse en todo el rango de trabajo de procedimiento analítico y generalmente se demuestra mediante la comparación de los resultados medidos con un valor esperado.

La precisión debe demostrarse en condiciones de prueba regulares del procedimiento analítico, en presencia de matriz de muestra y usando los pasos habituales de preparación de muestra.

**Repetibilidad:** Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo. [22, p. 42]

#### **Precisión Intermedia**

La medida en que debe establecerse una precisión intermedia depende de las circunstancias las que se pretenda utilizar el procedimiento. Las variaciones típicas a estudiar incluyen diferentes días, condiciones ambientales, analistas y equipos, según corresponda. [22, p. 42]

### **Reproducibilidad**

Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método, en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros.

Cuando se desea determinar la reproducibilidad inter laboratorios para fines de validación de un método, deben participar diferentes laboratorios, se debe tener en consideración que estos utilicen el mismo método y misma muestra, en un intervalo de tiempo preferentemente establecido, se determina de este modo la desviación estándar de los resultados obtenidos por los diferentes laboratorios. [22. p. 43]

#### **2.4.7 Robustez**

La Guía Eurachem la define como “una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso

normal”. [21, p. 38]

“El objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio y describir bajo qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener a través de este, resultados confiables”. [22, p. 45]

## 2.5 Principios activos componentes de la formulación

### 2.5.1 Acetaminofén

El acetaminofén (paracetamol, N-acetil-p-aminofenol) es el metabolito activo de la fenacetina, el analgésico derivado del alquitrán.

” [...]” El acetaminofén puede utilizarse eficazmente en vez de la aspirina como agente analgésico-antipirético; sin embargo, son mucho más débiles sus efectos antiinflamatorios. El fármaco se distribuye con relativa uniformidad en casi todos los líquidos corporales.

” [...]” Está indicado para aliviar el dolor en sujetos con osteoartritis no inflamatoria, pero no constituye un sustitutivo idóneo de la aspirina ni de otros NSAID en trastornos inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide. El fármaco es bien tolerado y es pequeña su incidencia de efectos adversos gastrointestinales. Se expende sin receta y se utiliza como analgésico casero común. Sin embargo, en dosis excesivas y a muy breve plazo puede originar daño intenso del hígado, y va en aumento el número de casos de intoxicación accidental o deliberada con este producto. El uso prolongado de menos de 2 g/día de acetaminofén no se acompaña típicamente de disfunción hepática. El efecto adverso agudo más grave en las sobredosis de acetaminofén es la necrosis hepática, que puede ser fatal. [24, p. 694]

**TABLA 2.2 Información química acetaminofén**

|                  |  |
|------------------|--|
| Nombre           | ACETAMINOFÉN<br>Paracetamol<br>4´-Hidroxiacetanilida<br>p-Acetilaminofenol<br>N-(4-Hidroxifenil) acetamida |
| CAS              | 103-90-2   |
| CE               | 203-157-5  |
| Fórmula          | C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub><br>HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NHCOCH <sub>3</sub>       |
| Masa molecular:  | 151.2  |
| Punto de fusión: | 169-170°C  |
| Densidad:        | 1.3 g/cm <sup>3</sup>  |

Solubilidad en agua g/100 ml a 20°C | 1.4 (moderada)

Nota: Ficha informativa Acetaminofén [25]

Fórmula estructural

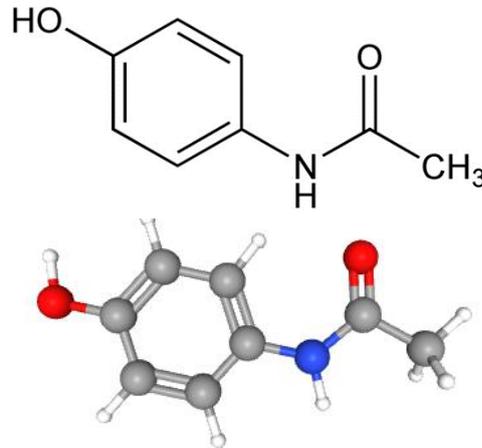


Fig. 2.1. Estructura molecular de acetaminofén

### 2.5.2 Ácido acetilsalicílico

El ingrediente activo de la corteza del sauce era un glucósido amargo llamado salicina, aislado por primera en forma pura por Leroux, en 1829, quien también demostró sus acciones antipiréticas. Por hidrólisis, la salicina produce glucosa y alcohol salicílico. Éste puede convertirse en ácido salicílico, ya sea in vivo o por manipulación química. El salicilato de sodio se utilizó primero para el tratamiento de la fiebre reumática y como antipirético en 1875 y pronto siguió el descubrimiento de sus efectos uricosúricos y su utilidad en el tratamiento de la gota. El enorme éxito de esta droga motivó a Hoffman, un químico empleado por Bayer, a preparar ácido acetilsalicílico (AAS) sobre la base del trabajo previo, pero olvidado, de Gerhardt en 1853. Después de la demostración de sus efectos antiinflamatorios, este compuesto fue introducido en la medicina en 1899 por Dreser con el nombre de Aspirina®. [26]

Pertenece a la familia de los AINE, y dentro de esta clasificación está dentro de los salicilatos. El ácido acetilsalicílico es un inhibidor no selectivo de ambas isoformas de la ciclooxigenasa; a dosis bajas (100 mg/día), inhibe irreversiblemente la COX de las plaquetas, produciendo un efecto antiagregante plaquetario.

El ácido acetilsalicílico se convierte en ácido salicílico durante la absorción y después de la misma (la CL y t<sub>1/2</sub> del salicilato son dependientes de la dosis; la semivida varía

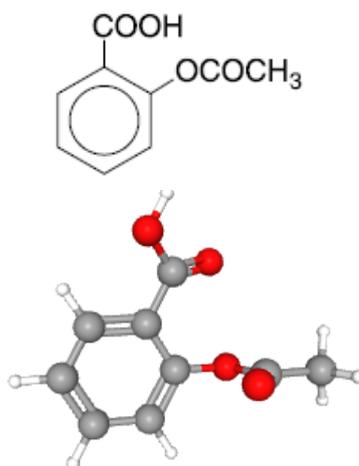
de 2.4 h luego de una dosis de 300 mg, hasta 19 h cuando hay intoxicación). B Después de administrar una dosis única de 1.2 g por vía oral en adultos.[24, p. 1794] Por su relación con el síndrome de Reye, están contraindicada la aspirina en niños y adultos menores de 20 años.

**TABLA 2.3 Información química ácido acetilsalicílico**

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| Nombre                              | ÁCIDO 2-(ACETILOXI) BENZOICO<br>Ácido acetilsalicílico<br>Ácido 2- acetoxibenzoico<br>Aspirina        |
| CAS                                 | 50-78-2   |
| CE                                  | 200-064-1   |
| Fórmula                             | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub><br>CH <sub>3</sub> COOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COOH |
| Masa molecular:                     | 180.2   |
| Punto de fusión:                    | 135 °C  |
| Densidad:                           | 1.4 g/cm <sup>3</sup>   |
| Solubilidad en agua g/100 ml a 15°C | 0.25 (escasa)   |
| Presión de vapor, Pa a 25°C         | ~ 0.004   |

Nota: Ficha informativa Ácido acetilsalicílico [25]

Fórmula estructural



**Fig. 2.2. Estructura molecular ácido acetilsalicílico**

### 2.5.3 Bromhexina

La bromhexina deriva de un alcaloide de la nuez de malabar (*Adhatoda vasica*). El ambroxol, uno de sus metabolitos activos. A dosis altas pueden ejercer cierta acción estimulante de la secreción de las glándulas mucosas bronquiales. In vitro ejercen acción mucolítica por despolimerización de las sialomucinas, con reducción de la viscosidad. En animales y a dosis altas se ha observado cierta acción regeneradora de las células epiteliales ciliadas.[28]

Se encuentra dentro de la clasificación como mucolítico, los cuales son agentes secretolíticos, mucocinéticos y fluidificantes de secreciones de la vía respiratoria respiratoria, disminuyen la viscosidad de las secreciones y facilita la eliminación. Esta función la pueden realizar estos fármacos por ruptura de las glicoproteínas del moco por apertura de los enlaces disulfuros de estas.[29]

“Se absorben bien por vía oral y difunden a los tejidos, incluido el epitelio bronquial, donde alcanzan concentraciones suficientes para actuar localmente, siempre que las dosis sean suficientemente elevadas, hecho que no siempre se cumple. Pueden producir molestias gastrointestinales”. [28, p. 275]

**TABLA 2.4 Información química bromhexina**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Nombre                        | BROMHEXINE<br>Benzenemethanamine, 2-amino-3,5-dibromo-N-cyclohexyl-N-methyl-<br>Bromhexina<br>Bromhexinum |
| CAS                           | 3572-43-8   |
| Fórmula                       | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub>  |
| Masa molecular:               | 376.13 g/mol  |
| Punto de fusión:              | 232-235   |
| Densidad:                     | 1.57  |
| Presión de vapor, mmHg a 25°C | 0.0±1.0   |

Nota: Ficha informativa Bromhexina [27]

Fórmula estructural

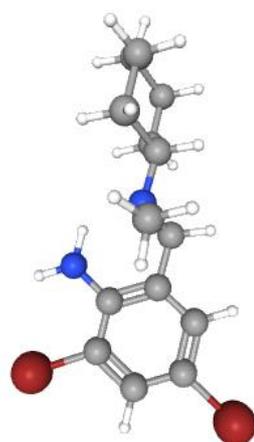
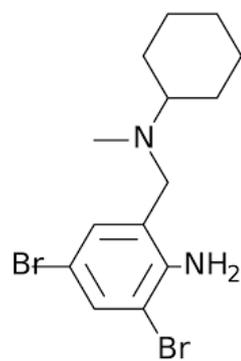


Fig. 2.3. Estructura molecular bromhexina

## **CAPÍTULO 3**

### **3.1 Enfoque de la investigación**

#### **3.1.1 Tipo de investigación**

Se planteó una investigación de base experimental empleando un proceso lógico, metódico y secuencial que permitió desarrollar la validación bajo los siguientes parámetros: (especificidad, efecto matriz, rango de trabajo, exactitud, repetibilidad, robustez); de manera complementaria, es también una investigación documental ya que se ha requerido una revisión bibliográfica en distintas fuentes mediante las cuales se recopiló información, se analizó y permitió generar las bases para el desarrollo de la metodología.

#### **3.1.2 Diseño de investigación**

La clasificación del diseño experimental se basó en los objetivos del experimento, de la siguiente manera:

Diseño para estudiar las características fisicoquímicas, de cada uno de los principios activos.

Diseño para comparar metodologías existentes.

Diseño para estudiar el efecto de los factores sobre la(s) respuesta(s).

Diseño para determinar el tratamiento de la muestra.

Diseño para determinar los parámetros óptimos para operación del equipo.

Diseño para establecer la metodología sin interferencias.

Diseño para determinar los requisitos de desempeño para validar el método.

Diseño estadístico para evaluación de los parámetros de validación.

El diseño experimental y los requisitos que debe tener el método, brinda las bases para determinar los factores que determinen el punto óptimo de la metodología y parámetros a validar.

### **3.2 Metodología**

#### **3.2.1 Diseño experimental**

El trabajo se realizó bajo el siguiente esquema.

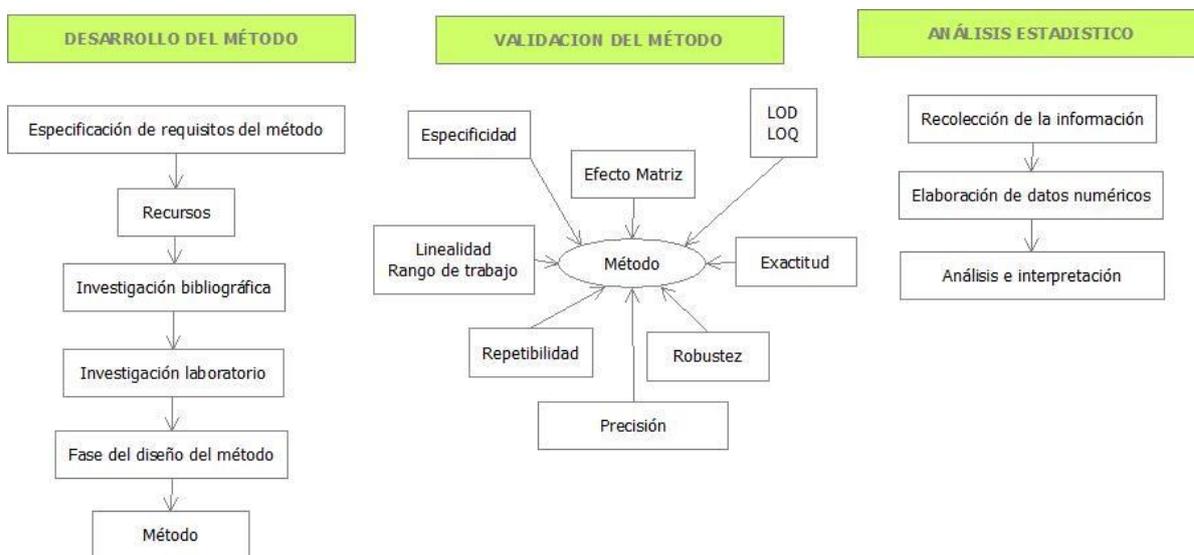


Fig. 2.4. Esquema general para desarrollo y validación del método

### 3.2.2 Recolección de datos

#### 3.2.2.1 Métodos y técnicas

Según el esquema anteriormente planteado se realizó el siguiente procedimiento.

##### 3.2.2.1.1 Desarrollo de la metodología

Se acudió a búsqueda bibliográfica de metodologías de productos similares que contengan los analitos de interés y se realizan pruebas en el cromatógrafo líquido en la búsqueda de una metodología en la que, impurezas, excipientes que están presentes en la muestra o solventes, fase móvil no produzcan interferencias; se quiere obtener un método que sea capaz de identificar y cuantificar acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina de una manera satisfactoria aún bajo estas condiciones.

##### 3.2.2.2 Validación del método analítico

La validación se realizó de acuerdo a los siguientes parámetros propuestos por la ICH: Especificidad, linealidad/rango de trabajo, exactitud, precisión (repetibilidad) y robustez.

**TABLA 3.1 Criterios de aceptación para validación**

| <b>Requisito de desempeño</b> | <b>Criterio de aceptación</b>   |
|-------------------------------|---|
| Especificidad                 | No hay interferencia cromatográfica con los analitos de estudio.<br>Resolución $\geq 1.5$   |
| Linealidad y rango de trabajo | Coefficiente de correlación $\geq 0.99$<br>Análisis residuales: aleatoriedad<br>$F_{cal} < F_{Crítico}$   |
| LOD                           | $LOD < 50\%LC$  |
| LOQ                           | $LOQ \leq 50\%$ valor medio   |
| Efecto matriz                 | Coefficiente de correlación $\geq 0.99$ placebo<br>Coefficiente de correlación $\geq 0.99$ estándar<br>$F_{cal} < F_{crítico}$<br>$t_{cal} < t_{crítico}$ |
| Exactitud                     | Porcentaje de recobro entre 90-110%   |
| Precisión (Repetibilidad)     | $RSD \leq 2\%$  |
| Robustez                      | Verificación del desempeño del método en 8 muestras y mínimo 5 variaciones<br>$(X - \bar{x}) < \sqrt{2}DS$  |

### 3.2.2.2.1. Especificidad

Se realizó el análisis de los tres principios activos utilizando MRC agregados al solvente y a la matriz, por triplicado por cinco días en la concentración objetivo (0.2mg/ml que es en la que se trabaja la muestra). También se realizó análisis de testigos de reactivos: fase móvil /solvente por triplicado por 3 días.

Criterio de aceptación:

Se comparan las lecturas (señales de medición) obtenidas tanto en solvente como en matriz y se evalúa que no haya interferencia de manera visual y mediante la resolución mayor o igual a 1 de la señal que brindan los tres analitos principales de interés en relación con los excipientes y demás interferentes.

### 3.2.2.2.2. Linealidad y rango de trabajo

La determinación del rango lineal se realizó bajo los siguientes requisitos: cada nivel por triplicado, en 5 niveles de concentración por 5 días, en el intervalo es de 50%, 75%, 100%, 125%, 150% correspondientes a 0.1mg/ml, 0.15mg/ml, 0.20 mg/ml, 0.25mg/ml y 0.3 mg/ml respectivamente, quedando de esta manera dos puntos por arriba y dos por debajo de la concentración objetivo (0.20 mg/ml).

#### **Método de análisis:**

Pesar exactamente 50 mg de Acetaminofén RS transferir a un matraz volumétrico de 5 ml, pesar exactamente 50 mg de Ácido acetilsalicílico RS y transferir a otro matraz volumétrico de 5 ml, pesar exactamente 50 mg de Bromhexina HCl RS y transferir a otro matraz volumétrico de 5 ml, disolver completamente con fase móvil y enrasar. Esta será la solución stock de estándar.

De cada solución stock tomar 100 µl y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil (0.10 mg/ml) de cada estándar.

De cada una de las soluciones stock tomar 150 µl y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil (0.15 mg/ml) de cada uno de los estándares.

De cada solución stock tomar 200 µl y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil (0.20 mg/ml) de cada estándar.

De cada solución stock tomar 250 µl y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil (0.25 mg/ml) de cada estándar.

De cada solución stock tomar 300 µl y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil (0.30 mg/ml) de cada estándar.

#### *Criterio de aceptación:*

El método de mínimos cuadrados, se utiliza para calcular la recta de regresión lineal, donde la concentración (eje de abscisas) y la respuesta en unidades de absorbancia (eje de ordenadas) se obtiene de la curva de calibración donde el coeficiente de correlación  $r^2$  debe ser mayor o igual a 0.99.

Además, se evalúan los puntos experimentales de la curva de regresión lineal medidas en la dirección paralela al eje de las ordenadas, con graficas de análisis

residual, que deberán estar aleatoriamente distribuidos indicando de esta manera un grado de linealidad. Si por el contrario los puntos siguen una tendencia determinada, al no estar regularmente distribuidos a ambos lados de la coordenada X, se pondrá en duda la linealidad.

### **3.2.2.2.3. Efecto matriz**

Se realizó la evaluación de muestras en cinco niveles por 3 días de los tres analitos con MRC fortificadas en placebo y solvente al 50%, 75%, 100%, 125%, 150% correspondientes a 0.1mg/ml, 0.15mg/ml, 0.20 mg/ml, 0.25mg/ml y 0.3 mg/ml respectivamente.

#### *Criterio de aceptación:*

El coeficiente de correlación  $r^2 \geq 0.99$  en las curvas tanto del estándar como del placebo fortificado.

Al comparar la curva de calibración estándar en solvente orgánico, con la curva de adición en placebo; las pendientes de ambas curvas deben ser similares, se utiliza la herramienta estadística de análisis de varianza, la cual, nos permite hacer esta comparación bajo la premisa de hipótesis nula que indica que no hay diferencias significativas entre las dos si,  $F_{cal} < F_{crítico}$ .

Mediante la prueba t de student con un porcentaje de confiabilidad del 95% de confianza, es decir, un valor  $\alpha$  de 0.05, se puede determinar si no existe diferencias estadísticamente significativas entre el analito agregado al solvente y el analito agregado a la matriz. Si el t calculado es inferior al t crítico, entonces, no existirá diferencias significativas entre las dos curvas.

### **3.2.2.2.4 Límite de detección LOD**

El límite de detección se determinó analizando la matriz por triplicado fortificados con MRC en 5 puntos de concentración, el cálculo se realizó teniendo en cuenta el valor promedio de la señal.

$$LOD = \frac{3.3 DS}{S}$$

Donde: DS = Desviación estándar de la respuesta

S = Pendiente de calibración de la curva

*Criterio de aceptación:* LOD <50% LOQ

#### **3.2.2.2.5 Límite de cuantificación LOQ**

El límite de detección se determinó analizando la matriz por triplicado fortificados con MRC en 5 puntos de concentración, el cálculo se realizó teniendo en cuenta el valor promedio de la señal.

$$LOQ = \frac{10 DS}{S}$$

Donde: DS = Desviación estándar de la respuesta

S = Pendiente de calibración de la curva

*Criterio de aceptación:* LOQ ≤ 50% Valor medio

#### **3.2.2.2.6 Exactitud**

Se evaluó en tres niveles de concentración cubriendo el intervalo: 50% (5mg/ml), 100% (10 mg/ml) y 150% (15 mg/ml) por triplicado, es decir 9 determinaciones, utilizando MRC en la matriz. Se calcula el porcentaje de recobro.

*Criterio de aceptación:*

El porcentaje de recuperación debe estar entre 90 y 110%

RSD ≤2

#### **3.2.2.2.7 Precisión**

Se prepararon 9 soluciones de trabajo diarias en tres concentraciones por arriba, de la concentración en la que normalmente se reporta la muestra esto es 1.5%; en la concentración en la que normalmente se cuantifica la muestra 1% y por abajo de la concentración en la que normalmente se reporta la muestra 0.5%, por triplicado durante cinco días de análisis.

- ❖ Repetibilidad: Bajo las condiciones para cada día: mismo laboratorio, mismo analista, mismo día. Se calcula el promedio de los resultados en porcentaje de lo declarado.

*Criterio de aceptación*

Repetibilidad, precisión intermedia.

- RSD ≤2

### 3.2.2.2.8 Robustez

Para proporcionar una indicación de fortaleza del procedimiento en el uso normal del método se aplica el Test de Youden y Steiner en la cual se evalúa cinco variables con ocho análisis de muestra. Para proceder a realizar el estudio de robustez se identifican aquellos factores del método que posiblemente afectarían los resultados finales.

**TABLA 3.2 Parámetros de prueba para análisis de robustez de Younden y Steiner**

| N.º | Variación                        | Valor inferior -     | Valor superior +     |
|-----|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| 1   | Volumen de inyección             | 5 µl                 | 15 µl                |
| 2   | Variación de la longitud de onda | 220 nm               | 240 nm               |
| 3   | pH de FM                         | 2                    | 4                    |
| 4   | Solvente orgánico en FM          | 35% ACN - 65% buffer | 45% ACN - 55% buffer |
| 5   | Variación solvente muestra       | 35% ACN - 65% buffer | 45% ACN - 55% buffer |

A partir de los resultados se calcula el efecto de cada variable haciendo la media de las cuatro. A partir de los resultados, se calcula el efecto de cada variable haciendo la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor más alto (mayúscula) y aquellas que corresponden al valor más bajo (minúscula).

**TABLA 3.3 Esquema Younden y Steiner para robustez**

| Valor de la condición variable | ANÁLISIS |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|
|                                | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A, a                           | A        | A | A | A | a | a | a | a |
| B, b                           | B        | B | b | b | B | B | b | b |
| C, c                           | C        | c | C | c | C | c | C | c |
| D, d                           | D        | D | d | d | d | d | D | D |
| E, e                           | E        | e | E | e | e | E | e | E |
| RESULTADOS                     | s        | t | u | v | w | x | y | z |

Nota: Tabla de Robustez Youden y Steiner [22]

$$A = \frac{s+t+u+v}{4} = \frac{4A}{4}$$

$$a = \frac{w+x+y+z}{4} = \frac{4a}{4}$$

Al hacer las siete comparaciones posibles, es decir las diferencias entre la variable de mayor valor versus la de menor valor:

(A – a), (B – b), (C – c), (D – d), (E – e), (F – f) y (G – g)

De este modo se puede conocer el efecto de cada variable. En este sentido, cuanto mayor sea la diferencia de los resultados entre el valor mayor y el valor menor ( $\Delta = X-x$ ), mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico.

**TABLA 3.4 Esquema de prueba para ensayo de robustez del método**

| Variable                | Valor inferior | Valor superior | ANÁLISIS |          |          |          |          |          |          |          |
|-------------------------|----------------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                         |                |                | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        | 7        | 8        |
| Volumen de inyección    | 5              | 15             | A        | A        | A        | A        | a        | a        | a        | a        |
| Longitud de onda        | 220            | 240            | B        | B        | b        | b        | B        | B        | b        | b        |
| pH solución TEA         | 2              | 4              | C        | c        | C        | c        | C        | c        | C        | c        |
| ACN en fase móvil       | 35             | 45             | D        | D        | d        | d        | d        | d        | D        | D        |
| ACN en solvente muestra | 35             | 45             | E        | e        | E        | e        | e        | E        | e        | E        |
| <b>RESULTADOS</b>       |                |                | <b>s</b> | <b>t</b> | <b>u</b> | <b>v</b> | <b>w</b> | <b>x</b> | <b>y</b> | <b>z</b> |

### Criterio de aceptación

Se considera que la diferencia entre el valor alto y el valor bajo sea superior a  $\sqrt{2}$  de la desviación estándar de la precisión del método (S), es decir:

$$(X - x) < \sqrt{2}DS$$

### 3.2.2.3 Recursos

#### 3.2.2.3.1 Equipos, materiales y reactivos

##### Equipos

- HPLC Waters Alliance con detector UV-VIS
- Balanza analítica OHAUS Adventurer AR3130.
- Potenciómetro Mettler Toledo Seven Easy

### **Material de referencia certificado**

- Estándar acetaminofén Supelco Lote: LRAC6466
- Estándar ácido acetilsalicílico Supelco Lote: LRAC6517
- Estándar bromhexina Supelco Lote: LRAD0575

### **Consumibles**

- Columna Nova Pak C18 4 $\mu$ m (3.9mm x 300mm)
- Filtros de jeringa de PVDF 25 mm x 0.45 $\mu$ m
- Filtros de membrana PVDF 47 mm x 0.48 $\mu$ m
- Material de Vidrio de uso común en el laboratorio
- Bomba al vacío Millipore
- Equipo de filtración
- Viales de 1.5 ml con tapa rosca
- Micropipeta mono canal Nichiryo 100- 1000  $\mu$ l
- Puntas para micropipeta 100- 1000  $\mu$ l
- Matraces de vidrio de 10ml, 25ml, 50ml
- Pipeta aforada de 1 ml.
- Ultrasonido digital Ultrasonic.

### **Reactivos**

- Ácido orto fosfórico 85% Fisher Chemical
- Trietilamina extra puro AR 99.5% SRL
- Acetonitrilo HPLC JT Baker
- Agua ultra pura.

#### **3.2.2.3.2. Sistema cromatográfico y condiciones de equipo**

Se utilizó cromatografía en fase inversa (o reversa), en donde la fase estacionaria que se empleo es no polar, basada en sílice, el embalaje es C18 octadecylsilano (ODS), la fase móvil es una mezcla de buffer trietilamina 0.05M ajustada a pH 3 con ácido fosfórico en proporción de 60%, y acetonitrilo HPLC en proporción del 40%. El detector espectrofotométrico es de diodos, la detección se estableció en 230 nm para los tres principios activos.

Las dimensiones de la columna son 3.9 mm (diámetro interno) x 300 mm y la sílice (tamaño de partícula de 4 µm).

El flujo de la fase móvil se establece en 1,0 ml/min, y el tiempo de corrida es de 10 minutos, el tiempo de retención para cada analito fue de 2.2 para acetaminofén, 3.0 para ácido acetilsalicílico y 8 para bromhexina.

#### **3.2.2.4. Preparación de fase móvil, muestras, estándares y cálculos**

##### **Solución de trietilamina**

Colocar 2.08 ml de trietilamina en un balón aforado de 1000 ml y enrasar, homogenizar y mezclar bien la solución, ajustar a pH 3 con ácido fosfórico.

##### **Preparación de la fase móvil**

De la solución de trietilamina; medir 600 ml y mezclar con 400 ml de acetonitrilo. Filtrar, desgasificar la solución y llevar al equipo. Esta misma solución será el solvente para las muestras.

##### **Preparación del estándar.**

Pesar exactamente 10 mg de cada uno de los estándares Acetaminofén, Ácido acetilsalicílico, Bromhexina HCl MRC en matraces separados de 10 ml, diluir con fase móvil. Transferir una alícuota de 5 ml de cada uno de los estándares a un matraz volumétrico de 25 ml, diluir con solución de fase móvil, disolver completamente y enrasar.

Concentración de acetaminofén en estándar: 0.20 mg/ml

Concentración de ácido acetilsalicílico en estándar: 0.20 mg/ml

Concentración de bromhexina HCl en estándar: 0.20 mg/ml

##### **Preparación de las muestras**

Con una pipeta volumétrica, tomar 1ml de muestra y llevar a 50 ml con fase móvil, filtrar con filtro jeringa a un vial. 6

Concentración en la muestra de acetaminofén: 0.20 mg/ml

Concentración en la muestra de ácido acetil salicílico:0.20 mg/ml

Concentración en la muestra de bromhexina: 0.20 mg/ml

\* Para fines de la validación, la concentración de 0.2 mg/ml será considerada la concentración objetivo ya que es la cantidad que contienen los analitos en 1 ml de muestra y disuelta en 50 ml.

### **Preparación de la curva de calibración**

Pesar exactamente 50 mg de Acetaminofén MRC transferir a un matraz volumétrico de 5 ml, pesar exactamente 50 mg de Ácido acetilsalicílico MRC y transferir a otro matraz volumétrico de 25 ml, pesar exactamente 50 mg de Bromhexina HCl MRC y transferir a otro matraz volumétrico de 5 ml, disolver completamente con fase móvil y enrasar. Esta será la solución stock de cada estándar.

Concentración de la solución stock: (10mg/ml)

- De cada una de las soluciones stock tomar 100  $\mu$ l y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil.  
Concentración estándar N1: (0.10 mg/ml) de cada uno de los estándares.
- De cada una de las soluciones stock tomar 150  $\mu$ l y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil.  
Concentración estándar N2 (0.15 mg/ml) de cada uno de los estándares.
- De cada una de las soluciones stock tomar 200  $\mu$ l y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil.  
Concentración estándar N3 (0.20 mg/ml) de cada uno de los estándares.
- De cada una de las soluciones stock tomar 250  $\mu$ l y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil.  
Concentración estándar N4 (0.25 mg/ml) de cada uno de los estándares.
- De cada una de las soluciones stock tomar 300  $\mu$ l y colocar en un mismo matraz volumétrico de 10 ml y enrasar con fase móvil.  
Concentración estándar N5 (0.3 mg/ml) de cada uno de los estándares.

### **Cálculos**

Los resultados del análisis pueden ser obtenidos de dos maneras, ya sea por el cálculo directo del equipo o por cálculos manuales.

Para los cálculos manuales se requiere las áreas que nos da el cromatógrafo líquido. Para los dos casos los resultados se expresan en porcentaje de acetaminofén,

porcentaje de ácido acetilsalicílico y porcentaje de Bromhexina.

Fórmula para cálculo en %:

$$\% = \frac{\text{AM} \times \text{PSt} \times \text{AlSt} \times \text{DM} \times \text{Pur St} \times 100}{\text{ASt} \times \text{D1St} \times \text{D2St} \times \text{CM}}$$

Donde:

AM = Área de la muestra

ASt = Área del estándar

PSt = Peso del estándar

AlSt = Alícuota del estándar

D2St = Dilución 2 del estándar

D1St = Dilución 1 estándar

CM = Concentración de la muestra

DM = Dilución de la muestra

Pur St= Pureza del estándar

\* Solo para Bromhexina = Multiplicar por el factor de corrección de 0.9116 para transformación de Bromhexina HCl a Bromhexina.

### 3.2.3 Análisis estadístico

Para los fines de esta validación se utilizarán mediciones estadísticas para establecer si el método se encuentra dentro de los parámetros establecidos.

#### Media, media aritmética o promedio[22]

$$\bar{X} = \frac{\sum Xi}{n}$$

Donde:

Xi = Valor de una lectura

n = Número de lecturas

#### Desviación estándar (S): [22]

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{n-1} (Xi - \bar{X})^2}}{n - 1}$$

Donde:

Xi = Valor de una lectura

n = Número de lecturas

X = Promedio del total de las lecturas

**Coefficiente de variación (CV).** También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación puede ser expresado en porcentaje:[22]

$$\%CV = \frac{S}{X} \times 100$$

Donde:

S = Desviación estándar de las lecturas

X = Promedio del total de las lecturas

**Varianza:** [22]

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X)^2}{n-1}$$

Donde:

S = Desviación estándar de las lecturas

X = Promedio del total de las lecturas

X<sub>i</sub> = Valor de una lectura

n = Número de lecturas

**t experimental** [22]

$$t \text{ exp} = \left( \frac{100 - R}{CV \times \sqrt{n}} \right)$$

Donde:

CV = Coeficiente de variación

t = t experimental

R = Valor de recuperación para cada nivel

n = Número de lecturas

**t calculado** [22]

$$t \text{ cal} = \left( \frac{100 - \%R}{CV \times \sqrt{n}} \right)$$

Donde:

CV = Coeficiente de variación

t = t experimental

%R = Porcentaje de recuperación para cada nivel

n = Número de lecturas

**Pruebas de Significancia** [22]

Se utiliza prueba F- (de Fisher) para identificar errores aleatorios (precisiones). Mediante esta prueba se comprueba la veracidad de la hipótesis experimental

llamada “hipótesis alternativa  $H_1$ ” (sin hay diferencia) con respecto a la “hipótesis nula  $H_0$ ” no hay diferencia.

Esta prueba será utilizada para comprobar si la hipótesis nula puede o no ser rechazada.

Si el valor de F calculado  $< F$  tabla se admite  $H_0$ .

### **Análisis de varianza (ANOVA) [22]**

Para realizar el análisis e interpretación de los resultados, se emplearon herramientas estadísticas que son necesarias para interpretar y visualizar datos que deben ser relacionados, esto se llevó a cabo con el software Microsoft Excel.

Mediante este análisis estadístico se comparó más de dos medias entre sí, y se puede evaluar las diferencias entre y dentro de cada grupo. Se determinó el valor crítico de tabla para un  $\alpha=0.05$  y se basará en que si el F calculado  $> F$  crítico habrá diferencias significativas.

### **Recuperación [22]**

$$R = \left( \frac{C_e - C_o}{C_a} \right)$$

Donde:

R = Recuperación

$C_e$  = Concentración del analito de la muestra enriquecida

$C_o$  = Concentración del analito medida en la muestra sin adicionar

$C_a$  = Concentración del analito adicionado a la muestra enriquecida

### **Porcentaje de recuperación %R [22]**

$$\%R = [R] \times 100$$

## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS

#### 4.1 Desarrollo del método

Para poder cuantificar acetaminofén, ácido acetil salicílico se han encontrado en la bibliografía el estudio de métodos que incluyen estos dos principios activos, solos o asociados con otro tipo de moléculas y en distintos tipos de formas farmacéuticas a través de varias metodologías analíticas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [1], espectrofotometría UV/VIS, titulación, pero no se ha logrado encontrar una metodología que tenga los tres principios activos, acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina en solución oral por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El proceso que se adoptó para el desarrollo del método fue el siguiente:

##### 4.1.1 Parámetros cromatográficos para desarrollo de la metodología.

- Selección de la técnica:

Para desarrollar el método se decidió utilizar cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC, ya que es una técnica de separación con capacidad para analizar multicomponentes en tiempo real, y compatible con las características de la muestra problema. El equipo puede analizar, obtener separación y visualización de cromatogramas en minutos y con alta resolución; es ideal para desarrollar el método porque modifica gradientes, flujo, volumen de inyección, temperatura, solventes, para lograr separar la muestra.

##### 4.1.2 Desarrollo de la metodología

Inicialmente se abordó el problema estableciendo las condiciones iniciales de separación mediante búsqueda en la literatura de métodos de separación por HPLC de muestras similares que contienen los tres principios activos que se desean identificar y cuantificar.

Se inició el desarrollo del método con la técnica de la USP [1] para análisis de acetaminofén y ácido acetilsalicílico en tabletas, bajo los siguientes parámetros:

La solución A: Cloroformo, metanol y ácido acético glacial (78:20:2)

Fase móvil: Transferir 225 mg de hidróxido de tetrametilamonio pentahidratado a un matraz de 1000 ml en agua, 125 ml de metanol, 125 ml de acetonitrilo y 1 ml de ácido acético glacial.

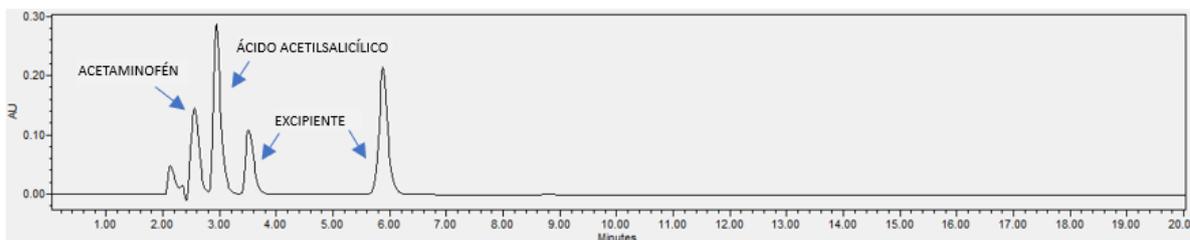
Estándar interno: 20 mg/ml de ácido benzoico en solución A.

Solución estándar: 3.25 mg/ml de ER acetaminofén USP y de ER Aspirina USP, y 2 mg/ml de ácido benzoico, a partir de solución de estándar interno, en solución A.

Solución muestra: Nominalmente 3.25 mg/ml de acetaminofén en solución A, transferir 325 mg de acetaminofén de la solución en un matraz de 100 ml, agregar 10 ml de solución estándar interno, diluir a volumen con solución A.

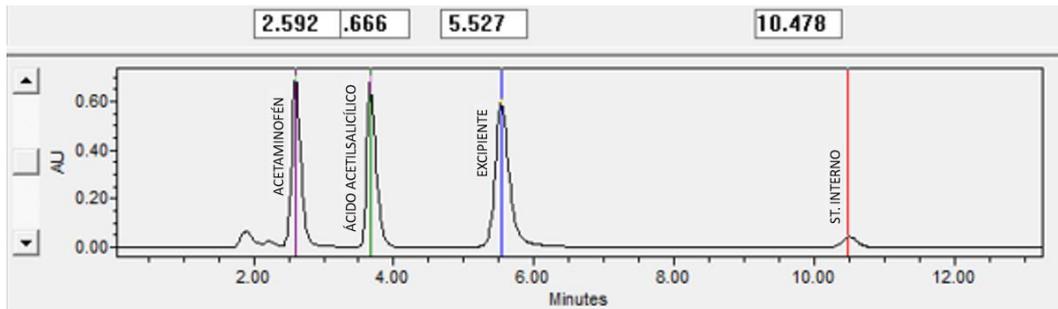
Sistema cromatográfico: Detector: UV 280 nm. Columna 3.9 mm x 30 cm; relleno L1. Velocidad de flujo 2 ml/min. Volumen de inyección: 5 µL [1]

La primera variante que se realizó al primer método ensayado fue la eliminación de cloroformo del solvente ya que este formó una emulsión con la muestra problema. Se procedió a inyectar la muestra y los estándares para conocer todas las señales que emite la muestra y mediante la inyección de los estándares de los tres analitos de interés en una misma muestra, se identificó a cada uno de los analitos de interés mediante la inyección de MRC individual de cada analito y es así como se pudo identificar cuáles son las señales propias de la matriz. Con la identificación de los tiempos de retención de los analitos y que no hubo superposición de picos, se juzgó que no se necesitaba hacer un procedimiento previo a la muestra; pero, se realizó un cambio en el solvente: 91% metanol y 9% ácido acético debido a que no se puede utilizar cloroformo. Mediante esta técnica se identificaron picos separados de los excipientes, se obtuvo los tiempos de retención que indica la técnica para acetaminofén 2 minutos y ácido acetil salicílico 3 minutos, pero no se obtuvo respuesta analítica para bromhexina hasta los 20 minutos, como se puede observar en la figura 4.1



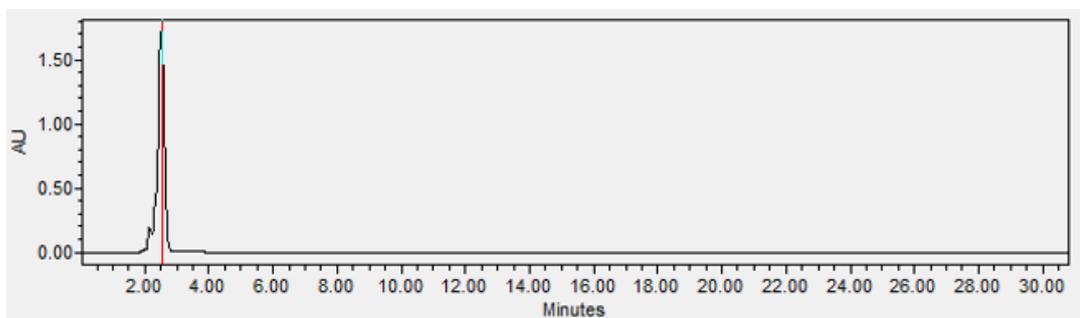
**Fig. 4.1 Cromatograma de la muestra con la técnica acetaminofén, aspirina tabletas USP.**

Se realizó un cambio en solvente de las muestras: Metanol 20%, Agua purificada 78% y ácido acético 2% como se muestra en la figura 4.2. Mejoran los tiempos de retención de los dos primeros analitos, pero no hay una respuesta favorable para el tercer analito bromhexina.



**Fig. 4.2: Cromatograma de la muestra con la variante en el solvente para la técnica acetaminofén, aspirina tabletas USP.**

Se inyectó solución de estándar de bromhexina, sin respuesta hasta los 30 minutos como se observa en la figura 4.3



**Fig. 4.3 Estándar de bromhexina en fase móvil original**

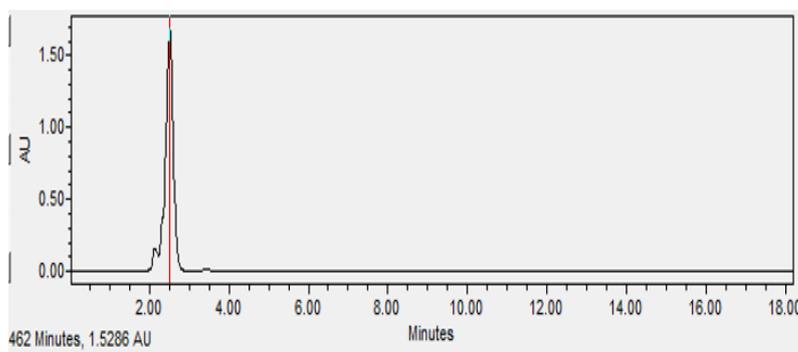
Con el objetivo de buscar respuesta analítica del método para la bromhexina, se utilizó la fase móvil en modo isocrático hasta el minuto 8 ya que hasta ese tiempo los dos componentes de interés, así como excipientes ya han eluido, y desde este tiempo, y como se conoce, que cuando aumenta la proporción de la fase orgánica, disminuyen los tiempos de retención de los analitos, por lo tanto un cambio ligero en el porcentaje de acetonitrilo o metanol tal vez nos permita acortar el tiempo de retención del pico cromatográfico de bromhexina, se trabajó entonces en modo

gradiente como se indica en la tabla 4.1 bajo las mismas condiciones anteriores salvo la variación de la concentración de la fase móvil desde el minuto 8.

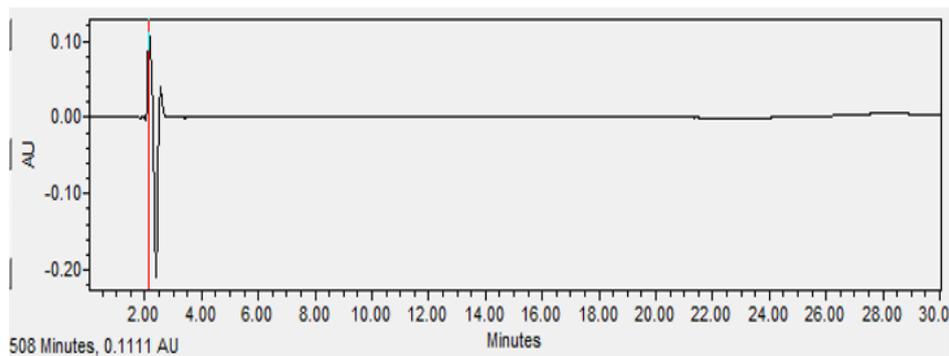
**TABLA 4.1 Ensayo 1 de variantes en gradiente al método 1**

| Prueba |           | Fase móvil | Acetonitrilo 50%<br>Metanol 50% | Acetonitrilo | Metanol | Respuesta<br>Bromhexina<br>30 minutos |
|--------|-----------|------------|---------------------------------|--------------|---------|---------------------------------------|
| 1      | Gradiente | 90         | 10                              | -            | -       | No                                    |
| 2      | Gradiente | 70         | 30                              | -            | -       | No                                    |
| 3      | Gradiente | 50         | 50                              | -            | -       | No                                    |
| 4      | Gradiente | 30         | 70                              | -            | -       | No                                    |
| 5      | Gradiente | 90         | -                               | 10           | -       | No                                    |
| 6      | Gradiente | 70         | -                               | 30           | -       | No                                    |
| 7      | Gradiente | 50         | -                               | 50           | -       | No                                    |
| 8      | Gradiente | 90         | -                               | -            | 10      | No                                    |
| 9      | Gradiente | 70         | -                               | -            | 30      | No                                    |
| 10     | Gradiente | 50         | -                               | -            | 50      | No                                    |

Se puede apreciar los cambios en la fase móvil 50% con 50% de acetonitrilo y fase móvil 50% con 50% de metanol que se establecen en la tabla 4.1 y que corresponden a las figuras 4.4 y 4.5 respectivamente.



**Fig. 4.4 Solución del estándar madre de bromhexina en fase móvil original 50% y 50% ACN**



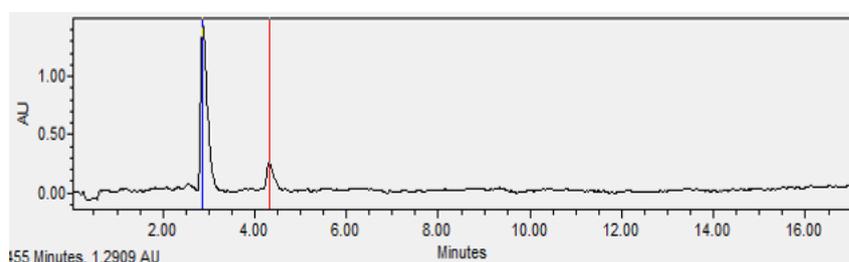
**Fig. 4.5 Solución del estándar madre de bromhexina en fase móvil original 50% y 50% metanol**

A pesar de los cambios que se hicieron ninguno tuvo respuesta cromatográfica para bromhexina.

Se decidió probar otra metodología debido a que tiempos superiores a 30 minutos (en caso de eluir Bromhexina posterior a este tiempo) no es viable con los objetivos por el tiempo de corrida extenso.

Adicionalmente se decidió disminuir la concentración de la muestra, ya que los cromatogramas en las últimas inyecciones empezaron a presentar ruido en la línea base y asimetría en los picos debido a la naturaleza y viscosidad de los excipientes que saturaron la columna, por lo que se hizo un proceso de limpieza en la misma.

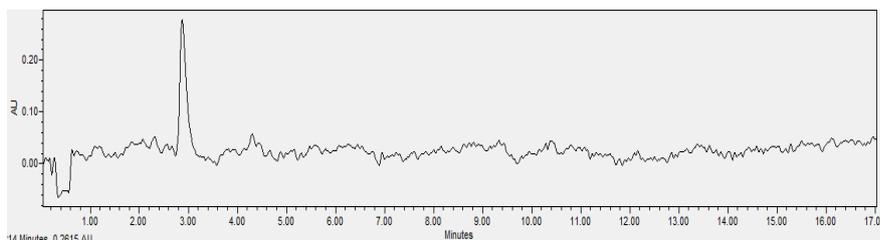
Se ensayó una segunda metodología, esta vez, específica para bromhexina, se encontró una técnica para bromhexina tabletas [8] en la cual se utiliza como solvente y fase móvil buffer fosfato y la fase orgánica metanol y acetonitrilo (18:41:41), con lecturas a 254 nm, para esta metodología se indica columna C8 zorbax, pero se utilizó columna C18, 3.9 mm x 30 cm; relleno L1. Velocidad de flujo 1 ml/min. Al disolver la muestra en la fase móvil forma una solución blanca, se baja el pH de la fase móvil a 3 para evitar enturbiamiento, siendo este mínimo que se elimina mediante filtración con filtro de jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$ , pero no existe una buena respuesta del cromatograma, como se observa en la figura 4.6



**Fig. 4.6 Muestra en fase móvil buffer fosfatos, metanol, acetonitrilo**

Se probó una tercera metodología para bromhexina, clorfenamina y dextrometorfano [9] usando una fase móvil que consiste en metanol, acetonitrilo buffer fosfato 0.025 M (50:25:25) ajustado a pH 5.5 con ácido fosfórico, usando una columna C18 (25cm x 4.6 mm i.d x 5 $\mu\text{m}$ ) con detección a 265 nm. Solvente metanol. Se sigue la técnica

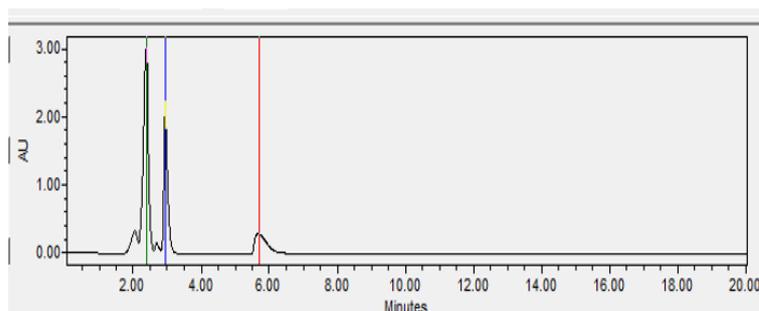
con la única variante, la columna, se utilizó C18, 3.9 mm x 30 cm. No hubo respuesta cromatográfica y con línea base inestable. Se decidió no hacer más pruebas con buffer fosfatos, dado el inconveniente de interacción de la muestra en presencia de fosfatos.



**Fig. 4.7 Muestra en fase móvil buffer fosfatos, metanol, acetonitrilo ajustado pH 5.5**

Se realizó la revisión bibliográfica para determinación de una cuarta metodología, bromhexina clorhidrato y metil y propil hidroxibenzoato [7] en donde se utilizó una fase móvil de trietilamina 0.015M y acetonitrilo (57:43) utilizando una columna C18 ajustados a pH 3.9 y detección de los analitos a 245 nm.

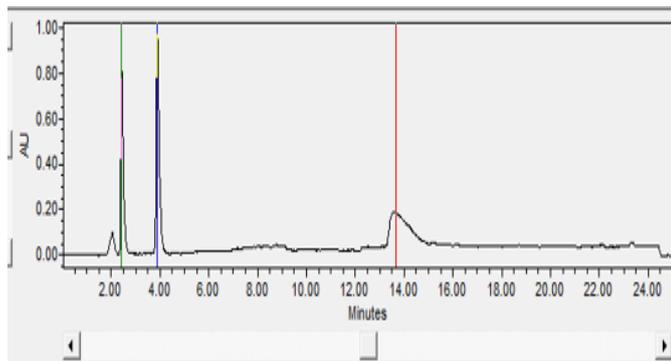
Se preparó muestras con la primera dilución en metanol debido a la fácil solubilidad de los analitos en este solvente, y la segunda dilución en fase móvil, se obtiene un cromatograma con interferencia en el primer pico que corresponde al acetaminofén. Como se observa en la figura 4.8



**Fig. 4.8 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.015M y acetonitrilo (57:43)**

Se empezó a evaluar el origen de la interferencia al inicio del cromatograma; se disminuyó a la mitad la concentración de TEA 0.007M con la finalidad de evaluar si la solución de TEA es la interferencia en el primer pico, se vio inestabilidad en la línea base, no cumple el parámetro de asimetría en el tercer pico (2.5) y la

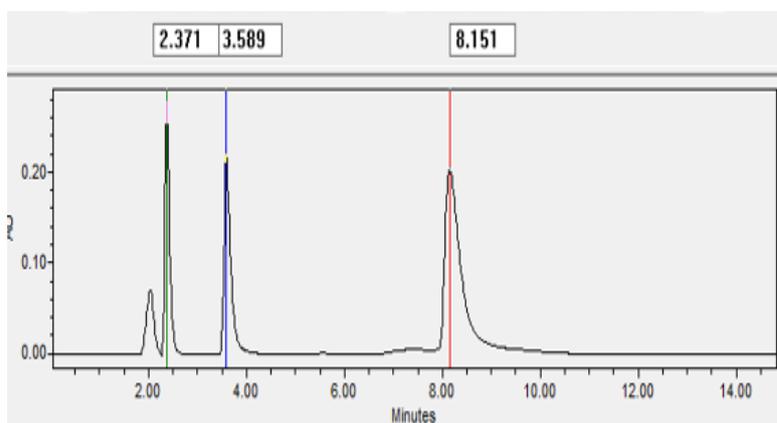
interferencia en el pico inicial continua como se observa en la figura 4.9



**Fig. 4.9** Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.007M y acetonitrilo (57:43)

Se prepararon la solución de TEA y acetonitrilo en recipientes por separado con la finalidad de realizar las mezclas con ayuda del equipo y poder encontrar el punto de equilibrio en la que la fase móvil no interfiere en la resolución del primer pico, se evaluó trietilamina: acetonitrilo (70:30) y evaluó trietilamina: acetonitrilo (60:40) sin la presencia de picos.

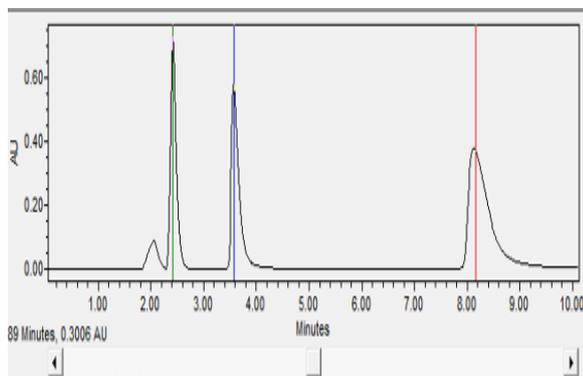
Se regresó la preparación de la fase móvil en las condiciones originales TEA a concentración de 0.015M pH 3.9 en proporción de 65 y disminuyendo la fase orgánica, esto con el fin de lograr la separación del frente del solvente de la primera señal del cromatograma, como se aprecia en la figura 4.10



**Fig. 4.10** Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina 0.015M y acetonitrilo (65:35)

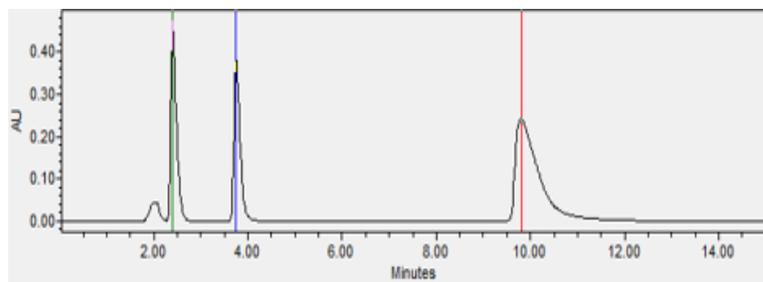
Se disminuyó el pH a 3 bajo las condiciones anteriores y se mejora la separación, y

la línea base, teniendo entonces el parámetro pH3 el primer valor fijo en el método, como se observa en la figura 4.11



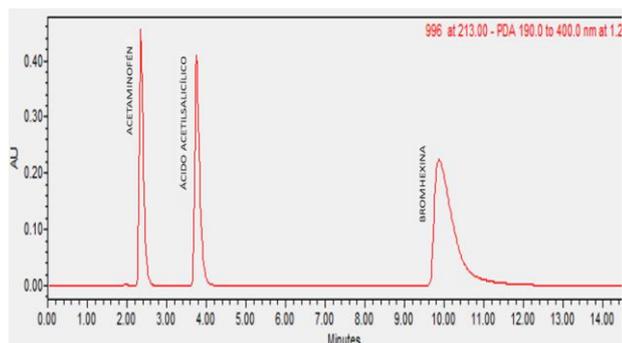
**Fig. 4.11 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH 3 0.015M y acetonitrilo (65:35)**

Bajo los parámetros de fase móvil TEA 0.015M pH 3 y acetonitrilo (60:40) y utilizando como solvente todo metanol para la preparación de la muestra, se tuvo un cromatograma similar al anterior y aumento de los tiempos de retención. Se evidenció así que el último parámetro a evaluar, metanol, es responsable de la primera señal en el cromatograma. Figura 4.12



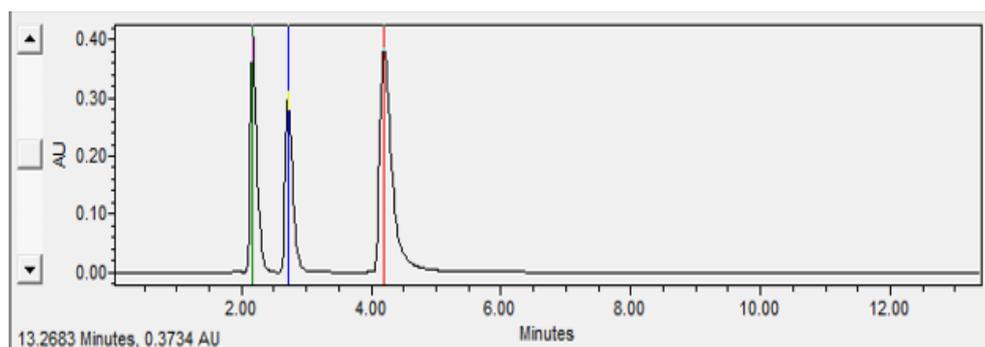
**Fig. 4.12 Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH3 0.015M y acetonitrilo (60:40)**

Se realizó una prueba con fase móvil TEA 0.015M pH 3 y acetonitrilo (60:40) y utilizando como solvente siempre fase móvil en la preparación de la muestra, se elimina así la primera interferencia en el cromatograma y se puede visualizar los 3 picos de los analitos de interés que se colocaron en el estándar sin otra interferencia. Se procede entonces a realizar inyecciones nuevamente de cada uno de los estándares para poder confirmar sus tiempos de retención como se observa en la figura 4.13

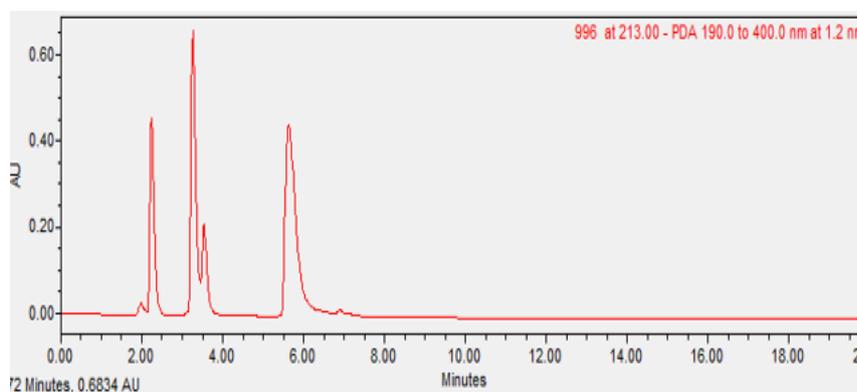


**Fig. 4.13** Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico en fase móvil de trietilamina pH3 0.015M y acetonitrilo (60:40)

Se quiso mejorar aún más el tiempo de corrida, mediante el incremento de la fase orgánica al 50%, probando bajo los parámetros anteriores, pero con fase móvil, buffer 50% y ACN 50%, mejoran los tiempos de retención y anchos de pico en el estándar, figura 4.14 pero se produce sobreposición de picos en la muestra cómo se observa en la figura 4.15

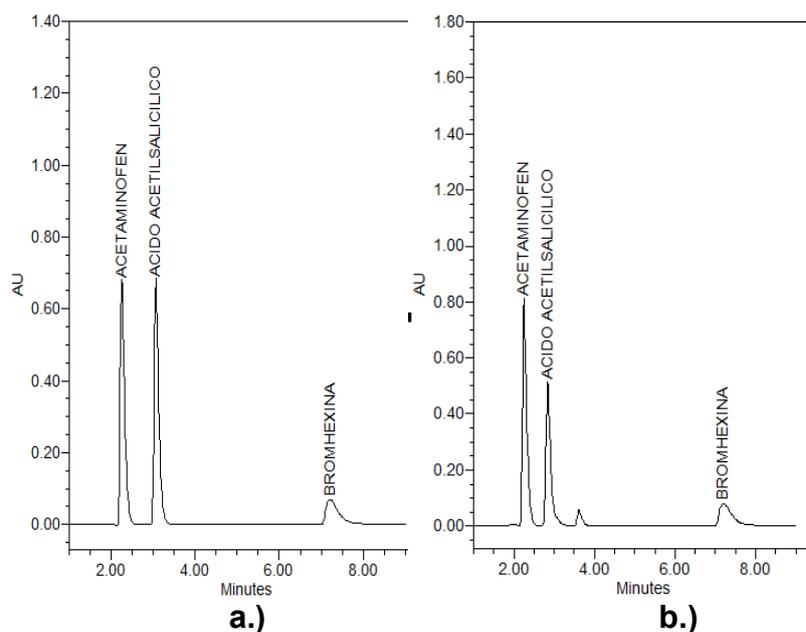


**Fig. 4.14** Cromatograma del estándar de acetaminofén, aspirina y ácido acetilsalicílico, fase móvil: buffer trietilamina pH3 0.05 M y acetonitrilo (50:50)

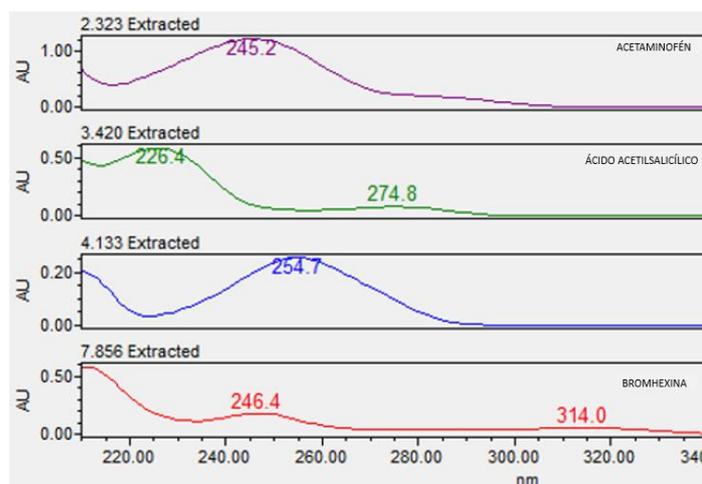


**Fig. 4.15** Cromatograma de la muestra, fase móvil: buffer trietilamina pH3 0.05 M y acetonitrilo (50:50)

Finalmente se modificó la fase móvil en la proporción de TEA 0.05M pH3, acetonitrilo (60:40), longitud de onda 230 nm en la cual se puede cuantificar correctamente los 3 analitos de interés, solvente el mismo de la fase móvil. Se estableció la longitud de onda a 230 nm, pese a que a valores superiores tiene mayor sensibilidad el acetaminofén y bromhexina y a valor inferior aspirina; 230 nm fue escogida para minimizar la interferencia de un excipiente del pico junto al ácido acetilsalicílico.



**Fig. 4.16 Cromatograma de a.) estándar b.) muestra en fase móvil de trietilamina pH3 0.007M y acetonitrilo (60:40)**



**Fig. 4.17 Cromatograma UV/VIS de muestra**

Podremos resumir, que, mediante el empleo del sistema de ensayo y error, variando la fuerza de la fase móvil hasta alcanzar el rango de detección, selectividad

adecuada; gradiente, concentración, volumen de inyección, hasta obtener una buena resolución, asimetría y un tiempo de retención adecuado.

## 4.2 Pretratamiento de la muestra

La muestra requiere una dilución volumétrica previo al análisis, no requiere un pretratamiento, separación parcial, ser extraída, se encuentra en estado líquido, fluido y claro. Se filtró la muestra con filtro jeringa 0.45  $\mu\text{m}$  antes del ingreso al vial.

## 4.3 Validación del método

Para la validación del método se tomó como referencia la guía de validación ICH (Q2 R2), la metodología a seguir se especifica en el capítulo 3, donde se señalan también los criterios de aceptación.

### 4.3.1 Especificidad

Se evidencio mediante el cromatograma tanto de la muestra como del estándar, que no hay interferencia entre los 3 analitos de interés ni con impurezas, solventes, o excipientes como se aprecia en la figura 4.19 y figura 4.20

Con ayuda del detector de diodos nos permitió ver en tercera dimensión la detección espectrofotométrica, y se realizó el cálculo de pureza de pico mediante el cual se atribuye la señal únicamente a cada componente, como se aprecia en la tabla 4.2.

El análisis de placebo y cada uno de los estándares de los analitos de interés fue requerido para poderlos identificar.

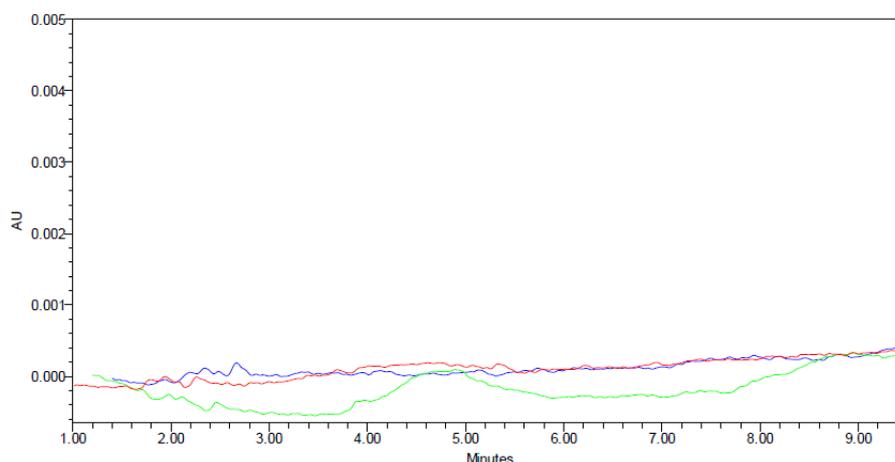
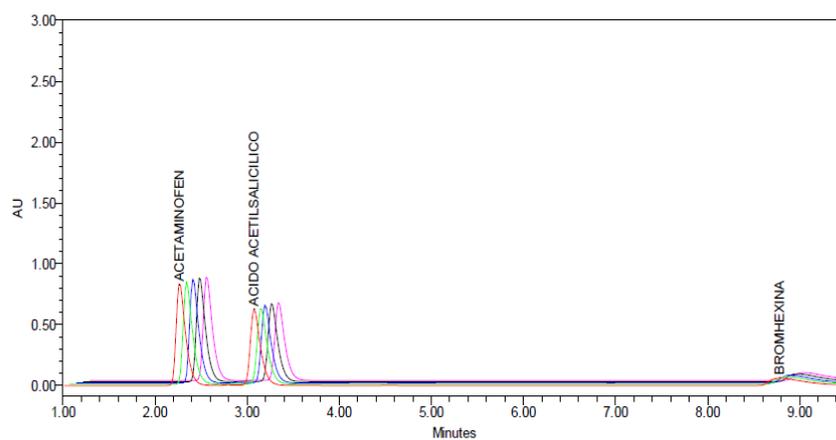
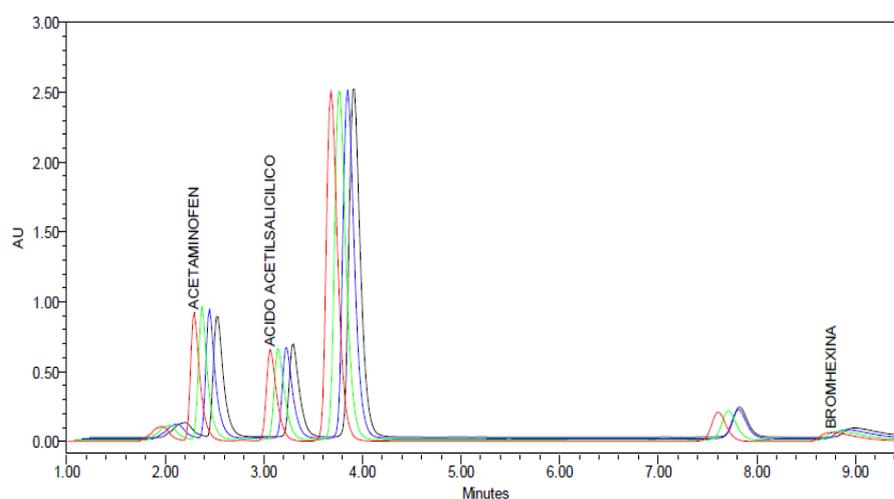


Fig. 4.18 Cromatograma del solvente/fase móvil.



**Fig. 4.19** Cromatograma sin presentar interferencias entre los tres principios activos



**Fig. 4.20** Cromatograma sin presentar interferencias en la muestra

Se calcularon parámetros cromatográficos que nos indican la adaptabilidad del sistema cromatográfico y nos permiten comprobar que el método y el sistema funciona apropiadamente y es adecuado para realizar esta determinación simultánea de los tres analitos. Los parámetros que fueron considerados para evaluar la adaptabilidad del sistema se resumen en la tabla 4.2

**TABLA 4.2** Datos de evaluación de la adaptabilidad del sistema

| PARÁMETROS | CRITERIOS DE ACEPTACIÓN | ACETAMINOFÉN |            | ACIDO ACETILSALICÍLICO |            | BROMHEXINA |            |
|------------|-------------------------|--------------|------------|------------------------|------------|------------|------------|
|            |                         | MUESTRA      | ESTANDAR   | MUESTRA                | ESTANDAR   | MUESTRA    | ESTANDAR   |
| ÁREA       | N/A                     | 5863008.36   | 5984742.67 | 4149193.12             | 4642647.27 | 1303230.12 | 1357353.92 |
| ALTURA     | N/A                     | 906751       | 844157     | 625576                 | 622268     | 60556      | 59056      |

|                       |                    |            |           |             |            |            |            |
|-----------------------|--------------------|------------|-----------|-------------|------------|------------|------------|
| PLATOS TEORICOS       | >2000              | 2.84 E+003 | 2.31E+003 | 4.463 E+003 | 3.767E+003 | 3.324E+003 | 3.139E+003 |
| TAILING               | ≤ 1.8              | 1.433      | 1.539     | 1.349       | 1.434      | 1.738      | 1.772      |
| FACTOR DE CAPACIDAD K | ≤ 10               | 6.655      | 6.56      | 9.233       | 9.265      | 2.821      | 2.829      |
| PURITY ANGLE          | < Purity Threshold | 0.542      | 0.216     | 0.091       | 0.082      | 0.067      | 0.059      |
| PURITY THRESHOLD      | > Purity Angle     | 1.505      | 1.006     | 1.512       | 1.013      | 1.542      | 1.042      |
| RESOLUCIÓN            | > 1.5              | N/A        | N/A       | 4.175       | 3.939      | 1.423E+001 | 1.36E+001  |

### 4.3.2 Linealidad

La linealidad se estableció en el intervalo completo del procedimiento analítico, como se indica en la figura 4.3.

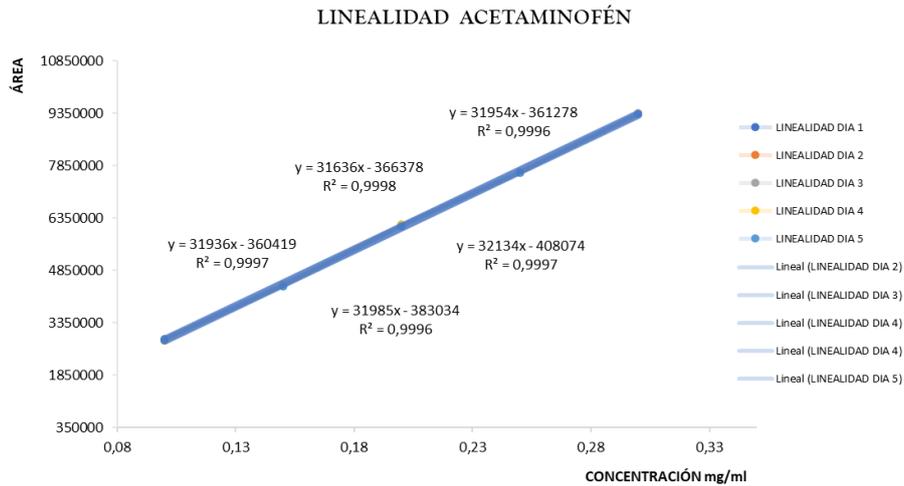
**TABLA 4.3 Concentración final teórica utilizada para linealidad del sistema**

| PORCENTAJE % | CONCENTRACIÓN mg/ml    |
|--------------|------------------------|
|              | Acetaminofén           |
|              | Ácido acetilsalicílico |
|              | Bromhexina             |
| 50           | 0.10                   |
| 75           | 0.15                   |
| 100          | 0.20                   |
| 125          | 0.25                   |
| 150          | 0.30                   |

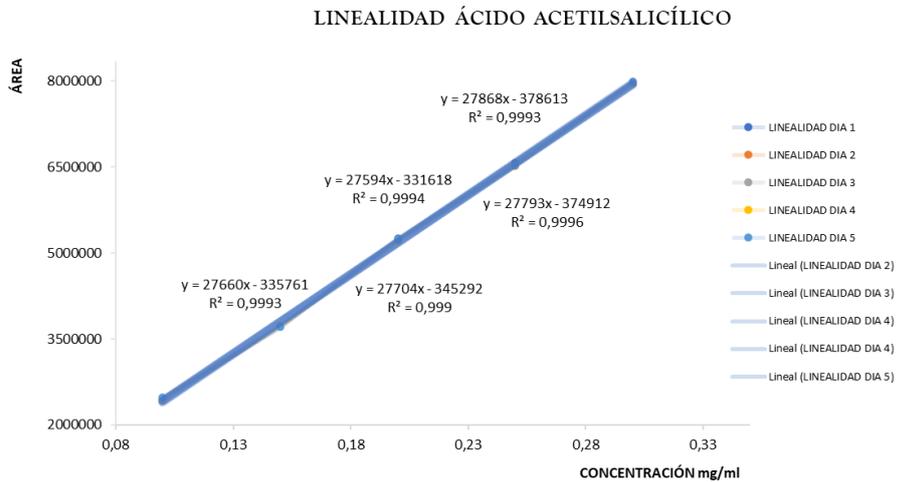
### Cálculo estadístico:

La curva de regresión se determinó sobre los puntos individuales por el método de los mínimos cuadrados, en el eje de las abscisas se coloca la concentración de los analitos y en el eje de las ordenadas la respuesta analítica que será el área. Los estimadores de regresión para un nivel de significación ( $\alpha=0.05$ ) fue el coeficiente de determinación, siendo para acetaminofén 0.9996, ácido acetilsalicílico 0.9990 y para bromhexina 0.9997; estos valores señalan el grado en el que la variable dependiente cambia de acuerdo a los cambios en la variable independiente siendo muy próximos a 1, como se puede observar en las figuras 4.21, 4.22 y 4.23; lo cual nos permite considerar que el método es lineal; se observa también una correlación lineal evaluada de manera visual y se confirma con el coeficiente de correlación lineal de Pearson, el cual para los tres principios activos fue mayor a 0.99, como se indica en las tablas 4.4; 4.5 y 4.6

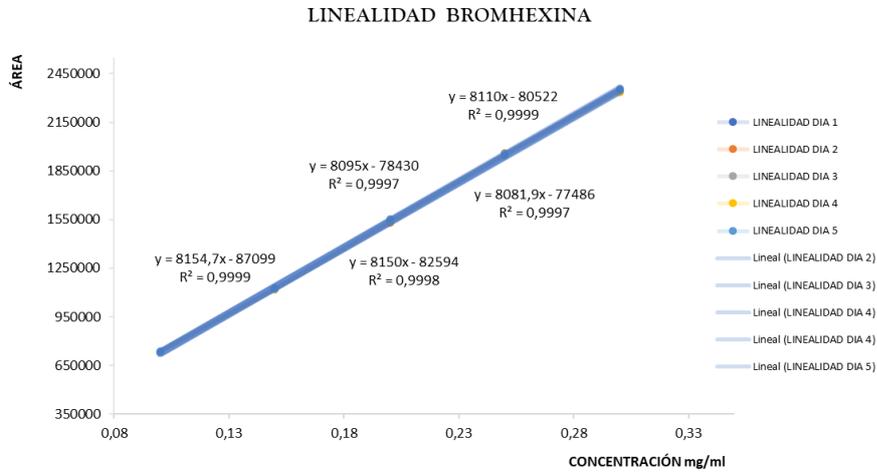
Al realizar la comparación de las rectas de regresión de los tres analitos la probabilidad fue superior a 0.05, por lo tanto, con un nivel de confianza del 95% se puede decir que las curvas de regresión son paralelas, comparten el mismo origen y tienen la misma pendiente.



**Fig. 4.21** Curvas de regresión lineal para acetaminofén



**Fig.4.22** Curvas de regresión lineal para ácido acetilsalicílico



**Fig. 4.23** Curvas de regresión lineal para bromhexina

**TABLA 4.4** Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración de acetaminofén

| ACETAMINOFÉN | Pendiente  | Ordenada al origen | Coefficiente de correlación lineal r | Coefficiente de determinación r <sup>2</sup> |
|--------------|------------|--------------------|--------------------------------------|--|
| Curva 1      | 31954.0779 | -361278.26         | 0.9997                               | 0.9996                                       |
| Curva 2      | 31635.8629 | -366378.31         | 0.9999                               | 0.9998                                       |
| Curva 3      | 31932.4170 | -360419.27         | 0.9998                               | 0.9997                                       |
| Curva 4      | 32134.2604 | -408073.628        | 0.9998                               | 0.9997                                       |
| Curva 5      | 31984.5280 | -383034.13         | 0.9997                               | 0.9996                                       |

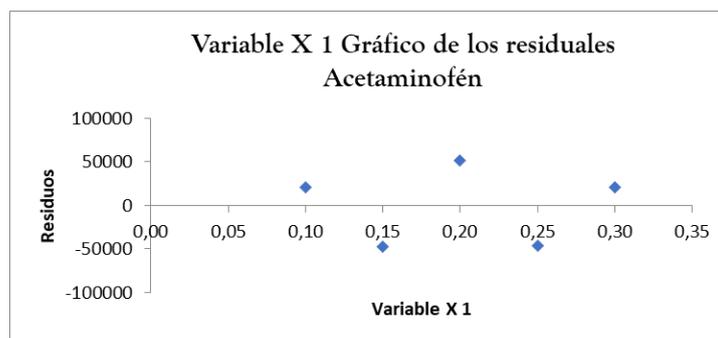
**TABLA 4.5** Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración ácido acetilsalicílico

| ÁCIDO ACETILSALICÍLICO | Pendiente  | Ordenada al origen | Coefficiente de correlación lineal r | Coefficiente de determinación r <sup>2</sup> |
|------------------------|------------|--------------------|--------------------------------------|--|
| Curva 1                | 27868.093  | -378613.21         | 0.9996                               | 0.9993                                       |
| Curva 2                | 27594.1901 | -331618.13         | 0.9996                               | 0.9994                                       |
| Curva 3                | 27659.549  | -335761.35         | 0.9996                               | 0.9993                                       |
| Curva 4                | 27792.584  | -374912.01         | 0.9997                               | 0.9996                                       |
| Curva 5                | 27704.391  | -345292.47         | 0.9995                               | 0.9990                                       |

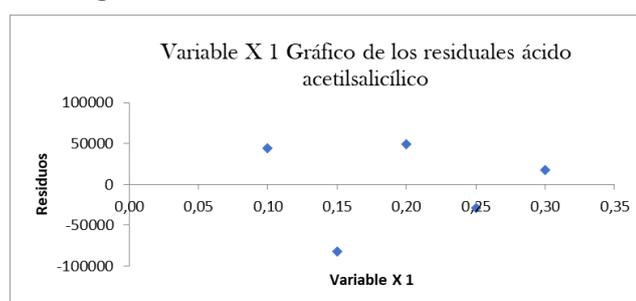
**TABLA 4.6 Comparación de valores estadísticos obtenidos de las curvas de calibración de bromhexina**

| BROMHEXINA | Pendiente  | Ordenada al origen | Coefficiente de correlación lineal r | Coefficiente de determinación r <sup>2</sup> |
|------------|------------|--------------------|--------------------------------------|--|
| Curva 1    | 8110.84381 | -80522.4448        | 0.9999                               | 0.9999                                       |
| Curva 2    | 8095.49413 | -78429.569         | 0.9998                               | 0.9997                                       |
| Curva 3    | 8154.74196 | -87098.7065        | 0.9999                               | 0.9999                                       |
| Curva 4    | 8081.94229 | -77485.7786        | 0.9998                               | 0.9997                                       |
| Curva 5    | 8149.9902  | -82594.147         | 0.9998                               | 0.9998                                       |

Se realizó el análisis de varianza, con la finalidad de comparar las curvas de calibración; de los resultados obtenidos, se concluye que el valor que se obtuvo de F calculado para acetaminofén, ácido acetil salicílico y bromhexina es 2.82E-05, 3.41E-05 y 1.2E-04 respectivamente, son menores al valor de F crítico 2.866; esto indica que hay evidencia suficiente para concluir que las desviaciones estándar son iguales y que las curvas tienen el mismo error aleatorio, ya que t calculado es menor a t tabla, por lo cual se concluyó que las medias de las curvas de calibración de los tres analitos son estadísticamente iguales, con una probabilidad del 95% de certeza. Mediante el análisis de residuales de cada uno de los analitos en los estudios de linealidad nos permitió comparar si las suposiciones del modelo de regresión se cumplen, los cuales no muestran ninguna tendencia como se puede apreciar en las figuras 4.24; 4.25 y 4.26



**Fig. 4.24 Análisis de residuales de acetaminofén**



**Fig. 4.25 Análisis de residuales de ácido acetilsalicílico**

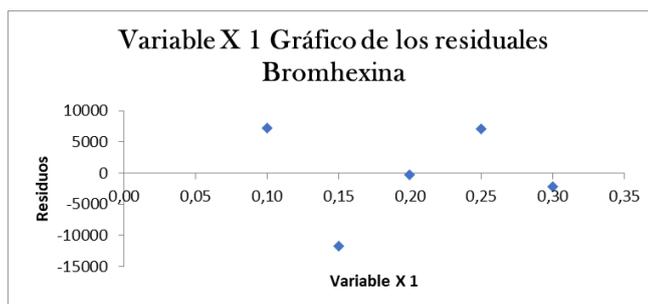


Fig. 4.26 Análisis de residuales de ácido acetilsalicílico

### 4.3.3 Efecto Matriz

Se evaluó que la matriz no distorsionó, aumentó o disminuyó la señal instrumental, en los tres analitos de interés mediante la construcción de 3 curvas de calibración tanto en solvente como en la matriz en 5 puntos en 3 días diferentes, para cada uno de los principios activos. Como se puede observar en el Anexo G.

Se obtuvo un  $r^2 \geq 0.99$  en los tres principios activos, y cuando se realizó análisis de varianza se evidenció que el F calculado es  $<$  que el F crítico, lo cual nos indicó que no hay diferencias significativas entre la curva con solvente y con la matriz. Como se resume en la tabla 4.7

**TABLA 4.7 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz para acetaminofén.**

| ACETAMINOFÉN |           |                              |                 |         |
|--------------|-----------|------------------------------|-----------------|---------|
|              | PENDIENTE | COEFICIENTE DE DETERMINACION | VALOR CRÍTICO F | F       |
| SOLVENTE     | 27390,072 | 0,9998                       | 5,3176          | 0,00023 |
| MATRIZ       | 27143,526 | 0,9997                       |                 |         |
| SOLVENTE     | 27506,724 | 0,9996                       |                 | 0,00001 |
| MATRIZ       | 27111,198 | 0,9991                       |                 |         |
| SOLVENTE     | 29925,576 | 0,9991                       |                 | 0,00005 |
| MATRIZ       | 29977,001 | 0,9989                       |                 |         |

**TABLA 4.8 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz  
para ácido acetilsalicílico**

ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

|         |          | PENDIENTE | COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN | VALOR CRÍTICO F | F       |
|---------|----------|-----------|------------------------------|-----------------|---------|
| CURVA 1 | SOLVENTE | 22766,822 | 0,9998                       | 5,3176          | 0,00658 |
|         | MATRIZ   | 22581,203 | 0,9997                       |                 |         |
| CURVA 2 | SOLVENTE | 21823,392 | 0,9998                       |                 |         |
|         | MATRIZ   | 21702,918 | 0,9997                       |                 |         |
| CURVA 3 | SOLVENTE | 24088,62  | 0,9997                       |                 |         |
|         | MATRIZ   | 24253,74  | 0,9999                       |                 |         |

**TABLA 4.9 Comparación de regresión lineal entre solvente y matriz  
para bromhexina**

BROMHEXINA

|         |          | PENDIENTE | COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN | VALOR CRÍTICO F | F       |
|---------|----------|-----------|------------------------------|-----------------|---------|
| CURVA 1 | SOLVENTE | 5669,5257 | 0,9999                       | 5,3176          | 0,00650 |
|         | MATRIZ   | 5655,7001 | 0,9998                       |                 |         |
| CURVA 2 | SOLVENTE | 6641,6026 | 0,9995                       |                 |         |
|         | MATRIZ   | 6642,0220 | 0,9999                       |                 |         |
| CURVA 3 | SOLVENTE | 8191,7143 | 0,9991                       |                 |         |
|         | MATRIZ   | 8168,4567 | 0,9996                       |                 |         |

Mediante la prueba de t-student se compararon las medias de las curvas de calibración de las muestras con y sin placebo con la finalidad de determinar si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente diferentes, concluyendo que  $F$  calculado es  $< F$  crítico por lo cual se concluye que no son significativamente diferentes. Los  $t$  calculados son inferiores a los  $t$  críticos como se observa en el Anexo F.

#### 4.3.4 Límite de detección

Para acetaminofén fue de 0.0048 mg/ml.

Para ácido acetilsalicílico fue de 0.0052 mg/ml.

Para bromhexina fue de 0.0023 mg/ml.

Para los tres analitos fue inferior al límite de cuantificación.

#### **4.3.5 Límite de cuantificación**

Para acetaminofén fue de 0.0146 mg/ml.

Para ácido acetilsalicílico fue de 0.0157 mg/ml.

Para bromhexina fue de 0.0348 mg/ml.

Para los tres analitos fue inferior al 50% del valor medio.

#### **4.3.6 Exactitud**

La exactitud se evaluó mediante el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada en relación a la cantidad añadida a la muestra, las mismas que de acuerdo a la USP deben estar dentro del 90%-110% [1]. En la tabla 4.10 se resumen los resultados obtenidos.

Con la finalidad de conocer si la exactitud es aceptable, se realizó el test de “t” student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado, para lo cual y se obtuvo el t calculado utilizando la formula:

$$t \text{ calc} = \frac{100 - \%R}{s \times \sqrt{n}} \quad [22]$$

En donde, el t calc es el t observado o calculado, % R es el porcentaje de recuperación, s es la desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación y n es el número de lecturas o valores observados.

**TABLA 4.10 Porcentaje de recuperación para acetaminofén, ácido acetilsalicílico y aspirina**

| Nº          | ACETAMINOFÉN       |                     |                     | ÁCIDO ACETILSALICÍLICO |                     |                     | BROMHEXINA         |                     |                     |
|-------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
|             | NIVEL 1<br>5 mg/ml | NIVEL 2<br>10 mg/ml | NIVEL 3<br>15 mg/ml | NIVEL 1<br>5 mg/ml     | NIVEL 2<br>10 mg/ml | NIVEL 3<br>15 mg/ml | NIVEL 1<br>5 mg/ml | NIVEL 2<br>10 mg/ml | NIVEL 3<br>15 mg/ml |
| 1           | 100,48             | 100,29              | 100,21              | 99,78                  | 100,31              | 100,30              | 99,92              | 99,98               | 100,34              |
| 2           | 100,56             | 99,90               | 99,90               | 99,92                  | 100,10              | 99,91               | 100,30             | 100,20              | 100,40              |
| 3           | 101,19             | 99,99               | 99,69               | 99,90                  | 100,65              | 100,16              | 100,02             | 100,39              | 99,24               |
| 4           | 100,31             | 100,14              | 99,71               | 100,07                 | 100,44              | 100,20              | 99,42              | 99,74               | 100,43              |
| 5           | 100,14             | 99,20               | 99,76               | 100,12                 | 100,13              | 100,81              | 100,14             | 100,73              | 100,87              |
| 6           | 100,30             | 99,30               | 99,52               | 100,20                 | 99,93               | 100,77              | 100,15             | 100,02              | 100,56              |
| 7           | 101,22             | 99,30               | 100,25              | 100,61                 | 100,23              | 100,90              | 99,31              | 100,26              | 100,09              |
| 8           | 101,93             | 98,96               | 99,20               | 99,68                  | 100,58              | 99,38               | 100,28             | 99,38               | 99,82               |
| 9           | 100,10             | 99,56               | 99,47               | 100,00                 | 100,44              | 100,25              | 100,25             | 100,60              | 100,96              |
| 10          | 100,36             | 100,36              | 99,39               | 100,57                 | 100,19              | 100,58              | 100,66             | 100,40              | 100,43              |
| 11          | 99,57              | 98,70               | 99,71               | 100,42                 | 100,12              | 100,61              | 100,75             | 100,29              | 100,78              |
| 12          | 99,93              | 98,76               | 99,62               | 100,11                 | 100,76              | 100,58              | 100,36             | 100,52              | 100,35              |
| 13          | 100,03             | 99,06               | 99,56               | 100,39                 | 99,95               | 100,24              | 100,17             | 100,90              | 100,37              |
| 14          | 100,15             | 99,58               | 99,81               | 99,91                  | 99,96               | 100,29              | 99,88              | 100,24              | 100,96              |
| 15          | 100,33             | 99,08               | 100,13              | 100,02                 | 99,61               | 100,56              | 100,95             | 100,23              | 100,42              |
| MEDIA       | 100,44             | 99,48               | 99,73               | 100,11                 | 100,23              | 100,37              | 100,17             | 100,26              | 100,40              |
| ST. DESV    | 0,5925             | 0,5481              | 0,2981              | 0,2775                 | 0,3103              | 0,3911              | 0,4419             | 0,3817              | 0,4489              |
| Coef variac | 0,0059             | 0,0055              | 0,0030              | 0,0028                 | 0,0031              | 0,0039              | 0,0044             | 0,0038              | 0,0045              |
| % RSD       | 0,5899             | 0,5510              | 0,2989              | 0,2772                 | 0,3096              | 0,3897              | 0,4411             | 0,3807              | 0,4471              |
| t calculado | <b>0,1921</b>      | <b>0,2458</b>       | <b>0,2342</b>       | <b>0,1046</b>          | <b>0,1887</b>       | <b>0,2437</b>       | <b>0,0989</b>      | <b>0,1749</b>       | <b>0,2309</b>       |

El t- student teórico para grados de libertad n-1 y porcentaje de seguridad (1- $\alpha$ ) para un error  $\alpha$  de 0.05, es decir un 95 % de confianza, es de 2.145. De esta manera, el t calculado es menor que el t crítico; lo que significa que no existen diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.3.7 Repetibilidad

La precisión del método se estableció en términos de repetibilidad y el grado de precisión se calculó como la desviación estándar de los resultados que debe ser menor o igual a 2 de acuerdo a la USP [30]. Los resultados de repetibilidad se obtuvieron bajo las condiciones del mismo método, ítems de análisis idénticos comparado en material de referencia, en el mismo laboratorio, el mismo operador, el mismo equipo. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 4.11; 4.12 y 4.13, en las que se puede evidenciar que la desviación estándar es menor a 2.

Además, con la finalidad de saber si existen diferencias entre los valores obtenidos en cada grupo se realizó un análisis de varianza en Excel y se obtuvo el calor F calculado, que se comparó con el F tab y se evidencia así que al ser menor el F

calculado que el F crítico se concluye que no hay diferencias significativas en los resultados obtenidos en los 5 días de análisis en acetaminofén, ácido acetilsalicílico y bromhexina.

**TABLA 4.11 Resultados de repetibilidad para acetaminofén**

| ACETAMINOFÉN  |        |        |        |        |        |        |                      |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------------|
|               | DIA 1  | DIA 2  | DIA 3  | DIA 4  | DIA 5  | F      | Valor crítico para F |
| Concentración | %      | %      | %      | %      | %      |        |                      |
| <b>0,5%</b>   | 0,502  | 0,503  | 0,506  | 0,502  | 0,506  | 2,375  | 3,478                |
|               | 0,507  | 0,501  | 0,500  | 0,498  | 0,505  |        |                      |
|               | 0,506  | 0,503  | 0,508  | 0,500  | 0,504  |        |                      |
| Promedio      | 0,505  | 0,502  | 0,505  | 0,500  | 0,505  |        |                      |
| Std. Dev      | 0,0026 | 0,0012 | 0,0042 | 0,0020 | 0,0010 |        |                      |
| CV            | 0,0052 | 0,0023 | 0,0082 | 0,0040 | 0,0020 |        |                      |
| %RSD          | 0,524  | 0,230  | 0,825  | 0,400  | 0,198  |        |                      |
| <b>1,0%</b>   | 0,998  | 0,999  | 0,993  | 1,000  | 0,991  | 1,7405 |                      |
|               | 0,999  | 0,992  | 0,990  | 0,987  | 0,996  |        |                      |
|               | 1,000  | 0,993  | 0,993  | 0,988  | 0,991  |        |                      |
| Promedio      | 0,999  | 0,995  | 0,992  | 0,992  | 0,993  |        |                      |
| Std. Dev      | 0,0010 | 0,0038 | 0,0017 | 0,0072 | 0,0029 |        |                      |
| CV            | 0,0010 | 0,0038 | 0,0017 | 0,0073 | 0,0029 |        |                      |
| %RSD          | 0,100  | 0,381  | 0,175  | 0,729  | 0,291  |        |                      |
| <b>1,5%</b>   | 1,503  | 1,496  | 1,510  | 1,490  | 1,493  | 0,3603 |                      |
|               | 1,498  | 1,496  | 1,487  | 1,495  | 1,497  |        |                      |
|               | 1,495  | 1,492  | 1,491  | 1,494  | 1,501  |        |                      |
| Promedio      | 1,499  | 1,495  | 1,496  | 1,493  | 1,497  |        |                      |
| Std. Dev      | 0,0040 | 0,0023 | 0,0123 | 0,0026 | 0,0040 |        |                      |
| CV            | 0,0027 | 0,0015 | 0,0082 | 0,0018 | 0,0027 |        |                      |
| %RSD          | 0,270  | 0,155  | 0,821  | 0,177  | 0,267  |        |                      |

**TABLA 4.12 Resultados de repetibilidad para ácido acetilsalicílico**

| ÁCIDO ACETILSALICÍLICO    |        |        |        |        |        |       |                      |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|----------------------|
|                           | DIA 1  | DIA 2  | DIA 3  | DIA 4  | DIA 5  | F     | Valor critico para F |
|                           | %      | %      | %      | %      | %      |       |                      |
| <b>Concentración 0,5%</b> | 0,499  | 0,505  | 0,501  | 0,504  | 0,499  |       |                      |
|                           | 0,500  | 0,508  | 0,498  | 0,504  | 0,502  |       |                      |
|                           | 0,499  | 0,499  | 0,500  | 0,500  | 0,500  |       |                      |
| Promedio                  | 0,499  | 0,504  | 0,500  | 0,503  | 0,500  | 1,984 |                      |
| Std. Dev                  | 0,0006 | 0,0046 | 0,0015 | 0,0023 | 0,0015 |       |                      |
| CV                        | 0,0012 | 0,0091 | 0,0031 | 0,0046 | 0,0031 |       |                      |
| %RSD                      | 0,116  | 0,909  | 0,306  | 0,459  | 0,305  |       |                      |
| <b>Concentración 1,0%</b> | 1,016  | 1,004  | 1,014  | 1,024  | 1,020  |       |                      |
|                           | 1,005  | 1,001  | 1,011  | 1,001  | 1,000  |       |                      |
|                           | 1,020  | 1,001  | 1,010  | 1,008  | 1,024  | 1,02  |                      |
| Promedio                  | 1,014  | 1,002  | 1,012  | 1,011  | 1,015  |       | 3,478                |
| Std. Dev                  | 0,0078 | 0,0017 | 0,0021 | 0,0118 | 0,0129 |       |                      |
| CV                        | 0,0077 | 0,0017 | 0,0021 | 0,0117 | 0,0127 |       |                      |
| %RSD                      | 0,766  | 0,173  | 0,206  | 1,166  | 1,267  |       |                      |
| <b>Concentración 1,5%</b> | 1,504  | 1,503  | 1,483  | 1,500  | 1,507  |       |                      |
|                           | 1,499  | 1,491  | 1,491  | 1,502  | 1,509  |       |                      |
|                           | 1,502  | 1,502  | 1,504  | 1,506  | 1,494  | 1,199 |                      |
| Promedio                  | 1,502  | 1,499  | 1,493  | 1,503  | 1,503  |       |                      |
| Std. Dev                  | 0,0025 | 0,0067 | 0,0106 | 0,0031 | 0,0081 |       |                      |
| CV                        | 0,0017 | 0,0044 | 0,0071 | 0,0020 | 0,0054 |       |                      |
| %RSD                      | 0,168  | 0,444  | 0,710  | 0,203  | 0,542  |       |                      |

**TABLA 4.13 Resultados de repetibilidad para bromhexina**

| BROMHEXINA    |        |        |        |        |        |        |                      |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------------|
|               | DIA 1  | DIA 2  | DIA 3  | DIA 4  | DIA 5  | F      | Valor critico para F |
| Concentración | %      | %      | %      | %      | %      |        |                      |
| 0,5%          | 0,500  | 0,499  | 0,500  | 0,503  | 0,502  |        |                      |
|               | 0,502  | 0,501  | 0,498  | 0,498  | 0,499  |        |                      |
|               | 0,502  | 0,501  | 0,497  | 0,502  | 0,501  |        |                      |
| Promedio      | 0,501  | 0,500  | 0,498  | 0,501  | 0,501  | 1,453  |                      |
| Std. Dev      | 0,0012 | 0,0012 | 0,0015 | 0,0026 | 0,0015 |        |                      |
| CV            | 0,0023 | 0,0023 | 0,0031 | 0,0053 | 0,0031 |        |                      |
| %RSD          | 0,230  | 0,231  | 0,307  | 0,528  | 0,305  |        |                      |
| Concentración | DIA 1  | DIA 2  | DIA 3  | DIA 4  | DIA 5  |        |                      |
| 1,0%          | %      | %      | %      | %      | %      |        |                      |
|               | 1,000  | 1,003  | 1,008  | 0,993  | 1,009  |        |                      |
|               | 1,001  | 1,007  | 0,988  | 1,003  | 1,003  |        |                      |
|               | 1,007  | 1,000  | 0,989  | 1,006  | 1,002  | 1,004  |                      |
| Promedio      | 1,003  | 1,003  | 0,995  | 1,001  | 1,005  |        | 3,478                |
| Std. Dev      | 0,0038 | 0,0035 | 0,0113 | 0,0068 | 0,0038 |        |                      |
| CV            | 0,0038 | 0,0035 | 0,0113 | 0,0068 | 0,0038 |        |                      |
| %RSD          | 0,378  | 0,350  | 1,133  | 0,680  | 0,377  |        |                      |
| Concentración | DIA 1  | DIA 2  | DIA 3  | DIA 4  | DIA 5  |        |                      |
| 1,5%          | %      | %      | %      | %      | %      |        |                      |
|               | 1,499  | 1,493  | 1,492  | 1,498  | 1,506  |        |                      |
|               | 1,506  | 1,495  | 1,497  | 1,506  | 1,498  |        |                      |
|               | 1,483  | 1,502  | 1,500  | 1,505  | 1,488  | 0,4574 |                      |
| Promedio      | 1,496  | 1,497  | 1,496  | 1,503  | 1,497  |        |                      |
| Std. Dev      | 0,0118 | 0,0047 | 0,0040 | 0,0044 | 0,0090 |        |                      |
| CV            | 0,0079 | 0,0032 | 0,0027 | 0,0029 | 0,0060 |        |                      |
| %RSD          | 0,788  | 0,316  | 0,270  | 0,290  | 0,602  |        |                      |

#### 4.3.8 Robustez

Con la finalidad de conocer si el método analítico se ve afectado por pequeñas variaciones en los parámetros del método, se establecieron condiciones analíticas que podrían afectar al método y estas fueron: cambio en el volumen de inyección, cambio de longitud de onda, variación en el pH de la fase móvil, cambio en el solvente orgánico de la fase móvil y cambio en el solvente orgánico del solvente en el que se preparan las muestras.

Para esta determinación se aplica el test Youden y Steiner, el mismo que nos permitirá evaluar el efecto de 5 variables con 8 análisis de las muestras, cuyo esquema se resume en la tabla 4.14

**TABLA 4.14 Esquema Youden y Steiner establecido para análisis de robustez**

| Valor de la condición variable       | ANÁLISIS |          |          |          |          |          |          |          |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                      | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        | 7        | 8        |
| A: Volumen de inyección 15 µl        | A        | A        | A        | A        | a        | a        | a        | a        |
| a: Volumen de inyección 5 µl         |          |          |          |          |          |          |          |          |
| B: Cuantificar a 240 nm              | B        | B        | b        | b        | B        | B        | b        | b        |
| b: Cuantificar a 230 nm              |          |          |          |          |          |          |          |          |
| C: pH4 solución TEA                  | C        | c        | C        | c        | C        | c        | C        | c        |
| c: pH2 solución TEA                  |          |          |          |          |          |          |          |          |
| D: 45% ACN en fase móvil             | D        | D        | d        | d        | d        | d        | D        | D        |
| d: 35% ACN en fase móvil             |          |          |          |          |          |          |          |          |
| E: 45% ACN en solvente muestra       | E        | e        | E        | e        | e        | E        | e        | E        |
| e: 35% ACN en solvente de la muestra |          |          |          |          |          |          |          |          |
| <b>RESULTADOS</b>                    | <b>s</b> | <b>t</b> | <b>u</b> | <b>v</b> | <b>w</b> | <b>x</b> | <b>y</b> | <b>z</b> |

Los resultados de los efectos de cada una de las variables se calcularon con la media de los cuatro análisis que contienen la variable mayúscula (ensayo original) y aquellas que corresponden al valor en la variable minúscula (ensayo modificado) y se comparó con la desviación estándar de los resultados s a z. La expresión matemática es la siguiente:

$$A - a = V_A = \frac{1}{4} (s + t + u + v) - \frac{1}{4} (w + x + y + z)$$

$$B - b = V_B = \frac{1}{4} (s + t + w + x) - \frac{1}{4} (u + v + y + z)$$

$$C - c = V_c = \frac{1}{4} (s + u + w + y) - \frac{1}{4} (t + v + x + z)$$

$$D - d = V_D = \frac{1}{4} (s + t + y + z) - \frac{1}{4} (u + v + w + x)$$

$$E - e = V_E = \frac{1}{4} (s + t + x + z) - \frac{1}{4} (t + v + w + y)$$

**TABLA 4.15 Resultados de ensayo de robustez**

| Variable                          | Valor alto | Valor bajo | ANÁLISIS |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------|------------|------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                   |            |            | 1        | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   |
| Volumen de inyección (µl)         | 15         | 5          | 15       | 15  | 15  | 15  | 5   | 5   | 5   | 5   |
| Longitud de onda (nm)             | 240        | 220        | 240      | 240 | 220 | 220 | 240 | 240 | 220 | 220 |
| pH solución TEA                   | 4          | 2          | 4        | 2   | 4   | 2   | 4   | 2   | 4   | 2   |
| Variación ACN en fase móvil       | 45         | 35         | 45       | 45  | 35  | 35  | 35  | 35  | 45  | 45  |
| Variación ACN en solvente muestra | 45         | 35         | 45       | 35  | 45  | 35  | 35  | 45  | 35  | 45  |

| RESULTADOS %           |              | s      | t      | u      | v      | w      | x      | y      | z      |
|------------------------|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                        | Acetaminofén | 1.0588 | 1.0480 | 1.0634 | 1.0442 | 1.0434 | 1.0490 | 1.0448 | 1.0442 |
| Ácido acetilsalicílico | 0.9954       | 1.0036 | 0.7760 | 0.7852 | 0.7680 | 0.8010 | 0.9764 | 1.0106 |        |
| Bromhexina             | 1.0044       | 1.0092 | 0.8176 | 0.8182 | 0.7950 | 0.7934 | 1.0022 | 0.972  |        |

En la tabla 4.15 se aprecian las diferencias de cada una de las variables que se obtuvo mediante calculo, y, con la media de los cuatro análisis que contienen la variable del método superior en mayúscula y aquellas que tienen el valor inferior en minúscula. Se calculó así las 5 comparaciones posibles, por la diferencia entre la variable en mayúscula versus la minúscula. De esta manera, cuanto mayor es la diferencia de los resultados entre el valor de las mayúsculas y el valor de las minúsculas, mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico. Se tomo como criterio de aceptación de la robustez lo siguiente:  $(X - x) < \sqrt{2}S$ , en donde la diferencia entre el valor mayúsculas y el valor minúsculas sea menor a menos a la desviación estándar del método. En las tablas se muestran los resultados para cada uno de los analitos de interés.

**TABLA 4.16 Resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para acetaminofén**

| ACETAMINOFÉN                  |            |            |          |              |                       |
|-------------------------------|------------|------------|----------|--------------|-----------------------|
| Variable                      |            | Resultados |          |              | Comparación           |
| Valor Alto                    | Valor bajo | Promedio   | Promedio | Diferencia   |                       |
| X                             | x          | X          | x        | X - x        |                       |
| A                             | a          | 1,0536     | 1,0454   | 0,0083       | No sensible al cambio |
| B                             | b          | 1,0498     | 1,0492   | 0,0006       | No sensible al cambio |
| C                             | c          | 1,0526     | 1,0464   | 0,0063       | No sensible al cambio |
| D                             | d          | 1,0490     | 1,0514   | -0,0025      | No sensible al cambio |
| E                             | e          | 1,0539     | 1,0465   | 0,0074       | No sensible al cambio |
| <b>Media</b>                  |            |            |          | 1,0495       |                       |
| <b>S</b>                      |            |            |          | 0,0075       |                       |
| <b>FACTOR DE COMPARACIÓN:</b> |            |            |          | $Sx\sqrt{2}$ | <b>0,0107</b>         |

En la tabla 4.16 se muestran los resultados de la comparación del método con las modificaciones analíticas para Acetaminofén, en la que se puede apreciar que ninguna de estas variaciones afecta al método ya que todos los resultados tienen valores inferiores a 0.017 que es el factor de comparación. Concluyendo que el método es robusto para acetaminofén.

**TABLA 4.17 Resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para ácido acetilsalicílico**

| <b>ÁCIDO ACETILSALICÍLICO</b>                         |                   |                   |                 |                   |                       |
|---|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| <b>Variable</b>                                       |                   | <b>Resultados</b> |                 |                   | <b>Comparación</b>    |
| <b>Valor Alto</b>                                     | <b>Valor bajo</b> | <b>Promedio</b>   | <b>Promedio</b> | <b>Diferencia</b> |                       |
| <b>X</b>  | <b>x</b>          | <b>X</b>          | <b>x</b>        | <b>X - x</b>      |                       |
| <b>A</b>  | <b>a</b>          | 0,8901            | 0,8890          | 0,0011            | No sensible al cambio |
| <b>B</b>  | <b>b</b>          | 0,8920            | 0,8871          | 0,0050            | No sensible al cambio |
| <b>C</b>  | <b>c</b>          | 0,8790            | 0,9001          | -0,0212           | No sensible al cambio |
| <b>D</b>  | <b>d</b>          | 0,9965            | 0,7826          | 0,2140            | Sensible al cambio    |
| <b>E</b>  | <b>e</b>          | 0,8958            | 0,8833          | 0,0125            | No sensible al cambio |
| <b>Media</b>  |                   |                   |                 | 0,8895            |                       |
| <b>S</b>  |                   |                   |                 | 0,1151            |                       |
| <b>FACTOR DE COMPARACIÓN: <math>Sx\sqrt{2}</math></b> |                   |                   |                 | <b>0,1628</b>     |                       |

En la tabla 4.17 se observan los resultados de robustez para ácido acetilsalicílico frente a modificaciones en el método, y se puede concluir que el método es sensible a este cambio para este analito cuando se realiza un cambio en la proporción de la fase orgánica acetonitrilo en la fase móvil, ya que no se pudo realizar la cuantificación del mismo por superposición con otros picos presente en la matriz y se evidencia estadísticamente porque nos dio un resultado superior a 0.168 que es el factor de comparación. Para el resto de las modificaciones que se realizó en el método no existió variación alguna.

**TABLA 4.18 Tabla resultados prueba de robustez de Youden y Steiner para bromhexina**

| <b>BROMHEXINA</b>             |                   |                   |                 |                   |                       |
|-------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|
| <b>Variable</b>               |                   | <b>Resultados</b> |                 |                   | <b>Comparación</b>    |
| <b>Valor Alto</b>             | <b>Valor bajo</b> | <b>Promedio</b>   | <b>Promedio</b> | <b>Diferencia</b> |                       |
| <b>X</b>                      | <b>x</b>          | <b>X</b>          | <b>x</b>        | <b>X - x</b>      |                       |
| <b>A</b>                      | <b>a</b>          | 0,9124            | 0,8970          | 0,0154            | No sensible al cambio |
| <b>B</b>                      | <b>b</b>          | 0,9005            | 0,9088          | -0,0083           | No sensible al cambio |
| <b>C</b>                      | <b>c</b>          | 0,9048            | 0,9045          | 0,0003            | No sensible al cambio |
| <b>D</b>                      | <b>d</b>          | 1,0033            | 0,8061          | 0,1972            | Sensible al cambio    |
| <b>E</b>                      | <b>e</b>          | 0,9032            | 0,9062          | -0,0030           | No sensible al cambio |
|                               |                   | <b>Media</b>      |                 | 0,9047            |                       |
|                               |                   | <b>S</b>          |                 | 0,1058            |                       |
| <b>FACTOR DE COMPARACIÓN:</b> |                   | $Sx\sqrt{2}$      |                 | <b>0,1497</b>     |                       |

En la tabla 4.18 se observan los resultados de robustez para bromhexina en los cuales se aprecia que el método no es robusto cuando se realiza un incremento en la fase orgánica de la fase móvil, por superposición de picos de la matriz y se evidencia estadísticamente porque presenta un valor superior a 0.1497 que es el factor de comparación. Para el resto de modificaciones a las que se sometió al método no existió variación.

## CAPÍTULO 5

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

Se desarrolló un método que permite el análisis simultáneo de acetaminofén, ácido acetilsalicílico, bromhexina en solución oral.

Se demostró mediante validación que el método cumple con los requisitos establecidos en la guía ICH Q2 (R2) y que es específico, lineal, exacto y preciso.

El método permite la determinación cualitativa y cuantitativa simultánea de los tres principios activos de manera efectiva, rápida, con corto tiempo de análisis, de manera que el método puede ser utilizado en análisis de rutina y brindar resultados de una manera ágil.

| Parámetros  | Objetivos   | Resultados  |
|---|---|---|
| <b><u>ESPECIFICIDAD</u></b>   |   |   |
| No hay interferencia cromatográfica con los analitos de estudio entre ellos o con otras interferencias. | Específico  | No hay respuesta cromatográfica que interfiera con los analitos de interés.   |
|   | Resolución $\geq 1,5$                                 | Cumple  |
| <b><u>LINEALIDAD</u></b>  |   |   |
| Coeficiente de correlación $\geq 0,99$  | Mínimo: 0.99  | r acetaminofén: 0.9998  |
|   |   | r ácido acetilsalicílico: 0.9997  |
|   |   | r bromhexina: 0.9997  |
| Análisis residuales   | Aleatoriedad  | Aleatorio   |
| F cal < F Crítico<br>$\alpha=0,05$  | F crítico < 2,866                                     | Acetaminofén: $2,82E-05 < 2,866$<br>Ácido acetilsalicílico: $3,41E-05 < 2,866$<br>Bromhexina: $1,2E-04 < 2,866$       |
| <b><u>EFEECTO MATRIZ</u></b>  |   |   |
| Pendientes similares entre placebo y matriz   | t cal < t crítico<br>$\alpha=0,05$                    | T crítico: 2,776<br>t cal acetaminofén: 0,55<br>t cal ácido acetilsalicílico: 0,14<br>t cal bromhexina: 0,23          |
| F cal < F crítico   | F crítico: 5.3176                                     | F cal acetaminofén: 0.00009<br>F cal ácido acetilsalicílico: 0.00366<br>F cal bromhexina: 0.00298                     |
| <b><u>EXACTITUD</u></b>   |   |   |
| Porcentaje de recuperación  | 90-110%   | Acetaminofén: 99.95%<br>Ácido acetilsalicílico: 100.20%<br>Bromhexina: 100.25%  |
| <b><u>PRECISIÓN</u></b> (Repetibilidad, precisión intermedia).  |   |   |
| Desviación estándar relativa (RSD)  | Menor 2%  | Acetaminofén: 0.369%<br>Ácido acetilsalicílico: 0.516%<br>Bromhexina: 0.452%  |
| <b><u>ROBUSTEZ</u></b>  |   |   |
| Verificación del desempeño del método en 8 muestras y mínimo 5 variaciones                              | Verificar el desempeño del método para los 3 analitos | Acetaminofén: Robusto en 5 variaciones<br>Ácido acetilsalicílico: Robusto en 4<br>Bromhexina: Robusto en 4 parámetros |

## **5.2 RECOMENDACIONES**

Evaluar si el método puede ser usado para identificación y cuantificación de degradantes.

El estudio del parámetro de robustez, permite recomendar que la proporción de fase móvil debe ser fija.

## 6. REFERENCIAS

- [1] USP United States Pharmacopeia @2023 USPC, “Acetaminofeno y aspirina tabletas”, 2023. doi: [En línea]. Disponible [https://doi.org/10.31003/USPNF\\_M230\\_01\\_02](https://doi.org/10.31003/USPNF_M230_01_02).
- [2] R.M. Kamble et al., “Validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of paracetamol and tramadol hydrochloride in a commercial tablet”, *J Pharm Res*, vol. 4, núm. 11, pp. 4038–4040, jul. 2011, doi: [En línea]. Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/282356554>.
- [3] S.R. Pattan et al, “RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Paracetamol and Etoricoxib from Bulk and Tablets”, *J Chem Pharm Res*, vol. 1, núm. 1, pp. 329–335, ene. 2009, doi: [En línea]. Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/268359453>.
- [4] B. G. Tsvetkova et al., “Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol and ibuprofen in fixed dose combinations”, *Int. J Pharm Sci Rev Res*, vol. 16, núm. 1, pp. 13–16, oct. 2012, doi: [En línea]. Disponible: <https://www.researchgate.net/publication/232261699>.
- [5] *British Pharmacopoeia. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances*, Volume I & II. London, United Kingdom 2009, “Bromhexine Hydrochloride” pp. 770-773.
- [6] Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) “Bromhexina Clorhidrato”. México, 2020, pp.1288.
- [7] J. P. Rauha, H. Salomies, y M. Aalto, “Simultaneous determination of bromhexine hydrochloride and methyl and propyl p-hydroxybenzoate and determination of dextromethorphan hydrobromide in cough-cold syrup by high-performance liquid chromatography”, *Journal o Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 15, núm. 2, pp. 287–293, nov. 1996, doi: [En línea].

Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8933431/>.

- [8] S. Navarrete, "Validación de un método de análisis cuantitativo de Bromhexina tabletas por HPLC", Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua, 2000.
- [9] V. Jain y M. C. Sharma, "Validated RP-HPLC method for determining the leves of bromhexine HCl, clorpheniramine maleate, dextromethorphan HBr and guaiphenesin in their pharmaceutical dosage forms", *Journal of Taibah Univesity Science.*, vol. 10, núm. 1, pp. 38–45, doi: [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.02.019>.
- [10] L. V. Sonawane y S. B. Bari., "Development and Validation of RP-HPLC Method for the simultaneous estimation of amoxicilina trihidrato y bromhexina hydrochloride from oily suspension.", *Pharm Anal Acta*, vol. 1, núm. 2, pp. 1–6, 2010, doi: [En línea]. Disponible: 10.4172/2153-2435.1000107.
- [11] J. L. Vila Jato, Ed., *Tecnología farmacéutica Volumen I, "Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas"*, vol. 1. Madrid, España: Editorial Síntesis S.A, 2001.
- [12] S. E. Bustamante, "*Vías de Administración de Fármacos*", 1a ed., vol. 1. Universidad de Chile: Editorial del Cardo, 2003.
- [13] J. De Pedro, "Formas Farmacéuticas en Veterinaria", *Revista de Farmacia Profesional*, vol. 19, núm. 2, pp. 74–77, feb. 2005, doi: [En línea]. Disponible: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-formas-farmaceuticas-veterinaria-i--13072123>.
- [14] L. Villafuerte, "Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos", *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional de México, México, pp. 1–19, marzo de 2011. doi: [En línea]. Disponible: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v42n1/v42n1a3.pdf>.
- [15] E. Goldstein, J. Monzón, y N. Barcos, "Ingredientes farmacéuticos activos.

- Oportunidades para su desarrollo, producción y exportación”, jul. 2022. doi:  
[En línea].  
Disponible:[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/03/29\\_-\\_ingredientes\\_farmaceuticos\\_activos\\_-\\_arg\\_productiva.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/03/29_-_ingredientes_farmaceuticos_activos_-_arg_productiva.pdf).
- [16] A. Y. Cárdenas, P. S. García, y F. U. Corona, “Administración de medicamentos”, en Manual de conocimientos básicos de farmacología, 1a ed., vol. 1, Guadalajara, México: Universidad de Guadalajara 2015, cap. 5, pp. 41–62.
- [17] D. A. Skoog, F. J. Holler, y S. R. Crouch, Principios de análisis instrumental, Sexta Edición. Santa Fé, México, 2008.
- [18] D. A. Skoog et al., “Fundamentos de Química Analítica”, Novena edición. Santa Fe, México, 2014.
- [19] A. García de Marina y D. J. Yusá, “HPLC instrumental”, 3ª edición. Valencia, España, 2016.
- [20] WHO/VSQ/97.02, “Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF)”, Ginebra, Suiza, 1998.
- [21] Erolab España P.P. Morillas y colaboradores, Guía Eurachem: “La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados”, (1ª ed. 2016). [En línea].  
Disponible en [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- [22] “Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos”, Instituto de Salud Pública Chile. Santiago, Chile 2010, pp. 1–70, diciembre de 2010.
- [23] “International Committee for Harmonization, ICH. "Validation of analytical procedures Q2(R2)". 22 March 2022. [En línea]. Disponible:  
[https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q2-R2\\_Document\\_Step2\\_Guideline\\_2022\\_0324.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2-R2_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf)”, 2022.

- [24] Goodman y Gilman, “Las bases farmacológicas de la Terapéutica”, Undécima. Colombia: McGRAW-HILL Interamericana editores S.A., 2007.
- [25] “Fichas Internacionales de Seguridad Química (ICSCs)”.
- [26] R. E. Joya, “Un medicamento ancestral: ácido acetilsalicílico (Aspirina)”, *Revista Mexicana de Urología*, pp. 197–198, 2010.
- [27] “National Center for Biotechnology Information (2023) PubChem Compound Summary”.
- [28] A. J. M. A. Flórez J, “Farmacología humana”, 3ª edición. Barcelona, España: MASSON S.A.
- [29] L. C. Anzola, “Fundamentos básicos de Farmacología”, vol. 2a. edición. Bogotá, 2013.
- [30] United States Pharmacopeial Convention. “Farmacopea de los Estados Unidos de América: USP-NF 2021”. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention.

## 7. APÉNDICES Y ANEXOS

### Apéndice A Standard acetaminofén



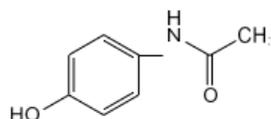
www.sigmaaldrich.com

## Certificate of Analysis – Certified Reference Material

### ACETAMINOPHEN

(Paracetamol)

**Product no.:** PHR1005-1G  
**Lot no.:** LRAC6466  
**Description of CRM:** White Powder  
**Expiry date:** 30 September 2024  
**Storage:** Room Temperature, Protect from Light  
**Certificate version:** LRAC6466.02 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) for the most current version.)  
**Chemical formula:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>  
**Molecular mass:** 151.16  
**CAS No.:** 103-90-2



| Analyte       | Certified Purity ± associated uncertainty $U$ , $U = k \cdot u$ ( $k =$ ) (Mass Balance/ basis) |
|---------------|---|
| Acetaminophen | 99.98 % $U_{CRM} = \pm 0.3$ %, $k = 2.0$ (as is basis)  |

**Metrological traceability:** Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.  
**Measurement method:** Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.  
**Intended use:** Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses.  
**Minimum sample size:** 10 mg  
**Instructions for handling and correct use:** Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.  
**Health and safety information:** All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.  
**Accreditation:** Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.  
**Certificate issue date:** 19 April 2021




[Andy Ommen; Quality Control]



[Mark Pooler; Quality Assurance]

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;  
 Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)  
 Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



Certificate Page 1 of 7

Certificate version 02

## Apéndice B Standard ácido acetilsalicílico

Supelco®

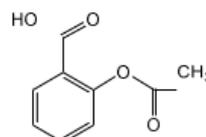
www.sigmaaldrich.com

### Certificate of Analysis – Certified Reference Material

#### ASPIRIN

(Acetylsalicylic Acid)

**Product no.:** PHR1003-1G  
**Lot no.:** LRAC6517  
**Description of CRM:** White Powder  
**Expiry date:** 31 October 2024  
**Storage:** Room Temperature  
**Certificate version:** LRAC6517.03 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) for the most current version.)  
**Chemical formula:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>  
**Molecular mass:** 180.16  
**CAS No.:** 50-78-2



| Analyte | Certified Purity ± associated uncertainty U, U=k·u (k=) (Mass Balance/basis) |
|---------|--|
| Aspirin | 99.9 % U <sub>CRM</sub> = ± 0.1 %, k = 2.0 (as is basis)                     |

**Metrological traceability:** Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.

**Measurement method:** Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.

**Intended use:** Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses

**Minimum sample size:** 25 mg

**Instructions for handling and correct use:** Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

**Health and safety information:** All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.

**Accreditation:** Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.

**Certificate issue date:** 12 April 2022



*Andy Ommen*

[Andy Ommen; Quality Control]

*Mark Pooler*

[Mark Pooler; Quality Assurance]

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;  
 Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)  
 Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



Certificate Page 1 of 6

Certificate version 03

## Apéndice C Standard ácido acetilsalicílico

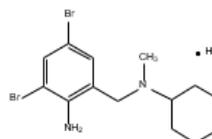
Supelco®

www.sigmaldrich.com

### Certificate of Analysis – Certified Reference Material

#### BROMHEXINE HYDROCHLORIDE

**Product no.:** PHR1831-200MG  
**Lot no.:** LRAD0575  
**Description of CRM:** White powder  
**Expiry date:** 30 November 2025  
**Storage:** Refrigerator  
**Certificate version:** LRAD0575.01 (Note: Certificates may be updated due to Pharmacopeial Lot Changes or the availability of new data. Check our website at: [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com) for the most current version.)  
**Chemical formula:** C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>Br<sub>2</sub>ClN<sub>2</sub>  
**Molecular mass:** 412.6  
**CAS No.:** 611-75-6



| Analyte        | Certified Purity ± associated uncertainty U, U=k·u (k=) (Mass Balance/ basis) |
|----------------|---|
| Bromhexine HCl | 99.8 % U <sub>CRM</sub> = ± 0.5 %, k = 2.0 (as is basis)                      |

**Metrological traceability:** Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. Additional traceability to Primary Standards is established through comparative assay determinations. See "Details on metrological traceability" on page 2.

**Measurement method:** Where applicable, the certified value is based on a purity determination by mass balance. See "Certification process details" on page 3.

**Intended use:** Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses

**Minimum sample size:** 25 mg

**Instructions for handling and correct use:** Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

**Health and safety information:** All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.

**Accreditation:** Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034.

**Certificate issue date:** 15 November 2021



*[Signature]*

[Andy Ommen; Quality Control]

*[Signature]*

Shawn Stetler- QA Manager

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd, Laramie, WY 82070, USA;  
 Tel: 1 307-742-5452; Fax 1 307-855-831-9211; [www.sigmaldrich.com](http://www.sigmaldrich.com)  
 Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Certificate Page 1 of 5

Certificate version 01



## Apéndice D Certificado analítico de Acetonitrilo



### Certificate of Analysis

1.00030.4000 Acetonitrile gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv®  
Reag. Ph Eur  
Batch 11223530

|                                     | Batch Values |         |
|-------------------------------------|--------------|---------|
| Purity (GC)                         | ≥ 99.9       | %       |
| Identity (IR)                       | conforms     |         |
| Evaporation residue                 | ≤ 2.0        | mg/l    |
| Water                               | ≤ 0.02       | %       |
| Color                               | ≤ 10         | Hazen   |
| Density (d 20 °C/20 °C)             | 0.78         |         |
| Refractive index (n 20/D)           | 1.344        |         |
| Boiling range (80-82°C)             | ≥ 95         | % (v/v) |
| Acidity                             | ≤ 0.0002     | meq/g   |
| Alkalinity                          | ≤ 0.0002     | meq/g   |
| Gradient grade (at 210 nm)          | 0.1          | mAU     |
| Gradient grade (at 254 nm)          | 0.1          | mAU     |
| Fluorescence (as quinine at 254 nm) | 0.1          | ppb     |
| Fluorescence (as quinine at 365 nm) | 0.1          | ppb     |
| Transmission (at 193 nm)            | 75           | %       |
| Transmission (at 195 nm)            | 88           | %       |
| Transmission (from 230 nm)          | ≥ 98         | %       |

Filtered by 0.2 µm filter.

Suitable for UPLC / UHPLC / Ultra HPLC - instruments.

Conforms to Acetonitrile for chromatography and Acetonitrile R1 according to Reag.Ph Eur;  
conforms to the requirements of ACS for liquid chromatography suitability.

Date of release (DD.MM.YYYY) 03.08.2022

Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.08.2025

# Apéndice E Certificado analítico de Ácido fosfórico



## Certificate of Analysis

1 Reagent Lane  
Fair Lawn, NJ 07410  
201.796.7100 tel  
201.796.1329 fax

Thermo Fisher Scientific's Quality System has been found to conform to Quality Management System  
Standard ISO9001:2015 by SAI Global Certificate Number CERT – 0120633

This is to certify that units of the lot number below were tested and found to comply with the specifications of the grade listed. Certain data have been supplied by third parties. Thermo Fisher Scientific expressly disclaims all warranties, expressed or implied, including the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose. Products are for research use or further manufacturing. Not for direct administration to humans or animals. It is the responsibility of the final formulator and end user to determine suitability based upon the intended use of the end product. Products are tested to meet the analytical requirements of the noted grade. The following information is the actual analytical results obtained.

|                   |   |                             |            |
|-------------------|---|-----------------------------|------------|
| Catalog Number    | A242  | Quality Test / Release Date | 10/28/2022 |
| Lot Number        | 224168  |                             |            |
| Description       | O-PHOSPHORIC ACID, ACS  |                             |            |
| Country of Origin | China   | Suggested Retest Date       | Oct/2027   |
| Chemical Origin   | Inorganic-non animal  |                             |            |
| BSE/TSE Comment   | No animal products are used as starting raw material ingredients, or used in processing, including lubricants, processing aids, or any other material that might migrate to the finished product. |                             |            |

| N/A                                |           |                |                          |
|------------------------------------|-----------|----------------|--------------------------|
| Result Name                        | Units     | Specifications | Test Value               |
| APPEARANCE                         |           | REPORT         | Clear, colorless liquid. |
| ANTIMONY (Sb)                      | %         | <= 0.002       | <0.002                   |
| ARSENIC (As)                       | ppm       | <= 0.5         | <0.5                     |
| ASSAY                              | w/w %     | >= 85.0        | 85.45                    |
| CALCIUM                            | %         | <= 0.002       | <0.002                   |
| CHLORIDE                           | ppm       | <= 3           | <3                       |
| COLOR                              | APHA      | <= 10          | 1                        |
| HEAVY METALS (as Pb)               | %         | <= 0.001       | <0.001                   |
| IDENTIFICATION                     | PASS/FAIL | = PASS TEST    | PASS TEST                |
| INSOLUBLE MATTER                   | %         | <= 0.001       | <0.001                   |
| IRON (Fe)                          | %         | <= 0.003       | <0.003                   |
| MAGNESIUM                          | %         | <= 0.002       | <0.002                   |
| MANGANESE (Mn)                     | ppm       | <= 0.5         | <0.5                     |
| NITRATE (NO3)                      | ppm       | <= 5           | <5                       |
| PHOSPHOROUS & HYPOPHOSPHOROUS ACID | PASS/FAIL | = PASS TEST    | PASS TEST                |
| POTASSIUM (K)                      | %         | <= 0.005       | <0.005                   |
| REACTION WITH H2SO4                | PASS/FAIL | = PASS TEST    | PASS TEST                |
| REDUCING SUBSTANCES                | PASS/FAIL | = PASS TEST    | PASS TEST                |
| SODIUM (Na)                        | %         | <= 0.025       | <0.025                   |
| SULFATE (SO4)                      | %         | <= 0.001       | <0.001                   |
| VOLATILE ACIDS                     | %         | <= 0.001       | <0.001                   |

Note: The data listed is valid for all package sizes of this lot of this product, expressed as an extension of this catalog number listed above.

## Apéndice F Certificado analítico de Trietilamina

|   |   |                       |
|---|---|-----------------------|
|  <p><b>SISCO<br/>RESEARCH<br/>LABORATORIES<br/>PVT. LTD.</b><br/>www.srlchem.com</p>                 | <h3>Certificate of Analysis</h3>  |                       |
| <b>Product</b><br><br><b>Batch No</b><br><b>Analysis Date</b><br><b>Date of Manufacture</b><br><b>Expiry Date/Re-Test Date</b><br><b>Molecular Formula</b><br><b>Molecular Weight</b> | <b>95205 - Triethylamine extrapure AR, ExiPlus,<br/>Multi-Compendial, 99.5% - [121-44-8]</b><br><br><b>8013902</b><br>28-Dec-2021<br>December 2021<br>December 2026<br>C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N<br>101.19 |                       |
| <b>Test Parameters</b>  | <b>Standards</b>  | <b>Actual Results</b> |
| ExiPlus   | meets compendial specs of USP, BP,<br>Ph Eur  | Complies              |
| Appearance (Clarity)  | Clear   | Clear                 |
| Appearance (Colour)   | Colourless  | Colourless            |
| Appearance (Form)   | Liquid  | Liquid                |
| Miscibility in Ethanol (96%)  | Clear, colourless   | Clear, colourless     |
| Assay (GC)  | min. 99.5%  | 99.90%                |
| Density (g/ml) @ 20°C   | 0.726-0.728   | 0.726                 |
| Refractive Index (20°C)   | 1.400-1.402   | 1.400                 |
| Boiling Range   | 88-90°C   | 88-90°C               |
| Non Volatile Matter   | max. 0.003%   | 0.0001%               |
| Iron (Fe)   | max. 0.0001%  | Passes                |
| Heavy Metals (Pb)   | max. 0.0001%  | Passes                |
| Copper (Cu)   | max. 0.00001%   | Passes                |
| Water (KF)  | max. 0.1%   | 0.04%                 |
| Absorbance (A) of 6% in dilute<br>H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  |   | -                     |
| @250 nm   | max. 0.04   | 0.0244                |
|   |   |                       |
| FRW82/11/295205 Rev No. 1 Date 01/11/2015   | Prepared by: SudhanPatil  |                       |
| In compliance with the standard specifications of SRL   | Plant Site 1 : D-88/2, MIDC, Turbhe - 400 705, New Mumbai, India  |                       |

## Anexo A ANOVA para Efecto matriz Placebo y solvente acetaminofén

Análisis de varianza de un factor  
EFECTO MATRIZ ACETAMINOFEN 1  
RESUMEN

| Grupos    | Cuenta | Suma       | Promedio    | Varianza   |
|-----------|--------|------------|-------------|------------|
| Columna 1 | 5      | 27712630,9 | 5542526,179 | 4,6973E+12 |
| Columna 2 | 5      | 27608175,8 | 5521635,151 | 4,7829E+12 |

### 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              | 1091087669        | 1                  | 1091087669                | 0,00023018 | 0,98826666   | 5,317655072          |
| Dentro de los grupos      | 3,79206E+13       | 8                  | 4,74007E+12               |            |              |                      |
| Total                     | 3,79217E+13       | 9                  |                           |            |              |                      |

Análisis de varianza de un factor  
EFECTO MATRIZ ACETAMINOFEN 2  
RESUMEN

| Grupos    | Cuenta | Suma       | Promedio    | Varianza   |
|-----------|--------|------------|-------------|------------|
| Columna 1 | 5      | 29701345,1 | 5940269,023 | 4,8241E+12 |
| Columna 2 | 5      | 29679838,4 | 5935967,67  | 4,6886E+12 |

### 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              | 46254089,77       | 1                  | 46254089,77               | 9,7247E-06 | 0,997588208  | 5,317655072          |
| Dentro de los grupos      | 3,80509E+13       | 8                  | 4,75636E+12               |            |              |                      |
| Total                     | 3,8051E+13        | 9                  |                           |            |              |                      |

Análisis de varianza de un factor  
EFECTO MATRIZ ACETAMINOFEN 3  
RESUMEN

| Grupos    | Cuenta | Suma       | Promedio    | Varianza   |
|-----------|--------|------------|-------------|------------|
| Columna 1 | 5      | 29245743,2 | 5849148,638 | 5,6007E+12 |
| Columna 2 | 5      | 29261650,4 | 5852330,077 | 5,6199E+12 |

### 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              | 25303882,1        | 1                  | 25303882,1                | 4,5102E-06 | 0,99835751   | 5,317655072          |
| Dentro de los grupos      | 4,4883E+13        | 8                  | 5,61034E+12               |            |              |                      |
| Total                     | 4,4883E+13        | 9                  |                           |            |              |                      |

## Anexo B ANOVA para Efecto matriz placebo y solvente ácido acetilsalicílico

Análisis de varianza de un factor  
EFFECTO MATRIZ ACIDO ACETIL SALICILICO 1  
RESUMEN

| Grupos    | Cuenta | Suma       | Promedio   | Varianza   |
|-----------|--------|------------|------------|------------|
| Columna 1 | 5      | 22565344,2 | 4513068,84 | 3,2336E+12 |
| Columna 2 | 5      | 22105964,1 | 4421192,83 | 3,1815E+12 |

### 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              | 21103002391       | 1                  | 2,1103E+10                | 0,00657915 | 0,93734544   | 5,317655072          |
| Dentro de los grupos      | 2,56604E+13       | 8                  | 3,2076E+12                |            |              |                      |
| Total                     | 2,56816E+13       | 9                  |                           |            |              |                      |

Análisis de varianza de un factor  
EFFECTO MATRIZ ACIDO ACETILSALICILICO 2  
RESUMEN

| Grupos    | Cuenta | Suma       | Promedio    | Varianza   |
|-----------|--------|------------|-------------|------------|
| Columna 1 | 5      | 23676395,8 | 4735279,161 | 2,9735E+12 |
| Columna 2 | 5      | 23736689   | 4747337,807 | 2,9387E+12 |

### 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              | 363527395         | 1                  | 363527394,6               | 0,00012297 | 0,99142368   | 5,317655072          |
| Dentro de los grupos      | 2,3649E+13        | 8                  | 2,95611E+12               |            |              |                      |
| Total                     | 2,3649E+13        | 9                  |                           |            |              |                      |

Análisis de varianza de un factor  
EFFECTO MATRIZ ACIDO ACETILSALICILICO 3  
RESUMEN

| Grupos    | Cuenta | Suma       | Promedio    | Varianza   |
|-----------|--------|------------|-------------|------------|
| Columna 1 | 5      | 24587800,7 | 4917560,136 | 3,8866E+12 |
| Columna 2 | 5      | 24177374,7 | 4835474,931 | 3,9383E+12 |

### 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              | 1,6845E+10        | 1                  | 16844952200               | 0,00430551 | 0,94929335   | 5,317655072          |
| Dentro de los gru         | 3,1299E+13        | 8                  | 3,91242E+12               |            |              |                      |
| Total                     | 3,1316E+13        | 9                  |                           |            |              |                      |

## Anexo C ANOVA para Efecto matriz placebo y solvente bromhexina

Análisis de varianza de un factor

EFFECTO MATRIZ BROMHEXINA 1

RESUMEN

| Grupos    | Cuenta | Suma        | Promedio    | Varianza   |
|-----------|--------|-------------|-------------|------------|
| Columna 1 | 5      | 6123318,874 | 1224663,775 | 1,9913E+11 |
| Columna 2 | 5      | 6237645,15  | 1247529,03  | 2,0015E+11 |

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              | 1307049738        | 1                  | 1307049738                | 0,00654699 | 0,93749841   | 5,317655072          |
| Dentro de los grupos      | 1,59713E+12       | 8                  | 1,99641E+11               |            |              |                      |
| Total                     | 1,59844E+12       | 9                  |                           |            |              |                      |

Análisis de varianza de un factor

EFFECTO MATRIZ BROMHEXINA 2

RESUMEN

| Grupos    | Cuenta | Suma       | Promedio    | Varianza   |
|-----------|--------|------------|-------------|------------|
| Columna 1 | 5      | 6880499,29 | 1376099,858 | 2,3262E+11 |
| Columna 2 | 5      | 6870954,49 | 1374190,897 | 2,2825E+11 |

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              | 9110326,43        | 1                  | 9110326,431               | 3,9535E-05 | 0,99513716   | 5,317655072          |
| Dentro de los grupos      | 1,8435E+12        | 8                  | 2,30438E+11               |            |              |                      |
| Total                     | 1,8435E+12        | 9                  |                           |            |              |                      |

Análisis de varianza de un factor

EFFECTO MATRIZ BROMHEXINA 3

RESUMEN

| Grupos    | Cuenta | Suma       | Promedio    | Varianza   |
|-----------|--------|------------|-------------|------------|
| Columna 1 | 5      | 7637628,97 | 1527525,794 | 3,9481E+11 |
| Columna 2 | 5      | 7734979,93 | 1546995,986 | 3,9248E+11 |

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              | 947720883         | 1                  | 947720882,9               | 0,00240755 | 0,96206897   | 5,317655072          |
| Dentro de los grupos      | 3,1492E+12        | 8                  | 3,93646E+11               |            |              |                      |
| Total                     | 3,1501E+12        | 9                  |                           |            |              |                      |

## Anexo D Pruebas t- Student para determinar diferencias significativas entre solvente y placebo acetaminofén

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

### ACETAMINOFÉN 1 CURVA

|  | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| Media                                  | 5521635,151       | 5542526,179       |
| Varianza                               | 4,78288E+12       | 4,69726E+12       |
| Observaciones                          | 5                 | 5                 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,999825367       |                   |
| Diferencia hipotética de las medias    | 0                 |                   |
| Grados de libertad                     | 4                 |                   |
| Estadístico t                          | -1,033729174      |                   |
| P(T<=t) una cola                       | 0,179831632       |                   |
| Valor crítico de t (una cola)          | 2,131846786       |                   |
| P(T<=t) dos colas                      | 0,359663263       |                   |
| Valor crítico de t (dos colas)         | 2,776445105       |                   |

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

### ACETAMINOFÉN 2 CURVA

|  | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| Media                                  | 5940269,023       | 5935967,67        |
| Varianza                               | 4,8241E+12        | 4,68863E+12       |
| Observaciones                          | 5                 | 5                 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,99995512        |                   |
| Diferencia hipotética de las medias    | 0                 |                   |
| Grados de libertad                     | 4                 |                   |
| Estadístico t                          | 0,257827658       |                   |
| P(T<=t) una cola                       | 0,404630666       |                   |
| Valor crítico de t (una cola)          | 2,131846786       |                   |
| P(T<=t) dos colas                      | 0,809261331       |                   |
| Valor crítico de t (dos colas)         | 2,776445105       |                   |

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

### ACETAMINOFÉN 3 CURVA

|  | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| Media                                  | 5849148,638       | 5852330,077       |
| Varianza                               | 5,60075E+12       | 5,61993E+12       |
| Observaciones                          | 5                 | 5                 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,999992447       |                   |
| Diferencia hipotética de las medias    | 0                 |                   |
| Grados de libertad                     | 4                 |                   |
| Estadístico t                          | -0,707334965      |                   |
| P(T<=t) una cola                       | 0,259195522       |                   |
| Valor crítico de t (una cola)          | 2,131846786       |                   |
| P(T<=t) dos colas                      | 0,518391044       |                   |
| Valor crítico de t (dos colas)         | 2,776445105       |                   |

## Anexo E Pruebas t- Student para determinar diferencias significativas entre solvente y placebo ácido acetilsalicílico

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

ASPIRINA 1 CURVA

|  | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| Media                                  | 4513068,835       | 4421192,827       |
| Varianza                               | 3,23359E+12       | 3,18152E+12       |
| Observaciones                          | 5                 | 5                 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,999856569       |                   |
| Diferencia hipotética de las medias    | 0                 |                   |
| Grados de libertad                     | 4                 |                   |
| Estadístico t                          | 6,107821989       |                   |
| P(T<=t) una cola                       | 0,001818417       |                   |
| Valor crítico de t (una cola)          | 2,131846786       |                   |
| P(T<=t) dos colas                      | 0,003636835       |                   |
| Valor crítico de t (dos colas)         | 2,776445105       |                   |

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

ASPIRINA 2 CURVA

|  | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| Media                                  | 4735279,161       | 4747337,807       |
| Varianza                               | 2,97353E+12       | 2,93869E+12       |
| Observaciones                          | 5                 | 5                 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,999842094       |                   |
| Diferencia hipotética de las medias    | 0                 |                   |
| Grados de libertad                     | 4                 |                   |
| Estadístico t                          | -0,837650321      |                   |
| P(T<=t) una cola                       | 0,224679552       |                   |
| Valor crítico de t (una cola)          | 2,131846786       |                   |
| P(T<=t) dos colas                      | 0,449359104       |                   |
| Valor crítico de t (dos colas)         | 2,776445105       |                   |

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

ASPIRINA 3 CURVA

|  | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| Media                                  | 4917560,136       | 4835474,931       |
| Varianza                               | 3,88655E+12       | 3,93828E+12       |
| Observaciones                          | 5                 | 5                 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,999713421       |                   |
| Diferencia hipotética de las medias    | 0                 |                   |
| Grados de libertad                     | 4                 |                   |
| Estadístico t                          | 3,736251587       |                   |
| P(T<=t) una cola                       | 0,010093377       |                   |
| Valor crítico de t (una cola)          | 2,131846786       |                   |
| P(T<=t) dos colas                      | 0,020186755       |                   |
| Valor crítico de t (dos colas)         | 2,776445105       |                   |

## Anexo F Pruebas t- Student para determinar diferencias significativas entre solvente y placebo bromhexina

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

BROMHEXINA CURVA 1

|  | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| Media                                  | 1247529,03        | 1224663,77        |
| Varianza                               | 2,00152E+11       | 1,9913E+11        |
| Observaciones                          | 5                 | 5                 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,999908798       |                   |
| Diferencia hipotética de las medias    | 0                 |                   |
| Grados de libertad                     | 4                 |                   |
| Estadístico t                          | 8,324863614       |                   |
| P(T<=t) una cola                       | 0,000568786       |                   |
| Valor crítico de t (una cola)          | 2,131846786       |                   |
| P(T<=t) dos colas                      | 0,001137573       |                   |
| Valor crítico de t (dos colas)         | 2,776445105       |                   |

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

BROMHEXINA CURVA 2

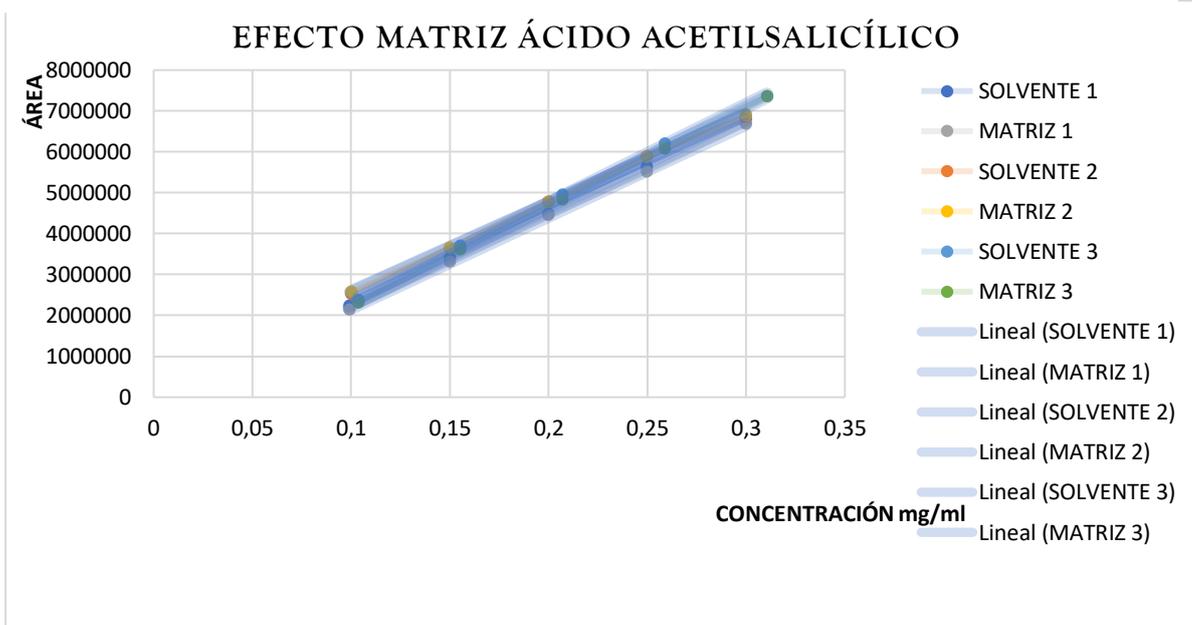
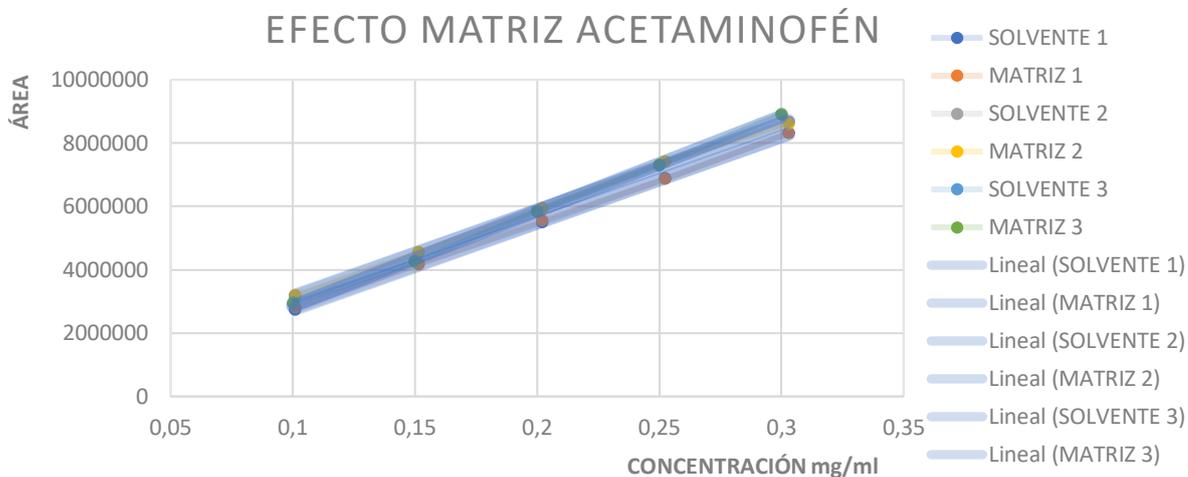
|  | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| Media                                  | 1376099,858       | 1374190,9         |
| Varianza                               | 2,32625E+11       | 2,2825E+11        |
| Observaciones                          | 5                 | 5                 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,999897009       |                   |
| Diferencia hipotética de las medias    | 0                 |                   |
| Grados de libertad                     | 4                 |                   |
| Estadístico t                          | 0,516803683       |                   |
| P(T<=t) una cola                       | 0,316276732       |                   |
| Valor crítico de t (una cola)          | 2,131846786       |                   |
| P(T<=t) dos colas                      | 0,632553465       |                   |
| Valor crítico de t (dos colas)         | 2,776445105       |                   |

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

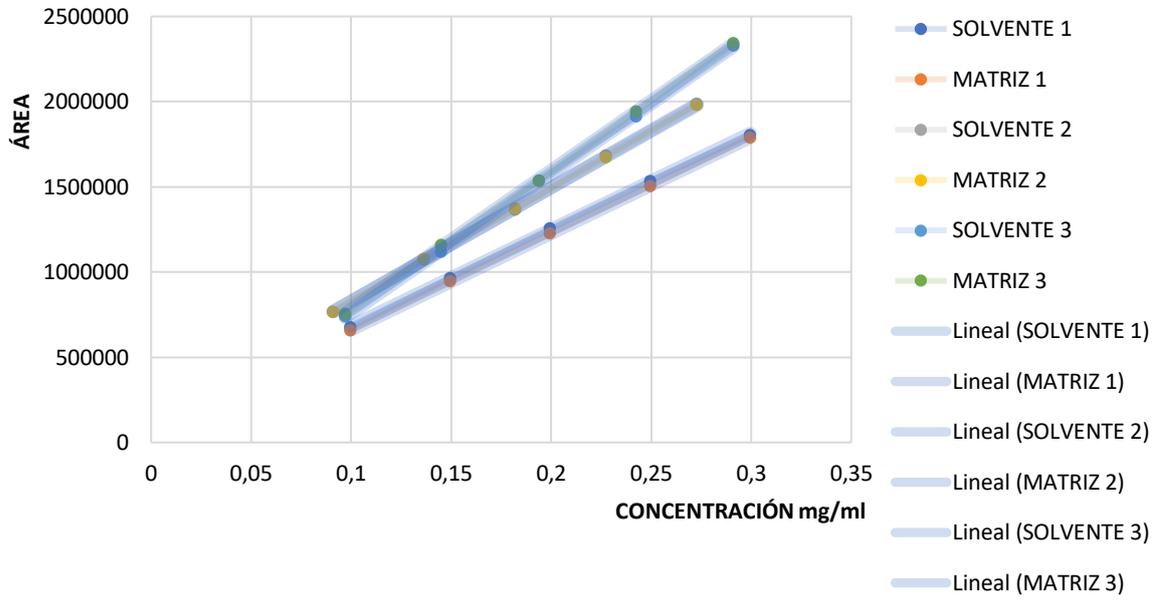
BROMHEXINA CURVA 3

|  | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|--|-------------------|-------------------|
| Media                                  | 1527525,794       | 1546995,99        |
| Varianza                               | 3,94815E+11       | 3,9248E+11        |
| Observaciones                          | 5                 | 5                 |
| Coefficiente de correlación de Pearson | 0,999613829       |                   |
| Diferencia hipotética de las medias    | 0                 |                   |
| Grados de libertad                     | 4                 |                   |
| Estadístico t                          | -2,482751335      |                   |
| P(T<=t) una cola                       | 0,03400515        |                   |
| Valor crítico de t (una cola)          | 2,131846786       |                   |
| P(T<=t) dos colas                      | 0,0680103         |                   |
| Valor crítico de t (dos colas)         | 2,776445105       |                   |

**Anexo G Imágenes de efecto matriz, acetaminofén, ácido acetil salicílico y aspirina.**



### EFFECTO MATRIZ BROMHEXINA



## Anexo H Linealidad acetaminofén

Resumen  
LINEALIDAD 1 ACETAMINOFEN

---

*Estadísticas de la regresión*

|  |            |
|--|------------|
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99979813 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99959629 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99946172 |
| Error típico                                 | 59195,8819 |
| Observaciones                                | 5          |

ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cuadrados | F          | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 2,6029E+13                   | 2,6029E+13 | 7428,144262        |
| Residuos  | 3                  | 1,0512E+10                   | 3504152433 |                    |
| Total     | 4                  | 2,604E+13                    |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| Intercepción | -361278,26    | 79419,26     | -4,549000586  | 0,019901897  | -614025,7908 | -108530,73   |
| Variable X 1 | 31954,0779    | 370,754238   | 86,18668262   | 3,44302E-06  | 30774,17241  | 33133,9833   |

Resumen  
LINEALIDAD 3 ACETAMINOFEN

---

*Estadísticas de la regresión*

|  |            |
|--|------------|
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99983498 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99966999 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99955999 |
| Error típico                                 | 53482,5923 |
| Observaciones                                | 5          |

ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cuadrados | F          | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 2,5994E+13                   | 2,5994E+13 | 9087,60476         |
| Residuos  | 3                  | 8581163032                   | 2860387677 |                    |
| Total     | 4                  | 2,6003E+13                   |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| Intercepción | -360419,274   | 71754,1114   | -5,02297731   | 0,01520012   | -588772,88   | -132065,667  |
| Variable X 1 | 31932,4171    | 334,970899   | 95,3289293    | 2,5446E-06   | 30866,3902   | 32998,444    |

Resumen  
LINEALIDAD 2 ACETAMINOFEN

---

*Estadísticas de la regresión*

|  |            |
|--|------------|
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99990623 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99981247 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99974996 |
| Error típico                                 | 40334,5972 |
| Observaciones                                | 5          |

ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cuadrados | F          | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 2,6021E+13                   | 2,6021E+13 | 15994,5956         |
| Residuos  | 3                  | 4880639191                   | 1626879730 |                    |
| Total     | 4                  | 2,6026E+13                   |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| Intercepción | -366378,309   | 54114,3426   | -6,77044737   | 0,00658447   | -538594,298  | -194162,319  |
| Variable X 1 | 31635,8629    | 250,145706   | 126,469742    | 1,09E-06     | 30839,7876   | 32431,9382   |

Resumen  
LINEALIDAD 4 ACETAMINOFEN

---

*Estadísticas de la regresión*

|  |            |
|--|------------|
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99984955 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99969912 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99959882 |
| Error típico                                 | 51389,7422 |
| Observaciones                                | 5          |

ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cuadrados | F          | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 2,6324E+13                   | 2,6324E+13 | 9967,68905         |
| Residuos  | 3                  | 7922716812                   | 2640905604 |                    |
| Total     | 4                  | 2,6332E+13                   |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| Intercepción | -408073,628   | 68946,2707   | -5,91871937   | 0,00963529   | -627491,432  | -188655,823  |
| Variable X 1 | 32134,2604    | 321,86301    | 99,8383146    | 2,2152E-06   | 31109,94869  | 33158,5722   |

Resumen  
LINEALIDAD 5 ACETAMINOFEN

---

*Estadísticas de la regresión*

|  |             |
|--|-------------|
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,999792903 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,999585848 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,999447798 |
| Error típico                                 | 60014,24384 |
| Observaciones                                | 5           |

ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cuadrados | F          | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 2,6079E+13                   | 2,6079E+13 | 7240,723599        |
| Residuos  | 3                  | 10805128393                  | 3601709464 |                    |
| Total     | 4                  | 2,60898E+13                  |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| Intercepción | -383034,134   | 80517,20293  | -4,757171388  | 0,017632666  | -639275,809  |
| Variable X 1 | 31984,52847   | 375,8797833  | 85,09244149   | 3,57752E-06  | 30788,31124  |

## Anexo I Linealidad ácido acetilsalicílico

Resumen

### LINEALIDAD 1 ACIDO ACETILSALICILICO

#### Estadísticas de la regresión

|  |            |
|--|------------|
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99964036 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99928085 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99904114 |
| Error típico                                 | 68178,3876 |
| Observaciones                                | 5          |

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cua | F          | valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 1,9377E+13             | 1,9377E+13 | 4168,61738         |
| Residuos  | 3                  | 1,3945E+10             | 4648292542 | 8,1867E-06         |
| Total     | 4                  | 1,9391E+13             |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|
| Intercepción | -378613,211   | 91470,9056   | -4,13916544   | 0,02560071                | -669714,457  |
| Variable X 1 | 27868,093     | 431,629614   | 64,5648309    | 8,1867E-06                | 26494,4549   |

Resumen

### LINEALIDAD ACIDO ACETILSALICILICO 2

#### Estadísticas de la regresión

|  |            |
|--|------------|
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99967677 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99935365 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,9991382  |
| Error típico                                 | 63998,2035 |
| Observaciones                                | 5          |

Resumen

### LINEALIDAD ACIDO ACETILSALICILICO 3

#### Estadísticas de la regresión

|  |            |
|--|------------|
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99965547 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99931105 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,9990814  |
| Error típico                                 | 66231,1594 |
| Observaciones                                | 5          |

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cua | F          | valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 1,8998E+13             | 1,8998E+13 | 4638,42697         |
| Residuos  | 3                  | 1,2287E+10             | 4095770046 | 6,9755E-06         |
| Total     | 4                  | 1,901E+13              |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|
| Intercepción | -331618,129   | 85862,6      | -3,86219529   | 0,03068761                | -604871,243  |
| Variable X 1 | 27594,1901    | 405,165344   | 68,105998     | 6,9755E-06                | 26304,7731   |

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cua | F          | valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 1,9088E+13             | 1,9088E+13 | 4351,47461         |
| Residuos  | 3                  | 1,316E+10              | 4386566475 | 7,6764E-06         |
| Total     | 4                  | 1,9101E+13             |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|
| Intercepción | -335761,354   | 88858,4248   | -3,77861025   | 0,03247423                | -618548,52   |
| Variable X 1 | 27659,5488    | 419,301933   | 65,9657079    | 7,6764E-06                | 26325,143    |

Resumen

### LINEALIDAD ACIDO ACETILSALICILICO 4

#### Estadísticas de la regresión

|  |            |
|--|------------|
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99979254 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99958512 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99944682 |
| Error típico                                 | 51636,398  |
| Observaciones                                | 5          |

Resumen

### LINEALIDAD ACIDO ACETILSALICILICO 5

#### Estadísticas de la regresión

|  |            |
|--|------------|
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,9995133  |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99902683 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99870245 |
| Error típico                                 | 78854,8046 |
| Observaciones                                | 5          |

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cua | F          | valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 1,9272E+13             | 1,9272E+13 | 7227,98005         |
| Residuos  | 3                  | 7998952794             | 2666317598 | 3,587E-06          |
| Total     | 4                  | 1,928E+13              |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|
| Intercepción | -374912,008   | 69277,4976   | -5,41174293   | 0,01237354                | -595383,925  |
| Variable X 1 | 27792,5835    | 326,90416    | 85,0175279    | 3,587E-06                 | 26752,2286   |

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cua | F          | valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 1,915E+13              | 1,915E+13  | 3079,72451         |
| Residuos  | 3                  | 1,8654E+10             | 6218080207 | 1,2888E-05         |
| Total     | 4                  | 1,9169E+13             |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|
| Intercepción | -345292,465   | 105794,822   | -3,26379362   | 0,04699668                | -681978,806  |
| Variable X 1 | 27704,3906    | 499,220795   | 55,4952657    | 1,2888E-05                | 26115,6473   |

# Anexo J Linealidad bromhexina

## Resumen

| LINEALIDAD BROMHEXINA 1                      |            |
|--|------------|
| Estadísticas de la regresión                 |            |
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99995136 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99990273 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99987031 |
| Error típico                                 | 7296,83396 |
| Observaciones                                | 5          |

## ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cua | F          | valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 1,642E+12              | 1,642E+12  | 30839,5927         |
| Residuos  | 3                  | 159731358              | 53243785,9 | 4,0715E-07         |
| Total     | 4                  | 1,6422E+12             |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|
| Intercepción | -80522,4448   | 9781,88613   | -8,23179127   | 0,00375304                | -111652,772  |
| Variable X 1 | 8110,84381    | 46,1861457   | 175,612052    | 4,0715E-07                | 7963,85888   |

## Resumen

| LINEALIDAD BROMHEXINA 2                      |            |
|--|------------|
| Estadísticas de la regresión                 |            |
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99982885 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99965773 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99954364 |
| Error típico                                 | 13663,5984 |
| Observaciones                                | 5          |

## ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cua | F          | valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 1,6358E+12             | 1,6358E+12 | 8761,97552         |
| Residuos  | 3                  | 560081760              | 186693920  | 2,6878E-06         |
| Total     | 4                  | 1,6364E+12             |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|
| Intercepción | -78429,569    | 18316,9528   | -4,28180221   | 0,02340287                | -136722,288  |
| Variable X 1 | 8095,49413    | 86,4853096   | 93,6054246    | 2,6878E-06                | 7820,25927   |

## Resumen

| LINEALIDAD BROMHEXINA 3                      |            |
|--|------------|
| Estadísticas de la regresión                 |            |
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,9999306  |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99986121 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99981494 |
| Error típico                                 | 8763,71232 |
| Observaciones                                | 5          |

## ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cua | F          | valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 1,6598E+12             | 1,6598E+12 | 21611,7386         |
| Residuos  | 3                  | 230407961              | 76802653,7 | 6,9401E-07         |
| Total     | 4                  | 1,6601E+12             |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|
| Intercepción | -87098,7065   | 11748,3331   | -7,41370761   | 0,00507722                | -124487,146  |
| Variable X 1 | 8154,74196    | 55,4709202   | 147,009315    | 6,9401E-07                | 7978,20874   |

## Resumen

| LINEALIDAD BROMHEXINA 4                      |             |
|--|-------------|
| Estadísticas de la regresión                 |             |
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,999836023 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,999672074 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,999562765 |
| Error típico                                 | 13351,72346 |
| Observaciones                                | 5           |

## ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cua | F          | valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 1,6303E+12             | 1,6303E+12 | 9145,39186         |
| Residuos  | 3                  | 534805558              | 178268519  | 2,5206E-06         |
| Total     | 4                  | 1,6309E+12             |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|
| Intercepción | -77485,77858  | 17898,864    | -4,32908919   | 0,02272834                | -134447,952  |
| Variable X 1 | 8081,942294   | 84,5112618   | 95,6315422    | 2,5206E-06                | 7812,98974   |

## Resumen

| LINEALIDAD BROMHEXINA 5                      |            |
|--|------------|
| Estadísticas de la regresión                 |            |
| Coefficiente de correlación múltiple         | 0,99988901 |
| Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> | 0,99977603 |
| R <sup>2</sup> ajustado                      | 0,99970137 |
| Error típico                                 | 11126,6397 |
| Observaciones                                | 5          |

## ANÁLISIS DE VARIANZA

|           | Grados de libertad | de cuadrado de los cua | F          | valor crítico de F |
|-----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1                  | 1,6579E+12             | 1,6579E+12 | 13391,5735         |
| Residuos  | 3                  | 371406336              | 123802112  | 1,4227E-06         |
| Total     | 4                  | 1,6583E+12             |            |                    |

|              | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|
| Intercepción | -82594,1475   | 14915,9928   | -5,53728797   | 0,01160918                | -130063,494  |
| Variable X 1 | 8149,99024    | 70,4273397   | 115,721966    | 1,4227E-06                | 7925,85902   |