

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y
BIOQUIMICAS**

**INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE
DIAGNOSTICO E INVESTIGACION EN SALUD**



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA LA VALORACIÓN SIMULTÁNEA DE
TREMENTINA, ALCANFOR, MENTOL Y SALICILATO
DE METILO EN EMULSIÓN TOPICA POR
CROMATOGRFÍA GASEOSA**

**Trabajo de grado presentada para la obtención del Título de Especialista en Análisis
Fármaco – Químicos**

MENCIÓN: Control de Calidad de Medicamentos y Bioequivalencia

POR: LIC. ROSA BEATRIZ CALLISAYA MAMANI

TUTORA: MYRIAM LINA TRIGO ORSINI M.Sc.

**SEDE: LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS
Y BIODISPONIBILIDAD DEL INSTITUTO SELADIS**

LA PAZ – BOLIVIA

JULIO, 2024

DEDICATORIA

Únicamente a Dios con mucho amor y gratitud por darme la fuerza necesaria para lograr mis objetivos, por mantenerme constante y por formar parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y guiar mis pasos cada día.

A mis padres Natividad y Norberto, hermanos Ana y Wilmer por su amor y apoyo incondicional.

Al Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, Dr. Walter Montaña Pérez y a la Vicedecana, Dra. Carolina Montenegro Reynaga, por dar esta gran oportunidad, mediante becas de especialidad a profesionales que continúan el camino de potenciar sus conocimientos en aquello que más aman hacer dentro de su profesión

A la Dra. Teresa Rescala Nemtala Doctor Honoris y Docente Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés por brindarme todo su apoyo incondicional.

A mis Profesores y amigos: Dra. Donatella Boschi y Marta Giorgis de la Universidad de Turín, por motivarme a seguir creciendo académicamente y enseñarme que “La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica” y a todo el equipo de MEDSynth: Ileana incondicional amiga, Federico, Alessia Priotto, Samuele Tarallo, Rebecca Grano, Matteo Crudo, Noemi Vilella quienes me apoyaron y me incentivaron a seguir creciendo.

TABLA DE CONTENIDO

A. INTRODUCCIÓN	1
B. ANTECEDENTES	2
C. JUSTIFICACIÓN	3
D. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
E. MARCO TEÓRICO	7
1. Analgésico de uso Tópico	7
2. Dolor	9
2.1. Fisiología del Dolor	9
2.2. Analgésico antitérmico y antiinflamatorios no esteroideos (AINE)	10
2.3. Anestésico	11
2.4. Principios activos estudiados	11
3. Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)	18
4. Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)	18
5. Desarrollo de metodologías analíticas	18
5.1. Enfoque mínimo contra enfoque mejorado en el desarrollo de procedimientos analíticos según la ICH Q14 (2022)	19
5.2. Desarrollo de un método analítico por Cromatografía Gaseosa	21
6. Validación	23
6.1. Validación de metodologías analíticas	23
6.2. Características de procedimientos analíticos	24
6.3. Datos requeridos para la validación	28

7. Cromatografía de Gases	30
7.1. Gas Carrier/Gas Portador	31
7.2. Fase Estacionaria Sólida	32
7.3. Columna cromatográfica.....	32
7.4. Interpretación de cromatograma	33
7.5. Aptitud o idoneidad del sistema.....	34
F. OBJETIVOS.....	35
1. Objetivo General	35
2. Objetivos Específicos.....	35
G. DISEÑO METODOLÓGICO.....	36
1. Diseño de Estudio	36
1.1. Tipo de Estudio	36
1.2. Población en Estudio.....	36
2. Descripción de la Población.....	36
2.1. Tamaño de Muestra.....	36
2.2. Contexto y Lugar	37
2.3. Financiamiento.....	37
3. Materiales y Métodos.....	37
3.1. Análisis Estadístico de Datos.....	37
3.2. Materiales, Reactivos y Equipos.....	42
3.3. Estándares de Trabajo	44
3.4. Matriz.....	44

3.5. Desarrollo Experimental	44
H. RESULTADOS	49
I. DISCUSIÓN	111
J. CONCLUSIONES.....	120
K. RECOMENDACIONES	124
L. BIBLIOGRAFÍA	125
M. ANEXOS.....	129

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Estructura del Alcanfor</i>	13
Figura 2 <i>Estructura del Mentol</i>	14
Figura 3 <i>Estructura del Salicilato de metilo</i>	16
Figura 4 <i>Diseño y evaluación del estudio de validación.</i>	22
Figura 5 <i>Cromatógrafo de Gases (GC)</i>	31
Figura 6 <i>Separación Cromatográfica de dos Sustancias</i>	33
Figura 7 <i>Estabilidad de los principios activos</i>	52
Figura 8 <i>Calculo del volumen de expansión</i>	55
Figura 9 <i>Cromatograma para Trementina</i>	58
Figura 10 <i>Cromatograma para el Alcanfor</i>	58
Figura 11 <i>Cromatograma para el Mentol</i>	59
Figura 12 <i>Cromatograma para el Salicilato de metilo</i>	59
Figura 13 <i>Relación de la concentración y la respuesta analítica de la Trementina</i>	67
Figura 14 <i>Relación de la concentración y la respuesta analítica del Alcanfor</i>	68
Figura 15 <i>Relación de la concentración y la respuesta analítica del Mentol</i>	69
Figura 16 <i>Relación de la concentración y la respuesta analítica de Salicilato de metilo</i>	71
Figura 17 <i>Cromatograma con resolución de picos</i>	73
Figura 18 <i>Linealidad instrumental para Trementina</i>	77
Figura 19 <i>Hipérbolas de confianza para la Trementina</i>	77
Figura 20 <i>Linealidad instrumental para Alcanfor</i>	79
Figura 21 <i>Hipérbolas de confianza para Alcanfor</i>	80
Figura 22 <i>Linealidad instrumental para Mentol</i>	81
Figure 23 <i>Hipérbolas de confianza para Mentol</i>	82
Figura 24 <i>Linealidad instrumental del Salicilato de Metilo</i>	84
Figura 25 <i>Hipérbolas de confianza para Salicilato de Metilo</i>	84
Figure 26 <i>Linealidad del método para Trementina</i>	86

Figure 27 <i>Hipérbolas de confianza para la Trementina</i>	86
Figura 28 <i>Linealidad del método para Alcanfor</i>	88
Figura 29 <i>Hipérbolas de confianza para Alcanfor</i>	88
Figura 30 <i>Linealidad del método para Mentol</i>	90
Figura 31 <i>Hipérbolas de confianza para Mentol</i>	90
Figura 32 <i>Linealidad del método para Salicilato de Metilo</i>	92
Figure 33 <i>Hipérbolas de confianza para Salicilato de Metilo</i>	92
Figura 34 <i>Gráfica de distribución normal para Trementina (principio activo + matriz): Anderson y Darling</i>	105
Figura 35 <i>Gráfica de distribución normal para Trementina (principio activo): Anderson y Darling</i>	106
Figura 36 <i>Gráfica de distribución normal para Alcanfor (principio activo + matriz): Anderson y Darling</i>	106
Figura 37 <i>Gráfica de distribución normal para Alcanfor (principio activo): Anderson y Darling</i>	106
Figura 38 <i>Gráfica de distribución normal para Mentol (principio activo + matriz): Anderson y Darling</i>	107
Figura 39 <i>Gráfica de distribución normal para Mentol (principio activo): Anderson y Darling</i>	107
Figure 40 <i>Gráfica de distribución normal para Salicilato de metilo (principio activo + matriz): Anderson y Darling</i>	107
Figure 41 <i>Gráfica de distribución normal para Salicilato de metilo (principio activo): Anderson y Darling</i>	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Propiedades Fisicoquímicas del Alcanfor</i>	13
Tabla 2 <i>Propiedades Fisicoquímicas del Mentol</i>	15
Tabla 3 <i>Propiedades Fisicoquímicas del Salicilato de metilo</i>	16
Tabla 4 <i>Estructura y propiedades fisicoquímicas de la trementina</i>	17
Tabla 5 <i>Datos requeridos para la validación</i>	29
Tabla 6 <i>Pruebas de solubilidad</i>	50
Tabla 7 <i>Elección del diluyente y del método de disolución de muestra</i>	51
Tabla 8 <i>Estabilidad de Principios activos</i>	52
Tabla 9 <i>Compatibilidad de filtro jeringa</i>	53
Tabla 10 <i>Tipo de inyector (Split)</i>	53
Tabla 11 <i>Tipo de liner</i>	54
Tabla 12 <i>Volumen de expansión</i>	55
Tabla 13 <i>Tipo de inyección (Standard)</i>	56
Tabla 14 <i>Velocidad de embolo (6000 uL/min)</i>	56
Tabla 15 <i>Concentración de los principios activos</i>	57
Tabla 16 <i>Orden de elución de los principios activos</i>	57
Tabla 17 <i>Repetibilidad en tiempos de retención y áreas</i>	60
Tabla 18 <i>Temperatura de Horno (columna) a 150, 140, 130 y 120°C</i>	61
Tabla 19 <i>Determinación inequívoca del principio activo</i>	62
Tabla 20 <i>Evaluación del porcentaje de recuperación de Trementina</i>	63
Tabla 21 <i>Evaluación del porcentaje de recuperación de Alcanfor</i>	63
Tabla 22 <i>Evaluación del porcentaje de recuperación de Mentol</i>	64
Tabla 23 <i>Evaluación del porcentaje de recuperación de Salicilato de metilo</i>	65
Tabla 24 <i>Evaluación de la relación de la concentración y la respuesta analítica de la Trementina</i>	66
Tabla 25 <i>Evaluación de la relación de la concentración y la respuesta analítica del Alcanfor</i>	67

Tabla 26 <i>Evaluación de la relación de la concentración y la respuesta analítica del Mentol</i>	68
Tabla 27 <i>Evaluación de la relación de la concentración y la respuesta analítica del Salicilato de metilo</i>	70
Tabla 28 <i>Evaluación de la aptitud del sistema</i>	71
Tabla 29 <i>Linealidad instrumental para Trementina</i>	76
Tabla 30 <i>Linealidad instrumental para Alcanfor</i>	78
Tabla 31 <i>Linealidad instrumental para Mentol</i>	80
Tabla 32 <i>Linealidad instrumental del Salicilato de Metilo</i>	83
Tabla 33 <i>Linealidad del método para Trementina</i>	85
Tabla 34 <i>Linealidad del método para Alcanfor</i>	87
Tabla 35 <i>Linealidad del método para Mentol</i>	89
Tabla 36 <i>Linealidad del método para Salicilato de Metilo</i>	91
Tabla 37 <i>Repetibilidad instrumental</i>	93
Tabla 38 <i>Repetibilidad del método para Trementina</i>	93
Tabla 39 <i>Repetibilidad del método para Alcanfor</i>	94
Tabla 40 <i>Repetibilidad del método para Mentol</i>	95
Tabla 41 <i>Repetibilidad del método para Salicilato de metilo</i>	96
Tabla 42 <i>Precisión intermedia para la Trementina</i>	97
Tabla 43 <i>Precisión intermedia para el Alcanfor</i>	98
Tabla 44 <i>Precisión intermedia para el Mentol</i>	99
Tabla 45 <i>Precisión intermedia para el Salicilato de metilo</i>	99
Tabla 46 <i>Exactitud para Trementina</i>	101
Tabla 47 <i>Exactitud para el Alcanfor</i>	102
Tabla 48 <i>Exactitud para el Mentol</i>	103
Tabla 49 <i>Exactitud para el Salicilato de metilo</i>	104
Tabla 50 <i>Especificidad del método</i>	105
Tabla 51 <i>Límite de detección y cuantificación para Trementina</i>	108

Tabla 52 <i>Límite de detección y cuantificación para Alcanfor</i>	109
Tabla 53 <i>Límite de detección y cuantificación para Mentol</i>	110
Tabla 54 <i>Límite de detección y cuantificación para el Salicilato de metilo</i>	110

INDICE DE ANEXOS

Anexos 1 <i>Evaluación De Temperatura De Horno</i>	129
Anexos 2 <i>Carátula del procedimiento operativo estandarizado</i>	131
Anexos 3 <i>Datos primarios para el Desarrollo y validación del Método Analítico</i>	132

RESUMEN

La Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo en emulsión tópica por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y rubefacientes, ha sido considerado un medicamento de venta libre, recomendada para el tratamiento y alivio del dolor muscular, motivo por el cual existe una alta demanda en ventas obligando a las industrias farmacéuticas e importadoras a realizar la fabricación e ingreso de este tipo de medicamentos, la AGEMED agencia estatal de medicamentos en Bolivia, exige a las industrias e importadoras la certificación del control de calidad de los principios activos, siendo necesario el desarrollo y validación de una metodología para verificar la calidad del fármaco ya que no se cuenta con una metodología oficial USP.

Se desarrolló y validó un método por cromatografía gaseosa para la valoración simultánea de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo, por cromatografía gaseosa (GC).

Las condiciones óptimas de separación se lograron con una columna HP-5, Longitud: 30 m, Diámetro: 0.320 mm, Película: 0,25 μm .; Helio como gas transportador, detector de ionización a llama (FID); Temperaturas de trabajo de inyector 260°C, detector 240°C y Columna 120°C; Volumen de inyección 1 μL y tipo de inyección (Split), los tiempos de retención para cada principio activo son los siguientes: 0,965 min para Trementina; 1.497 min para Alcanfor; 1,603 para Mentol y 1,744 para Salicilato de metilo.

La metodología validada presento linealidad en el intervalo de concentración de 1,6 mg/mL a 2,4 mg/mL para Trementina; 0,8 mg/mL a 1,2 mg/mL para Alcanfor; 1,6 mg/mL a 2,4 mg/mL para Mentol y 2,4 mg/mL a 3,6 mg/mL para Salicilato de metilo, con un coeficiente de determinación superior a 0.997.

En el análisis del principio activo más matriz se demostró como el método propuesto es capaz de determinar las cantidades de principios activos a diferentes concentraciones dentro del rango de la linealidad.

Palabras clave: *trementina, alcanfor, mentol y salicilato de metilo.*

SUMMARY

Turpentine, Camphor, Menthol and Methyl Salicylate in topical emulsion due to its anti-inflammatory, analgesic and rubefacient properties, has been considered an over-the-counter medication, recommended for the treatment and relief of muscle pain, which is why there is a high demand in sales forcing to the pharmaceutical and importing industries to carry out the manufacture and entry of this type of medicines, the state medicines agency AGEMED in Bolivia, requires the industries and importers to certify the quality control of the active ingredients, being necessary the development and validation of a methodology to verify the quality of the drug since there is no official USP methodology.

A gas chromatography method was developed and validated for the simultaneous assessment of Turpentine, Camphor, Menthol and Methyl Salicylate, by gas chromatography (GC).

The optimal separation conditions were achieved with an HP-5 column, Length: 30 m, Diameter: 0.320 mm, Film: 0.25 μm .; Helium as carrier gas, flame ionization detector (FID); Working temperatures of injector 260°C, detector 240°C and Column 120°C; Injection volume 1 μL and injection type (Split), the retention times for each active ingredient are as follows: 0.965 min for Turpentine; 1,497 min to Camphor; 1,603 for Menthol and 1,744 for Methyl Salicylate.

The validated methodology presented linearity in the concentration range from 1.6 mg/mL to 2.4 mg/mL for Turpentine; 0.8 mg/mL to 1.2 mg/mL for Camphor; 1.6 mg/mL to 2.4 mg/mL for Menthol and 2.4 mg/mL to 3.6 mg/mL for Methyl Salicylate, with a coefficient of determination greater than 0.997.

In the analysis of the active ingredient plus matrix, it was demonstrated how the proposed method is capable of determining the amounts of active ingredients at different concentrations within the range of linearity.

Keywords: *turpentine, camphor, menthol and methyl salicylate*

A. INTRODUCCIÓN

Diversos tratamientos y terapias con medicamentos combinados se han desarrollado con productos que se utilizaron originalmente como terapias independientes para controlar más rápidamente y de mejor forma las enfermedades. Para el químico analítico, esto presenta un gran desafío. Muchas veces los componentes de estos medicamentos combinados tienen diferencias significativas en sus propiedades físicas (solubilidad, punto de fusión, volatilidad, termorresistencia etc.) y químicas (máximo de absorción UV, estabilidad en los disolventes etc.), esto requiere el desarrollo de métodos analíticos que permitan el análisis simultáneo de las formulaciones multicomponentes (Fonseca Gola et al., 2020).

El medicamento en estudio contiene una combinación de cuatro principios activos, Trementina (antiinflamatorio), Alcanfor (anestésico), Mentol (analgésico) y Salicilato de metilo (rubefaciente y analgésico local) en emulsión tópica. Este tipo de medicamento analgésico local (tópico) es producido por la industria farmacéutica la cual debe cumplir con normativas en: Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), así como el control de calidad del producto fabricado, para asegurar un medicamento confiable, estable y seguro.

Los cuatro principios activos presentan características particulares de termorresistencia, lo cual hace posible que el análisis por Cromatografía Gaseosa (GC) sea una opción para su valoración en producto final tomando en cuenta que la GC presenta ventajas sobre los métodos tradicionales. Sin embargo, no se cuentan con una metodología específica para la valoración simultánea de los cuatro principios activos dentro de la forma farmacéutica presentada, lo cual hace interesante el estudio para el Desarrollo y Validación de una metodología.

En este sentido el presente trabajo plantea desarrollar y validar una técnica analítica con tiempos de análisis rápidos con la separación de cuatro principios activos obteniendo una alta resolución y ejecución de análisis con facilidad y exactitud.

B. ANTECEDENTES

La Ley del medicamento en su artículo 17 indica que mientras se elabore y apruebe la Farmacopea Nacional, el Estado Boliviano adopta la Farmacopea Internacional de la Organización Mundial de la Salud, Farmacopea Norteamericana (USP), Farmacopea Británica (BP) y Farmacopea de la Unión Europea para el análisis de productos farmacéuticos terminados (Ley del medicamento, 1996).

La USP 42 (Farmacopea de los Estados Unidos)-NF 37 (Formulario Nacional), no describe un método específico para la valoración de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo en emulsión tópica, si bien existe la valoración individual de cada compuesto (USP 42, 2019), no se cuenta por el momento con la documentación que respalde el análisis para la valoración simultánea de estos cuatro principios activos.

La Farmacopea Argentina en su séptima edición, la Farmacopea Británica (2020), la Real Farmacopea Española (2015), la farmacopea Internacional de Organización Mundial de la Salud (2020) y la Farmacopea Europea (2016) no brindan información acerca de la valoración simultánea de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo.

Existen pocos estudios respecto al desarrollo y validación de métodos para la cuantificación por Cromatografía Gaseosa (GC) de algunos de los principios activos en estudio. El desarrollo y validación de un método analítico para la valoración de mentol, salicilato de metilo, timol y ácido benzoico en solución antiséptica por GC fue publicado en la revista colombiana de ciencias farmacéuticas vol.49 (Fonseca Gola et al., 2020), desarrollada en la Universidad de la Habana, pero no existen publicaciones nacionales respecto al estudio planteado.

Actualmente el Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos y Biodisponibilidad-SELADIS, responde a la alta demanda de análisis que es solicitado por la industria farmacéutica, hacia fármacos compuestos por uno a tres principios activos que requieren un método por Cromatografía Gaseosa para su valoración en materia prima o producto terminado, sin embargo, a la fecha no se cuenta con un método oficial para la valoración

simultánea de un fármaco en emulsión tópica compuesta por cuatro principios activos: Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo.

C. JUSTIFICACIÓN

Los analgésicos frotados sobre la piel se llaman analgésicos tópicos (locales) que a nivel nacional se encuentran distribuidos en las farmacias en sus diferentes presentaciones como pomadas, cremas y emulsiones, estos medicamentos son uno de los grupos farmacológicos más utilizados en la automedicación al ser en su mayoría medicamentos de venta libre para calmar el dolor, generando así una mayor demanda en venta de analgésicos tópicos.

A nivel Nacional existen considerables debates entre los consumidores sobre si funcionan y cómo funcionan los analgésicos locales, además el ingreso y comercialización de medicamentos de contrabando al país ha hecho más dudoso y peligroso el consumo de estos medicamentos, para ello la Agencia Estatal de Medicamentos y Tecnologías en Salud (AGEMED) responde a estas demandas, mediante la exigencia a las importadoras e industrias farmacéuticas la certificación del control de calidad de medicamentos donde se demuestre la calidad y efectividad de los principios activos declarados en la formula cuali-cuantitativa.

La industria farmacéutica que se encarga de la fabricación de medicamentos de fricción penetrante para calmar el dolor en diferentes formas farmacéuticas debe demostrar que el producto cumple con los criterios de calidad según normativas vigentes como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). El laboratorio de control de calidad es el encargado de comprobar la calidad de los medicamentos, para ello se deben utilizar métodos establecidos en las farmacopeas oficiales en Bolivia, sino se cuenta con métodos oficiales, el laboratorio de control de calidad es el encargado del desarrollo y validación del método analítico. De acuerdo con los requisitos legales descritos en el Informe 44 de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) de la OMS, Anexo 1, establece que los métodos analíticos deben ser adecuados para su uso previsto y esto debe atestiguararse mediante la validación.

El Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos y Biodisponibilidad perteneciente al Instituto SELADIS, ofrece servicios a la industria farmacéutica en la cuantificación de principios activos en diferentes formas farmacéuticas, para ello, el laboratorio cuenta con métodos desarrollados y validados. Se conoce la existencia de medicamentos de fricción penetrante para calmar el dolor que combinan diferentes principios activos para mejorar su efecto farmacológico como Salicilato de metilo, Alcanfor, Mentol, Trementina en emulsión tópica y se evidenció que no existe un método oficial para la cuantificación simultánea de estos cuatro principios activos.

La importancia de contar con un método validado para la valoración simultánea por Cromatografía Gaseosa de un medicamento, conformado por cuatro principios activos en su forma farmacéutica emulsión tópica, es la obtención un método preciso, exacto y reproducible con errores relativos menores al 2%, sin contar que la principal ventaja al tratarse de un método simultáneo es la separación de los cuatro principios activos cumpliendo con los principales parámetros cromatográficos (resolución, simetría y platos teóricos), optimizando así el tiempo de trabajo, disminuyendo el costo de análisis, debido a que la utilización de varios métodos para la valoración de los principios activos ocasionaría el aumento de costo y tiempo de análisis.

Éste y otros puntos señalados anteriormente nos conducen a realizar este trabajo, ya que con los resultados obtenidos se podrá realizar el control de calidad para la valoración simultánea de Alcanfor, Mentol, Trementina y Salicilato de metilo en una emulsión tópica, medicamento que es comercializado por las importadoras y fabricado por la industria farmacéutica, verificando de esta manera el cumplimiento de los requisitos de calidad del medicamento.

D. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cada año se realizan millones de análisis de cualquier tipo en todo el mundo y se toman millones de decisiones basadas en esos análisis; ¿Tienen los medicamentos, la cantidad de droga reportada en su envase?, esta pregunta se responde a frases del empleo de análisis químico confiable, reproducible y de calidad. Prácticamente todos los aspectos de la sociedad están respaldados de alguna manera por mediciones analíticas; en consecuencia, es necesario que estos análisis sean confiables (Bernal, 2014).

Por ello, varias agencias como la Conferencia Internacional para la Armonización (ICH), la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Organización Internacional de Normalización (ISO /IEC), la Organización Mundial de la Salud (OMS), garantizan la validez y fiabilidad de los estudios mediante la exigencia del cumplimiento de guías, normativas y requisitos como: ICH Q2-Validación de procedimientos Analíticos, Monografías sobre métodos oficiales-USP, ISO/IEC 17025- Competencia para Laboratorios de medición, Informes 44 de la OMS anexo 1.

La demanda de medicamentos para el alivio de dolores musculares en Bolivia obliga a las diferentes industrias farmacéuticas a producir cantidades considerables de medicamentos, realizando diferentes combinaciones de principios activos de alta calidad de acuerdo con la normativa vigente en Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Buenas Practicas de Laboratorio (BPL), para posteriormente ser comercializados en las farmacéuticas.

La Ley del Medicamento en Bolivia indica en su Artículo 3 que se debe: Garantizar medicamentos que tengan calidad y eficacia comprobada, preservando que la relación beneficio-riesgo sea favorable a la salud y que sean accesibles a todos los habitantes del país. Establecer un universo racional de medicamentos de costo beneficio favorable para la comunidad, acorde con las necesidades de patologías prevalentes en el país. (Ley del Medicamentos, 1996). Con la finalidad de cumplir la ley, los laboratorios de control de calidad de medicamentos son los responsables de analizar los productos farmacéuticos y verificar su calidad.

Para verificar la Calidad del fármaco, se deben realizar diversas pruebas físico químicas y microbiológicas antes de su comercialización. Las pruebas que se encuentran descritas en la USP o en cualquier otra farmacopea reconocida en nuestro país, se denominan “Métodos analíticos oficiales”, cuya implementación requiere solo un control de aptitud para su posterior aplicación. Pero existen productos farmacéuticos cuyos métodos de análisis no son descritos en la USP u otra farmacopea, en tal caso deben desarrollarse métodos llamados "informales" que deben validarse antes de su uso y/o aplicación para la cuantificación de uno o varios principios activos.

La USP 42 - NF 37 y otras farmacopeas reconocidas en Bolivia no cuentan con una monografía específica para la valoración simultánea de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo en emulsión tópica, pero podemos encontrar monografías para la valoración de algunos principios activos por separado como: Mentol, Alcanfor y Salicilato de metilo y no así de la Trementina, aunque los mismos podrían ser cuantificados de manera individual ninguna de las monografías es aplicable para la valoración en emulsión tópica como medicamento.

Por todo lo descrito la calidad de los productos farmacéuticos es un factor de suma importancia para asegurar el pronto restablecimiento de la salud de los individuos, por lo cual es necesario desarrollar y validar un método para garantizar la calidad del medicamento.

E. MARCO TEÓRICO

1. Analgésico de uso Tópico

Por definición, las formulaciones tópicas son las que, cuando se aplican en la proximidad del área afectada, ejercen una acción analgésica, estando asociada al aumento de la concentración en el tejido diana y a la reducida concentración sérica.

Desde la antigüedad, la administración de medicamentos por vía tópica ha sido realizada por médicos griegos, chinos, egipcios y romanos, que utilizaban pastas y cataplasmas a base de plantas como remedio para la curación de diversas dolencias.

En la actualidad, la medicina tradicional se sigue practicando en diferentes partes del mundo, como en África donde su uso es superior al 80%, en China alrededor del 40%, mientras que en Asia y América Latina se emplea basándose en creencias culturales y circunstancias históricas (Gómez Estrada et al., 2011).

La vía tópica es la más utilizada cuando se desea obtener una acción rápida y localizada de un fármaco con mínimos o nulos efectos sistémicos. Además, ofrece otras ventajas como:

- Una amplia variedad de formulaciones, presentándose en formas sólidas, semisólidas y líquidas.
- Características organolépticas aceptables como olor y texturas variadas.
- Fácil aplicación y alto nivel de aceptación por los pacientes.
- Seguridad y eficacia reduciendo las interacciones entre los medicamentos.
- Dispensación sin receta de algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos tópicos y de otros que alivian o hidratan la piel.

Algunos inconvenientes a tener en cuenta son:

- En cuanto al fármaco: las condiciones medioambientales necesarias para su conservación como humedad y temperatura.

- En cuanto al paciente: la fotosensibilidad y alergias que le pueden provocar.

El objetivo de un tratamiento dermatológico puede ser curativo de una lesión o foco de dolor localizado, de mantenimiento fisiológico, estético o de defensa frente a agentes externos. La terapia farmacológica tópica comprende elegir el agente apropiado, la concentración del fármaco y los excipientes, teniendo en cuenta tanto las zonas corporales afectadas como el estado de la piel a tratar; también el tiempo de aplicación que consiga el mejor resultado con los menores efectos indeseados (Bergstrom y Strober, 2009).

La absorción cutánea de las formulaciones tópicas puede llevarse a cabo a través de sitios específicos:

- Células del estrato córneo (vía intracelular o transcelular), es la vía de penetración preferente y está en función de las dimensiones de los corneocitos; o bien a través de los espacios intercelulares (vía intercelular) en función de la composición de la matriz lipídica extracelular que rodea a los corneocitos.
- Anejos cutáneos como los folículos pilosos y glándulas sebáceas o sudoríparas. Hay que considerar la importancia de la secreción de sebo por parte de las glándulas sebáceas ya que crea un entorno hidrófobo que puede afectar a la absorción (Camean et al., 1994).

La velocidad a la que un medicamento por vía tópica o el mismo agente en distintos excipientes se absorbe, depende de la concentración del fármaco en el vehículo, del coeficiente de partición del principio activo entre el estrato córneo y el vehículo, y del coeficiente de difusión del mismo en el estrato córneo que, a su vez, está en función del tamaño molecular y de la capacidad para difundir a través de las diferentes capas de la piel (García Delgado et al., 2004).

2. Dolor

2.1. Fisiología del Dolor

El término dolor es definido en la última Edición del Diccionario de la Lengua Española de la Real Academia Española, basado en su etimología latina (dolor-oris) como: Aquella sensación molesta y aflictiva de una parte del cuerpo por causa interior o exterior (Ilodo, Sobrino y Fandiño, 2017).

El dolor es una experiencia sensorial y emocional, de carácter desagradable, originado en un determinado sector del organismo, que se asocia a una lesión real o potencial de los tejidos. Actúa como señal de alarma en caso de lesión o de un funcionamiento anormal del organismo. Proviene de la estimulación de terminaciones nerviosas libres, o de receptores nerviosos, situados en distintas partes del organismo, donde se inician los impulsos nerviosos que se transmiten por fibras especializadas de la sensación dolorosa hasta la corteza cerebral. Los estímulos capaces de generar los impulsos nerviosos dolorosos son de diversos tipos, como calor intenso, presión, pinchazos, penetraciones con objetos punzantes, distensión, falta de oxigenación de algún tejido o síntoma de muchas enfermedades (Font, 2002).

El tratamiento del dolor involucra la utilización de analgésicos opioides, analgésicos comunes, antiinflamatorios no hormonales (AINH's) y analgésicos adyuvantes. Tradicionalmente, esos fármacos son administrados por vía sistémica o en el neuro eje. Sin embargo, cuando se aplican por esas vías, están asociados a los efectos colaterales importantes, los cuales pueden impedir su uso (Flores et al., 2012), La administración tópica de analgésicos es una alternativa frente aquellos medicamentos que son administrados por vía sistémica, debido a que la vía tópica posibilita elevadas concentraciones en el tejido diana en contraposición con sus bajos niveles séricos. Así, es poco probable la aparición de efectos colaterales no deseados.

2.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son un conjunto heterogéneo de compuestos químicos generalmente no relacionados entre sí, que comparten acciones terapéuticas para el control en diverso grado del dolor, la inflamación y la fiebre. esta diversidad química les confiere propiedades farmacocinéticas distintas (Prieto, J. M. ,2007).

2.2.1. Mecanismo de acción

Los AINES tienen múltiples efectos centrales y periféricos, una gran cantidad de los cuales están mediados por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas(PG). El efecto analgésico se basa en el bloqueo de la producción periférica y central de prostaglandinas; a nivel central impiden la sensibilización de las neuronas medulares y supramedulares, permitiendo la modulación (inhibición) central del dolor (Rivera-Ordoñez, A., 2006).

2.2.2. Tratamiento farmacológico

Los AINE son adecuados para el tratamiento de dolores de intensidad leve a moderada como dolores musculares, musculoesqueléticos, articulares, vasculares, los asociados a espasmos uterinos, así, se utilizan por ejemplo en cefaleas, migrañas, odontalgias, dismenorreas, artritis o artrosis y, en dosis más elevadas, en el dolor posquirúrgico, en enfermedades neoplásicas incipientes, en cólicos renales y en dolor postraumático. A diferencia de los opiáceos, no presentan las acciones no deseadas sobre el sistema nervioso central y no producen farmacodependencia (Font, 2002).

2.2.3. Mecanismo de Acción del efecto antipirético

Los antipiréticos actúan a nivel central reduciendo el punto de ajuste del centro regulador hipotalámico mediante la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), la enzima responsable de la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas y leucotrienos. Esta reducción conduce a una serie de respuestas fisiológicas, incluyendo la disminución de la producción de calor, aumento del flujo sanguíneo a la piel y la consecuente pérdida de calor por

radiación, convección y evaporación. La mayoría de los antipiréticos inhiben los efectos de las prostaglandinas sobre los receptores del dolor (Sanjuanelo, A. B.,2013).

2.3. Anestésico

La anestesia local tópica consiste en la aplicación directa del agente anestésico sobre la piel o mucosas, produciendo inhibición de estímulos dolorosos, táctiles y térmicos. Un buen anestésico tópico es aquel que produce un efecto anestésico del 100% en un corto período de tiempo y que es útil sobre piel intacta sin provocar efectos adversos locales o sistémicos. Todavía hoy no se ha encontrado el anestésico tópico ideal; sin embargo, en los últimos 30 años se ha ido desarrollando una variedad de combinaciones farmacológicas que han mejorado su perfil de actuación, su seguridad y sus indicaciones (Bonet, 2011).

2.4. Principios activos estudiados

Los cuatro principios activos Alcanfor, Mentol, Trementina y Salicilato de metilo, utilizados para el desarrollo y validación de la metodología analítica, presentes en una emulsión tópica. A diferencia de un ungüento la emulsión presenta mayor penetración debido a su forma farmacéutica, dado que satisfacen a las exigencias fisiológicas de la piel y pueden liberar uniformemente materias hidrosolubles y liposolubles en la piel sin dejar de mencionar que son dispersiones formadas por dos fases inmiscibles que se mezclan mediante cizallamiento mecánico y tensioactivo. (Kale & Deore, 2016), donde una fase es dispersa (interna o discontinua) y la otra fase dispersante (externa o continua), teniendo así una emulsión oleo-acuosa (O/W).

2.4.1. Alcanfor

El alcanfor es un terpenoide de olor aromático presente en la madera del alcanforero (*Cinnamomum camphora*), un árbol bastante común en Borneo y Taiwan. También se obtiene sintéticamente a partir del pineno (OMS, OIT y INSST, 2003), para mayor detalle

la estructura química del Alcanfor se detalla en la Figura 1 y sus propiedades fisicoquímicas en la Tabla 1.

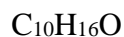
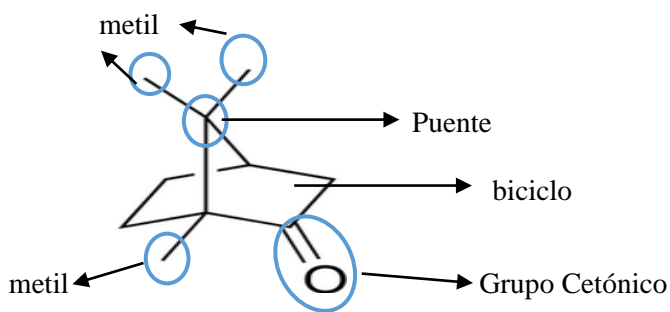
El alcanfor se utiliza tópicamente para aliviar el dolor, aunque también se ha utilizado para el tratamiento de las verrugas, las hemorroides, los sabañones y la osteoartritis. El alcanfor se utiliza frecuentemente para tratar enfermedades respiratorias que producen inflamación en las mucosas. A veces se ha utilizado como rubefaciente para aumentar el flujo sanguíneo local. Por vía oral, el alcanfor se utiliza como expectorante, antiflatulento y para el tratamiento de enfermedades respiratorias (IQB, 2010).

2.4.1.1. Mecanismo de acción

El alcanfor es muy lipófilo y atraviesa fácilmente las membranas mucosas. Tópicamente, el alcanfor tiene propiedades anestésicas locales, analgésicas y antipruríticas.

El alcanfor actúa activando el receptor TRPV3 (Transient Receptor Potential Vanillin 3), un receptor de la familia de los TRP, que se expresa en los queratinocitos, las raíces de los ganglios dorsales y en la médula espinal. Este receptor ha sido implicado en la hiperalgesia de los tejidos inflamados y en la sensibilización de la piel. Sin embargo, el hecho de que algunos preparados en los que se combinan, alcanfor, mentol y eucaliptol y que se utilizan para que sus vapores alivien la congestión nasal, sugiere que todos estos productos al actuar sobre los receptores TRPV y TRPM8 (este receptor es activado por el mentol) producen una sensación de frío en las vías respiratorias por lo que el sujeto parece respirar mejor. Probablemente los efectos antitusivos del alcanfor se deban también a una modulación de los receptores TRPV de la porción superior del tracto respiratorio (IQB, 2010).

Figura 1 Estructura del Alcanfor



Nota: Nombre químico, Bicyclo [2.2.1] heptane-2-one,1,7, 7-trimetil.

Fuente: USP 42 (2019) y elaboración propia

Tabla 1 Propiedades Fisicoquímicas del Alcanfor

Propiedad	Valor/Características
Peso molecular (g/mol)	152,23
Aspecto	Cristales incoloros o blancos de olor aromático debido a la presencia del grupo cetona
Punto de Fusión (°C)	174-179
Punto de ebullición (°C)	204
Solubilidad	Insoluble en agua, soluble en alcohol, éter y ácido acético, esto es debido a que es poco polar.

Nota: Recopilación de datos fisicoquímicos de Alcanfor.

Fuente: USP 42 (2019); OMS, OIT y INSSST (2003) y elaboración propia.

2.4.2. Mentol

El mentol es un alcohol monoterpénico, que se encuentra en los aceites de la menta, y posee una estructura química que se detalla en la Figura 2 y propiedades fisicoquímicas descritas en la Tabla 2.

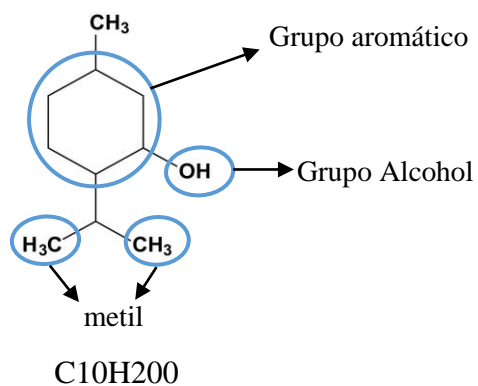
El mentol es apreciado para el tratamiento sintomático de contusiones, edemas y dolores musculares, en razón del efecto refrescante que produce en la piel, proporcionando una sensación de frío que actúa como relajante muscular. La sensación de frescor se produce por estimulación específica de los receptores de la sensación de frío de una serie de

terminaciones nerviosas cutáneas que, al mismo tiempo, son las que generan la sensación de dolor. Así, en casos de contusiones leves o dolor muscular consecuente a la práctica deportiva (agujetas, tirones, congestión, etc.), la sensación de frescor enmascara dichos síntomas, por lo que puede decirse que se produce una anestesia local moderada (Solans & del Pozo, 2009).

2.4.2.1. Mecanismo de acción

El efecto anestésico local moderado se consigue mediante activación del denominado canal iónico TRPM8 (Potencial receptor transitorio del canal catiónico subfamilia M miembro 8), presente en las células del sistema nervioso. Dicha activación produce un modo de analgesia, ya que contrarresta el envío de señales dolorosas. La proteína TRPM8 se activa a bajas temperaturas y por el contacto con determinadas sustancias, tales como el mentol. El efecto anestésico junto a su poder refrescante es de gran interés para aliviar las molestias ocasionadas por problemas circulatorios, tales como procesos varicosos (Solans & del Pozo, 2009).

Figura 2 Estructura del Mentol



Nota: Nombre químico, 5-Metil-2-(1-metiletil) ciclohexanol.

Fuente: USP 42 (2019) y elaboración propia.

Tabla 2 *Propiedades Fisicoquímicas del Mentol*

Propiedad	Valor/Características
Peso molecular (g/mol)	156,27
Aspecto	Solido cristalino de color blanco
Punto de Fusión (°C)	41 – 44
Punto de ebullición (°C)	212
Solubilidad	Insoluble en agua, soluble en alcohol, éter.

Nota: Recopilación de datos fisicoquímicos de Mentol.

Fuente: USP 42 (2019) y elaboración propia.

2.4.3. Salicilato de Metilo

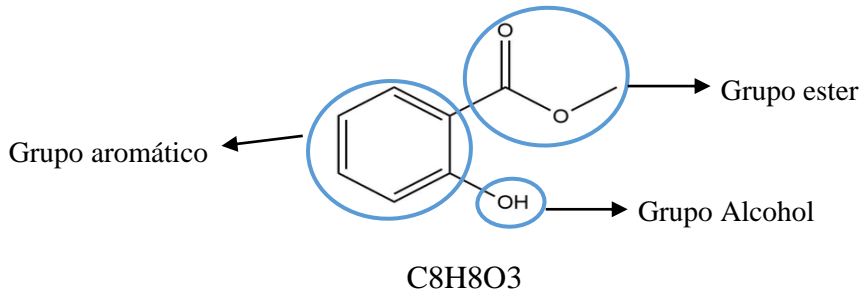
El Salicilato de Metilo se produce sintéticamente o se obtiene por maceración y subsiguiente destilación con vapor, a partir de las hojas de *Gaultheria procumbens* (Familia Ericaceae) o de la corteza de *Betula lenta* (Familia Betulaceae) (USP 42, 2019), muy conocido por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicos y sobretodo rubefaciente causando irritación y enrojecimiento de la piel debido al aumento del flujo sanguíneo. Se considera que alivian el dolor en diversas afecciones osteomusculares (Derry S, Matthews PRL, Wiffen PJ, Moore RA, 2019).

Para mayor detalle la estructura química del Salicilato de metilo se detalla en la Figura 3 y sus propiedades fisicoquímicas en la Tabla 3

2.4.3.1. Mecanismo de acción

El salicilato de metilo contribuye al efecto analgésico de los tejidos inflamados. Es bien conocido que los fármacos denominados salicilatos producen un efecto analgésico y antiinflamatorio por la inhibición de la enzima ciclooxigenasa que interviene en la síntesis de los prostanoïdes del ácido araquídico. Se ha demostrado que estos productos administrados de forma tópica son tan efectivos como administrados de forma oral, siendo además de esta primera forma mejor tolerados ya que se produce una menor absorción sistémica y menor concentración plasmática (Ministerio de sanidad, política social e igualdad, 2013).

Figura 3 Estructura del Salicilato de metilo



Nota: Nombre químico, ácido benzoico, 2-hidroxí, metil ester.

Fuente: USP 42 (2019) y elaboración propia.

Tabla 3 Propiedades Físicoquímicas del Salicilato de metilo

Propiedad	Valor/Características
Peso molecular (g/mol)	152,15
Aspecto	Líquido incoloro o ligeramente amarillo
Punto de Fusión (°C)	-9
Punto de ebullición (°C)	222
Solubilidad	Muy poco soluble en agua, miscible con el alcohol.

Nota: Recopilación de datos físicoquímicos del Salicilato de metilo.

Fuente: USP 42 (2019) y elaboración propia.

2.4.4. Trementina

La trementina es un líquido pegajoso de color amarillo que proviene de la goma de pino o de la madera de pino. Se compone de terpenos que incluyen monoterpenos, alfa-pineno, beta-pineno y cierta cantidad de carena, canfeno (Delaware health and social services, 2013).

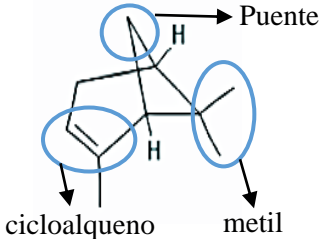
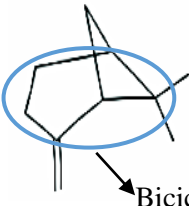

La composición química de la trementina puede variar según la fuente y el método de obtención. La proporción de los tres constituyentes monoterpenos en la trementina es aproximadamente 10:1:5, α -pineno: β -pineno: 3-careno (California Department of Industrial Relations, 2019).

En la Tabla 4 se presenta la estructura química de la trementina, además en la Tabla 4 se presentan las propiedades físicoquímicas de los monoterpenos seleccionados.

2.4.4.1. Mecanismo de Acción

Un proceso inflamatorio que cursa con dolor, edema, enrojecimiento, calor o incapacidad funcional tisular es desencadenado como respuesta defensiva frente a ciertos estímulos dañinos como agresiones físicas, químicas o biológicas. Este proceso es debido a la activación de un complejo enzimático, la ciclooxigenasa (COX), encargada de catalizar la transformación del ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos, a partir de los cuales se sintetizan diferentes eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) responsables de la inflamación. Los AINEs tópicos son agentes que, aunque tienen estructuras químicas diferentes, la gran mayoría posee una acción inespecífica sobre la COX, inhibiendo de forma no selectiva ambas isoformas (COX-1 y COX-2), logrando así una eficacia terapéutica similar entre ellos. Los AINEs son más efectivos frente a procesos inflamatorios agudos que crónicos (Garrote y Bonet, 2017).

Tabla 4 Estructura y propiedades fisicoquímicas de la trementina

Propiedades	α -Pinene	β -Pineno	3-Carene
Estructura			
Peso Molecular	136,24 g/mol	136,23 g/mol	136,23 g/mol
Punto de Fusión	-55°C	-61,5°C	<25°C
Punto de ebullición	155 a 156 °C	168 a 169 °C	168 a 169 °C
Solubilidad	Insoluble en agua, soluble en la mayoría de solventes orgánicos	Insoluble en agua; soluble en grasas, solventes orgánicos y aceites.	Insoluble en agua; soluble en grasas, disolventes orgánicos y aceites.
Características especiales	-	-	Se oxida fácilmente en el aire

Nota: Recopilación de datos fisicoquímicos de Trementina.

Fuente: California Department of Industrial Relations (2019) y elaboración propia.

3. Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)

Dentro de la Norma Técnica de BPM para la industria de productos farmacéuticos, se encuentra las buenas prácticas en control de calidad que refiere al muestreo, especificaciones y ensayo, incluyendo procedimientos de organización, documentación y liberación, que aseguren que los ensayos necesarios y pertinentes realmente se efectúen, y que se evite la liberación de los materiales para el uso, no se permita el suministro o venta de los productos, hasta que se haya verificado su calidad y sea aprobado como satisfactorio (Organización Mundial de la Salud, 1997).

4. Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)

Los laboratorios de control de calidad pueden llevar a cabo todas o algunas de las actividades de control de calidad, por ejemplo, muestreos, análisis de principios activos, excipientes, materiales de acondicionamiento y/o productos farmacéuticos, ensayos contra especificaciones, ensayos de estabilidad y ensayos de investigación (OMS, 2010).

Las Buenas Prácticas de Laboratorio que se encuentran en el anexo 1, del informe 44 de la OMS (Organización Mundial de la Salud), deben ser consideradas como una guía general y pueden ser adaptadas para satisfacer las necesidades individuales siempre y cuando se logre alcanzar un nivel equivalente de garantía de calidad (OMS, 2010).

5. Desarrollo de procedimientos analíticas

La guía *ICH Q14*, se considera la guía de armonización para el *Desarrollo de Procedimientos analítico*, publicada en marzo de 2022, esta guía describe enfoques basados en la ciencia y en el riesgo para desarrollar y mantener procedimientos apropiados para la evaluación de la calidad de fármacos.

El enfoque sistemático sugerido en la *ICH Q8 Desarrollo Farmacéutico* junto con principios de *ICH Q9 Gestión de riesgos de calidad*, también se puede aplicar al desarrollo y la gestión del ciclo de vida de procedimientos analíticos. Al desarrollar un procedimiento

analítico, se puede aplicar un enfoque mínimo (también conocido como tradicional) o elementos de un enfoque mejorado (ICH Q14, 2022).

Con la publicación de esta guía se puede complementar la Guía *ICH Q2* para la *Validación de Procedimientos Analíticos*, ya que esta última carece de información importante sobre el adecuado desarrollo de un procedimiento o metodología analítica.

El fin del desarrollo es obtener un procedimiento analítico adecuado para su propósito previsto: medir un atributo o atributos del material analizado con la selectividad, exactitud y precisión necesaria sobre el rango reportable, por esta razón la *ICH Q14* ha desarrollado los enfoques mínimos y mejorados para el desarrollo de procedimientos analíticos (ICH Q14, 2022).

5.1. Enfoque mínimo contra enfoque mejorado en el desarrollo de procedimientos analíticos según la *ICH Q14* (2022)

5.1.1. Enfoque mínimo

En el desarrollo de procedimientos analíticos se deberá incluir los siguientes elementos como adecuados:

- Identificar qué atributos de la sustancia farmacéutica o del producto farmacéutico deben ser probados por el procedimiento analítico.
- Seleccionar una tecnología de procedimiento analítico adecuada e instrumentos relacionados o aparato.
- Realización de estudios de desarrollo apropiados para evaluar el rendimiento del procedimiento analítico, incluyendo características tales como especificidad, exactitud y precisión sobre el rango reportable incluyendo el modelo de calibración, límites en los extremos de rango inferior y/o superior) y robustez.

- Definición de una descripción adecuada del procedimiento analítico, incluido el procedimiento analítico y la estrategia de control (por ejemplo, configuración de parámetros e idoneidad del sistema).

5.1.2. Enfoque mejorado

El enfoque mejorado ofrece una forma sistemática de desarrollar y refinar el conocimiento de un procedimiento analítico. Un enfoque mejorado debe incluir uno o más de los siguientes elementos además de los ya descritos para el enfoque mínimo:

- Llevar a cabo una evaluación de riesgos y evaluar el conocimiento previo para identificar los parámetros del procedimiento analítico que pueden afectar el rendimiento del procedimiento.
- Realización de experimentos de una o varias variables para explorar rangos e interacciones entre parámetros de procedimientos analíticos identificados.
- Definición de una estrategia de control de procedimientos analíticos basada en una mejor comprensión de los procedimientos, incluidos los puntos de ajuste y/o rangos apropiados para los parámetros relevantes de los procedimientos analíticos, lo que garantiza el cumplimiento de los criterios de rendimiento.
- Definir un plan de gestión de cambios del ciclo de vida con definiciones claras y categorías de informes de condiciones establecidas (EC), rangos aceptables probados (PAR) o regiones de diseño operativo del método (MODR), según corresponda.

La aplicación de elementos del enfoque mejorado para el desarrollo puede conducir a procedimientos analíticos más sólidos, una mejor comprensión del impacto de los parámetros del procedimiento analítico y más flexibilidad para la gestión del ciclo de vida, como rangos operativos más amplios, un conjunto más apropiado de EC y categorías de informes asociadas para cambios (ICH, 2022).

El enfoque mejorado ofrece potencialmente varias ventajas, entre ellas:

- Comprensión de qué atributos del procedimiento analítico son esenciales para el desempeño del procedimiento
- Emplear características de rendimiento predefinidas vinculadas a atributos críticos de calidad (CQA) y sus criterios de aceptación para proporcionar protocolos orientados a un propósito para la validación de procedimientos analíticos y para comparaciones futuras entre procedimientos/tecnologías analíticas actuales y nuevos.
- Mejorar el control de los procedimientos analíticos dando como resultado una operación más confiable.
- Reducir la cantidad de esfuerzo a lo largo del ciclo de vida del procedimiento analítico.

5.2. Desarrollo de un método analítico por Cromatografía Gaseosa

La cromatografía de gases moderna no puede tratarse completamente sin analizar también la preparación de las muestras. A diferencia de la mayoría de las otras técnicas instrumentales, la cromatografía de gases requiere técnicas especializadas de preparación de muestras, debido al requisito de que las muestras para GC se volatiliza en la entrada. Además, en la mayoría de los casos, los analitos deben distribuirse en un líquido orgánico o en una fase gaseosa antes de la inyección. La infinidad de matrices de muestras e interferencias que pueden estar presentes complican aún más el análisis (Grob & Barry, 2004).

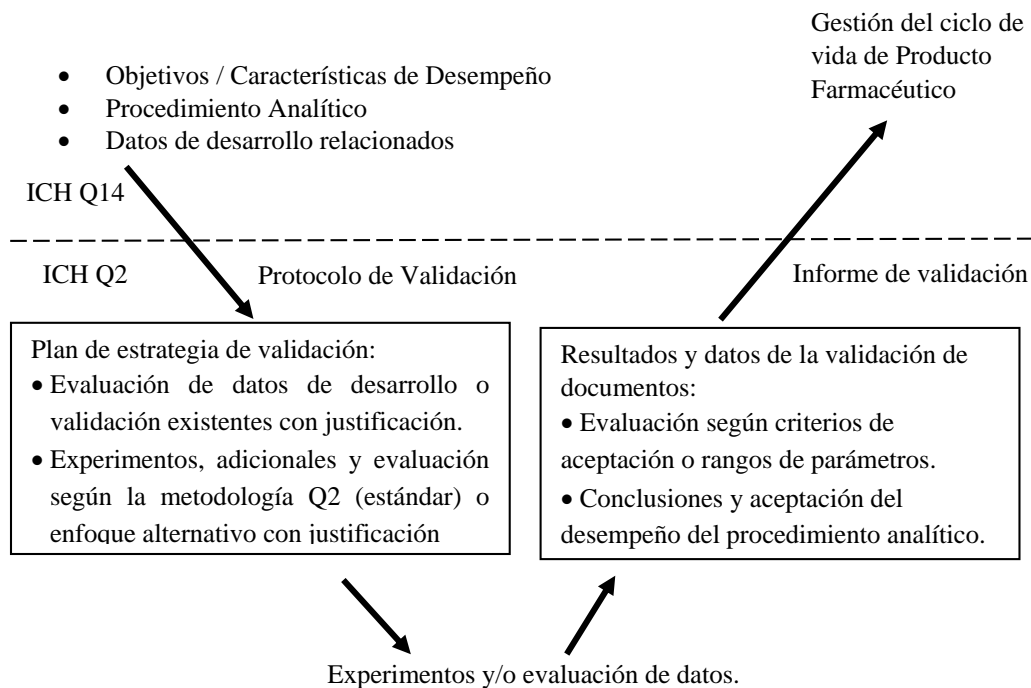
Para el desarrollo y validación de un método analítico, es necesario tomar en cuenta el diseño y evaluación del estudio de validación basados en las *ICH Q14* e *ICH Q2*, que se describen en la Figura 4.

5.2.1. Fases en el desarrollo de un método analítico

El desarrollo lógico de un método analítico transcurre en tres fases:

- Definición: de las características y requerimientos que debe satisfacer el método analítico: precisión exigible, sensibilidad deseable, grado de selectividad, tiempo coste, tipo de instrumentación necesaria, etc (USP 42, 2019).
- Puesta a punto del método analítico: desde los primeros estudios de tanteo con patrones hasta la utilización del método en muestras reales, pasando por la definición de los parámetros de idoneidad que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento de análisis (USP 42, 2019).
- Validación del método analítico: Esta tercera etapa permitirá conocer la fiabilidad del método para su aplicación rutinaria y, en combinación con las etapas anteriores, sus características de funcionamiento con consecuencias positivas para su rendimiento (USP 42, 2019).

Figura 4 *Diseño y evaluación del estudio de validación.*



Nota: ICH (Consejo internacional de armonización de medios técnicos para productos farmacéuticos de uso humano) / *Q14* (Guía para el Desarrollo de procedimientos analíticos) / *Q2* (Guía para la Validación de Procedimientos Analíticos)

Fuente: ICH (2005).

6. Validación

La validación es una parte importante del programa de garantía de calidad de un producto determinado para garantizar el cumplimiento de la calidad, la seguridad y la eficacia. La implementación del trabajo de validación incluye medidas tales como:

- Tiempo: La validación se realiza según horarios estrictos.
- Finanzas: La validación requiere tecnología costosa y personal especializado.
- Humana: La validación debe ser realizada por personal calificado y un equipo multidisciplinario (OMS, 1997).

6.1. Validación de metodologías analíticas

Todos los procedimientos analíticos empleados para las pruebas deben ser adecuados para el uso previsto. Esto se demuestra mediante la validación y también sirve para establecer criterios de aceptación para las pruebas de idoneidad del sistema que posteriormente se emplean para la verificación del procedimiento analítico antes del análisis. La validación debe realizarse de acuerdo con un protocolo de validación, que incluye características de rendimiento analítico que se verificarán para varios tipos de procedimientos analíticos de manera experimental. En la fase de desarrollo de un procedimiento analítico, también se debe considerar la solidez, es decir, la capacidad del procedimiento para proporcionar resultados de exactitud y precisión aceptables en una variedad de condiciones. Los resultados deben documentarse en el informe de validación (OMS, 2010).

Los análisis a realizar deben estar descritos en la documentación de las metodologías analíticas estandarizadas. Pueden ser usadas, especificaciones y metodologías analíticas estandarizadas en farmacopeas “metodologías farmacopeicas”, o especificaciones y metodologías analíticas desarrolladas “metodologías no-farmacopeicas” como las aprobadas por la autoridad regulatoria nacional de medicamentos (OMS, 1997).

Para los estudios de validación, deben utilizarse estándares de referencia con pureza documentada y los resultados de las metodologías analíticas deben ser fiables, exactos y reproducibles. Es necesario realizar la verificación o revalidación cuando sea relevante,

por ejemplo, cuando haya cambios en el proceso de la síntesis de las materias primas; cambios en la composición del producto terminado; modificación del procedimiento analítico; cuando la metodología analítica es transferida de un laboratorio a otro; o cuando cambian partes importantes de equipos e instrumentos. La verificación o grado de revalidación depende de la naturaleza del (de los) cambio(s) (OMS, 1997).

Los métodos de la farmacopea se consideran validados para el uso previsto según lo prescrito en la(s) monografía(s). Sin embargo, el laboratorio también debe confirmar que, por ejemplo, para un producto farmacéutico terminado (PFP) particular examinado por primera vez, no surgen interferencias de los excipientes presentes, o que para un API (ingrediente farmacéutico activo), las impurezas provenientes de una nueva ruta de síntesis son adecuadamente diferenciados. Si el método de la farmacopea se adapta para otro uso, entonces debe validarse para dicho uso para demostrar que es adecuado para su propósito (OMS, 2010).

6.2. Características de procedimientos analíticos

Las características a considerar durante la validación de metodologías analíticas incluyen: exactitud, precisión, robustez, linealidad, intervalo, especificidad, límite de detección y límite de cuantificación.

6.2.1. Exactitud

Según las BPM, es el grado de concordancia de los resultados de los ensayos en relación al valor verdadero, o la cercanía de los resultados obtenidos mediante el procedimiento al valor verdadero. La exactitud debe ser establecida a lo largo del rango especificado en el procedimiento analítico (OMS, 1997).

6.2.2. Precisión

Según las BPM, es el grado de concordancia entre los resultados individuales. El procedimiento completo debe ser aplicado reiteradas veces para separar muestras idénticas

extraídas del mismo lote homogéneo del material. Debe ser medida por el grado de dispersión de los resultados individuales con respecto a la media y estar expresada como la desviación estándar relativa (DSR) (OMS, 1997).

Repetibilidad: debe ser evaluada usando un mínimo de nueve determinaciones que abarquen el rango especificado en el procedimiento, por ejemplo, tres concentraciones con tres repeticiones cada uno, o con un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración del análisis (OMS, 1997).

Precisión intermedia: expresa variaciones dentro del laboratorio (usualmente diferentes días, con diferentes analistas y diferentes equipos). Si se evalúa la reproducibilidad, la medición de la precisión intermedia no es requerida (OMS, 1997).

Reproducibilidad: expresa precisión entre laboratorios.

6.2.3. Robustez

Es la capacidad del procedimiento que proporcionará resultados analíticos de exactitud y precisión aceptable bajo una variedad de condiciones. Los resultados de muestras independientes son influenciados por cambios en las condiciones operacionales o ambientales. La robustez debe ser considerada durante la fase de desarrollo, y debe demostrar la fiabilidad de un análisis cuando se realizan variaciones deliberadas en los parámetros del método (OMS, 1997).

Los factores que pueden afectar la robustez, al realizar análisis cromatográficos, incluyen: Estabilidad de las muestras para análisis, de los estándares y de soluciones, reactivos (por ejemplo, diferentes proveedores), diferentes columnas (por ejemplo, diferentes lotes y proveedores), tiempo de retención, variaciones de temperatura, variaciones en la composición de los gases, temperatura y velocidad de flujo.

6.2.4. Linealidad

Indica la capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras. Deben prepararse una serie de muestras en las cuales las

concentraciones del analito abarcan el rango declarado en el procedimiento. Si existe una relación lineal, los resultados del análisis deben ser evaluados por métodos estadísticos apropiados. Deben ser utilizados un mínimo de cinco concentraciones (OMS, 1997).

6.2.5. Intervalo

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo esos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (por ejemplo, porcentaje, partes por millón) obtenidos mediante el procedimiento analítico (USP 42, 2019).

6.2.6. Especificidad

Los documentos de ICH definen especificidad como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios (USP 42, 2019).

Los documentos de ICH afirman que cuando se utilizan los procedimientos Cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. Las pruebas de pureza de picos (por ejemplo, utilizando redes de diodos o espectrometría de masa) pueden resultar útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no puede atribuirse a más que un solo componente (USP 42, 2019).

6.2.7. Límite de detección

El límite de detección es una característica de las pruebas de limite, los cuales simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de

un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje o partes por billón) en la muestra (USP 42, 2019).

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo enfoque que para procedimientos no instrumentales. En el caso de procedimientos presentados como candidatos a procedimientos Farmacopéico oficiales, casi nunca es necesario determinar el límite de detección real. Por el contrario, debe demostrarse que el límite de detección es lo suficientemente bajo para el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e inferiores al nivel de detección requerido. Por ejemplo, si se requiere detectar una impureza con una concentración del 0,1%, debería demostrarse que el procedimiento detectará de modo confiable la impureza a esa concentración (USP 42, 2019).

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos de ICH describen un enfoque usual, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones de analito con las muestras blancas. Se establece la concentración mínima a la que puede detectarse confiablemente un analito. Las relaciones señal-ruido habitualmente aceptables son de 2:1 o 3:1. Otros enfoques dependen de la determinación de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las respuestas. Independientemente del método utilizado, el límite de detección debería validarse posteriormente mediante el análisis de un número adecuado de muestras preparadas al límite de detección o que se sabe que están cerca de dicho límite (USP 42, 2019).

6.2.8. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede

determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo, porcentaje o partes por billón) en la muestra (USP 42, 2019).

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo enfoque que para procedimientos no instrumentales. En el caso de procedimientos presentados como candidatos a procedimientos farmacopeicos oficiales, casi nunca resulta necesario determinar el límite de cuantificación real. Por el contrario, debe mostrarse que el límite de cuantificación es lo suficientemente bajo mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito superiores e inferiores al nivel de cuantificación requerido. Por ejemplo, si se requiere analizar un analito a una concentración de 0,1 mg por tableta, debería demostrarse que el procedimiento cuantificará de modo confiable el analito a esa concentración (USP 42, 2019).

En el caso de procedimientos analíticos instrumentales que presentan ruido de fondo, los documentos ICH describen un enfoque común, que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las de muestras blanco. Se establece la concentración mínima a la que puede cuantificarse confiablemente un analito. Una relación señal-ruido habitualmente aceptable es de 10:1 (USP 42, 2019).

6.3. Datos requeridos para la validación

Los requisitos de las pruebas farmacopéicas varían desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones de atributos subjetivos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. En la Tabla 1 se describen las categorías de prueba más habituales para las que se exigen datos de validación. (USP 42, 2019).

La descripción de las cuatro categorías son las siguientes:

Categoría I: Los procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Los procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

Categoría III: Los procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco).

Categoría IV: Pruebas de identificación.

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica. En la Tabla 1 se indican los elementos de datos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías (USP 42, 2019).

El presente trabajo de desarrollo y validación para la valoración simultánea de cuatro principios activos se clasifica dentro de la categoría II para análisis cuantitativos.

Tabla 5 Datos requeridos para la validación

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de Detección	No	No	Sí	*	No
Límite de Cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

Nota: * Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica. Fuente: USP 42 (2019)

7. Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es una técnica analítica que se utiliza principalmente para analizar compuestos que pueden volatizar en la entrada del GC sin descomponerse. Sin embargo, su aplicación puede extenderse a algunos compuestos de alto punto de ebullición mediante derivatización química. Esto la convierte en una de las técnicas analíticas más utilizadas en diversos campos analíticos.

El inyector, la columna y el detector funcionan a temperaturas controladas y variables de acuerdo con el tipo de análisis. Los gases transportadores típicos son helio, nitrógeno o hidrógeno, dependiendo de la columna y el detector en uso. El tipo de detector que se usa depende de la naturaleza de los compuestos que se analizan y se especifica en la monografía individual. La señal de salida de los detectores se registra como la respuesta del instrumento en función del tiempo y la medida del área o altura del pico, es una función de la cantidad presente (USP, 2019).

La longitud y la calidad de una separación por Cromatografía Gaseosa, se pueden controlar alterando la temperatura de la columna cromatográfica. Cuando sea necesario un programa de temperatura, la monografía individual indica las condiciones en formato de tabla. La tabla indica la temperatura inicial, la velocidad de cambio de temperatura (rampa), la temperatura final y el tiempo de espera (hold time) a la temperatura final (USP, 2019).

Los componentes básicos del Cromatógrafo de Gases constan de una fuente de gas transportador, un inyector, una columna, un detector y un dispositivo registrador, en la Figura 5 se observa como ejemplo un modelo 7890B N° de serie de la marca Agilent Technologies que cuenta con los componentes descritos.

Figura 5 *Cromatógrafo de Gases (GC)*



Fuente: Elaboración propia

7.1. Gas Carrier/Gas Portador

Para el desarrollo de un método analítico por Cromatografía Gaseosa es el uso de Helio como gas portador, probando con una velocidad lineal media inicial de 30 cm/seg. Si se desea una mejor resolución se reduce la velocidad de flujo a un máximo de 25cm/seg, aunque de esta forma el tiempo de análisis se incrementa. En caso que se desee un tiempo de análisis menor, se debe aumentar la velocidad a 35 cm/seg o hasta un máximo de 40 cm/seg. Se debe tener en cuenta que a velocidades lineales tan altas, se pueden producirse pérdidas de resolución. Es posible que también sea necesario realizar unos ajustes mínimos en la temperatura del horno. Cuando el Helio es el gas portador se utilizan velocidades lineales medias de 30-35 cm/seg en muchos análisis (Agilent Technologies, 2015).

Cuando se utilice hidrogeno como gas portador, se comienza con una velocidad inicial de 60cm/seg. Si desea una resolución mejor, se debe reducir la velocidad a un máximo de 50 cm/seg, aunque de esta forma el tiempo de análisis incrementara. En caso que se desee un tiempo de análisis menos, se debe aumentar la velocidad a 70 cm/seg o hasta un máximo de 80 cm/seg. Teniendo presente que las velocidades lineales altas pueden producirse pérdidas de resolución. Es posible que también sea necesario realizar unos ajustes mínimos en la temperatura del horno. Cuando el hidrogeno es el gas portador se utilizan

velocidades lineales medias de 60-70 cm/seg en muchos análisis (Agilent Technologies, 2015).

Al comparar los cromatogramas a distintas velocidades lineales medias, se observarán diferencias en cuanto a retención y resolución. En ocasiones, hay diversas velocidades lineales medias que son las más adecuadas para picos diferentes del mismo cronograma. En tales casos, normalmente se selecciona una velocidad de compromiso. A excepción del nitrógeno, es muy improbable que la resolución se vea alterada al efectuar pequeños cambios en la velocidad lineal media (<2cm/seg). Si se experimenta con velocidades lineales medias, se debe probar con valores distintos dentro de un rango de entre 3-4 cm/seg (Agilent Technologies, 2015).

7.2. Fase Estacionaria Sólida

Este tipo de fase está disponible únicamente en columnas rellenas. En estas columnas, la fase sólida es un adsorbente activo, como por ejemplo alúmina, sílice o carbono, con el que se rellena una columna. Las resinas poliaromáticas porosas, que a veces se emplean en las columnas rellenas, no se recubren con una fase líquida.

Las columnas capilares y rellenas deben acondicionarse antes del uso, hasta que la línea base y otras características sean estables. Los distribuidores de columnas y materiales de relleno proveen instrucciones relativas al acondicionamiento recomendado (USP, 2019)

7.3. Columna cromatográfica

Una columna capilar consta de dos partes principales: Tubo y fase estacionaria. Una fina película (de 0.1 a 10 μm) de un polímero térmicamente estable y con un elevado peso molecular recubre la pared interna del tubo de diámetro interno (entre 0.005 y 0.53 mm de d.i.). Esta capa polimerica se denomina fase estacionaria. El gas fluye por el tubo y se denomina gas portador o fase móvil (Agilent Technologies, 2015).

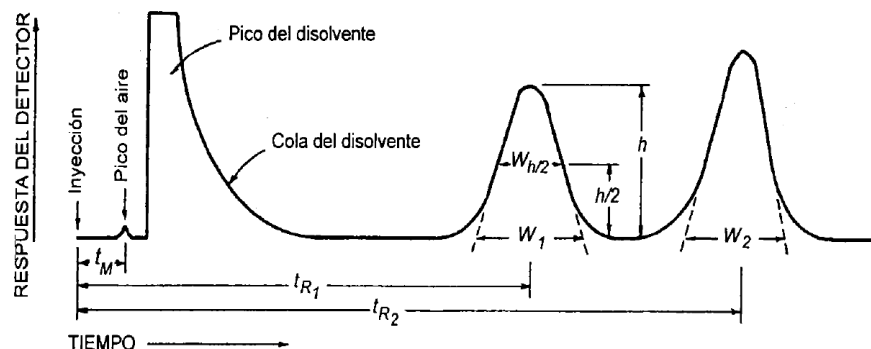
7.4. Interpretación de cromatograma

El tamaño de pico se corresponde con la cantidad de compuesto en la muestra. Así cuando más aumente la concentración de un compuesto mayor será el pico obtenido. El tiempo de retención es el tiempo que un compuesto tarda en recorrer la columna. Si la columna y todas las condiciones de funcionamiento para el compuesto se mantienen constantes, este siempre tendrá el mismo tiempo de retención.

El tamaño del pico y el tiempo de retención sirven para determinar la cantidad de un compuesto. No obstante, es importante incidir en que la identificación de un compuesto no se realiza exclusivamente a partir del tiempo de retención. Antes, deberá analizarse una cantidad conocida de una muestra auténtica (estándar) y pura del compuesto buscado que está presente (comparando los tiempos de retención) y en su cantidad (comparando el tamaño de pico).

El cromatograma ideal presenta picos cercanos entre sí que no se solapan (coelución). Esto es importante por dos motivos: primero, porque la coelución impide medir picos de manera precisa y segundo, porque en caso de que dos picos presenten el mismo tiempo de retención, ninguno se podrá identificar con exactitud. (Agilent Technologies, 2015). En la Figura 6, se observa los parámetros que se miden en un cromatograma.

Figura 6 Separación Cromatográfica de dos Sustancias



Nota: Ejemplo de cromatograma para el cálculo de parámetros cromatográficos.
Fuente: USP 42 (2019).

Donde el tiempo muerto (t_M), volumen muerto (V_M), tiempo de retención (t_R), ancho de pico (W), altura del pico (h).

7.5. Aptitud o idoneidad del sistema

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de la Cromatografía de Gases. Estas pruebas se usan para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar como tal.

La USP 42 describe los factores que pueden afectar el comportamiento cromatográfico:

- Composición, fuerza iónica, temperatura
- Velocidad de flujo, dimensiones de la columna, temperatura de la columna y presión
- Las características de la fase estacionaria, incluyendo el tipo de soporte cromatográfico (basado en partículas o monolítico), tamaño de partícula, tamaño de poro y área superficial específica

Las inyecciones repetidas de una preparación estándar se comparan entre sí para determinar si se cumplen los requisitos de precisión. Se usan los datos de cinco inyecciones repetidas del analito para calcular la desviación estándar relativa (RSD), si el requisito es 2,0% y se usan los datos de seis inyecciones repetidas si el requisito de desviación estándar relativa es >2,0% (USP 42, 2019).

F. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Desarrollar y validar un método analítico para la valoración simultánea de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo en emulsión tópica por Cromatografía gaseosa.

2. Objetivos Específicos

- Realizar la evaluación teórica de las propiedades fisicoquímicas de los principios activos en estudio: Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo.
- Establecer los parámetros de estabilidad, solubilidad, compatibilidad de filtro, tipo de liner, tipo de inyector, volumen de expansión, velocidad del embolo, concentración de los principios activos, orden de elución, Temperatura del horno de la columna, determinación inequívoca del analitos y evaluación del porcentaje de recuperación, utilizados para el desarrollo de método analítico.
- Determinar los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección y cuantificación, utilizados para la validación de método analítico.
- Validar los resultados de análisis obtenidos mediante el procesamiento de tratamiento estadístico.
- Establecer un Procedimiento Operativo Estandarizado.

G. DISEÑO METODOLÓGICO

1. Diseño de Estudio

1.1. Tipo de Estudio

Experimental, prospectivo

1.2. Población en Estudio

Se empleará una formulación en emulsión Tópica con la combinación de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo comercializada en la ciudad de La Paz, obtenida de una industria farmacéutica legalmente establecida.

2. Descripción de la Población

a) Criterios de Inclusión

Medicamento en su forma farmacéutica, emulsión tópica con los cuatro principios activos: Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo.

b) Criterios de Exclusión

- Muestras de matriz no correspondiente a una emulsión tópica.
- Muestras que no contengan los cuatro principios activos o que contengan 3 de los cuatro principios activos.

c) Criterios de Eliminación

Muestras de matriz que presente contaminación o precipitación de sustancias extrañas.

2.1. Tamaño de Muestra

Matriz proporcionada por la industria farmacéutica que contiene excipientes, equivalentes a 50 frascos de aproximadamente de 30g (1500g), calculado con respecto al número de determinaciones a realizar en el desarrollo y validación del método. Las muestras fueron fortificadas con estándares de Trementina, Alcanfor, Metol, Salicilato

de metilo.

2.2. Contexto y Lugar

La falta de una metodología para la valoración simultanea de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo en emulsión tópica y dada la importancia de contar con un método para verificar la Calidad de los medicamentos se realiza el presente estudio de Desarrollo y Validación dentro de las instalaciones del Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos y Biodisponibilidad del Instituto SELADIS.

2.3. Financiamiento

Instituto SELADIS, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y bioquímicas, Universidad Mayor de San Andres (UMSA) e Industria Farmacéutica.

3. Materiales y Métodos

3.1. Análisis Estadístico de Datos

3.1.1. Software

- Hojas de cálculos de Microsoft Excel, Microsoft Office Professional Plus 2013
- Minitab® 17.1.0

3.1.2. Fórmulas estadísticas para la Validación

Cada formula está compuesta por índices y/o abreviaturas siendo la descripción de la siguiente manera:

C: Prueba de Cochran	ECMR: Error cuadrático medio relativo
S: Varianza	DESR_{δ}: Desviación estándar del sesgo
a: Intercepto	S : Desviación estándar
b: Pendiente	ADc: Anderson-Darling
\bar{y}: Media de Y o promedio	F exp : F-Fisher
Y: Respuesta	%D : Porcentaje de discrepancia
q: Tamaño de muestra	Di : Promedio de respuestas entre principio activo y matriz
r: Coeficiente de correlación	Ds : Promedio de respuestas Principio activo
tr: Correlación lineal significativa	D : Diferencia entre medias
n: tamaño de muestra	\bar{x}_a : Respuesta media con interferencia
s: Desviación estándar	\bar{x}_b : Respuesta media sin interferencia
X: Concentración	EE : Error estándar combinado
\bar{x}: Media de X o promedio	n_A : Tamaño de muestra con interferencia
CV: Coeficiente de variación	n_B : Tamaño de muestra sin interferencia
δ : Sesgo	t : t-student
\bar{y} : Promedio de la Concentración	y_b : Limite de detección /cuantificación
\hat{y} : Concentración Teórica	

3.1.2.1. Linealidad

1) Cálculo del estadístico C del Test de Cochran's

$$C = \frac{S_{ij}^2 \max}{\sum_{i=1}^p S_{ij}^2} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Entonces si comparación con el valor tabulado del Test de Cochran's se presenta como:

$$C_{calculado} < C_{tabulado} ;$$

Significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas, es decir que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

2) Cálculo de la pendiente y el intercepto

$$b = \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \bar{y}_j - \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \sum_{j=1}^q \bar{y}_j}{q}}{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j\right)^2}{q}}$$

(Ecuación 2)

$$a = \frac{\sum_{j=1}^q \bar{y}_j - b * \sum_{j=1}^q \hat{y}_j}{q}$$

(Ecuación 3)

3) Cálculo del coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \bar{y}_j - \frac{\sum_{j=1}^q \hat{y}_j * \sum_{j=1}^q \bar{y}_j}{q}}{\sqrt{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \hat{y}_j\right)^2}{q}\right) \left(\sum_{j=1}^q \bar{y}_j^2 - \frac{\left(\sum_{j=1}^q \bar{y}_j\right)^2}{q}\right)}}$$

(Ecuación 4)

4) Cálculo de la correlación lineal significativa (tr).

$$t_r = \frac{r * \sqrt{(q-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

(Ecuación 5)

3.1.2.2. Precisión:

1) Cálculo de la desviación estándar y el coeficiente de variación

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

(Ecuación 6)

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

(Ecuación 7)

2) Cálculo del estadístico C del Test de Cochran's y comparación con el valor tabulado, ver ecuación 1.

3) Cálculo del estadístico G del Test de Grubs

$$G = \frac{[X_i - \bar{x}]}{s} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Comparar con el valor tabulado tanto para 95% y 99% de confianza.

$$\text{Si : } G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabulado}}$$

Clasificar los valores como correctos, sospechosos o fuera de especificación.

4) Cálculo de la repetibilidad

$$S_{ij}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)} \quad (\text{Ecuación 9})$$

$$Sr = \sqrt{S^2 r_j} \quad (\text{Ecuación 10})$$

Coefficiente de variación, ver ecuación 7

5) Cálculo de la precisión intermedia; ver ecuación 9

6) Calcular la dispersión entre ensayistas

$$S_{Lj}^2 = \frac{S_{dj}^2 - S_{ij}^2}{n_j} \quad (\text{Ecuación 11})$$

3.1.2.3. Exactitud:

1) Cálculo de los promedios de cada nivel

$$\hat{m}_j = \bar{y}_j = \frac{\sum_{i=1}^p n_{ij} \bar{y}_{ij}}{\sum_{i=1}^p n_{ij}} \quad (\text{Ecuación 12})$$

2) Cálculo del sesgo

$$\delta_j = \bar{y}_j - \hat{y}_j \quad (\text{Ecuación 13})$$

3) Cálculo del error cuadrático medio relativo

$$ECMR = \frac{\sqrt{\delta_j^2 + S_j^2}}{\hat{y}_j} * 100 \quad (\text{Ecuación 14})$$

4) Cálculo de la desviación del sesgo

$$DESR_{\delta} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{p_j} \delta_{ij}^2}{p_j}} \quad (\text{Ecuación 15})$$

La verificación de la exactitud se aplica la siguiente sistemática:

Cálculo de t experimental

$$t_{\text{exp}} = \frac{(\delta_j) * \sqrt{p_j}}{S_j^2} \quad (\text{Ecuación 16})$$

$t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab}}$ se puede afirmar que ambos valores no difieren significativamente para el nivel de confianza seleccionado y por lo tanto concluimos que el método satisface la condición de exactitud.

3.1.2.4. Especificidad:

- 1) Para métodos no separativos, calcular S y CV: Ver ecuación 6 y 7.
- 2) Análisis de varianza “F” de Fisher

$$F_{\text{exp}} = \frac{S^2_A}{S^2_B} \quad (\text{Ecuación 17})$$

Si $F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$, las varianzas son iguales.

- 3) Porcentaje de Discrepancia

$$\%D = \frac{(D_i - D_s)}{D_s} \quad (\text{Ecuación 18})$$

- 4) Test de t student

Cálculo de t Student:

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{s^* \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B}}} \quad (\text{Ecuación 19})$$

Si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, la matriz no es un interferente significativo, por lo tanto, el método es específico.

5) Cálculo de la diferencia entre medias

$$D = \bar{x}_a - \bar{x}_b \quad (\text{Ecuación 20})$$

6) Error Estándar combinado

$$EE = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_A} + \frac{s_2^2}{n_B}} \quad (\text{Ecuación 21})$$

7) Intervalo de confianza del 95% para la diferencia entre medias

$$LC (95\%) = D \pm t \times EE \quad (\text{Ecuación 22})$$

3.1.2.5. Límite de Detección y Cuantificación

1) Límite de detección

$$y_d = a + 3S_{y/x} \quad (\text{Ecuación 23})$$

2) Límite de Cuantificación

$$y_d = a + 10S_{y/x} \quad (\text{Ecuación 24})$$

3.2. Materiales, Reactivos y Equipos

3.2.1. Materiales:

- ✓ Matraces aforados de 25 mL y 500 mL
- ✓ Nave de pesada
- ✓ Vasos de precipitado 500, 250, y 100 mL
- ✓ Jeringa de 5 mL y 3 mL

- ✓ Filtros de jeringa Nylon 0.45um
- ✓ Viales para GC
- ✓ Pipeta graduada de 10 mL
- ✓ Tapas para viales para GC
- ✓ Propipeta
- ✓ Espátula

3.2.2. Reactivos

- ✓ Sulfato de sodio anhidro
- ✓ N-hexano grado HPLC
- ✓ Helio He – 5.0 Pureza 99.999% (ONU. 1046 CONEXIÓN CGA-580, marca: O 2 CHEMICAL).
- ✓ Hidrogeno H2 – 5.0 Pureza 99.999% (ONU. 1049 CONEXIÓN CGA-358 marca: O 2 CHEMICAL).
- ✓ Aire enriquecido con oxígeno (ONU. 1002 CONEXIÓN CGA-580, marca: O 2CHEMICAL)

3.2.3. Equipos

- ✓ Cromatógrafo de Gases Marca: AGILENT TECHNOLOGIES Modelo: 7890B, conformado por un detector: Ionización de llama (FID); Columna: HP-5, Longitud: 30 m, Diámetro: 0.320 mm, Película: 0,25 µm
- ✓ Tipo de inyección: Partición (Split), 100:1
- ✓ Balanza analítica Estándar Marca: Quintix Sartorius
- ✓ Equipos de ultrasonido Marca: GT-SONIC
- ✓ Campana de Extracción de Gases Marca: BIOBASE

3.3. Estándares de Trabajo

- ✓ Trementina, Pureza (100,0%)
- ✓ Alcanfor, Pureza (96,58%)
- ✓ Mentol, Pureza (99,49%)
- ✓ Salicilato de metilo, Pureza (99,94%).

3.4. Matriz

Emulsión tópica proporcionada por la industria farmacéutica.

3.5. Desarrollo Experimental

3.5.1. Desarrollo de la metodología analítica

Realizado de la siguiente manera:

- a. Estudio de las características fisicoquímicas de los principios activos
Se identificaron y evaluaron teóricamente las temperaturas de fusión y ebullición, además de los grupos funcionales que pueden proporcionar polaridad a las moléculas en estudio (Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo) y se determinó teóricamente el posible orden de elución.
- b. Solubilidad de los principios activos
Se realizaron pruebas de solubilidad para principios activos combinados + matriz, en los posibles diluyentes a utilizar Hexano, Metanol y Cloroformo.
- c. Estabilidad de los principios activos
La estabilidad de los principios activos fue evaluada realizando inyecciones de un estándar combinado con los 4 principios activos cada 5 minutos hasta los 60 minutos (1 hora) utilizando el método desarrollado.
- d. Compatibilidad de Filtro (Nylon 0,45 um)
Se preparó muestras combinadas de principios activos y muestras combinadas de principio activo + matriz a 3 niveles de concentración, 1,6 mg/mL, 2,0 mg/mL y 2,4 mg/mL para Trementina; 0,8 mg/mL, 1,0 mg/mL y 1,2 mg/mL para Alcanfor; 1,6

mg/mL, 2,0 mg/mL y 2,4 mg/mL para Mentol; 2,4 mg/mL, 3,0 mg/mL y 3,6 mg/mL para Salicilato de metilo, correspondiente en cada caso a 80, 100 y 120%.

Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de homogeneidad de varianzas y t-Student, para determinar que no existe interferencia del filtro (Nylon 0,45 μ m), en cuanto a la recuperación de los principios activos

e. Tipo de Inyector (Split)

Se preparó muestras a las mismas concentraciones del inciso “d”.

Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de homogeneidad de varianzas y t-Student, para establecer la capacidad del inyector para inyectar solo una porción de la muestra (1 μ L) en la columna y que esta no interfiere en la recuperación de los principios activos.

f. Tipo de Liner (Ultra Inert): Volumen de expansión (108 μ L)

Se preparó muestras a las mismas concentraciones del inciso “d”.

Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de homogeneidad de varianzas y t-Student, para comprobar que no existan problemas de Backflash (devolución de los vapores de la muestra por la línea de gas de arrastre).

g. Tipo de Inyección (Standart): Velocidad del émbolo (6000 μ L/min)

Se preparó muestras a las mismas concentraciones del inciso “d”.

Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de homogeneidad de varianzas y t-Student, para garantizar la introducción total de la muestra a la cabeza de la columna, además evaluar que la velocidad del embolo sea el adecuado para la viscosidad de la muestra.

h. Concentración de principios activos

Se preparó una muestra combinada de principios activos a 100% de concentración para Trementina (2,0 mg/mL), Alcanfor (1,0 mg/mL), Mentol (2,0 mg/mL) y Salicilato de metilo (3,0 mg/mL). Evaluándose los siguientes parámetros cromatógrafos: tiempo de retención, ancho de pico, altura de pico y resolución.

i. Orden de elución

Para determinar el orden de elución de los 4 principios activos se preparó muestras de cada principio activo por separado y una muestra combinada de principios activos a un nivel de concentración (100%), con tres replicas.

j. Temperatura del horno (columna)

Se preparó una muestra combinada de principios activos a 100% de concentración para Trementina (2,0 mg/mL), Alcanfor (1,0 mg/mL), Mentol (2,0 mg/mL) y Salicilato de metilo (3,0 mg/mL). Evaluándose el tiempo de retención, ancho de pico, altura de pico y resolución a diferentes temperaturas, correspondientes en cada caso a 150, 140, 130, 120°C.

k. Determinación inequívoca de los principios activos

Se preparó 6 muestras combinadas de principios activos y 6 muestras combinadas de principios activos + matriz al 100% de concentración para Trementina (2,0 mg/mL), Alcanfor (1,0 mg/mL), Mentol (2,0 mg/mL) y Salicilato de metilo (3,0 mg/mL). Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de Normalidad, homogeneidad de varianzas y t-Student, para determinar que la matriz (excipientes) no es un interferente para los principios activos.

l. Evaluación de los porcentajes de recuperación de los principios activos

Se preparó muestras combinadas de principios activos y muestras combinadas de principios activos + matriz a 3 niveles de concentración (80, 100 y 120%), con 6 réplicas por nivel.

Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de Grubbs, Cochran y t-Student, para garantizar la recuperación de los analitos dentro de la matriz.

m. Relación entre concentración y respuestas analítica

Se preparó muestras combinadas de principios activos a 5 niveles de concentración (80, 90, 100, 110 y 120%), con 3 réplicas por nivel.

Los resultados fueron evaluados por la prueba de ANOVA, para determinar si existe correlación entre X (concentración), Y (respuesta analítica).

n. Aptitud del sistema

Se preparó una muestra combinada de principios activos al 100% de concentración para Trementina (2,0 mg/mL), Alcanfor (1,0 mg/mL), Mentol (2,0 mg/mL) y Salicilato de metilo (3,0 mg/mL), evaluándose el desempeño del equipo en tiempo de retención, ancho de pico, altura de pico, resolución y áreas.

3.5.2. Validación de la metodología analítica

La validación de la metodología fue planteada de acuerdo a lo establecido en la USP 42-NF 37 y el documento de la ICH Q2 (R1).

3.5.1.1. Obtención de las muestras: Se utilizó matriz líquida correspondiente a una emulsión tópica, preparada por la Industria farmacéutica y proporcionada al Laboratorio de Control de calidad de medicamentos y Biodisponibilidad.

3.5.1.2. Preparación de las muestras: Se fortificó la matriz con los 4 principios activos (Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo) a diferentes concentraciones para obtener las muestras. Luego se realizó la preparación como indica el método analítico desarrollado en el punto 1.1 del inciso “H” de resultados.

- a. Linealidad instrumental (analito): Se prepararon estándares combinados de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo (analitos) en 5 niveles de concentración (80, 90, 100, 110 y 120%), con 12 réplicas por nivel.
- b. Linealidad del método (analito + matriz): Se prepararon muestras de matriz fortificada (analitos + matriz) en 5 niveles de concentración (80, 90, 100, 110 y 120%), con 12 réplicas por nivel. Los resultados fueron evaluados por la prueba de ANOVA, para determinar si existe correlación entre X (concentración), Y (respuesta analítica).
- c. Precisión
 - Repetibilidad instrumental: Se prepararon estándares combinados de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo (analitos) en un nivel de concentración (100%), leída 10 veces. Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de Coeficiente de variación (CV%), para evaluar la variabilidad del instrumento.

- Repetibilidad del método: Se prepararon muestras de matriz fortificada (analitos + matriz) en 3 niveles de concentración (90, 100, 110%), con 12 réplicas por nivel. Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de Grubbs y Cochran, para determinar la variabilidad del método.
 - Precisión intermedia: Se prepararon muestras de matriz fortificada (analitos + matriz) en 3 niveles de concentración (80, 100 y 120 %), durante 3 días y con 2 analistas diferentes, con 10 réplicas por nivel. Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de Grubbs y Cochran, para determinar la variabilidad del método con diferentes analistas.
- d. Exactitud: Se prepararon estándares combinados de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo (analitos) en 3 niveles de concentración (80, 100 y 120%), cada nivel con 10 réplicas y se prepararon muestras de matriz fortificada (analito + matriz) en 3 niveles de concentración (80, 100 y 120%), con 10 réplicas por nivel. Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de Cochran, y t-Student, para garantizar que la concentración no influye en los resultados y que la recuperación de los principios activos es el adecuado.
- e. Especificidad: se prepararon estándares combinados de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo (analitos) en un nivel de concentración (100%), con 6 réplicas, y se preparó muestras de matriz fortificada (analitos + matriz) en un nivel de concentración (100%), con 6 réplicas por nivel. Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de Normalidad, homogeneidad de varianzas y t-Student, para determinar que la matriz (excipientes) no es un interferente significativo.
- f. Límite de detección y cuantificación: se prepararon estándares combinados de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo (analitos) en un nivel de concentración (5%), con 4 réplicas, y se preparó muestras de matriz fortificada (analitos + matriz) en un nivel de concentración (5%), con 16 réplicas por nivel. Los resultados obtenidos fueron evaluados por la prueba de Cochran, para garantizar que la concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

H. RESULTADOS

1. DESARROLLO DE LA METODOLOGIA ANALITICA

a) Estudio de las propiedades fisicoquímicas de los principios activos

La información sobre las propiedades fisicoquímicas de las moléculas en estudio fue recopilada y analizada de manera teórica, descritas en la tabla 1 al 4 del inciso “E” marco teórico, además se evaluó teóricamente a los grupos funcionales de las moléculas en estudio dando los siguientes resultados:

- Trementina está compuesto por una mezcla de monoterpenos, mayormente alfa y beta pinenos además de canfeno, los pinenos son bicíclicos unidos por un puente (ver tabla 4) los cuales presentan grupos funcionales metilo y un cicloalqueno de característica no polar, debido a su incapacidad de formar enlaces de hidrogeno, dándole a la molécula la característica “No Polar e insoluble en agua”.
- Alcanfor es un terpeno bicíclico unido por un puente al igual que la Trementina, dentro de su estructura química presenta un grupo funcional cetónico (ver figura 1), que le permite formar enlaces dipolo, en consecuencia siendo así soluble en agua, sin embargo, la solubilidad no solo depende de los enlaces sino también de la longitud de la cadena de carbonos (medida que aumenta la cadena de carbonos decrece la solubilidad en agua), el alcanfor presenta más de siete átomos de carbonos en su estructura química, dándole a la molécula la característica “No Polar e insoluble en agua”.
- Mentol es un alcohol secundario, debido a que su grupo funcional está conformado por un oxígeno e hidrogeno (OH) y está unido a un carbono secundario, brindándole la característica polar, también dentro de la estructura química existe la presencia de grupos metilo que le dan cierta “No polaridad” a la molécula (ver figura 2).
- Salicilato de metilo es un éster del ácido salicílico y del metanol (ver figura 3), el grupo funcional ester puede participar en la formación de los enlaces de hidrogeno como aceptor, convirtiéndolo en una molécula hidrosoluble, otro grupo funcional es

el alcohol que le brinda la característica polar, siendo así el Salicilato de metilo una molécula “Polar y Muy poco soluble en agua”.

De acuerdo a la evaluación teórica de las propiedades físico químicas, principalmente el punto de ebullición (cuanto más volátil sea un soluto más rápido eluirá de la columna), y grupos funcionales de las moléculas en estudio (a menor polaridad mayor es el tiempo de retención en la columna HP-5, no polar), se determinó el posible orden de elución: Trementina (primero), Alcanfor (segundo), Mentol (tercero) y Salicilato de metilo (cuarto).

b) Solubilidad de los principios activos

En solubilidad de los principios activos, se sometió tanto a los principios activos como a la muestra (principios activos más matriz) a pruebas de solubilidad con distintos solventes (hexano HPLC, metanol HPLC, cloroformo y agua Ultrapura), seleccionando como diluyente al hexano debido a que es el solvente en el cual los principios activos + matriz, presentan mayor solubilidad (Ver tabla 6).

Tabla 6 Pruebas de solubilidad

Principios activos	Alcanfor			Alcanfor + Matriz			Mentol			Mentol + Matriz		
	I	PS	S	I	PS	S	I	PS	S	I	PS	S
Agua HPLC	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-
Metanol HPLC	-	X	-	-	X	-	-	X	-	X	-	-
Hexano HPLC	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X
Cloroformo	-	-	X	-	X	-	-	-	X	X	-	-

Principios activos	Trementina			Trementina + Matriz			Salicilato de metilo			Salicilato de metilo + Matriz		
	I	PS	S	I	PS	S	I	PS	S	I	PS	S
Agua HPLC	X	-	-	X	-	-	-	X	-	X	-	-
Metanol HPLC	-	X	-	-	X	-	-	-	X	-	X	-
Hexano HPLC	-	-	X	-	X	-	-	-	X	-	X	-
Cloroformo	-	-	X	-	X	-	-	-	X	-	X	-

I: Insoluble, PS: Poco soluble, S: Soluble

Fuente: Elaboración propia

Para optimizar el proceso de solubilización y obtener mejores resultados se trató a la muestra con un equipo de ultrasonido por 5 min para los principios activos y excipientes poco solubles, (ver tabla 7), este dato fue tomado por la referencia de la monografía USP 42-NF 37 del Mentol, ya que es el único que presenta una valoración por GC, Alcanfor y Salicilato de metilo presentan valoración por HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) y de la Trementina no encuentra la valoración dentro de la farmacopea USP 42.

Tabla 7 Elección del diluyente y del método de disolución de muestra.

Componentes	Diluyente	Método de disolución	Tiempo de disolución
Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo	Hexano (con la adición de sulfato de sodio anhidro, <i>ver preparación de la solución estándar y preparación de la solución muestra*</i>)	Agitación manual (<i>ver preparación de la solución estándar*</i>)	Inmediata
Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo + matriz		Ultrasonido, sin temperatura. (<i>ver preparación de la solución muestra*</i>)	Aproximadamente 5 minutos (hasta disolución completa)

*Ver el punto 1.1, inciso “H” de resultados

Fuente: Elaboración propia

c) Estabilidad de los principios activos

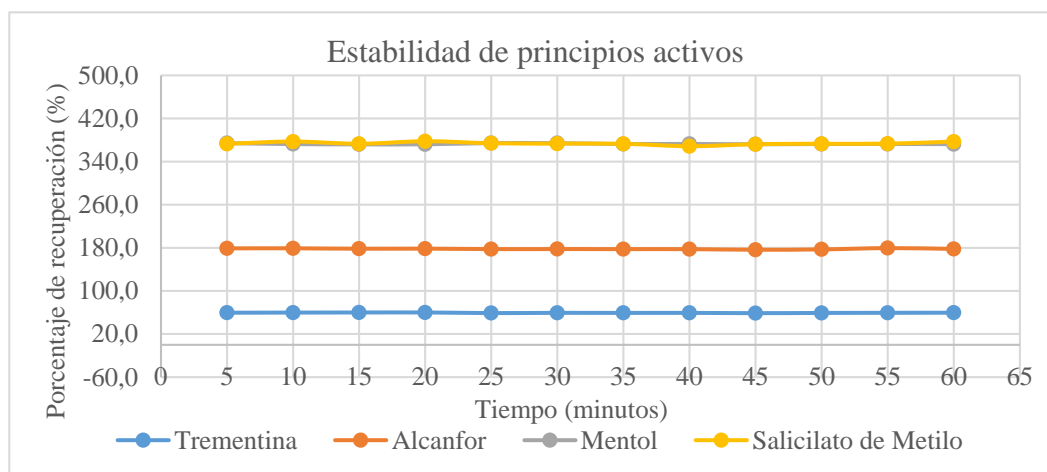
En estabilidad, se evidenció que los principios activos y la muestra (principios activos más matriz) son estables durante 1 hora en el diluyente seleccionado (Hexano grado HPLC), en consecuencia, a que el porcentaje de recuperación se mantuvo estable durante ese lapso de tiempo (Ver figura 7 y Tabla 8). Por tanto, se puede definir que dentro de este tiempo es posible realizar el análisis para la valoración, incluida la prueba de aptitud del sistema, sin evidenciar ninguna variabilidad representativa en los resultados.

Tabla 8 Estabilidad de Principios activos

	tiempo	Promedio		% de Recuperación	CV%
		Estándar	Muestra		
Trementina	60 min	59,3578	59,3801	100	0,57
Alcanfor		178,363	177,9873	99,8	0,49
Mentol		374,3666	372,881	99,6	0,25
Salicilato de Metilo		373,7405	373,6606	99,8	0,68

Fuente: Elaboración propia

Figura 7 Estabilidad de los principios activos



Fuente: Elaboración propia

d) Compatibilidad de filtro (Nylon 0,45 μ m)

En compatibilidad de filtro, se evaluó si el filtro jeringa de Nylon 0,45 μ m interfiere en la recuperación de los principios activos a tres diferentes concentraciones (80,100,120 %), se demostró que la concentración no influye en la variabilidad de los resultados con la prueba de homogeneidad de varianzas y que no existe interferencia de filtro utilizando la prueba de t-Student (ver tabla 9).

Tabla 9 *Compatibilidad de filtro jeringa*

Principio activo	Recuperación (%)	DSR (%)	PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		PRUEBA DE EXACTITUD t DE STUDENT	
			G de Cochran exp	G de Cochran tab	t de Student exp	t de Student tab
Trementina	100	1,498	0,4354	0,871	0,0322	2,145
Alcanfor	99,8	0,711	0,5653	0,8709	1,3528	2,145
Mentol	100,4	1,083	0,8204	0,871	1,3209	2,145
Salicilato de metilo	100	0,647	0,821	0,871	0,0275	2,145

Fuente Elaboración propia.

e) Tipo de inyector (Split)

Con respecto al tipo de inyector, se evaluó no solo el grado de vaporización de la muestra y la mezcla con el gas portador, sino también la capacidad del inyector de introducir en la columna solo una alícuota de la muestra total inyectada, se demostró que el tipo de inyector seleccionado “Split” no interfiere en la recuperación de los principios activos a tres diferentes concentraciones (80,100,120 %) y que el volumen de inyección es estable utilizando la prueba de t-Student, además que la concentración no influye en la variabilidad de los resultados con la prueba de homogeneidad de varianzas (ver tabla 10).

Tabla 10 *Tipo de inyector (Split)*

Principio activo	Recuperación (%)	DSR (%)	PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		PRUEBA DE EXACTITUD t DE STUDENT	
			G de Cochran exp	G de Cochran tab	t de Student exp	t de Student tab
Trementina	100,1	1,475	0,4503	0,8709	0,3675	2,145
Alcanfor	99,7	0,572	0,3751	0,8709	1,8079	2,145
Mentol	99,9	0,618	0,8028	0,8709	0,3305	2,145
Salicilato de metilo	100,1	1,187	0,7116	0,8709	0,1865	2,145

Fuente Elaboración propia.

f) Tipo de Liner (Ultra Inert): Volumen de expansión (108 uL)

Se evaluó el tipo de liner (Ultra Inert; dividido de baja caída de presión; Diámetro interno: 4 mm; largo: 78,5 mm; geometría del liner: cono simple LPD; diámetro externo: 6,25 mm) y se demostró que no existen problemas de backflash, a tres diferentes concentraciones (80,100,120 %) con la prueba de homogeneidad de varianzas y que no existe interferencia en la recuperación de principios activos utilizando la prueba de t-Student (ver tabla 11).

Tabla 11 Tipo de liner

Principio activo	Recuperación (%)	DSR (%)	PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		PRUEBA DE EXACTITUD t DE STUDENT	
			G de Cochran exp	G de Cochran tab	t de Student exp	t de Student tab
Trementina	100	1,498	0,4354	0,8709	0,0322	2,145
Alcanfor	99,8	0,711	0,5653	0,8709	1,3528	2,145
Mentol	100,4	1,083	0,8204	0,8709	1,3209	2,145
Salicilato de metilo	100	0,647	0,821	0,8709	0,0275	2,145

Fuente Elaboración propia.

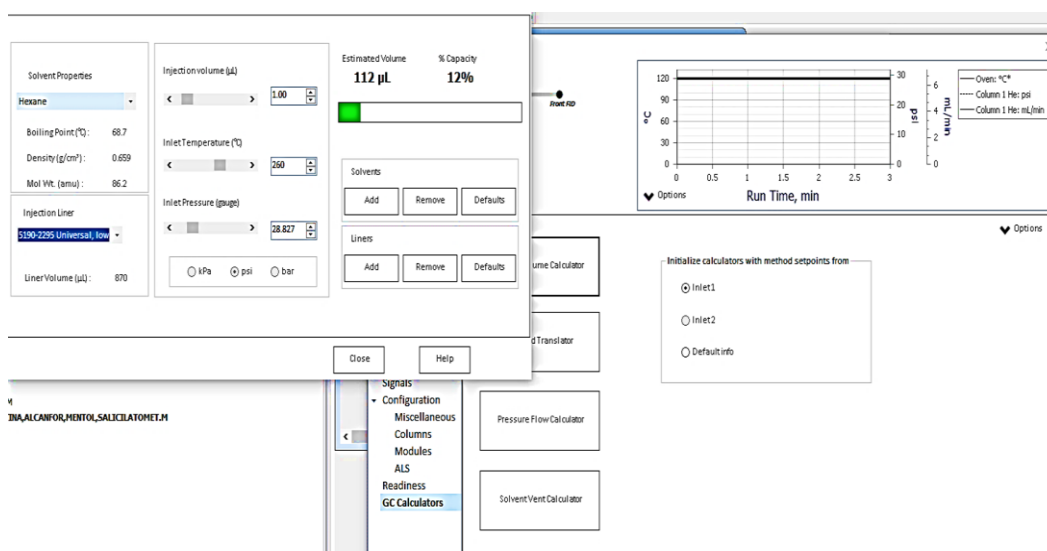
El Volumen de expansión calculado de acuerdo al tipo de liner (Ultra Inert) según “Vapor Volume Calculator” del Software del GC es 108 μ L, ocupando un 12% de la capacidad del liner (ver figura 8), es el adecuado para la valoración de los cuatro principios activos y no interfiere en la recuperación a diferentes concentraciones, además que la concentración no influye en la variabilidad de los resultados con la prueba de homogeneidad de varianzas y que no existe interferencia utilizando la prueba de t-Student (ver tabla 12).

Tabla 12 Volumen de expansión

Principio activo	Recuperación (%)	DSR (%)	PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		PRUEBA DE EXACTITUD t DE STUDENT	
			G de Cochran exp	G de Cochran tab	t de Student exp	t de Student tab
Trementina	100,1	1,475	0,4503	0,8709	0,3675	2,145
Alcanfor	99,7	0,572	0,3751	0,8709	1,8079	2,145
Mentol	99,9	0,618	0,8028	0,8709	0,3305	2,145
Salicilato de metilo	100,1	1,187	0,7116	0,8709	0,1865	2,145

Fuente: Elaboración propia.

Figura 8 Calculo del volumen de expansión



Fuente: Software ChemStation de GC Agilent Technologies 7890B

g) Tipo de inyección (Standard): Velocidad del embolo (6000 uL/ min)

En cuanto al tipo de inyección, se evaluó repetibilidad de inyección, garantizando la introducción total de la muestra a la cabeza de la columna, además se determinó la velocidad del embolo con respecto a la viscosidad del solvente utilizado para la preparación de la muestra, se demostró que el tipo de inyección “Standard” (ver tabla 13) y la velocidad del embolo a 6000 uL/ min “Fast” (ver tabla 14), son los adecuados para

la valoración de los cuatro principios activos y no interfiere en la recuperación de los principios activos a diferentes concentraciones, además que la concentración no influye en la variabilidad de los resultados con la prueba de homogeneidad de varianzas y que no existe interferencia utilizando la prueba de t-Student.

Tabla 13 Tipo de inyección (Standard)

Principio activo	Recuperación (%)	DSR (%)	PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		PRUEBA DE EXACTITUD t DE STUDENT	
			G de Cochran exp	G de Cochran tab	t de Student exp	t de Student tab
Trementina	100	1,498	0,4354	0,8709	0,0322	2,145
Alcanfor	99,8	0,711	0,5653	0,8709	1,3528	2,145
Mentol	100,4	1,083	0,8204	0,8709	1,3209	2,145
Salicilato de metilo	100	0,647	0,821	0,8709	0,0275	2,145

Fuente Elaboración propia.

Tabla 14 Velocidad de embolo (6000 uL/min)

Principio activo	R (%)	DSR (%)	PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		PRUEBA DE EXACTITUD t DE STUDENT	
			G de Cochran exp	G de Cochran tab	t de Student exp	t de Student tab
Trementina	100,1	1,475	0,4503	0,8709	0,3675	2,145
Alcanfor	99,7	0,571	0,3751	0,8709	1,8079	2,145
Mentol	99,9	0,618	0,8028	0,8709	0,3305	2,145
Salicilato de metilo	100,1	1,187	0,7116	0,8709	0,1865	2,145

Fuente Elaboración propia.

h) Concentración del principio activo

Para la concentración de los principios activos se evaluó el tiempo de retención, ancho de pico, altura de pico y resolución. Se obtuvo resultados dentro de especificaciones (resolución >1,5), el cálculo de la resolución fue realizado automáticamente por el equipo, en caso de la trementina no es de sorprenderse que cuanto mayor sea la resolución menor

será el solapamiento entre los picos y mejor será la capacidad de separación en la columna, hallando así que la concentración óptima de trabajo es de 2,0 mg/mL para Trementina; 1,0 mg/mL para Alcanfor; 2,0 mg/mL para Mentol y 3,0 mg/mL para Salicilato de metilo (ver tabla 15).

Tabla 15 *Concentración de los principios activos*

[Ct] (mg/mL)	Principio activo	Área	Tiempo de retención (min)	Ancho de pico (min)	Altura de pico	Resolución
2,0	Trementina	58,1936	0,9650	0,0110	88,0955	>40.0
1,0	Alcanfor	178,4080	1,4970	0,0157	181,2415	39,8572
2,0	Mentol	369,8226	1,6030	0,0173	346,9043	6,4245
3	Salicilato de metilo	370,1582	1,7440	0,0178	346,7610	8,0435

[Ct]: concentración teórica/ \bar{x} : Promedio

Fuente: Elaboración propia.

i) Orden de elución

El orden de elución de los cuatro principios activos fue determinado inicialmente de manera teórica de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas de las moléculas según revisión bibliografía, descrita en las Tabla 1 al 4 del inciso “E” marco teórico e inciso “a” de Resultados. Para contrastar los resultados teóricos se preparó muestras de cada principio activo por separado y una muestra de principios activos combinados, identificando así el orden de elución para los cuatro principios activos (ver tabla 16 y figuras 9 al 12).

Tabla 16 *Orden de elución de los principios activos*

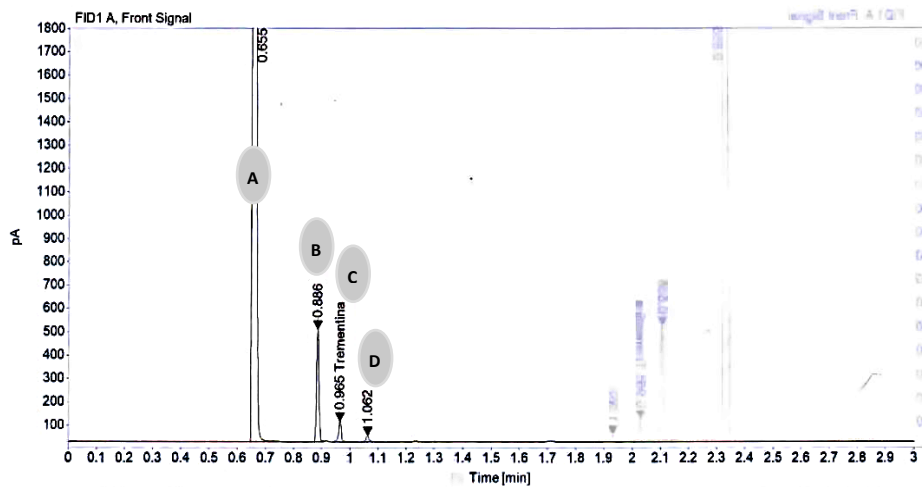
Principio activo	[Ct] (mg/mL)	tr promedio (min)	Conclusión
Trementina	2,0	0,965	Primer compuesto en eluir
Alcanfor	1,0	1,497	Segundo compuesto en eluir
Mentol	3,0	1,603	Tercer compuesto en eluir
Salicilato de metilo	2,0	1,744	Cuarto compuesto en eluir

[Ct]: Concentración teorica / tr: tiempo de retención

Fuente: Elaboración propia

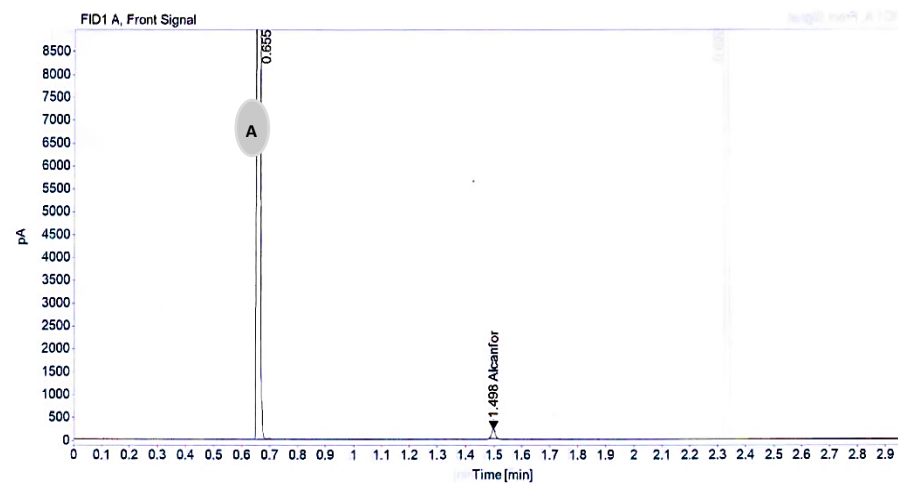
En el cromatograma de la Trementina (ver figura 9) se puede observar 4 picos de interés los cuales representan a la composición de la Trementina (α -pineno, β -pineno y canfeno): A:Hexano, B: α -pineno, C: β -pineno y D: Canfeno, considerando que el compuesto principal de la Trementina es el β -pineno, se cuantifica al pico C como trementina.

Figura 9 Cromatograma para Trementina



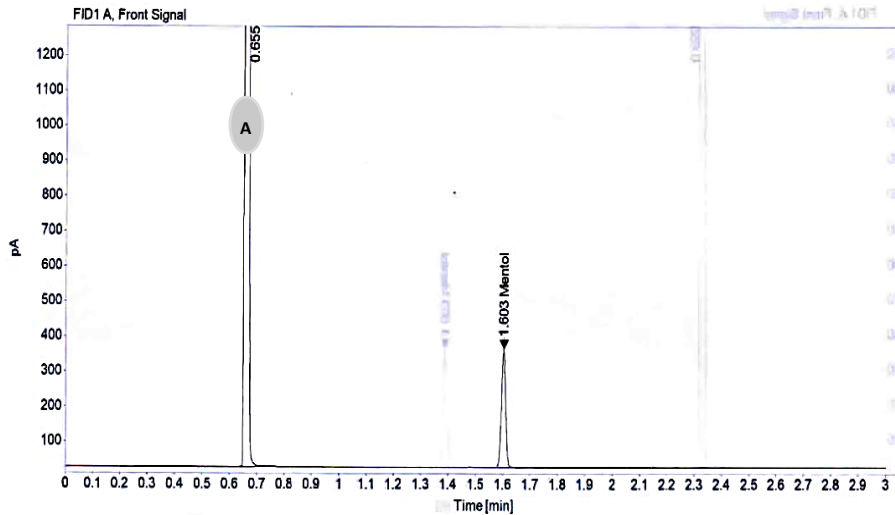
Fuente: Software ChemStation de GC Agilent Technologies 7890B.

Figura 10 Cromatograma para el Alcanfor



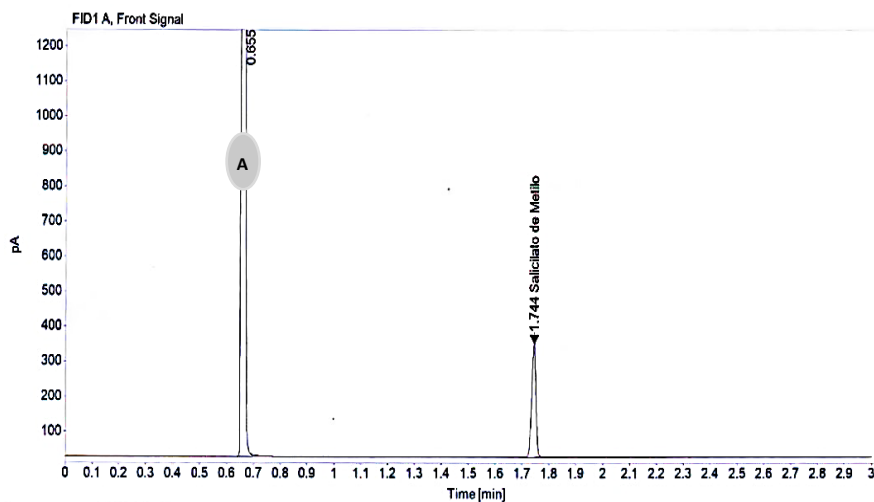
Fuente: Software ChemStation de GC Agilent Technologies 7890B

Figura 11 *Cromatograma para el Mentol*



Fuente: Software ChemStation de GC Agilent Technologies 7890B

Figura 12 *Cromatograma para el Salicilato de metilo*



Fuente: Software ChemStation de GC Agilent Technologies 7890B

Se inyectaron estándares de cada principio activo y estándar combinado. Los resultados evidencian que el método es repetible para el análisis de principios activos preparados individualmente y para principios activos combinados (ver tabla 17).

Tabla 17 Repetibilidad en tiempos de retención y áreas.

PRINCIPIO ACTIVO								
Estándar	Trementina		Alcanfor		Mentol		Salicilato de metilo	
	tr (min)	Área	tr (min)	Área	tr (min)	Área	tr (min)	Área
Por separado	0,9650	59,3245	1,4980	173,3167	1,6030	359,0260	1,7440	353,3820
	0,9650	59,5074	1,4970	171,4719	1,6030	357,3381	1,7440	354,9946
	0,9650	59,6248	1,4960	172,9550	1,6030	359,9308	1,7440	354,2058
Combinado	0,9650	58,0327	1,4970	171,4507	1,6030	359,3647	1,7440	356,6929
	0,9650	58,1134	1,4970	171,5397	1,6030	358,2835	1,7440	353,6470
	0,9650	57,9842	1,4970	171,2000	1,6030	359,3690	1,7440	352,8175
Promedio	0,9650	58,7645	1,4970	171,9890	1,6030	358,8854	1,7440	354,2900
DS	0,0000	0,7967	0,0006	0,9030	0,0000	0,9309	0,0000	1,3917
DSR (%)	0,0000	1,3558	0,0422	0,5251	0,0000	0,2594	0,0000	0,3928
$t_{exp} =$	0,03		0,01		0,01		0,01	
$t_{tab} =$	3,16		3,16		3,16		3,16	
Evaluación de la Exactitud	MÉTODO REPETIBLE		MÉTODO REPETIBLE		MÉTODO REPETIBLE		MÉTODO REPETIBLE	

tr: tiempo de retención

Fuente: Elaboración propia.

j) Temperatura de horno (Columna).

La temperatura de horno en el cromatógrafo gaseoso, se definió después de realizar cuatro pruebas en condiciones de temperatura isotérmica (T° constante) de manera descendiente a 150, 140, 130 y 120°C, a una temperatura de 150°C se observaron valores en tiempo de retención, ancho de pico, altura de pico y resolución para Trementina, Mentol y Salicilato de metilo fuera de especificaciones en resolución, sin embargo a una temperatura de 120°C existe una gran mejoría en la resolución de picos para los cuatro principios activos (ver tabla 18 y anexo 1: gráfica 1 al 6).

Tabla 18 *Temperatura de Horno (columna) a 150, 140, 130 y 120°C*

T (°C)	[C] teórica (mg/mL)	Principio activo	Área	Tiempo de retención (min)	Ancho de pico (min)	Altura de pico	Resolución	
150	2,0	Trementina	Promedio	53,9937	0,7610	0,0087	103,6048	-
			DSR (%)	0,0364	0,0000	0,0727	0,0222	-
140			Promedio	58,2846	0,8090	0,0101	96,2447	-
			DSR (%)	0,0058	0,0000	0,0262	0,0318	-
130			Promedio	58,2774	0,8750	0,0102	94,4595	-
			DSR (%)	0,0049	0,0000	0,0000	0,0027	-
120			Promedio	57,9735	0,9650	0,0109	86,0361	>40.0
			DSR (%)	0,0043	0,0000	0,0053	0,0039	-
150	1,0	Alcanfor	Promedio	-	-	-	-	-
			DSR (%)	-	-	-	-	-
140			Promedio	174,313	1,0760	0,0117	244,2275	24,5601
			DSR (%)	0,0059	0,0000	0,0544	0,0106	0,0402
130			Promedio	173,299	1,2480	0,0136	210,8617	31,3445
			DSR (%)	0,0047	0,0000	0,0000	0,0032	0,0000
120			Promedio	170,987	1,4970	0,0155	173,1314	40,3541
			DSR (%)	0,0040	0,0000	0,0000	0,0049	0,0022
150	2,0	Mentol	Promedio	-	-	-	-	-
			DSR (%)	-	-	-	-	-
140			Promedio	369,531	1,1160	0,0119	506,2759	3,4058
			DSR (%)	0,0060	0,0000	0,0535	0,0152	0,0523
130			Promedio	366,525	1,3120	0,0130	427,2277	4,8060
			DSR (%)	0,0045	0,0000	0,0044	0,0023	0,0022
120			Promedio	361,468	1,6030	0,0165	337,0747	6,6250
			DSR (%)	0,0043	0,0000	0,0000	0,0044	0,0000
150	3,0	Salicilato de metilo	Promedio	372,480	1,0290	0,0106	572,9750	-
			DSR (%)	0,0028	0,0000	0,0094	0,0150	-
140			Promedio	367,422	1,1840	0,0119	498,4613	5,7246
			DSR (%)	0,0059	0,0000	0,0511	0,0072	0,0246
130			Promedio	364,618	1,4090	0,0140	412,3337	7,1876
			DSR (%)	0,0046	0,0000	0,0413	0,0038	0,0228
120			Promedio	360,900	1,7440	0,0176	326,2334	8,2795
			DSR (%)	0,0045	0,0000	0,0329	0,0057	0,0171

Fuente: Elaboración propia.

k) Determinación inequívoca de los principios activos

Se evidencia que las varianzas entre el grupo “principio activo + matriz” y “principio activo”, son estadísticamente homogéneas con un 95% de nivel de confianza, por lo que se demuestra que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de ambos grupos lo que permite determinar igualdad de promedios con la prueba de “t” de Student (ver tabla 19).

Tabla 19 *Determinación inequívoca del principio activo*

Principio activo	Muestra	PRUEBA DE NORMALIDAD		PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		PRUEBA DE t DE STUDENT	
		Valor P exp	Valor P teórico	"F" de Fisher exp	"F" tabla	t de Student exp	t de Student tabla
Trementina	p.a + matriz	1	0,05	0,39	4,28	1,63	2,78
	p.a	0,99					
Alcanfor	p.a + matriz	1	0,05	0,58	4,28	0,96	2,78
	p.a	1					
Mentol	p.a + matriz	0,99	0,05	0,4	4,28	0,57	2,78
	p.a	1					
Salicilato de metilo	p.a + matriz	1	0,05	0,59	4,28	0,99	2,78
	p.a	0,98					

p.a: principio activo

Fuente: Elaboración propia.

l) Evaluación de los porcentajes de recuperación de los principios activos

La evaluación del porcentaje de recuperación de los principios activos se centró en utilizar los estadísticos de Grubbs, Cochran y el t-Student, a través de los cálculos de los cuales se determinó que el método desarrollado es capaz de obtener resultados cercanos al valor verdadero y garantizar la recuperación de los analitos dentro de la matriz.

Para Trementina con los resultados obtenidos se evidencia que las varianzas son iguales a tres niveles de concentración y el método es exacto (ver tabla 20).

Tabla 20 Evaluación del porcentaje de recuperación de Trementina

Trementina					
[Conc.] mg/mL	1,6	[Conc.] mg/mL	2,0	[Conc.] mg/mL	2,4
Grubbs [G]	Evaluación Grubbs	Grubbs [G]	Evaluación Grubbs	Grubbs [G]	Evaluación Grubbs
0,5056	CORRECTO	0,1798	CORRECTO	1,7462	CORRECTO
1,6520	CORRECTO	0,8581	CORRECTO	0,1271	CORRECTO
0,6632	CORRECTO	0,9529	CORRECTO	0,2780	CORRECTO
0,5513	CORRECTO	1,0450	CORRECTO	1,2132	CORRECTO
1,1190	CORRECTO	1,4174	CORRECTO	0,6173	CORRECTO
0,1393	CORRECTO	0,4716	CORRECTO	0,0666	CORRECTO
Gtab 95%	1,822	Gtab 95%	1,822	Gtab 95%	1,822
Gtab 99%	1,749	Gtab 99%	1,749	Gtab 99%	1,749
C cochran	0,666	C cochran	0,637	C cochran	0,469
C tabulado	0,745	C tabulado	0,745	C tabulado	0,745
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	
Evaluación de la exactitud		Evaluación de la exactitud		Evaluación de la exactitud	
$t_{exp} =$	0,02	$t_{exp} =$	0,003	$t_{exp} =$	0,02
$t_{tab} =$	3,16	$t_{tab} =$	3,16	$t_{tab} =$	3,16
MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO	

Fuente: Elaboración propia.

Para Alcanfor con los resultados obtenidos se evidencia que las varianzas son iguales a tres niveles de concentración y el método es exacto (ver tabla 21).

Tabla 21 Evaluación del porcentaje de recuperación de Alcanfor

Alcanfor					
[Conc.] mg/mL	0,8	[Conc.] mg/mL	1,0	[Conc.] mg/mL	1,2
Grubbs [G]	Evaluación Grubbs	Grubbs [G]	Evaluación Grubbs	Grubbs [G]	Evaluación Grubbs
0,8385	CORRECTO	1,4336	CORRECTO	0,1428	CORRECTO
1,0020	CORRECTO	0,4361	CORRECTO	1,1730	CORRECTO
0,7616	CORRECTO	0,4482	CORRECTO	1,1883	CORRECTO
0,5008	CORRECTO	0,4574	CORRECTO	0,8878	CORRECTO
0,6940	CORRECTO	0,4351	CORRECTO	0,5873	CORRECTO
1,4073	CORRECTO	1,4680	CORRECTO	1,0289	CORRECTO

Gtab 95%	1,822	Gtab 95%	1,822	Gtab 95%	1,822
Gtab 99%	1,749	Gtab 99%	1,749	Gtab 99%	1,749
C cochran	0,547	C cochran	0,617	C cochran	0,676
C tabulado	0,745	C tabulado	0,745	C tabulado	0,745
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	
Evaluación de la exactitud		Evaluación de la exactitud		Evaluación de la exactitud	
$t_{exp} =$	0,03	$t_{exp} =$	0,01	$t_{exp} =$	0,03
$t_{tab} =$	3,16	$t_{tab} =$	3,16	$t_{tab} =$	3,16
MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO	

Fuente: Elaboración propia.

Para Mentol con los resultados obtenidos se evidencia que las varianzas son iguales a tres niveles de concentración y el método es exacto (ver tabla 22).

Tabla 22 Evaluación del porcentaje de recuperación de Mentol

Mentol					
[Conc.] mg/mL	1,6	[Conc.] mg/mL	2,0	[Conc.] mg/mL	2,4
Grubbs [G]	Evaluación Grubbs	Grubbs [G]	Evaluación Grubbs	Grubbs [G]	Evaluación Grubbs
0,9712	CORRECTO	0,1912	CORRECTO	0,1699	CORRECTO
0,9407	CORRECTO	0,5765	CORRECTO	0,6342	CORRECTO
0,3669	CORRECTO	1,5399	CORRECTO	1,2302	CORRECTO
1,3957	CORRECTO	0,3679	CORRECTO	1,5644	CORRECTO
1,0329	CORRECTO	0,1035	CORRECTO	0,7339	CORRECTO
0,1498	CORRECTO	1,4538	CORRECTO	0,2640	CORRECTO
Gtab 95%	1,822	Gtab 95%	1,822	Gtab 95%	1,822
Gtab 99%	1,749	Gtab 99%	1,749	Gtab 99%	1,749
C cochran	0,366	C cochran	0,657	C cochran	0,637
C tabulado	0,745	C tabulado	0,745	C tabulado	0,745
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	
Evaluación de la exactitud		Evaluación de la exactitud		Evaluación de la exactitud	
$t_{exp} =$	0,01	$t_{exp} =$	0,01	$t_{exp} =$	0,01
$t_{tab} =$	3,16	$t_{tab} =$	3,16	$t_{tab} =$	3,16
MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO	

Fuente: Elaboración propia.

Para Salicilato de metilo con los resultados obtenidos se evidencia que las varianzas son iguales a tres niveles de concentración y el método es exacto (ver tabla 23).

Tabla 23 Evaluación del porcentaje de recuperación de Salicilato de metilo

Salicilato de Metilo					
[Conc.] mg/mL	2,4	[Conc.] mg/mL	3,0	[Conc.] mg/mL	3,6
Grubbs [G]	Evaluación Grubbs	Grubbs [G]	Evaluación Grubbs	Grubbs [G]	Evaluación Grubbs
0,0437	CORRECTO	0,4059	CORRECTO	0,6674	CORRECTO
0,0517	CORRECTO	0,7116	CORRECTO	1,6320	CORRECTO
0,4654	CORRECTO	1,1835	CORRECTO	1,6462	CORRECTO
0,9661	CORRECTO	0,6422	CORRECTO	1,5690	CORRECTO
0,6504	CORRECTO	0,5803	CORRECTO	1,6670	CORRECTO
0,3948	CORRECTO	0,9886	CORRECTO	0,9093	CORRECTO
Gtab 95%	1,822	Gtab 95%	1,822	Gtab 95%	1,822
Gtab 99%	1,749	Gtab 99%	1,749	Gtab 99%	1,749
C cochran	0,378	C cochran	0,352	C cochran	0,32
C tabulado	0,745	C tabulado	0,745	C tabulado	0,745
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	
Evaluación de la exactitud		Evaluación de la exactitud		Evaluación de la exactitud	
$t_{exp} =$	0,01	$t_{exp} =$	0	$t_{exp} =$	0,01
$t_{tab} =$	3,16	$t_{tab} =$	3,16	$t_{tab} =$	3,16
MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO	

Fuente: Elaboración propia.

m) Relación entre la concentración y la respuesta analítica

La evaluación de la relación entre la concentración y la respuesta analítica consistió en la valoración de áreas (respuesta analítica) a diferentes concentraciones de trabajo (80, 90, 100, 110 y 120%) para cada principio activo, demostrando que existe correlación entre X (concentración), Y (respuesta analítica), siendo la pendiente diferente de cero y el intercepto igual a cero, estableciendo que la regresión es lineal validada estadísticamente para los cuatro principios activos; Trementina (ver tabla 24 y figura 13), Alcanfor (ver

tabla 25 y figura 14), Mentol (ver tabla 26 y figura 15) y Salicilato de metilo (ver tabla 27 y figura 16).

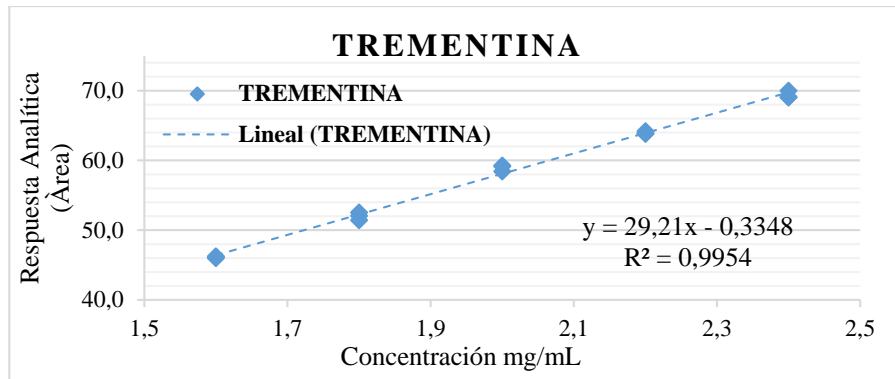
Tabla 24 Evaluación de la relación de la concentración y la respuesta analítica de la *Trementina*

TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL							
Valor de "t" experimental		52,7596					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,16					
Conclusión de la regresión lineal		Hay correlación proporcional entre x,y					
TEST DE LA PENDIENTE (b)							
Valor de "t" experimental		52,7596					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,16					
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)		La pendiente es diferente de cero					
TEST DEL INTERCEPTO (a)							
Valor de "t" experimental		0,2994					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,16					
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)		El intercepto es igual a cero					
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL							
Suma de cuadrados de la Regresión SCr		1023,8514					
Suma de cuadrados del Error Puro SCep		1,7183					
Suma de cuadrados entre concentraciones SCec		1026,9147					
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad SCl		3,0633					
ANOVA							
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl	Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	Fexp	Ftabla	Conclusión	
Regresión	1	1	1,0230E+03	1,0230E+03	5958,5	4,965	La regresión es lineal validada estadísticamente
Error puro	n-K	10	1,718	0,1718			

Fuente: elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para *Trementina* 1,6 mg/mL; 1,8 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,2 mg/mL; 2,4 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,9954 (ver figura 13).

Figura 13 Relación de la concentración y la respuesta analítica de la Trementina



Nota: Fuente: Elaboración propia.

Tabla 25 Evaluación de la relación de la concentración y la respuesta analítica del Alcanfor

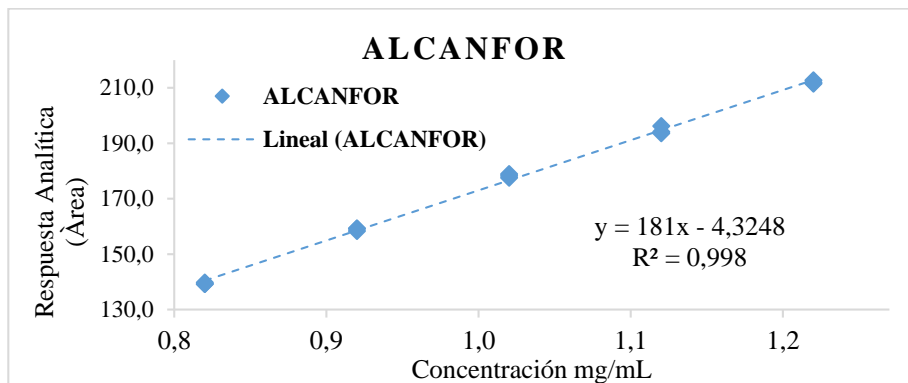
TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL						
Valor de "t" experimental		81,1664				
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,16				
Conclusión de la regresión lineal		Hay correlación proporcional entre x,y				
TEST DE LA PENDIENTE (b)						
Valor de "t" experimental		81,1664				
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,16				
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)		La pendiente es diferente de cero				
TEST DEL INTERCEPTO (a)						
Valor de "t" experimental		1,9203				
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,16				
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)		El intercepto es igual a cero				
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL						
Suma de cuadrados de la Regresión SCr		9828,2023				
Suma de cuadrados del Error Puro SCep		6,0938				
Suma de cuadrados entre concentraciones SCec		9841,5023				
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad SCI		13,3000				
ANOVA						
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl	Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	Fexp	Ftabla	Conclusión
Regresión	1	1	9,828E+03	9,828E+03	16128,053	4,965

Error puro	n-K	10	6,094	0,6094	La regresión es lineal validada estadísticamente
-------------------	-----	----	-------	--------	--

Fuente: elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Alcanfor 0,8 mg/mL; 0,9 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,1 mg/mL; 1,2 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,9954 (ver figura 14).

Figura 14 Relación de la concentración y la respuesta analítica del Alcanfor



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 26 Evaluación de la relación de la concentración y la respuesta analítica del Mentol

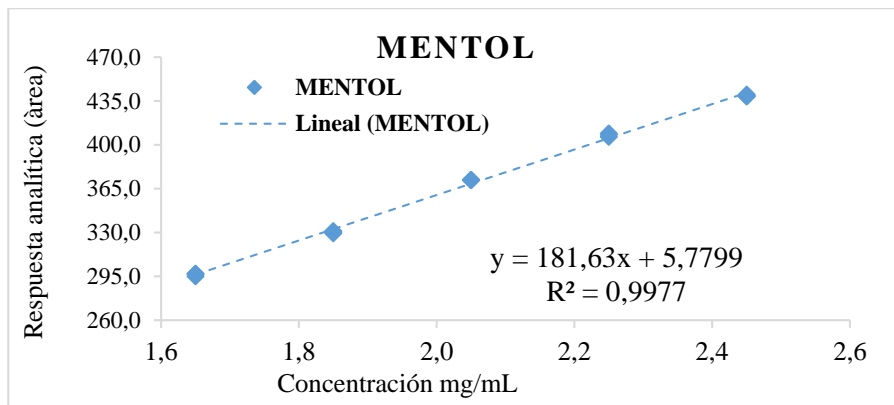
TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL	
Valor de "t" experimental	75,7382
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,16
Conclusión de la regresión lineal	Hay correlación proporcional entre x,y
TEST DE LA PENDIENTE (b)	
Valor de "t" experimental	75,7382
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,16
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)	La pendiente es diferente de cero
TEST DEL INTERCEPTO (a)	
Valor de "t" experimental	1,1932
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,16
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)	El intercepto es igual a cero

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL						
Suma de cuadrados de la Regresión SCr		39585,7209				
Suma de cuadrados del Error Puro SCep		8,2433				
Suma de cuadrados entre concentraciones SCec		39667,1899				
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad SCI		81,4690				
ANOVA						
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl	Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	Fexp	Ftabla	Conclusión
Regresión	1	3,95E+04	3,958E+04	48021,803	4,965	La regresión es lineal validada estadísticamente
Error puro	n-K	10	8,243	0,8243		

Fuente: elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Mentol 1.6 mg/mL; 1.8 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,2 mg/mL; 2,4 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,9954 (ver figura 15).

Figura 15 Relación de la concentración y la respuesta analítica del Mentol



Fuente: Elaboración propia.

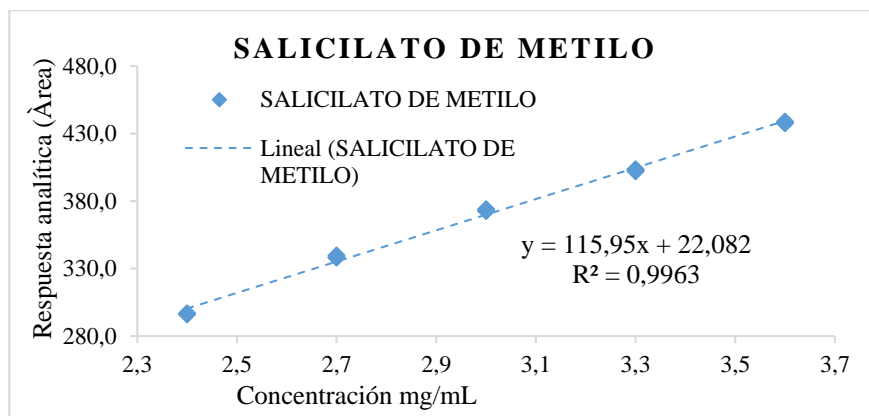
Tabla 27 Evaluación de la relación de la concentración y la respuesta analítica del Salicilato de metilo

TEST DE LA REGRESION LINEAL							
Valor de "t" experimental		59,1625					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,16					
Conclusión de la regresión lineal		Hay correlación proporcional entre x,y					
TEST DE LA PENDIENTE (b)							
Valor de "t" experimental		59,1625					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,16					
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)		La pendiente es diferente de cero					
TEST DEL INTERCEPTO (a)							
Valor de "t" experimental		3,7188					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,16					
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)		El intercepto es igual a cero					
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL							
Suma de cuadrados de la Regresión S_{Cr}		36297,4797					
Suma de cuadrados del Error Puro S_{Cep}		3,6805					
Suma de cuadrados entre concentraciones S_{Cec}		36428,6108					
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad S_{Cl}		131,1310					
ANOVA							
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl		Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	F_{exp}	F_{tabla}	Conclusión
Regresión	1	1	3,630E+04	3,6297E+04	98620,743	4,965	La regresión es lineal validada estadísticamente
Error puro	n-K	10	3,681	0,3681			

Fuente: elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Salicilato de metilo 2,4 mg/mL; 2,7 mg/mL; 3,0 mg/mL; 3,3 mg/mL; 3,6 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,9954 (ver figura 15).

Figura 16 Relación de la concentración y la respuesta analítica de Salicilato de metilo



Fuente: Elaboración propia.

n) Aptitud del Sistema

La prueba de aptitud del sistema cromatográfico fue realizado en la parte final del desarrollo del metodología analítica, utilizando las condiciones cromatográficas establecidas en el desarrollo del método y aplicando el apartado Aptitud del sistema del capítulo general de la USP 42-NF 37 <621> Cromatografía. Los parámetros cromatograficos evaluados cumplieron con las especificaciones establecidas verificando de esta forma que el sistema es apto para la cuantificación de los cuatro principios activos en emulsión tópica (ver tabla 28).

Tabla 28 Evaluación de la aptitud del sistema

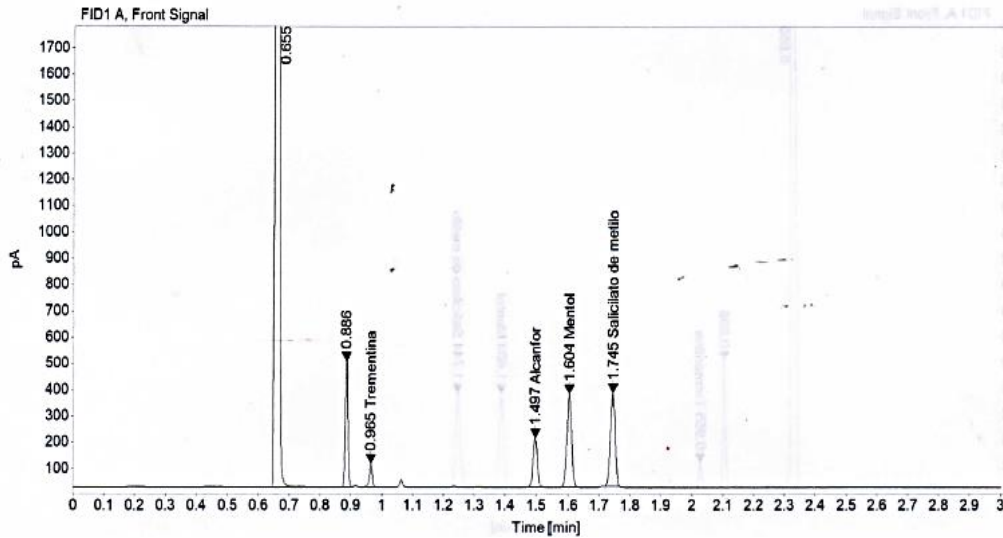
PRINCIPIO ACTIVO	PARÁMETRO	RESULTADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	CONCLUSIÓN POR PARÁMETRO CROMATOGRÁFICO
Trementina	Áreas (DSR)	0,4	≤ 2,0 %	Sistema apto
	Número de platos teóricos	125407	> 2000	Eficiencia adecuada
	Simetría (5%)	1,1	≤ 2,0	Simetría adecuada
	Capacidad del método	0,5	> 1	Capacidad adecuada. A pesar de que la capacidad del método es menor a 1, el pico de Trementina y

				tiempo muerto están resueltos
Alcanfor	Resolución	>40	$\geq 1,5$	Resolución adecuada
	Áreas (DSR)	0,4	$\leq 2,0 \%$	Sistema apto
	Número de platos teóricos	147337,9	> 2000	Eficiencia adecuada
	Simetría (5%)	0,9	$\leq 2,0$	Simetría adecuada
	Capacidad del método	1,3	> 1	Capacidad adecuada
Mentol	Resolución	40,2	$\geq 1,5$	Resolución adecuada
	Áreas (DSR)	1,1	$\leq 2,0 \%$	Sistema apto
	Número de platos teóricos	149349,7	> 2000	Eficiencia adecuada
	Simetría (5%)	1	$\leq 2,0$	Simetría adecuada
	Capacidad del método	1,4	> 1	Capacidad adecuada
Salicilato de metilo	Resolución	6,6	$\geq 1,5$	Resolución adecuada
	Áreas (DSR)	0,3	$\leq 2,0 \%$	Sistema apto
	Número de platos teóricos	164691,8	> 2000	Eficiencia adecuada
	Simetría (5%)	1,1	$\leq 2,0$	Simetría adecuada
	Capacidad del método	1,7	> 1	Capacidad adecuada
	Resolución	8,3	$\geq 1,5$	Resolución adecuada

Fuente: Elaboración propia.

Los picos de los cuatro principios activos presentes en la emulsión tópica se resuelven de forma satisfactoria, con una resolución mayor a 1,5 para cada pico Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo (ver figura 17).

Figura 17 Cromatograma con resolución de picos



Fuente: Software ChemStation de GC Agilent Technologies 7890B.

1.1. MÈTODO ANALÍTICO DESARROLLADO

Gas Carrier

- Helio

Sistema cromatográfico

- Modo: Cromatografía Gaseosa (GC)
- Detector: Ionización a la llama (FID)
- Columna: HP-5, Longitud: 30 m, Diámetro: 0.320 mm, Película: 0,25 µm.
- Temperaturas
 - ✓ Inyector: 260°
 - ✓ Detector: 240°
 - ✓ Columna: 120° (isocrática)
- Velocidad de flujo: Columna (He: 6,500 mL/min)
- Inyector (He: 659,5 mL/min)
- Detector (H2: 50,00 mL/min; Aire: 300,0 mL/min)

- Volumen de inyección: 1 μ L
- Tipo de inyección: Partición (Split), 100:1

Aptitud del Sistema

- DSR: $\leq 2\%$
- Número de platos teóricos (N): >2000
- Resolución (R): $\geq 1,5$
- Factor de capacidad (k): > 1
- Simetría de pico: $\leq 1,9$

Diluyente

Hexano

Preparación de la solución estándar

Pesar una cantidad de estándar de trementina, alcanfor, mentol y salicilato de metilo, diluir con Hexano grado HPLC en un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con el mismo solvente con agitación manual, para obtener una solución de 2,0 mg/mL; 1,0 mg/mL; 2,0 mg/mL y 3,0 mg/mL respectivamente. Filtrar por un filtro de nylon de 0,45 μ m.

Preparación de la solución muestra

Pesar una cantidad de emulsión tópica, que contenga aproximadamente 50 mg de trementina, 25 mg de alcanfor, 50 mg de mentol y 75 mg de salicilato de metilo, llevar a un matraz volumétrico de 25 mL, diluir con Hexano grado HPLC y llevar a volumen con el mismo solvente para obtener una solución de 2,0 mg/mL; 1,0 mg/mL; 2,0 mg/mL y 3,0 mg/mL respectivamente, luego llevar al ultrasonido por 5 min sin temperatura y finalmente adicionar una cantidad de sulfato de sodio anhidro, mezclar manualmente, filtrar por un filtro de nylon de 0,45 μ m.

Cálculos

Calcular por separado el porcentaje de trementina, alcanfor, mentol y salicilato de metilo declarada en la porción de muestra tomada.

Utilizar la siguiente formula:

$$\%R = (ru/rs) \times (Cs/Cu) \times 100$$

Donde:

%R= Rendimiento

ru = respuesta del pico de la muestra (Área)

rs = respuesta del pico del estándar (Área)

Cs = concentración del estándar

Cu = concentración de la muestra

Especificación

La emulsión tópica contiene no menos de 90,0% y no más de 110,0% de la cantidad declarada para cada principio activo: trementina $C_{10}H_{16}$, alcanfor $C_{10}H_{16}O$, mentol $C_{10}H_{20}O$ y salicilato de metilo $C_8H_8O_3$.

Las fórmulas para los cálculos y las especificaciones tienen como referencia a la monografía individual de 3 de los siguientes principios activos: Salicilato de metilo, Mentol, Alcanfor de la USP 42-NF 37.

2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación de la metodología analítica fue llevada a cabo siguiendo el documento de la *ICH Q2 (R1)* Validación de procedimientos analíticos y la USP 42-NF 37.

a) Linealidad Instrumental

Los resultados obtenidos en linealidad instrumental (ver Tabla 29 y Figura 18) para Trementina da a conocer que existe correlación proporcional entre X, Y (concentración y respuesta analítica), por los valores presentados en el coeficiente de correlación de Pearson $r=0,998$, coeficiente de determinación $r^2=0,996$ además que el valor de “t” de Student de Regresión es 74,22 mayor al “t” de Student de tablas 2,16.

La pendiente “b” es diferente de cero con un 95% de nivel de confianza por lo que hay una relación directamente proporcional entre “X” y “Y” y el intercepto “a” es igual a cero con un 95% de nivel de confianza. La prueba de ANOVA, demuestra que la regresión es estadísticamente lineal en el intervalo propuesto, por lo que se concluye que con un 95% de nivel de confianza el intervalo de 80%, 90 %, 100%, 110% y 120 % es adecuado para el análisis de Trementina.

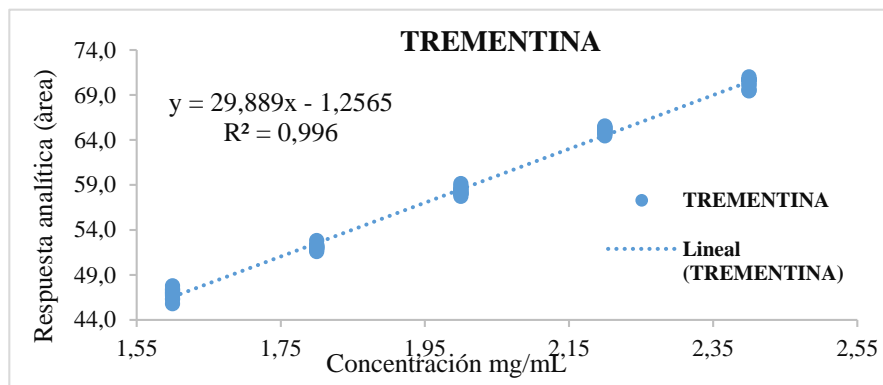
Tabla 29 *Linealidad instrumental para Trementina*

TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL							
Valor de "t" experimental		74,2255					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604					
Conclusión de la regresión lineal		Hay correlación proporcional entre x,y					
TEST DE LA PENDIENTE (b)							
Valor de "t" experimental		74,2255					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604					
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)		La pendiente es diferente de cero					
TEST DEL INTERCEPTO (a)							
Valor de "t" experimental		1,5448					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604					
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)		El intercepto es igual a cero					
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL							
Suma de cuadrados de la Regresión S_{Cr}		1072, 0252					
Suma de cuadrados del Error Puro S_{Cep}		0, 5019					
Suma de cuadrados entre concentraciones S_{Cec}		1074,0528					
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad S_{CI}		2,028					
ANOVA							
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl		Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	F_{exp}	F_{tabla}	Conclusión
Regresión	1	1	1,0720E+03	1,0720E+03	21358,495	4,965	La regresión es lineal validada estadísticamente
Linealidad	k-2	1	2, 028	0,6759	13,466	3,708	
Error puro	n-k	10	0,502	0,0502			

Fuente: Elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Trementina 1,6 mg/mL; 1,8 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,2 mg/mL; 2,4 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,996 (ver figura 18).

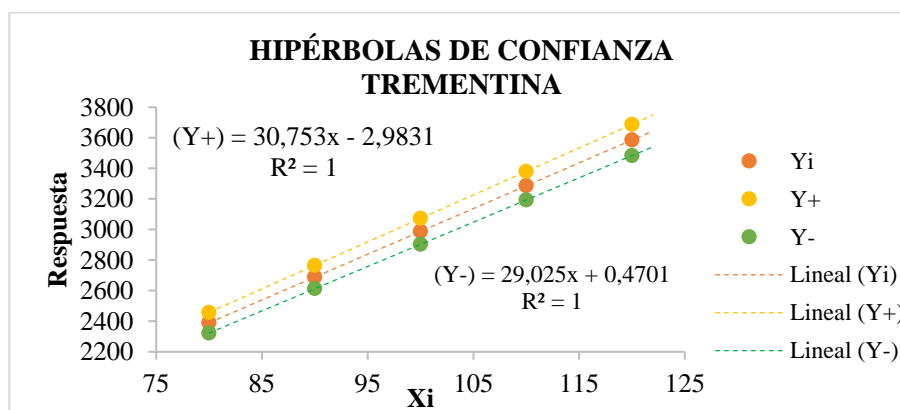
Figura 18 Linealidad instrumental para Trementina



Fuente: Elaboración propia.

Las hipérbolas de confianza para la linealidad instrumental de la Trementina (ver figura 19), demuestran que mientras mayor es el coeficiente de determinación (R^2) más angostas son las bandas de confianza ($Y+$) y ($Y-$) y el sistema está funcionando de manera tal que no interfiere en la interacción entre la concentración X y la respuesta Y.

Figura 19 Hipérbolas de confianza para la Trementina



Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos en linealidad instrumental (ver Tabla 30 y Figura 20) para Alcanfor da a conocer que existe correlación proporcional entre x,y (concentración y respuesta analítica), por los valores presentados en el coeficiente de correlación de Pearson $r=0,999$, coeficiente de determinación $r^2=0,998$ además que el valor de “t” de Student de Regresión es 89,99 mayor al “t” de Student de tablas 2,16.

La pendiente “b” es diferente de cero con un 95% de nivel de confianza por lo que hay una relación directamente proporcional entre “X” y “Y” y el intercepto “a” es igual a cero con un 95% de nivel de confianza. La prueba de ANOVA, demuestra que la regresión es estadísticamente lineal en el intervalo propuesto, por lo que se concluye que con un 95% de nivel de confianza el intervalo de 80%, 90 %, 100%, 110% y 120 % es adecuado para el análisis de Alcanfor.

Tabla 30 *Linealidad instrumental para Alcanfor*

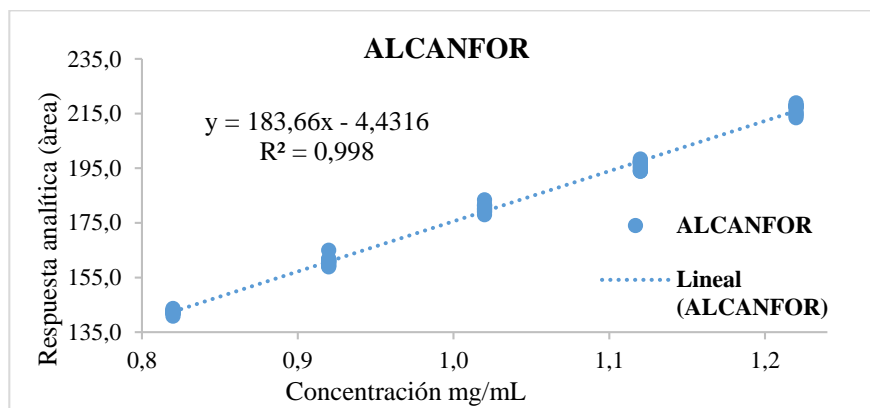
TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL	
Valor de "t" experimental	89,9999
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604
Conclusión de la regresión lineal	Hay correlación proporcional entre x,y
TEST DE LA PENDIENTE (b)	
Valor de "t" experimental	89,9999
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)	La pendiente es diferente de cero
TEST DEL INTERCEPTO (a)	
Valor de "t" experimental	2,1502
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)	El intercepto es igual a cero
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL	
Suma de cuadrados de la Regresión SCr	10119, 7303
Suma de cuadrados del Error Puro SCep	4 ,8474
Suma de cuadrados entre concentraciones SCec	10131, 12442
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad SCI	11,394

ANOVA						
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl	Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	Fexp	Ftabla	Conclusión
Regresión	1 1	1,0120E+04	1,0120E+4	20876,448	4,963	La regresión es lineal validada estadísticamente
Linealidad	k-2 1	11,394	3,7980	7,835	3,708	
Error puro	n-k 10	4,847	0,4847			

Fuente: Elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Alcanfor 0,8 mg/mL; 0,9 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,1 mg/mL; 1,2 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,998 (ver figura 20).

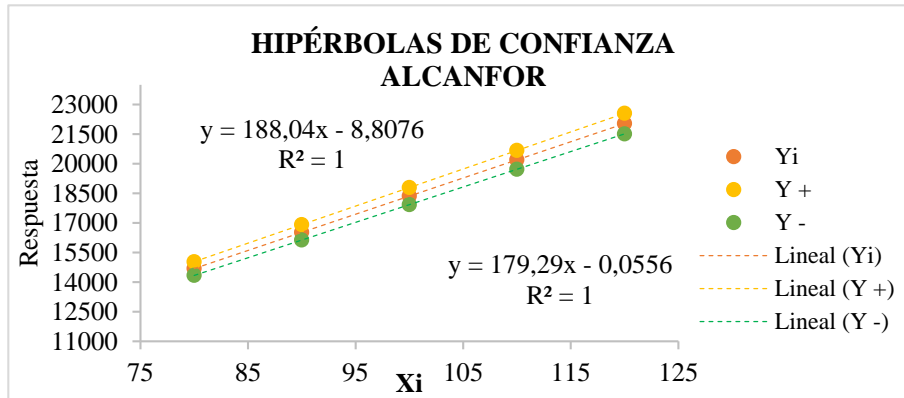
Figura 20 Linealidad instrumental para Alcanfor



Fuente: Elaboración propia.

Las hipérbolas de confianza para la linealidad instrumental de Alcanfor (ver figura 21), demuestran que mientras mayor es el coeficiente de determinación (R^2) más angostas son las bandas de confianza ($Y+$) y ($Y-$) y el sistema está funcionando de manera tal que no interfiere en la interacción entre la concentración X y la respuesta Y.

Figura 21 Hipérbolas de confianza para Alcanfor



Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos en linealidad instrumental (ver Tabla 31 y Figura 22) para Mentol da a conocer que existe correlación proporcional entre X, Y (concentración y respuesta analítica), por los valores presentados en el coeficiente de correlación de Pearson $r=0,998$, coeficiente de determinación $r^2=0,997$ y el valor de “t” de Student de Regresión es 89,99 mayor al “t” de Student de tablas 2,16.

La pendiente “b” es diferente de cero con un 95% de nivel de confianza por lo que hay una relación directamente proporcional entre “X” y “Y” y el intercepto “a” es igual a cero con un 95% de nivel de confianza. La prueba de ANOVA, demuestra que la regresión es estadísticamente lineal en el intervalo propuesto, por lo que se concluye que con un 95% de nivel de confianza el intervalo de 80%, 90 %, 100%, 110% y 120 % es adecuado para el análisis del Mentol.

Tabla 31 Linealidad instrumental para Mentol

TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL	
Valor de "t" experimental	72,3601
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604
Conclusión de la regresión lineal	Hay correlación proporcional entre x,y
TEST DE LA PENDIENTE (b)	
Valor de "t" experimental	72,3601
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)	La pendiente es diferente de cero

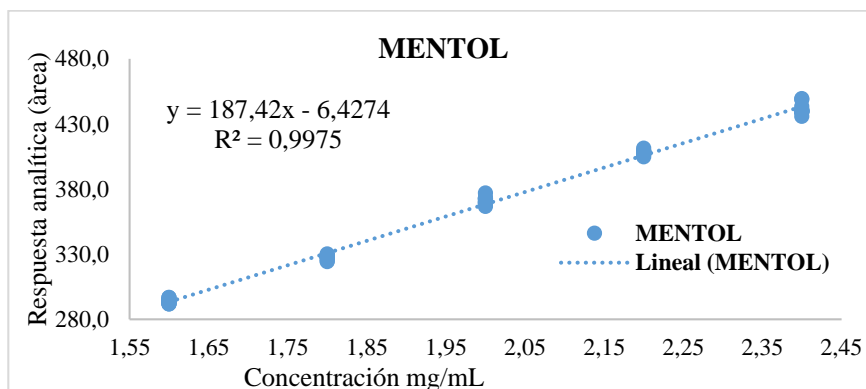
TEST DEL INTERCEPTO (a)	
Valor de "t" experimental	1,2285
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)	El intercepto es igual a cero
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL	
Suma de cuadrados de la Regresión SCr	42151, 37199
Suma de cuadrados del Error Puro SCep	26, 0099
Suma de cuadrados entre concentraciones SCec	42230, 0162
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad SCI	78,644

ANOVA						
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl	Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	Fexp	Ftabla	Conclusión
Regresión	1	4,2151E+4	4,2151E+4	16205,840	4,965	La regresión es lineal validada estadísticamente
Linealidad	k-2 1	78,644	26,2147	10,079	3,708	
Error puro	n-k 10	26,010	2,6009			

Fuente: Elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Mentol 1,6 mg/mL; 1,8 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,2 mg/mL; 2,4 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,998 (ver figura 22).

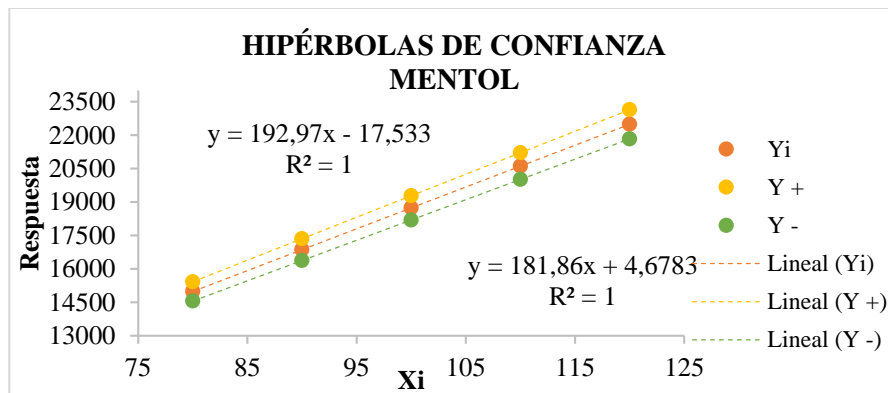
Figura 22 Linealidad instrumental para Mentol



Fuente: Elaboración propia.

Las hipérbolas de confianza para la linealidad instrumental del Mentol (ver figura 23), demuestran que mientras mayor es el coeficiente de determinación (R^2) más angostas son las bandas de confianza ($Y+$) y ($Y-$) y el sistema está funcionando de manera tal que no interfiere en la interacción entre la concentración X y la respuesta Y .

Figure 23 Hipérbolas de confianza para Mentol



Fuente: Elaboración propia

Los resultados obtenidos en linealidad instrumental (ver Tabla 30 y Figura 20) para Salicilato de metilo da a conocer que existe correlación proporcional entre x, y (concentración y respuesta analítica), por los valores presentados en el coeficiente de correlación de Pearson $r=0,997$, coeficiente de determinación $r^2=0,995$ y el valor de “ t ” de Student de Regresión es 89,99 mayor al “ t ” de Student de tablas 2,16.

La pendiente “ b ” es diferente de cero con un 95% de nivel de confianza por lo que hay una relación directamente proporcional entre “ X ” y “ Y ” y el intercepto “ a ” es igual a cero con un 95% de nivel de confianza. La prueba de ANOVA, demuestra que la regresión es estadísticamente lineal en el intervalo propuesto, por lo que se concluye que con un 95% de nivel de confianza el intervalo de 80%, 90 %, 100%, 110% y 120 % es adecuado para el análisis de Salicilato de metilo.

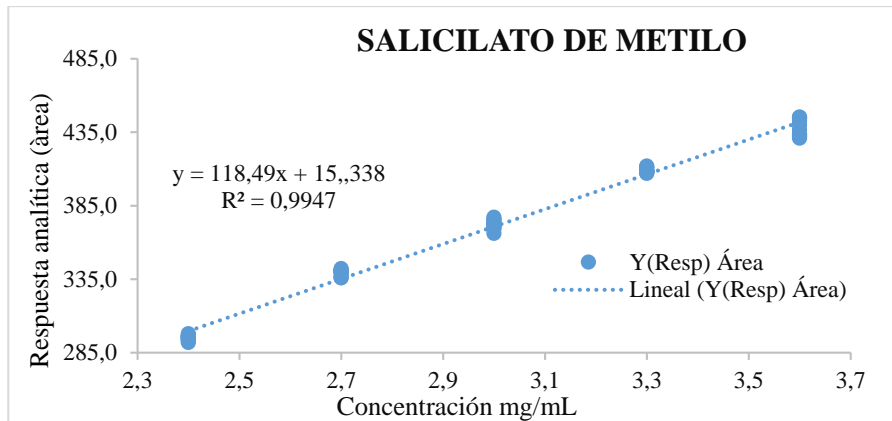
Tabla 32 Linealidad instrumental del Salicilato de Metilo

TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL						
Valor de "t" experimental		49,2131				
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604				
Conclusión de la regresión lineal		Hay correlación proporcional entre x,y				
TEST DE LA PENDIENTE (b)						
Valor de "t" experimental		49,2131				
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604				
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)		La pendiente es diferente de cero				
TEST DEL INTERCEPTO (a)						
Valor de "t" experimental		2,1024				
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604				
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)		El intercepto es igual a cero				
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL						
Suma de cuadrados de la Regresión SCr		37909, 56645				
Suma de cuadrados del Error Puro SCep		17, 1236				
Suma de cuadrados entre concentraciones SCec		38095, 9269				
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad SCI		186,360				
ANOVA						
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl	Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	Fexp	Ftabla	Conclusión
Regresión	1 1	3,7910E+04	3,7910E+4	22138,802	4,965	La regresión es lineal validada estadísticamente
Linealidad	k-2 1	186,360	62,1201	36,278	3,708	
Error puro	n-k 10	17,124	1,7124			

Fuente: Elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Salicilato de metilo 2,4 mg/mL; 2,7 mg/mL; 3,0 mg/mL; 3,3 mg/mL; 3,6 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,995 (ver figura 24).

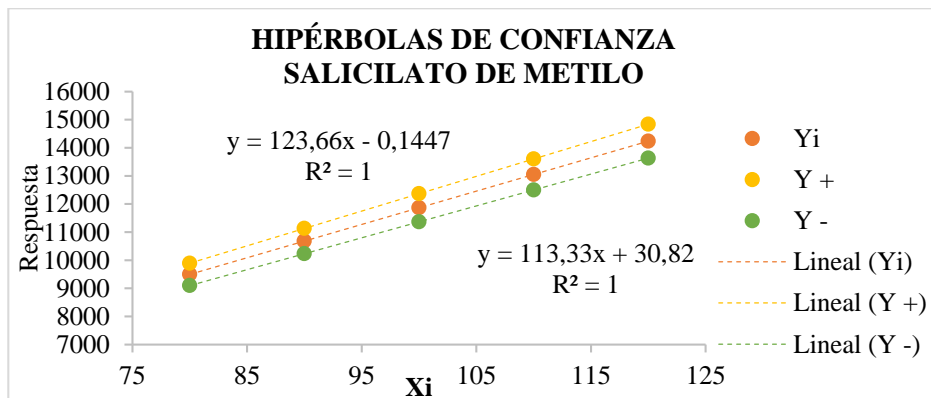
Figura 24 Linealidad instrumental del Salicilato de Metilo



Fuente: Elaboración propia.

Las hipérbolas de confianza para la linealidad instrumental del Salicilato de metilo (ver figura 25), demuestran que mientras mayor es el coeficiente de determinación (R^2) más angostas son las bandas de confianza ($Y+$) y ($Y-$) y el sistema está funcionando de manera tal que no interfiere en la interacción entre la concentración X y la respuesta Y .

Figura 25 Hipérbolas de confianza para Salicilato de Metilo



Fuente: Elaboración propia

b) Linealidad del Método

Los resultados obtenidos en linealidad método (ver Tabla 33 al 36 y Figura 25 al 32) para los cuatro principios activos más matriz, dan a conocer que existe correlación

proporcional entre X, Y (concentración y respuesta analítica), la pendiente es diferente de cero y el intercepto es igual a cero, el coeficiente de determinación es mayor a 0,998 y con los datos obtenidos se demostró que la regresión es lineal estadísticamente validada mediante el análisis de varianza ANOVA para los cuatro principios activos, demostrando que las medias son iguales.

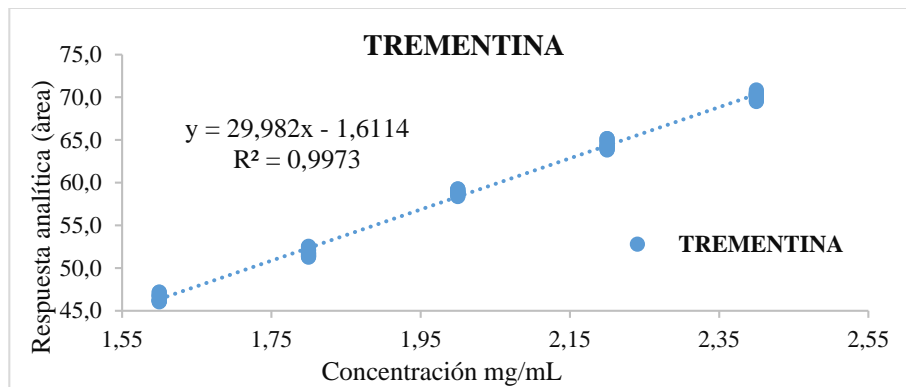
Tabla 33 Linealidad del método para Trementina

TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL						
Valor de "t" experimental	69,4741					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604					
Conclusión de la regresión lineal	Hay correlación proporcional entre x,y					
TEST DE LA PENDIENTE (b)						
Valor de "t" experimental	69,4741					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604					
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)	La pendiente es diferente de cero					
TEST DEL INTERCEPTO (a)						
Valor de "t" experimental	1,8485					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604					
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)	El intercepto es igual a cero					
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL						
Suma de cuadrados de la Regresión SCr	1078,7026					
Suma de cuadrados del Error Puro SCep	0,9550					
Suma de cuadrados entre concentraciones SCec	1080,6529					
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad SCI	1,950					
ANOVA						
Fuente de Variación FV	Grados de libertad	Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	F_{exp}	F_{tabla}	Conclusión
Regresión	1 1	1,0787E+03	1,0787E+03	11294,822	4,965	La regresión es lineal validada estadísticamente
Linealidad	k-2 1	1,950	0,6501	6,807	3,708	
Error puro	n-k 10	0,955	0,0955			

Fuente: Elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Trementina 1,6 mg/mL; 1,8 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,2 mg/mL; 2,4 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,997 (ver figura 26).

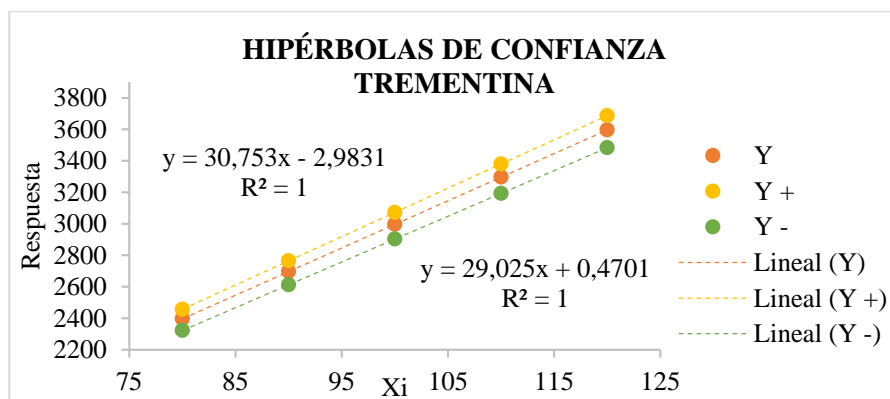
Figure 26 Linealidad del método para Trementina



Fuente: Elaboración propia.

Las hipérbolas de confianza para la linealidad del método de la Trementina (ver figura 27), demuestran que mientras mayor es el coeficiente de determinación (R²) más angostas son las bandas de confianza (Y+) y (Y-) y el sistema está funcionando de manera tal que no interfiere en la interacción entre la concentración X y la respuesta Y.

Figure 27 Hipérbolas de confianza para la Trementina



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 34 Linealidad del método para Alcanfor

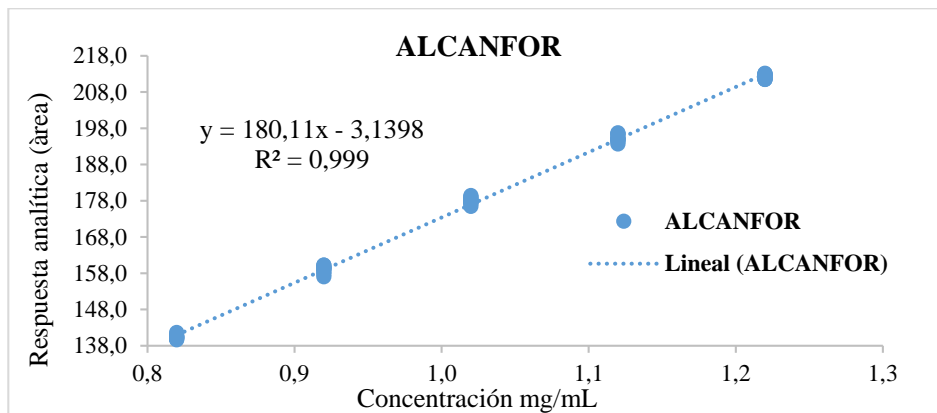
TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL							
Valor de "t" experimental		113,5470					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604					
Conclusión de la regresión lineal		Hay correlación proporcional entre x,y					
TEST DE LA PENDIENTE (b)							
Valor de "t" experimental		113,5470					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604					
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)		La pendiente es diferente de cero					
TEST DEL INTERCEPTO (a)							
Valor de "t" experimental		1,9600					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604					
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)		El intercepto es igual a cero					
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL							
Suma de cuadrados de la Regresión SCr		9731,5846					
Suma de cuadrados del Error Puro SCep		3,6411					
Suma de cuadrados entre concentraciones SCec		9737,7559					
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad SCI		6,171					
ANOVA							
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl		Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	Fexp	Ftabla	Conclusión
Regresión	1	1	9,7316E+03	9,7316E+03	26727,043	4,965	La regresión es lineal validada estadísticamente
Linealidad	k-2	1	6,171	2,0570	5,650	3,708	
Error puro	n-k	10	3,641	0,36411			

Fuente: Elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Alcanfor 0,8 mg/mL; 0,9 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,1 mg/mL; 1,2 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal

entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,999 (ver figura 28).

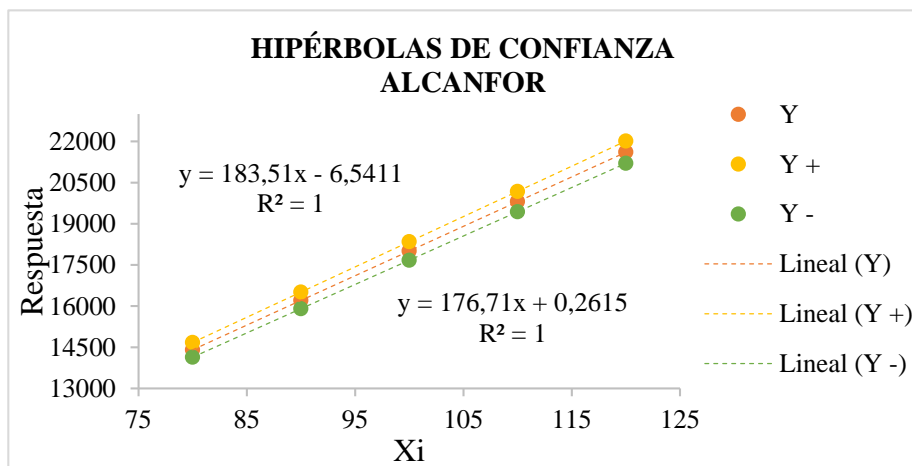
Figura 28 Linealidad del método para Alcanfor



Fuente: Elaboración propia.

Las hipérbolas de confianza para la linealidad del método de Alcanfor (ver figura 29), demuestran que mientras mayor es el coeficiente de determinación (R^2) más angostas son las bandas de confianza ($Y+$) y ($Y-$) y el sistema está funcionando de manera tal que no interfiere en la interacción entre la concentración X y la respuesta Y.

Figura 29 Hipérbolas de confianza para Alcanfor



Fuente: Elaboración propia.

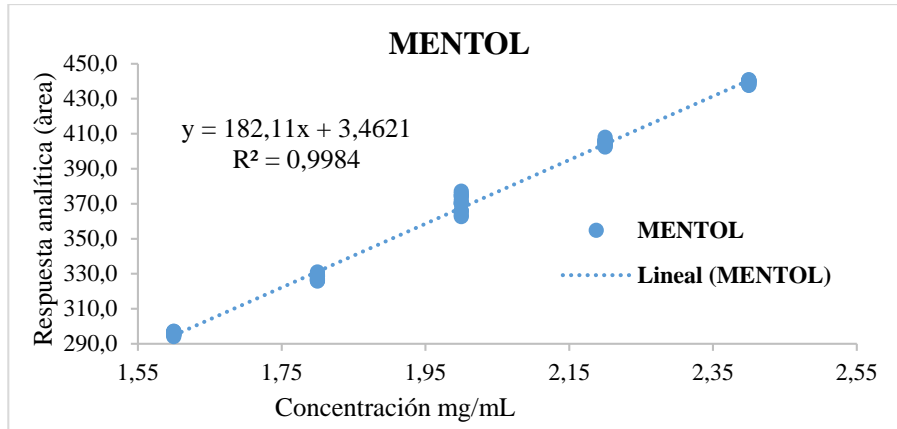
Tabla 35 Linealidad del método para Mentol

TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL							
Valor de "t" experimental		89,1267					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604					
Conclusión de la regresión lineal		Hay correlación proporcional entre x,y					
TEST DE LA PENDIENTE (b)							
Valor de "t" experimental		89,1267					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604					
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)		La pendiente es diferente de cero					
TEST DEL INTERCEPTO (a)							
Valor de "t" experimental		0,8388					
"t" de Student crítico (0,05;n-2)		2,1604					
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)		El intercepto es igual a cero					
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL							
Suma de cuadrados de la Regresión S_{Cr}		39798,0681					
Suma de cuadrados del Error Puro S_{Cep}		5,3519					
Suma de cuadrados entre concentraciones S_{Cec}		39857,8474					
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad S_{CI}		59,779					
ANOVA							
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl		Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	F_{exp}	F_{tabla}	Conclusión
Regresión	1	1	3,9798E+04	3,9798E+04	74362,721	4,965	La regresión es lineal validada estadísticamente
Linealidad	k-2	1	59,779	19,9264	37,233	3,708	
Error puro	n-k	10	5,352	0,5351			

Fuente: Elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Mentol 1,6 mg/mL; 1,8 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,2 mg/mL; 2,4 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,998 (ver figura 30).

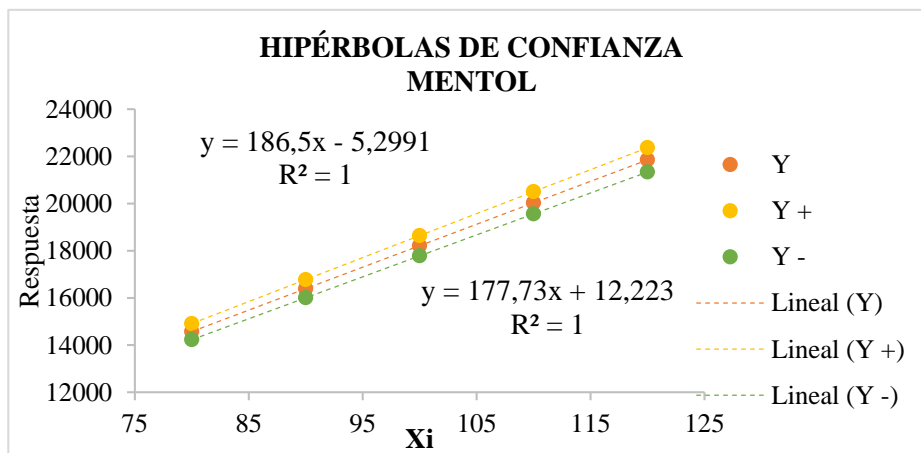
Figura 30 Linealidad del método para Mentol



Fuente: Elaboración propia.

Las hipérbolas de confianza para la linealidad del método de Mentol (ver figura 31), demuestran que mientras mayor es el coeficiente de determinación (R^2) más angostas son las bandas de confianza ($Y+$) y ($Y-$) y el sistema está funcionando de manera tal que no interfiere en la interacción entre la concentración X y la respuesta Y .

Figura 31 Hipérbolas de confianza para Mentol



Fuente: Elaboración propia.

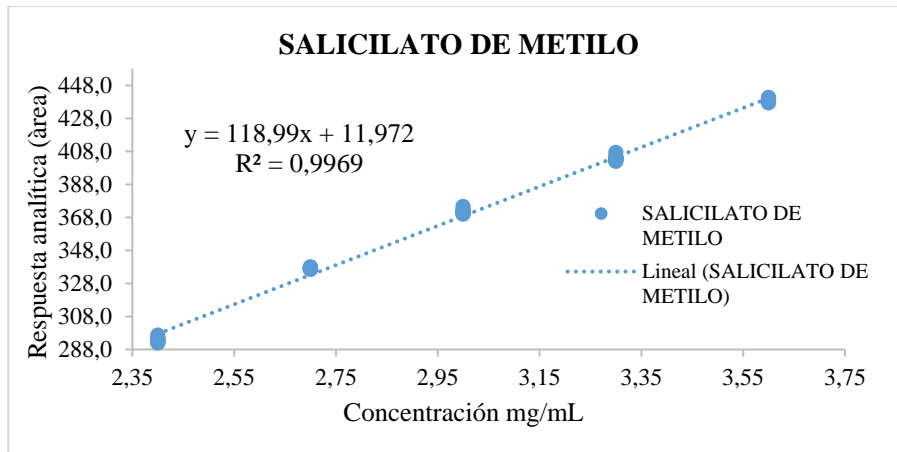
Tabla 36 Linealidad del método para Salicilato de Metilo

TEST PARA LA REGRESIÓN LINEAL							
Valor de "t" experimental	64,6001						
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604						
Conclusión de la regresión lineal	Hay correlación proporcional entre x,y						
TEST DE LA PENDIENTE (b)							
Valor de "t" experimental	64,6001						
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604						
Conclusión del comportamiento de la PENDIENTE (b)	La pendiente es diferente de cero						
TEST DEL INTERCEPTO (a)							
Valor de "t" experimental	2,1453						
"t" de Student crítico (0,05;n-2)	2,1604						
Conclusión del comportamiento del INTERCEPTO (a)	El intercepto es igual a cero						
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN LINEAL							
Suma de cuadrados de la Regresión SCr	38225,47746						
Suma de cuadrados del Error Puro SCep	1,8757						
Suma de cuadrados entre concentraciones SCec	38342,6791						
Suma de cuadrados para desvío de Linealidad SCI	117,202						
ANOVA							
Fuente de Variación FV	Grados de libertad gl		Suma de cuadrados SC	Cuadrado Medio CM	Fexp	Ftabla	Conclusión
Regresión	1	1	3,8225E+04	3,8225E+04	203790,666	4,965	La regresión es lineal validada estadísticamente
Linealidad	k-2	1	117,202	39,0672	208,278	3,708	
Error puro	n-k	10	1,876	0,1876			

Fuente: Elaboración propia.

Las concentraciones de trabajo para Salicilato de metilo 2,4 mg/mL; 2,7 mg/mL; 3,0 mg/mL; 3,3 mg/mL; 3,6 mg/mL (80, 90, 100, 110 y 120%), demostraron una buena relación lineal entre las variables Y (respuesta) y X (concentración) al presentar un coeficiente de determinación de 0,997 (ver figura 24).

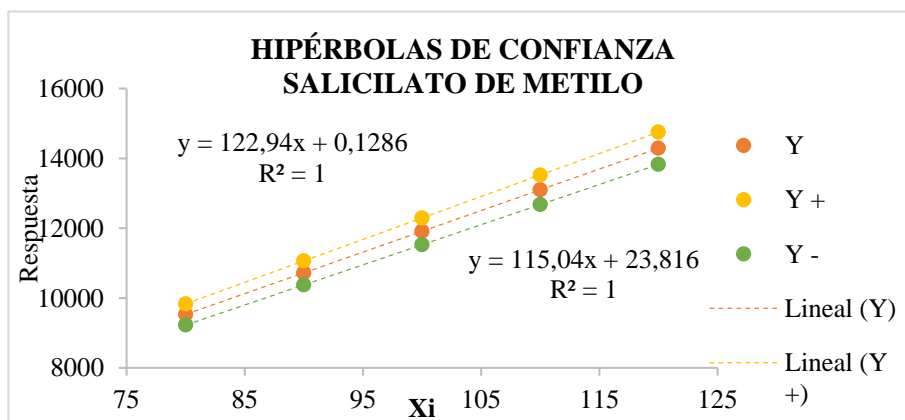
Figura 32 Linealidad del método para Salicilato de Metilo



Fuente: Elaboración propia.

Las hipérbolas de confianza para la linealidad del método de Salicilato de metilo (ver figura 33), demuestran que mientras mayor es el coeficiente de determinación (R^2) más angostas son las bandas de confianza ($Y+$) y ($Y-$) y el sistema está funcionando de manera tal que no interfiere en la interacción entre la concentración X y la respuesta Y .

Figure 33 Hipérbolas de confianza para Salicilato de Metilo



Fuente: Elaboración propia.

c) Precisión

La precisión fue evaluada para los cuatro principios activos de la siguiente manera

➤ Repetibilidad instrumental

Se realizó la repetibilidad instrumental al 100% de concentración, obteniendo un coeficiente de variación para cada principio activo menor al 2% (ver tabla 37).

Tabla 37 *Repetibilidad instrumental*

Principio activo	RESPUESTA ANALÍTICA ÁREA		RESPUESTA ANALÍTICA TIEMPO DE RETENCIÓN	
	% CV	Criterio de aceptación	% CV	Criterio de aceptación
Trementina	0,50	Máximo 2%	0,00	Máximo 2%
Alcanfor	0,45	Máximo 2%	0,00	Máximo 2%
Mentol	0,45	Máximo 2%	0,00	Máximo 2%
Salicilato de metilo	0,34	Máximo 2%	0,02	Máximo 2%

Fuente: Elaboración propia.

➤ Repetibilidad del método

Se realizó la repetibilidad del método a tres niveles de concentración (90, 100 y 110%) para Trementina 1,6 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,4 mg/mL (ver tabla 38); Alcanfor 0,8 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,2 mg/mL (ver tabla 39); Mentol 1,6 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,4 mg/mL (ver tabla 40) y Salicilato de metilo 2,4 mg/mL; 3,0 mg/mL; 3,6 mg/mL (ver tabla 41), obteniendo un coeficiente de variación para cada principio activo menor al 2% demostrando una buena repetibilidad del método en los resultados obtenidos utilizando los estadísticos Grubbs y Cochran.

Tabla 38 *Repetibilidad del método para Trementina*

Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM	46,53	S ² _{rj}	0,049
1,6	0,6442	CORRECTO	DS	0,3936	Sr	0,221
	1,2423	CORRECTO	G _{tab 95%}	2,2900	EVALUACIÓN	
	0,2103	CORRECTO	G _{tab 99%}	2,4820	CV [%]	0,474
	1,5714	CORRECTO	C _{cochran}	0,5493	Criterio de aceptación	2,00
	0,1790	CORRECTO	C _{tabulado}	0,7810		

	0,7044	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO	CUMPLE CRITERIO	
Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM_{PROM}	59,3	S²_{ij}	0,044
	0,5428	CORRECTO	DS	0,5507	Sr	0,211
	1,0820	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	1,6525	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	0,355
2,0	0,1184	CORRECTO	C_{Cochran}	0,6939	Criterio de aceptación	2,00
	0,5511	CORRECTO	C_{tabulado}	0,7810	CUMPLE CRITERIO	
	0,6972	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO		
Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM_{PROM}	69,59	S²_{ij}	0,047
	1,0384	CORRECTO	DS	0,7480	Sr	0,216
	0,5027	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	0,5188	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	0,311
2,4	0,4466	CORRECTO	C_{Cochran}	0,3477	Criterio de aceptación	2,00
	1,0813	CORRECTO	C_{tabulado}	0,7810	CUMPLE CRITERIO	
	1,4252	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO		

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 39 Repetibilidad del método para Alcanfor

Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM	139,24	S²_{ij}	0,262
	0,6823	CORRECTO	DS	0,7567	Sr	0,512
	0,1796	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	1,6756	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	0,368
0,8	0,9335	CORRECTO	C_{Cochran}	0,6567	Criterio de aceptación	2,00
	0,6987	CORRECTO	C_{tabulado}	0,7810	CUMPLE CRITERIO	
	0,5789	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO		
Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM	178,19	S²_{ij}	0,432

	1,3586	CORRECTO	DS	0,5260	Sr	0,657
	0,3266	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	0,1238	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	0,369
1,0	1,2210	CORRECTO	C_{Cochran}	0,7534	Criterio de aceptación	2,00
	0,3404	CORRECTO	C_{tabulado}	0,7810	CUMPLE CRITERIO	
	1,3079	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO		
Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM	212,25	S²_{rij}	0,321
	0,3241	CORRECTO	DS	0,5175	Sr	0,566
	1,2754	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	1,0750	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	0,267
1,2	0,7919	CORRECTO	C_{Cochran}	0,5016	Criterio de aceptación	2,00
	0,2725	CORRECTO	C_{tabulado}	0,7810	CUMPLE CRITERIO	
	1,1881	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO		

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 40 Repetibilidad del método para Mentol

Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM	295,82	S²_{rij}	0,334
	1,2881	CORRECTO	DS	0,8421	Sr	0,578
	0,6209	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	1,5545	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	0,195
1,6	0,3649	CORRECTO	C_{Cochran}	0,4825	Criterio de aceptación	2,00
	0,6307	CORRECTO	C_{tabulado}	0,7810	CUMPLE CRITERIO	
	0,0889	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO		
Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM	374,89	S²_{rij}	0,591
	0,2746	CORRECTO	DS	5,4040	Sr	0,769
2,0	0,5409	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	0,0974	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	0,205

	0,6026	CORRECTO	$C_{Cochran}$	0,4881	Criterio de aceptación	2,00
	0,4896	CORRECTO	$C_{tabulado}$	0,7810	CUMPLE CRITERIO	
	2,0049	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO		
Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM	439,28		S^2_{rj}
	1,6167	CORRECTO	DS	1,7195	Sr	1,533
	0,8034	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	0,1739	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	0,349
2,4	0,6246	CORRECTO	$C_{Cochran}$	0,6832	Criterio de aceptación	2,00
	0,7574	CORRECTO	$C_{tabulado}$	0,7810	CUMPLE CRITERIO	
	0,8642	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO		

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 41 Repetibilidad del método para Salicilato de metilo

Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM	294,41	S^2_{rj}	7,685
	0,8356	CORRECTO	DS	1,3845	Sr	2,772
	0,4824	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	0,1965	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	0,942
2,4	1,9657	CORRECTO	$C_{Cochran}$	0,7037	Criterio de aceptación	2,00
	0,0456	CORRECTO	$C_{tabulado}$	0,7810	CUMPLE CRITERIO	
	0,4056	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO		
Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM	374,28		S^2_{rj}
	0,2453	CORRECTO	DS	2,7727	Sr	3,975
	0,3631	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	0,2661	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	1,062
3,0	1,3143	CORRECTO	$C_{Cochran}$	0,6820	Criterio de aceptación	2,00
	0,6403	CORRECTO	$C_{tabulado}$	0,7810	CUMPLE CRITERIO	

	1,6124	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO		
Nivel	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	PROM	437,84	S^2_{rj}	0,366
	0,8409	CORRECTO	DS	1,6014	Sr	0,605
	0,9440	CORRECTO	Gtab 95%	2,2900	EVALUACIÓN	
	0,5771	CORRECTO	Gtab 99%	2,4820	CV [%]	0,138
3,6	1,6956	CORRECTO	C_{Cochran}	0,6812	Criterio de aceptación	2,00
	0,0505	CORRECTO	C_{tabulado}	0,7810		
	0,4373	CORRECTO	Evaluación Cochran	CORRECTO	CUMPLE CRITERIO	

Fuente: Elaboración propia.

➤ Precisión intermedia

Se determinó la variabilidad del método evaluando la precisión intermedia, las variables utilizadas fueron condiciones ambientales y analistas (3 días y 2 analistas diferentes) a diferentes niveles de concentración (90, 100, 110 %) para Trementina 1,6 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,4 mg/mL (ver tabla 42) ; Alcanfor 0,8 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,2 mg/mL (ver tabla 43) ; Mentol 1,6 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,4 mg/mL (ver tabla 44) y Salicilato de metilo 2,4 mg/mL; 3,0 mg/mL; 3,6 mg/mL (ver tabla 45), se determinó que el método es preciso para los cuatro principios utilizando los estadísticos Grubbs y Cochran.

Tabla 42 *Precisión intermedia para la Trementina*

NIVEL		NIVEL		NIVEL	
1,6		2,0		2,4	
G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs
0,5855	CORRECTO	0,6732	CORRECTO	0,1236	CORRECTO
0,2231	CORRECTO	0,7579	CORRECTO	0,6317	CORRECTO
0,3148	CORRECTO	0,7833	CORRECTO	0,5875	CORRECTO
0,4032	CORRECTO	0,4663	CORRECTO	0,3059	CORRECTO
1,1029	CORRECTO	0,9305	CORRECTO	0,2080	CORRECTO
0,7078	CORRECTO	1,4831	CORRECTO	0,7284	CORRECTO

1,5655	CORRECTO	1,4393	CORRECTO	1,7103	CORRECTO
1,9225	CORRECTO	1,3456	CORRECTO	1,9889	CORRECTO
0,3701	CORRECTO	0,1330	CORRECTO	0,3680	CORRECTO
0,5871	CORRECTO	0,4199	CORRECTO	0,7462	CORRECTO
G_{tab} 95%	2,29	G_{tab} 95%	2,29	G_{tab} 95%	2,29
G_{tab} 99%	2,482	G_{tab} 99%	2,482	G_{tab} 99%	2,482
C_{Cochran}	0,455	C_{Cochran}	0,280	C_{Cochran}	0,280
C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 43 *Precisión intermedia para el Alcanfor*

NIVEL		NIVEL		NIVEL	
0,8		1,0		1,2	
G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs
0,1797	CORRECTO	0,5710	CORRECTO	0,2036	CORRECTO
0,1185	CORRECTO	0,7511	CORRECTO	0,6516	CORRECTO
0,3775	CORRECTO	0,7665	CORRECTO	0,4283	CORRECTO
0,5481	CORRECTO	0,2147	CORRECTO	0,2714	CORRECTO
1,1775	CORRECTO	0,7943	CORRECTO	0,4198	CORRECTO
0,8239	CORRECTO	1,7286	CORRECTO	0,8135	CORRECTO
1,4780	CORRECTO	1,4094	CORRECTO	1,6780	CORRECTO
1,8604	CORRECTO	1,2940	CORRECTO	1,9427	CORRECTO
0,7895	CORRECTO	0,0867	CORRECTO	0,4190	CORRECTO
0,4200	CORRECTO	0,4347	CORRECTO	0,8207	CORRECTO
G_{tab} 95%	2,29	G_{tab} 95%	2,29	G_{tab} 95%	2,29
G_{tab} 99%	2,482	G_{tab} 99%	2,482	G_{tab} 99%	2,482
C_{Cochran}	0,340	C_{Cochran}	0,280	C_{Cochran}	0,160
C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 44 *Precisión intermedia para el Mentol*

NIVEL		NIVEL		NIVEL	
1,6		2,0		2,4	
G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs
0,4343	CORRECTO	0,6066	CORRECTO	0,0266	CORRECTO
0,1016	CORRECTO	0,8627	CORRECTO	0,5264	CORRECTO
0,4206	CORRECTO	0,5424	CORRECTO	0,6062	CORRECTO
0,2552	CORRECTO	0,3318	CORRECTO	0,2845	CORRECTO
0,8040	CORRECTO	0,9486	CORRECTO	0,2447	CORRECTO
0,6771	CORRECTO	1,6505	CORRECTO	0,6783	CORRECTO
1,6159	CORRECTO	1,3792	CORRECTO	1,6937	CORRECTO
1,9657	CORRECTO	1,2985	CORRECTO	1,9889	CORRECTO
0,7118	CORRECTO	0,1883	CORRECTO	0,4794	CORRECTO
0,6873	CORRECTO	0,4854	CORRECTO	0,8364	CORRECTO
Gtab 95%	2,29	Gtab 95%	2,29	Gtab 95%	2,29
Gtab 99%	2,482	Gtab 99%	2,482	Gtab 99%	2,482
C_{Cochran}	0,420	C_{Cochran}	0,280	C_{Cochran}	0,260
C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 45 *Precisión intermedia para el Salicilato de metilo*

NIVEL		NIVEL		NIVEL	
2,4		3,0		3,6	
G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs	G Grubbs	EVALUACIÓN Grubbs
0,4763	CORRECTO	0,6382	CORRECTO	0,0769	CORRECTO
0,0433	CORRECTO	0,8140	CORRECTO	0,5482	CORRECTO
0,3665	CORRECTO	0,6164	CORRECTO	0,5853	CORRECTO
0,3568	CORRECTO	0,1851	CORRECTO	0,3087	CORRECTO
0,9004	CORRECTO	1,0312	CORRECTO	0,2739	CORRECTO
0,6698	CORRECTO	1,6753	CORRECTO	0,6822	CORRECTO
1,6296	CORRECTO	1,3337	CORRECTO	1,6946	CORRECTO
1,8910	CORRECTO	1,2896	CORRECTO	2,0090	CORRECTO
0,7767	CORRECTO	0,1374	CORRECTO	0,4521	CORRECTO

0,6445	CORRECTO	0,4302	CORRECTO	0,7764	CORRECTO
G_{tab} 95%	2,29	G_{tab} 95%	2,29	G_{tab} 95%	2,29
G_{tab} 99%	2,482	G_{tab} 99%	2,482	G_{tab} 99%	2,482
C_{Cochran}	0,380	C_{Cochran}	0,290	C_{Cochran}	0,260
C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	

Fuente: Elaboración propia.

d) Exactitud

La exactitud del método fue evaluada a 3 niveles de concentración (80, 100 y 120%), para cada principio activo, se utilizó el estadístico de Cochran para probar la homogeneidad de varianzas y se determinó que la concentración no influye en los resultados ya que G (Grubbs) experimental es menor al G (Grubbs) de tablas para los cuatro principios activos; se calculó el sesgo (que surge de errores sistemáticos inherentes al método), existiendo para:

Trementina a la concentración de 1,6 mg/mL (80%) -0,001%, a 2,0 mg/mL (100%) - 0,01% y a 2,4 mg/mL (120%) -0.01% (ver tabla 46) ; Alcanfor a la concentración de 0,8 mg/mL (80%) -0.009%, a 1,0 mg/mL (100%) -0,007% y a 1,2 mg/mL (120%) - 0.013% (ver tabla 47) ; Mentol a la concentración de 1,6 mg/mL (80%) 0,004%, a 2,0 mg/mL (100%) 0,004% y a 2,4 mg/mL (120%) -0.002% (ver tabla 48) y Salicilato de metilo a la concentración de 2.4 mg/mL (80%) -0.004%, a 3,0 mg/mL (100%) 0.0007% y a 3,6 mg/mL (120%) -0,0027% (ver tabla 49) y por último se evaluó si la recuperación de los principios activos fue adecuado, esto aplicando el test de Student, donde el t experimental fue menor al t de tablas para los cuatro principios activos, lo que quiere decir que no existe diferencia significativa entre la recuperación obtenida y el valor verdadero.

Tabla 46 Exactitud para Trementina

NIVEL		NIVEL		NIVEL	
1,6		2,0		2,4	
G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs
0,88878	CORRECTO	0,2626	CORRECTO	1,4471	CORRECTO
0,97821	CORRECTO	1,1110	CORRECTO	0,4356	CORRECTO
0,12262	CORRECTO	1,2296	CORRECTO	0,0284	CORRECTO
1,45542	CORRECTO	0,0379	CORRECTO	0,6611	CORRECTO
0,90673	CORRECTO	0,7581	CORRECTO	1,2240	CORRECTO
0,92833	CORRECTO	1,2694	CORRECTO	1,5272	CORRECTO
1,41962	CORRECTO	1,7353	CORRECTO	0,9283	CORRECTO
0,57186	CORRECTO	0,6276	CORRECTO	0,3748	CORRECTO
0,89180	CORRECTO	0,6980	CORRECTO	0,8689	CORRECTO
0,54619	CORRECTO	0,3241	CORRECTO	0,8310	CORRECTO
G_{tab 95%}	2,29	G_{tab 95%}	2,29	G_{tab 95%}	2,29
G_{tab 99%}	2,48	G_{tab 99%}	2,48	G_{tab 99%}	2,48
C_{Cochran}	0,333	C_{Cochran}	0,297	C_{Cochran}	0,361
C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	
Promedio	1,5916 mg/mL	Promedio	2,0148 mg/mL	Promedio	2,6868 mg/mL
DS	0,0163	DS	0,0218	DS	0,023
δ (bias)	-0,01%	δ (bias)	0,01%	δ (bias)	-0,01%
t_{exp} =	0,03	t_{exp} =	0,03	t_{exp} =	0,03
t_{tab} =	2,69	t_{tab} =	2,69	t_{tab} =	2,69
Evaluación de la Exactitud		Evaluación de la Exactitud		Evaluación de la Exactitud	
MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 47 Exactitud para el Alcanfor

NIVEL		NIVEL		NIVEL	
0,8		1,0		1,2	
G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs
0,9204	CORRECTO	1,0460	CORRECTO	0,1148	CORRECTO
1,0888	CORRECTO	0,1753	CORRECTO	1,1387	CORRECTO
0,8412	CORRECTO	0,0992	CORRECTO	1,1539	CORRECTO
0,7956	CORRECTO	1,8610	CORRECTO	0,7754	CORRECTO
0,7545	CORRECTO	0,7718	CORRECTO	1,2847	CORRECTO
0,4589	CORRECTO	0,0955	CORRECTO	0,9097	CORRECTO
0,6580	CORRECTO	0,4557	CORRECTO	0,6109	CORRECTO
1,3926	CORRECTO	0,8725	CORRECTO	1,0499	CORRECTO
0,3595	CORRECTO	0,9298	CORRECTO	0,9970	CORRECTO
1,5315	CORRECTO	1,4014	CORRECTO	0,9000	CORRECTO
G_{tab 95%}	2,29	G_{tab 95%}	2,29	G_{tab 95%}	2,29
G_{tab 99%}	2,48	G_{tab 99%}	2,48	G_{tab 99%}	2,48
C_{Cochran}	0,428	C_{Cochran}	0,483	C_{Cochran}	0,361
C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	
Promedio	0,7905 mg/mL	Promedio	0,9929 mg/mL	Promedio	1,1863 mg/mL
DS	0,0107	DS	0,0095	DS	0,0153
δ (bias)	-0,01%	δ (bias)	-0,01%	δ (bias)	-0,01%
t_{exp} =	0,04	t_{exp} =	0,03	t_{exp} =	0,04
t_{tab} =	2,69	t_{tab} =	2,69	t_{tab} =	2,69
Evaluación de la Exactitud		Evaluación de la Exactitud		Evaluación de la Exactitud	
MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 48 Exactitud para el Mentol

NIVEL		NIVEL		NIVEL	
1,6		2,0		2,4	
G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs
1,3296	CORRECTO	0,0286	CORRECTO	0,0279	CORRECTO
1,2954	CORRECTO	1,3500	CORRECTO	0,5397	CORRECTO
0,6504	CORRECTO	1,5962	CORRECTO	1,1964	CORRECTO
1,1479	CORRECTO	1,4942	CORRECTO	1,1399	CORRECTO
0,6436	CORRECTO	0,7039	CORRECTO	0,6684	CORRECTO
1,3305	CORRECTO	0,2077	CORRECTO	1,8832	CORRECTO
0,9228	CORRECTO	0,0537	CORRECTO	0,9681	CORRECTO
0,4065	CORRECTO	1,2138	CORRECTO	0,1317	CORRECTO
0,7663	CORRECTO	0,1641	CORRECTO	0,6388	CORRECTO
0,1580	CORRECTO	0,5955	CORRECTO	0,7883	CORRECTO
Gtab 95%	2,29	Gtab 95%	2,29	Gtab 95%	2,29
Gtab 99%	2,48	Gtab 99%	2,48	Gtab 99%	2,48
C_{Cochran}	0,353	C_{Cochran}	0,483	C_{Cochran}	0,361
C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	
Promedio	1,6042 mg/mL	Promedio	2,0043 mg/mL	Promedio	2,3978 mg/mL
DS	0,0075	DS	0,0102	DS	0,0083
δ (bias)	0,00%	δ (bias)	0,00%	δ (bias)	0,00%
t_{exp} =	0,01	t_{exp} =	0,02	t_{exp} =	0,01
t_{tab} =	2,69	t_{tab} =	2,69	t_{tab} =	2,69
Evaluación de la Exactitud		Evaluación de la Exactitud		Evaluación de la Exactitud	
MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO	

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 49 Exactitud para el Salicilato de metilo

NIVEL 2,4		NIVEL 3,0		NIVEL 3,6	
G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs
0,1890	CORRECTO	0,2302	CORRECTO	0,5762	CORRECTO
0,2962	CORRECTO	0,4792	CORRECTO	1,9577	CORRECTO
0,2850	CORRECTO	0,5785	CORRECTO	1,9734	CORRECTO
1,4288	CORRECTO	2,2874	CORRECTO	0,6025	CORRECTO
0,3625	CORRECTO	0,5732	CORRECTO	1,2890	CORRECTO
1,3239	CORRECTO	1,5269	CORRECTO	1,8883	CORRECTO
0,9691	CORRECTO	1,6996	CORRECTO	1,9963	CORRECTO
0,6818	CORRECTO	0,7771	CORRECTO	0,5565	CORRECTO
1,4904	CORRECTO	0,7599	CORRECTO	0,7699	CORRECTO
0,5302	CORRECTO	0,2283	CORRECTO	1,0599	CORRECTO
Gtab 95%	2,29	Gtab 95%	2,29	Gtab 95%	2,29
Gtab 99%	2,48	Gtab 99%	2,48	Gtab 99%	2,48
C_{Cochran}	0,574	C_{Cochran}	0,225	C_{Cochran}	0,415
C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602	C_{tabulado}	0,602
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO		CORRECTO	
Promedio	2,3960 mg/mL	Promedio	3,0007 mg/mL	Promedio	3,5973 mg/mL
DS	0,0106	DS	0,0147	DS	0,0173
δ (bias)	0,00%	δ (bias)	0,00%	δ (bias)	0,00%
t_{exp} =	0,01	t_{exp} =	0,02	t_{exp} =	0,02
t_{tab} =	2,69	t_{tab} =	2,69	t_{tab} =	2,69
Evaluación de la Exactitud		Evaluación de la Exactitud		Evaluación de la Exactitud	
MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO		MÉTODO EXACTO	

Fuente: Elaboración propia.

e) Especificidad

La especificidad del método fue evaluada mediante el uso de la prueba de normalidad de datos Anderson-Darling, para determinar si los datos provienen de una población con distribución normal con un nivel de confianza del 95% para Trementina (ver figura 34 y 35), Alcanfor (ver figura 36 y 37), Mentol (ver figura 38 y 39) y Salicilato de metilo (ver

figura 40 y 41) ; el análisis de varianza de Fisher se utilizó para determinar que las varianzas sean iguales y la prueba t-Student para determinar que la matriz no es un interferente significativo (ver tabla 50).

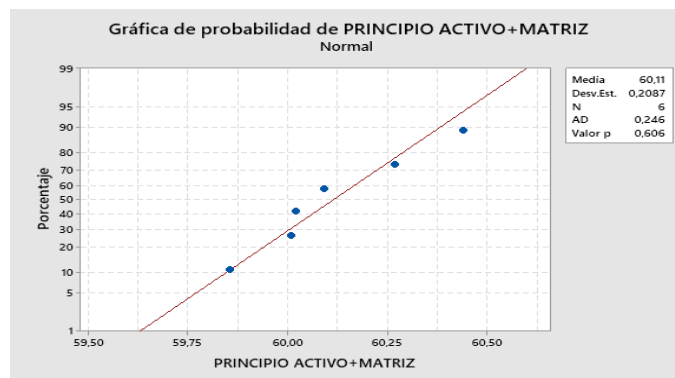
Tabla 50 Especificidad del método

Principio activo	Muestra	PRUEBA DE NORMALIDAD		PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS		PRUEBA DE t DE STUDENT (INTERFERENCIA DE MATRIZ)	
		Valor AD calculado	Valor AD teórico	"F" de FISHER experimental	"F" tabla (0,05-n=5-d=5)	t de Student exp	t de Student tabla
Trementina	p.a + matriz	0,2461	0,751	0,39	4,284	1,63	2,776
	p.a	0,3194					
Alcanfor	p.a + matriz	0,1636	0,751	0,58	4,284	0,96	2,776
	p.a	0,2767					
Mentol	p.a + matriz	0,3015	0,751	0,4	4,284	0,57	2,776
	p.a	0,265					
Salicilato de metilo	p.a + matriz	0,197	0,751	0,59	4,284	0,99	2,776
	p.a	0,3341					

p.a.: Principio activo

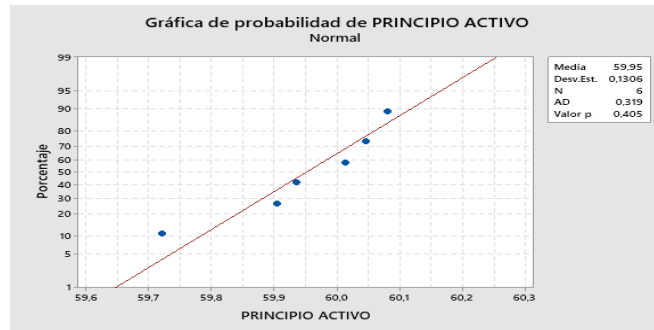
Fuente: Elaboración propia

Figura 34 Gráfica de distribución normal para Trementina (principio activo + matriz): Anderson y Darling



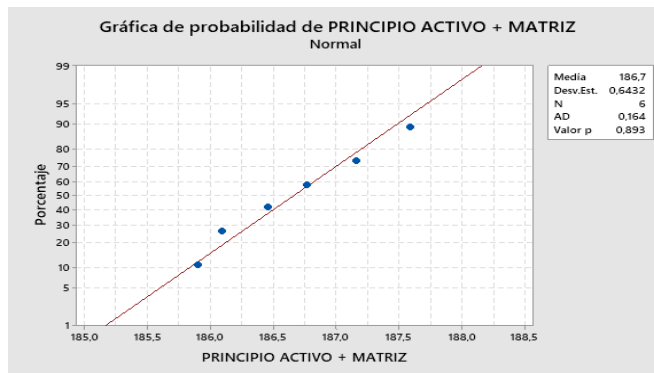
Fuente: Elaboración propia utilizando Minitab.

Figura 35 Gráfica de distribución normal para Trementina (principio activo): Anderson y Darling



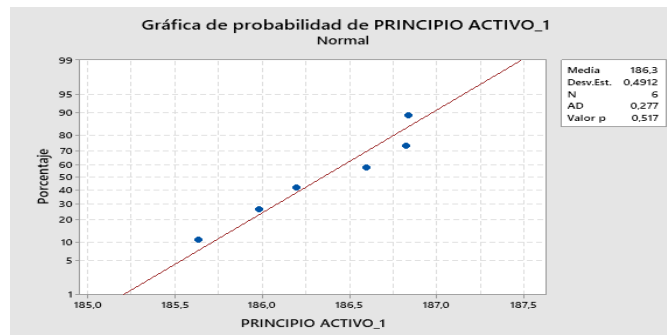
Fuente: Elaboración propia utilizando Minitab.

Figura 36 Gráfica de distribución normal para Alcanfor (principio activo + matriz): Anderson y Darling



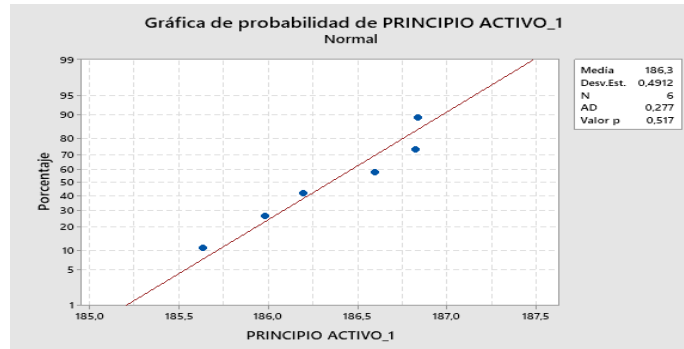
Fuente: Elaboración propia utilizando Minitab

Figura 37 Gráfica de distribución normal para Alcanfor (principio activo): Anderson y Darling



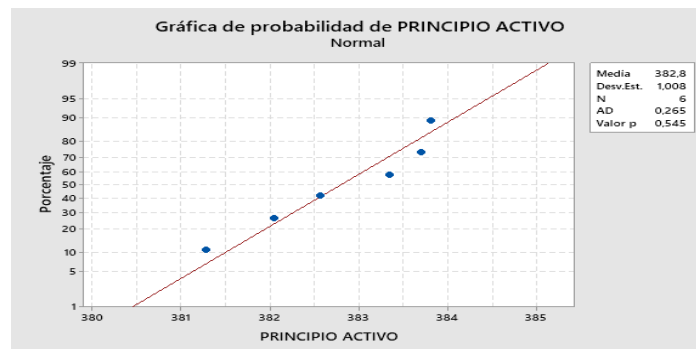
Fuente: Elaboración propia utilizando Minitab

Figura 38 Gráfica de distribución normal para Mentol (principio activo + matriz): Anderson y Darling



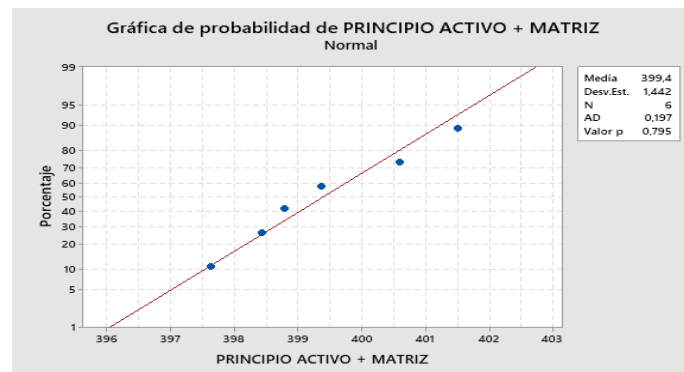
Fuente: Elaboración propia utilizando Minitab.

Figura 39 Gráfica de distribución normal para Mentol (principio activo): Anderson y Darling



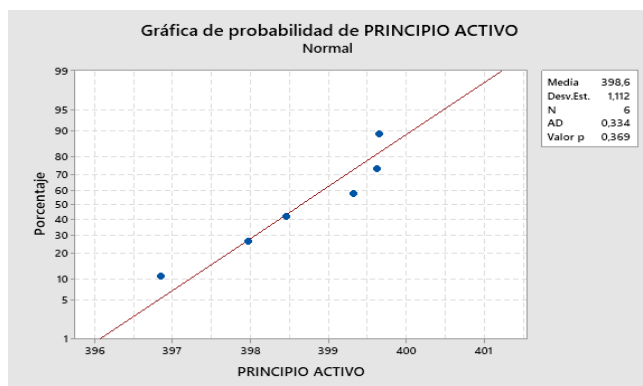
Fuente: Elaboración propia utilizando Minitab.

Figure 40 Gráfica de distribución normal para Salicilato de metilo (principio activo + matriz): Anderson y Darling



Fuente: Elaboración propia utilizando Minitab.

Figure 41 Gráfica de distribución normal para Salicilato de metilo (principio activo): Anderson y Darling



Fuente: Elaboración propia utilizando Minitab

f) Límite de detección y cuantificación

El límite de detección y cuantificación fue evaluado mediante la ecuación 23 y 24 además se evaluó la prueba de Cochran para probar la homogeneidad de varianzas y se determinó que la concentración al 5% con referencia al 100% no influye en los resultados ya que G experimental es menor al G de tablas para los cuatro principios activos : Trementina al 0,1 mg/mL (ver tabla 51), Alcanfor al 0,05 mg/mL (ver tabla 52), Mentol al 0,1 mg/mL (ver tabla 53) y Salicilato de metilo al 0,15 mg/mL (ver tabla 54).

Tabla 51 Límite de detección y cuantificación para Trementina

NIVEL (estándar)		NIVEL (Principio activo + Matriz)- AREA	
0,1		0,1	
G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs
0,3891	CORRECTO	0,3891	CORRECTO
0,2827	CORRECTO	0,2827	CORRECTO
1,0410	CORRECTO	1,0410	CORRECTO
0,5582	CORRECTO	0,5582	CORRECTO
0,2963	CORRECTO	0,2963	CORRECTO
0,9590	CORRECTO	0,9590	CORRECTO
1,9172	CORRECTO	1,9172	CORRECTO
0,8309	CORRECTO	0,8309	CORRECTO
Gtab 95%	2,127	Gtab 95%	2,127

G_{tab 99%}	2,274	G_{tab 99%}	2,274
C_{Cochran}	0,333	C_{Cochran}	0,333
C_{tabulado}	0,680	C_{tabulado}	0,680
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO	
Promedio	0,0995 mg/mL	Promedio (AREA)	2,855
Desv. Est.	0,00076	Desv. Est.	0,022
		ÁREA	[C] [mg/mL]
LÍMITE DE DETECCIÓN [K=3]		2,921	0,101773
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN [K=10]		3,075	0,107127

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 52 Límite de detección y cuantificación para Alcanfor

NIVEL (estándar)		NIVEL (Principio activo + Matriz)-AREA	
0,05		0,05	
G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs
0,3556	CORRECTO	0,3556	CORRECTO
0,2607	CORRECTO	0,2607	CORRECTO
1,0987	CORRECTO	1,0987	CORRECTO
0,4101	CORRECTO	0,4101	CORRECTO
0,8879	CORRECTO	0,8879	CORRECTO
0,2965	CORRECTO	0,2965	CORRECTO
2,0668	CORRECTO	2,0668	CORRECTO
0,5314	CORRECTO	0,5314	CORRECTO
G_{tab 95%}	2,127	G_{tab 95%}	2,127
G_{tab 99%}	2,274	G_{tab 99%}	2,274
C_{Cochran}	0,341	C_{Cochran}	0,341
C_{tabulado}	0,680	C_{tabulado}	0,680
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO	
Promedio	0,0497 mg/mL	Promedio (AREA)	8,767
Desv. Est.	0,0004	Desv. Est.	0,074
		ÁREA	[C] [mg/mL]
LÍMITE DE DETECCIÓN [K=3]		8,99	0,050958
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN [K=10]		9,51	0,053894

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 53 Límite de detección y cuantificación para Mentol

NIVEL (estándar)		NIVEL (Principio activo + Matriz)-AREA	
0,1		0,1	
G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs
0,2088	CORRECTO	0,2088	CORRECTO
0,0989	CORRECTO	0,0989	CORRECTO
0,9919	CORRECTO	0,9919	CORRECTO
0,5775	CORRECTO	0,5775	CORRECTO
0,7899	CORRECTO	0,7899	CORRECTO
0,5127	CORRECTO	0,5127	CORRECTO
2,0621	CORRECTO	2,0621	CORRECTO
0,7000	CORRECTO	0,7000	CORRECTO
Gtab 95%	2,127	Gtab 95%	2,127
Gtab 99%	2,274	Gtab 99%	2,274
C_{Cochran}	0,377	C_{Cochran}	0,377
C_{tabulado}	0,680	C_{tabulado}	0,680
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO	
Promedio	0,099 mg/mL	Promedio (AREA)	18,551
Desv. Est.	0,00087	Desv. Est.	0,163
		ÁREA	[C] [mg/mL]
	LÍMITE DE DETECCIÓN [K=3]	19,04	0,101818
	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN [K=10]	20,18	0,107907

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 54 Límite de detección y cuantificación para el Salicilato de metilo

NIVEL (estándar)		NIVEL (Principio activo + Matriz)-AREA	
0,15		0,15	
G Grubbs	Evaluación Grubbs	G Grubbs	Evaluación Grubbs
0,4925	CORRECTO	0,4925	CORRECTO
0,1293	CORRECTO	0,1293	CORRECTO
1,0956	CORRECTO	1,0956	CORRECTO
0,3358	CORRECTO	0,3358	CORRECTO
0,5557	CORRECTO	0,5557	CORRECTO
0,1735	CORRECTO	0,1735	CORRECTO
0,8837	CORRECTO	0,8837	CORRECTO
2,0755	CORRECTO	2,0755	CORRECTO

G_{tab} 95%	2,127	G_{tab} 95%	2,127
G_{tab} 99%	2,274	G_{tab} 99%	2,274
C_{Cochran}	0,300	C_{Cochran}	0,300
C_{tabulado}	0,680	C_{tabulado}	0,680
Evaluación Cochran		Evaluación Cochran	
CORRECTO		CORRECTO	
Promedio	1,1484 mg/mL	Promedio (AREA)	17,691
Desv. Est.	0,0007	Desv. Est.	0,088
		ÁREA	[C] [mg/mL]
	LÍMITE DE DETECCIÓN [K=3]	17,96	0,150667
	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN [K=10]	18,57	0,155851

Fuente: Elaboración propia.

I. DISCUSIÓN

El desarrollo de una metodología analítica contemplo la realización de 14 pruebas, además de la investigación teórica de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas estudiadas.

Durante el desarrollo de la metodología analítica para la valoración simultanea de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo, se estudiaron y evaluaron los siguientes 14 parámetros contrastados y recomendado en la norma *ICH Q14* : solubilidad y estabilidad de los principios activos, compatibilidad de filtro, tipo de inyector, tipo de liner, tipo de inyección, velocidad del embolo, concentración del principio activo, orden de elución, rampas de temperatura, determinación inequívoca del principio activo, evaluación del porcentaje de recuperación, relación de la concentración y la respuesta analítica y aptitud del sistema.

La información sobre las características fisicoquímicas de las moléculas en estudio fue recopilada teóricamente para ser utilizada en el desarrollo de la metodología analítica, se analizó el posible orden de elución no solo considerando el punto de ebullición o evaluación de los grupos funcionales sino también evaluando el tipo de columna, ya que el material de la columna y la polaridad de la fase estacionaria afecta de gran manera en la retención y separación de los principios activos. La columna HP-5 es la seleccionada para el desarrollo y validación del método analítico, este tipo de columna está compuesta

por (5% de fenil)- metilpolisiloxano de característica no polar, equivalente a la fase USP G27 que soporta temperaturas de -60°C a 325/350°C, realizando la comparación con otras metodologías de referencia, por ejemplo:

- Monografía del Mentol descrita en la USP 42, utiliza una columna compuesta de polietilenglicol (PEG) de alta polaridad que soporta temperaturas de 20°C a 250/230°C, equivalente a una fase USP G16, debido a la característica polar del Mentol.
- En la publicación sobre el desarrollo y validación de un método para la valoración simultánea de Mentol, Salicilato de metilo, Timol y Acido benzoico en una solución antiséptica, utiliza la misma columna que se describe en la monografía USP del mentol, debido a la característica polar de los principios activos y la matriz.

De acuerdo a estas referencias se decide trabajar con la columna HP-5 por las siguientes causas:

- Mejor Separación: La columna HP-5 (no polar) permite teóricamente la separación de los activos no polares como la Trementina, Alcanfor y Mentol, de esta manera solo se ajusta el método para el Salicilato de metilo de característica polar, en comparación con otros métodos donde se maneja una columna G16 (polar), no se utilizó esta columna porque solo permitiría la separación de Mentol y Salicilato de metilo, ya que son compuestos polares y de mediana polaridad que presentan una mayor retención en una fase estacionaria polar que en una menos polar.
- Mejor interacción con la fase estacionaria: La interacción de los grupos funcionales de los principios activos estudiados son mejores en una columna HP-5 por su característica no polar y composición del 5% de grupos fenilo, por consiguiente las fases estacionarias que presenten un contenido de fenilo tienen una mayor y mejor retención hacia los solutos aromáticos (esto es, una k “factor de capacidad” más elevada), realizando la evaluación del factor de capacidad “k” descritas en la tabla 28

se puede observar que esta teoría de interacción con la fase estacionaria respeta el orden elución encontrado en el desarrollo práctico del método.

La Trementina presenta un “k” factor de capacidad de 0,5, en consecuencia a que químicamente no es un compuesto aromático sino bicíclico y solo puede llegar a formar enlaces débiles de puentes de hidrógeno siendo el primer compuesto en eluir, además presenta una volatilidad alta con un punto de ebullición de 168°C; Alcanfor presenta un k de 1,3 porque al igual que la trementina químicamente no es un compuesto aromático sino bicíclico, sin embargo presenta un grupo funcional cetónico dándole la capacidad de formar puentes de hidrógeno con una fuerza moderada pero no lo suficiente para retenerse por mucho tiempo en la columna, en consecuencia siendo el segundo compuesto en eluir, con un punto de ebullición de 204°C; Mentol presenta un “k” de 1,4 a diferencia de la Trementina y Alcanfor este presenta un grupo aromático lo cual le brinda una mejor retención con los grupos fenilos de la columna, generando un enlace del tipo covalente no polar, e interacciones de dispersión por las propiedades físicas (entre más volátil se un soluto más rápido eluir de la columna), siendo así el tercer compuesto en eluir, con un punto de ebullición de 212°C y finalmente el Salicilato de metilo posee un valor de “k” más elevado de 1,7 por la presencia de un grupo aromático, que le permite formar enlaces covalentes no polar con los fenilos de la fase estacionaria, sin embargo este es el último compuesto en eluir debido a que presenta un grupo funcional éster, permitiéndole formar enlaces de puentes de hidrógeno, con un punto de ebullición de 222°C.

En la prueba de solubilidad se seleccionó al hexano grado HPLC como diluyente principal, no solo porque es el solvente que presenta mayor solubilidad de los principios activos, sino también porque este cuenta con un volumen de expansión estimado, calculado por “Vapor Volume Calculator” del Software del GC de 108 µL, ocupando un 12% de la capacidad del liner, siendo así el solvente adecuado para la preparación de muestras y funcionamiento adecuado del equipo, no se utilizó cloroformo como solvente según la bibliografía Desarrollo y validación de un método para la valoración simultánea de

Mentol, Salicilato de metilo, Timol y Acido benzoico en una solución antiséptica, debido a que el volumen de expansión de este solvente es 280 uL, ocupando el 31% de la capacidad del Liner, además que este solvente es polar por sus enlaces de carbono y cloro, por tanto la compatibilidad con la fase estacionaria de la columna HP-5 (no polar) y los principios activos (Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo) sería deficiente, lo mismo ocurre con el metanol que presenta un volumen de expansión de 560 uL, ocupando el 62% de la capacidad del liner. Al igual que la monografía individual del Mentol, descrita en la USP 42, se mantuvo por todo lo explicado como solvente de elección al hexano grado HPLC.

La prueba de estabilidad definió que los principios activos son estables por 1 hora, en el solvente elegido hexano grado HPLC, se evaluó la estabilidad solo por 1 hora, en consecuencia a los tiempos de elución de los cuatro activos que fueron: 0.965 min para trementina; 1.497 min para Alcanfor; 1.603 min para Mentol y 1.744 min para Salicilato de metilo, dando un tiempo total de análisis de 3 min, lo cual dan lugar a que en 60 min se lean aproximadamente 20 muestras, suficiente para la cantidad de muestras preparadas por un analista en ese tiempo, a comparación con otras metodologías por ejemplo en la monografía USP 42 el mentol presenta un tiempo de retención de 1.08 min pero solo para un activo y en el estudio de desarrollo y validación en una solución antiséptica, presenta un tiempo de corrida total de 25min con un estudio de estabilidad en Cloroformo de 72 horas, porque el tiempo de análisis es mucho mayor, por lo que requieren un estudio de estabilidad con tiempos más prolongados para garantizar la repetibilidad de las respuestas.

En compatibilidad de filtro, se evaluó al filtro jeringa fabricado de Nylon con una porosidad de 0,45µm, dando resultados satisfactorios, debido a que este tipo de filtro está compuesto de un poliéster inerte que lo hace resistente a solventes orgánicos como el Hexano grado HPLC, la utilización de filtro depende del tipo de solvente con el que se está trabajando y del pretratamiento y extracción de la muestra.

La selección del tipo de inyector Split (260°C), estuvo influenciada por el tipo de columna y la compatibilidad que existe entre ambos, el presente estudio ha seleccionado una columna capilar HP-5 (no polar) de diámetro 0.320 mm, en consecuencia el posible tipo de inyector de acuerdo al tipo de columna es “Split, las concentraciones de trabajo también influyen en la selección del tipo de inyector, porque la Inyección “Split” es utilizada para el análisis de concentraciones altas, debido a que el disolvente y el analito es mezclado por el gas portado generando una mezcla homogénea, de esta mezcla solo una parte es transferida a la columna y la otra escapa fuera del sistema a través de una válvula de salida, como resultado la muestra es dividida en dos porciones, mientras que el inyector “Splitless” es utilizada para el análisis de trazas, donde la totalidad de la muestra es inyectada hacia la columna, en cuanto a la temperatura seleccionada para el inyector se trabajó a 260°C, porque se eligió la Temperatura del compuesto menos volátil, en este caso el Salicilato de metilo.

La selección del tipo de Liner estuvo influenciada por el volumen de expansión, se evaluó si el tipo de disolvente, temperatura de inyección y presión de entrada del gas de arrastre en la cabeza de la columna es la adecuada para tener un volumen de expansión de acuerdo a la capacidad del tipo de Liner seleccionado y evitar los problemas de backflash, es decir, la “devolución” de los vapores de muestra por la línea de gas de arrastre, este fenómeno sucede cuando el volumen expandido de la muestra inyectada supera el volumen del liner. Los vapores en exceso crean sobrepresión y pueden escapar no solo por la línea de gas de arrastre (backflash), sino también por la línea de la purga de septum; es cuando los componentes más volátiles de la muestra pueden “perderse”, y ello afectará la exactitud y la precisión del análisis GC, se demostró con el Liner “ultra inerte, dividido, con baja caída de presión” y Volumen de expansión según “Vapor Volume Calculator” del Software del GC es 108 µL, ocupando un 12% de la capacidad del liner, son los adecuados para la valoración de los cuatro principios activos

En cuanto a la selección del tipo de inyección Standar, se determinó este tipo de inyección tomando en cuenta que se trabajó con muestras preparadas de manera individual a

diferentes concentraciones del 80 al 120 %, para evitar el error del tipo sistemático y la programación constante del equipo a niveles de inyección ya que el Cromatógrafo Gaseoso Agilent puede trabajar a tres niveles (N1, N2 Y N3) y en cada nivel un espacio de aire, de ahí que no se trabajó con la inyección del tipo Sandwich, aunque presenta ciertas ventajas como capacidad para extraer líquidos de varios viales a fin de crear inyecciones a varios niveles, donde cada nivel de muestra estaría con un patrón interno o disolvente, simplificando así la adición de estándares internos y realizando diluciones en el mismo Cromatógrafo Gaseoso, por todo lo mencionado la selección del tipo de inyección depende de las condiciones de trabajo del analista, tomando en cuenta que el desarrollo y validación de la metodología debe ser evaluada por parámetros como la repetibilidad del instrumento y precisión del analista entre otros, la programación automática con el equipo impediría la evaluación del analista.

Para la concentración de los principios activos, como resultado a todo lo mencionado en cuanto a la selección del tipo de inyector Split, tipo de Liner y tipo de inyección Standar, se trabajó en concentraciones expresadas en mg/mL, realizando la comparación con otros métodos por ejemplo la monografía del Mentol en la USP 42, trabaja con una concentración de 10 mg/mL, en cambio en la referencia de validación y desarrollo en una solución antiséptica, trabaja con concentraciones de 30 hasta 60 mg/mL, 10 veces más elevada a comparación de las concentraciones de los principios activos en estudio, puede ser una opción trabajar a este rango de concentraciones, sin embargo revisando las otros parámetros de estas metodologías descritas, se trabajan con un tipo de inyección Split pero a una división media 50:1, perdiendo una cantidad de muestra, mientras el método que se está presentando en este trabajo maneja una inyección Split 100:1 para evitar una pérdida de muestra y obtener una mejor respuesta.

El orden de elución fue evaluado teóricamente de acuerdo a toda la información recopilada de las propiedades fisicoquímicas de los cuatro principios (Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de Metilo), desafiando la teoría con la parte experimental se corroboró el mismo orden de elución teórico, en un tiempo de corrida total de 3 min, considerando que

es un tiempo adecuado y eficaz a diferencia de otras metodologías que presentan hasta un tiempo de 25 min de corrida, debido a la diferencia de la selección de los parámetros como elección del tipo de columna, tipo de inyección, tipo de liner, tipo inyector y Temperatura del horno.

En la Temperatura del horno de la columna, se trabajó en modo isotérmico, es decir una temperatura constante y no con rampas de temperatura, debido a que la selección de la temperatura estuvo influenciada por la volatilidad de los principios activos, si las temperaturas de ebullición de los principios activos en estudio difieren uno del otro en más de 30°C se podría trabajar con rampas de temperatura, sin embargo las temperaturas de ebullición de los principios activos estudiados: Trementina 168°C, Alcanfor 204°C, Mentol 212°C y Salicilato de metilo 222°C no presentan esta diferencia, por tanto se trabaja con una temperatura de horno en modo isotérmico, ahora si bien se eligió el modo de trabajo, posteriormente se seleccionó la temperatura del horno de la columna, cuatro fueron las temperaturas de prueba 150,140,130 y 120°C, seleccionando la temperatura 120°C donde se obtuvo mejores resultados en la resolución, se observó que a menor temperatura existe una mayor resolución de picos, algunas referencias bibliográficas trabajan con rampas de temperatura porque existe una diferencia mayor a 30°C de la temperatura de ebullición entre los compuestos estudiados, por tanto la selección del modo (isotérmico o rampas) y temperatura están fuertemente influenciadas por la volatilidad de los compuestos.

Con los resultados obtenidos en la determinación inequívoca de los principios activos y la prueba de especificidad se evidencio que el método es capaz de cuantificar a los principios activos en presencia de impurezas y/excipientes presentes en la matriz de la muestra, recordemos que la matriz con la que se trabajó está compuesta por una fase oleosa y acuosa lo que permitió el ajuste del método (tipo de columna, tipo de inyector, temperatura del horno entre otros) hacia una fase no polar, logrando la separación del principio activo de su matriz.

La evaluación de la relación entre la concentración y la respuesta analítica a diferentes concentraciones de trabajo (80, 90, 100, 110 y 120%) para cada principio activo, demostró que existe correlación proporcional entre x (concentración), y (respuesta analítica), lo cual indica que el rango de trabajo elegido en el desarrollo de la metodología ya sea superior o inferior, puede demostrar una correcta precisión, exactitud en el proceso de Validación del método analítico, además que al tener una respuesta lineal facilita el trazado e interpolación de diferentes concentraciones dentro del intervalo de trabajo de 80 a 120%.

La prueba de aptitud del sistema cromatográfico fue evaluado desafiando y aplicando todos los parámetros estudiados en el desarrollo del método dando los siguientes resultados:

- El número de platos teóricos para los cuatro principios fue mayor a 2000, uno de los factores que influyo en la buena obtención de resultados fue la condición de temperatura isotérmica ya que programas de temperatura (rampas) darían cantidades de platos teóricos inexactos, otro de los factores es el diámetro de película que está relacionado directamente con la eficiencia de la columna a mayor diámetro de película mayor eficiencia.
- El valor de la simetría del pico fue menor a 2, demostrando que los picos presentan un comportamiento gaussiano, se detectó que la simetría está influenciada directamente por la resolución ($>$ simetría: $>$ resolución).
- El factor de capacidad “ k ” que se define como la retención de los solutos en la columna, demostró proporcionar valores de $k > 1$ para los cuatro principios activos, se vio que la retención de los solutos está influenciada por las condiciones de temperatura del horno de la columna, espesor de la película además de las características fisicoquímicas de los principios activos (Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo), explicadas en la evaluación de las propiedades fisicoquímicas de este mismo inciso “I”, estos factores proporcionaron resultados en donde la retención del soluto es directamente proporcional al espesor de la película ($>k:>$ espesor de película), entonces si se desea mejorar el factor de capacidad de retención de los solutos en la columna se debe trabajar

con columnas cuyo diámetro de película sea más gruesa, recordemos que en este trabajo se está utilizando una columna HP-5, de diámetro 0.320mm con una película 0.25um, acondicionada en un horno con temperatura de 120°C en modo isotérmico, todas estas características brindaron buenos resultados, no superando un valor de “k” igual a 5, ya que superar este valor supondría un aumento de espesor de película que daría lugar al mejoramiento de la resolución de los picos que se eluyen primero pero también podría derivar en una pérdida de resolución de los picos que se eluyen más tarde.

- La resolución de los cuatro principios dio resultados mayores a 1.5, en cuanto mayor sea el valor de la resolución menor será el solapamiento de picos, indicando que existe una línea base visible entre dos picos, se vio que una opción para mejorar o aumentar aún más la resolución de los picos se tendría que duplicar la eficiencia de la columna, es decir los platos teóricos, sin embargo, esto solo es posible si se aumenta el diámetro de la columna y la película.

La validación de la metodología analítica fue llevada a cabo siguiendo el documento de la ICH Q2 (R1) Validación de procedimientos analíticos y la USP 42-NF 37.

Los resultados obtenidos en la linealidad instrumental y del método, demostraron ser estadísticamente lineal, lo que permite trazar e interpolar diferentes concentraciones en el rango de 80 al 120%, el intercepto $a=0$ permite disminuir la probabilidad de obtener resultados falsos positivos o negativos, en cuanto a la pendiente $b \neq 0$ demuestra que existe correlación proporcional entre x (concentración), y (respuesta analítica), es importante verificar todos estos parámetros para dar paso a las siguientes pruebas como precisión y exactitud ya que se trabajara a concentraciones similares de la linealidad.

Los resultados de la precisión dieron lugar a la evaluación no solo la variabilidad del método sino también la variabilidad del instrumento, que puede ser debida por errores aleatorios, es decir, porque se trabaja con analista, equipos, reactivos y tiempos diferentes, estos factores influyen sobre los resultados finales los cuales no siempre pueden ser

controlados, por esto la metodología que se desarrolló, tiene que cumplir con la prueba de precisión.

La exactitud del método puede haber sido evaluada mediante la comparación con un patrón de referencia de concentración conocida o mediante la comparación con un método de referencia validado, por lo descrito se realizó el estudio de la exactitud con un patrón de referencia ya que no se cuenta con una metodología validada con los cuatro principios activos Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo, se tiene una metodología de referencia publicada sobre el desarrollo y validación de un método para la valoración simultánea de Mentol, Salicilato de metilo, Timol y Acido benzoico en una solución antiséptica, sin embargo dos de los activos estudiados y la matriz es diferente lo que no permite realizar este tipo de comparación, sin embargo con la elección que se realizó se demostró que el método cumple con la prueba de exactitud.

J. CONCLUSIONES

El método desarrollado y validado para la valoración simultánea de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo en emulsión tópica, por cromatografía gaseosa es capaz de separar y cuantificar de forma efectiva a los cuatro principios activos, utilizando una columna HP-5, Longitud: 30 m, Diámetro: 0.320 mm, Película: 0,25 μm .; Helio como gas transportador, detector de ionización a llama (FID); Temperaturas de trabajo de inyector 260°C, detector 240°C y Columna 120°C (modo isotérmico); Velocidad de flujo para la columna (He:6,500 mL/min), inyector (He: 659,5 mL/min), detector (H₂: 50,00 mL/min; Aire: 300,0 mL/min); Volumen de inyección 1 μl y tipo de inyección (Split).

El método desarrollado es capaz de determinar inequívocamente a los cuatro principios activos (Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo), obteniendo resultados exactos y demostrando ser idóneo al conseguir resultados directamente proporcionales a la concentración en el rango de trabajo establecido para la valoración de los cuatro principios activos (80-120%).

De acuerdo a la información teórica, encontrada sobre las características fisicoquímicas de las moléculas, ésta fue utilizada durante el desarrollo del método analítico, ya que conocer la solubilidad, temperatura de ebullición, temperatura de fusión y estructura química e identificación de los grupos funcionales de los principios activos, dieron las directrices para seleccionar los parámetros de trabajo.

Los parámetros de trabajo que fueron evaluados son:

- La estabilidad de los principios activos fue establecida en el diluyente seleccionado Hexano grado HPLC, demostrando ser estable por 60 min puesto que el porcentaje de recuperación se mantuvo dentro de los valores aceptables de 90-110%.
- La solubilidad fue establecida con el Hexano grado HPLC, siendo el diluyente seleccionado, debido a que demostró disolver de forma efectiva a los principios activos, la emulsión al tratarse de una forma farmacéutica cuya matriz está compuesta por una fase oleosa y acuosa se optó por usar el ultrasonido para mejorar la solubilidad y posteriormente adicionar 10 mg de Sulfato de sodio anhidro para eliminar el posible remanente de agua. Tratando de esta manera a la muestra (principios activos más matriz), mientras que la preparación del estándar (principio activo) no requirió la adición de sulfato de sodio anhidro y ultrasonido.
- La prueba de compatibilidad de filtro fue aprobada para el Filtro Nylon de 0.45 μm
- El tipo de Liner aprobado de acuerdo al diluyente Hexano y el volumen de expansión fue el Ultrainerterte.
- El tipo de inyector seleccionado por las concentraciones de trabajo fue el Split
- El Volumen de expansión de acuerdo al tipo de liner Ultrainerterte y diluyente Hexano grado HPLC, fue de 108 μL ocupando el 12% de la capacidad del liner.
- La velocidad del embolo aplicada fue 6000 $\mu\text{L}/\text{min}$.
- La selección de las concentraciones de trabajo de los principios activos fue acorde al tipo de inyector Split, obteniendo una buena respuesta y separación de la Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo.

- Se estableció el orden de elución en los siguientes tiempos de retención: 0,965 min para Trementina; 1.497 min para Alcanfor; 1,603 para Mentol y 1,744 para Salicilato de metilo.
- El modo de trabajo de la temperatura del horno de la columna fue modo isotérmico a 120°C.
- La metodología desarrollada demostró determinar de manera inequívoca a los principios activos frente a su matriz
- Se demostró que no existe diferencia en el valor del porcentaje de recuperación con respecto al valor verdadero 100%

El método es lineal dentro del intervalo de concentración de 80% a 120% para cada uno de los cuatro principios activos. Por tanto, para Trementina las concentraciones de trabajo son 1,6 mg/mL; 1,8 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,2 mg/mL y 2,4 mg/mL; para Alcanfor 0,8 mg/mL; 0,9 mg/mL; 1,0 mg/mL; 1,1 mg/mL; 1,2 mg/mL; para Mentol 1,6 mg/mL; 1,8 mg/mL; 2,0 mg/mL; 2,2 mg/mL; 2,4 mg/mL y para Salicilato de metilo 2,4 mg/mL; 2,7 mg/mL; 3,0 mg/mL; 3,3 mg/mL; 3,6 mg/mL. Por lo cual el coeficiente de correlación lineal, el coeficiente de determinación, el intercepto y la pendiente cumplen con los requerimientos establecidos.

El método es preciso para los cuatro principios activos, demostrando el grado de concordancia entre una serie de medidas de múltiples muestras, obteniendo resultados precisos en los niveles de repetibilidad del método, repetibilidad del instrumento y precisión intermedia, con un coeficiente de variación dentro del 2%, cumpliendo la prueba de Cochran que evalúa la homocedasticidad, siendo la varianza constante para todas las concentraciones.

El método es exacto para los cuatro principios activos, ya que los resultados obtenidos en la prueba son cercanos al 100% con la evaluación de t de Student, demostrando no existir diferencia significativa entre la recuperación obtenida experimentalmente y el valor

verdadero. El sesgo en los tres niveles de concentración de los cuatro principios activos se encuentra dentro de los límites del -1% y +1%.

El método es específico para los cuatro principios activos, ya que, es capaz de evaluar a cada principio activo de manera inequívoca en presencia de los componentes de la matriz.

El método presenta un límite de detección de 0,101773 mg/mL para trementina; 0,050958 mg/mL para alcanfor; 0,101818 mg/mL para mentol y 0,150667 mg/mL para salicilato de metilo y un límite de cuantificación de 0,107128 mg/mL para trementina; 0,053894 mg/mL para alcanfor; 0,107907 mg/mL para mentol y 0,155851 mg/mL para salicilato de metilo evaluado al 5% con respecto de la concentración al 100%.

Los resultados obtenidos durante el análisis de parámetros de validación como linealidad, precisión, exactitud, especificidad y límite de detección y cuantificación demostraron ser válidos ya que fueron tratados estadísticamente utilizando mediciones como media, desviación estándar, coeficiente de variación, varianza; utilizando pruebas de significancia como la prueba de t-Student, la prueba de F-Fisher, la evaluación de Grubbs para la detección de datos anómalos, Cochran para determinar homogeneidad de varianza y Anderson y Darling para determinar normalidad en la distribución de datos. El método demuestra ser adecuado para la valoración simultánea de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo en emulsión tópica por GC. (Ver datos primarios en Anexo 3).

Por último, como producto del estudio realizado, se presenta el procedimiento operativo estandarizado al Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos y Biodisponibilidad del Instituto SELADIS en el formato proporcionado. Se adjunta una copia de la carátula en el anexo 3, por tratarse de un documento controlado del laboratorio.

K. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar solo una porción de 10mg de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua ya que la matriz contiene una fase acuosa.

Se recomienda realizar la prueba de Robustez del método, si bien este parámetro no forma parte de la validación, el borrador de la guía armonizada de la ICH desarrollo de procedimientos analíticos Q14 recomienda añadir este parámetro en el desarrollo del método analítico.

Utilizar el desarrollo y validación de este método para continuar el estudio de aquellas formas farmacéuticas que tienen otros principios activos además de los ya mencionados.

L. BIBLIOGRAFÍA

Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. (2003). Salicilato de Metilo, formulario nacional. En Boletín Oficial del Estado. Recuperado 6 de septiembre de 2023, de https://www.aemps.gob.es/formulario-nacional/monografias/materias-primas/principios-activos/fn_2003_pa_032.pdf?x66381

Agilent Technologies. (agosto de 2015). Guía de selección de columnas Agilent Technologies. Obtenido de Guía de selección de columnas Agilent Technologies: https://www.omnilab.com.ar/img/Catalogo_Columnas_GC.pdf

Bernal, E. (2014). Advances in Gas Chromatography. Edited by Xingua Guo. DOI: 10.5772/57016

Bonet, R. (2011). Anestésicos locales. *Offarm*. Vol. 30 (5), 42-47. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-anestesis-locales-X0212047X11276597>

Bergstrom, K.G., Strobe r, B.E., 2009. Principios del tratamiento tópico, En: Wolff, K., Goldsmith, L.A., Katz, S.I., Gilchrest, B.A., Paller, A.S., Leffell, D.J.(Eds.), *Dermatología en Medicina General*. 7ª edición. Tomo IV. Panamericana., Buenos Aires. 2091-2096

California Department of Industrial Relations. (2019). Draft Turpentine Substance Summary. Recuperado el 07 de septiembre de 2023, de <https://www.dir.ca.gov/dosh/DoshReg/5155-Meetings/Turpentine-2019-06-04.pdf>.

Camean, M., Buzo G., Rodríguez JC., Ávila JR., (1994). Administración tópica y transdérmica, En: Santos Ramos B., Guerrero Aznar M.D. (Eds.), *Administración*

de Medicamentos. Teoría y Práctica. Díaz de Santos., Madrid. 75-98

Delaware health and social services. (2013). Turpentine. Recuperado 7 de septiembre de 2023, de <https://dhss.delaware.gov/dhss/dph/files/turpentfaq.pdf>

Derry S, Matthews PR, Wiffen PJ, Moore RA. (2019). Salicylate-containing rubefaciants for acute and chronic musculoskeletal pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Nov 26;2014(11):CD007403. DOI: 10.1002/14651858.CD007403.pub3. PMID: 25425092; PMCID: PMC6458007.

Flores, M. P., Castro, A. P. C. R. D., & Nascimento, J. D. S. (2012). Analgésicos tópicos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 62(2), 248-252. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942012000200010>

Fonseca Gola, A., Cordoví Velázquez, J. M., Benítez Guerra, N., & Fernández Cervera, M. (2020). Desarrollo y validación de un método de cromatografía gaseosa para la determinación de mentol, salicilato de metilo, timol y ácido benzoico en solución antiséptica. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 49(2). <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v49n2.89484>

Font, E. (2002). Analgesia y analgésicos. *Elsevier-Offarm*, 21(9), 70-78. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-analgesia-analgescicos-13038003>

Garrote, A., Bonet, R., (2017). Antiinflamatorios no esteroideos tópicos. *Dialnet farmacia profesional*. 31(4): 13-15. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7719309>

García Delgado, R., Escario Travesedo, E., Sánchez Romero, A., (2004). Uso racional de la medicación tópica en Dermatología. *Medicina cutánea ibero latino americana* 32: 39-44. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=951957>

Gómez Estrada, H.A., González Ruiz, K.N., Domingo Medina, J., (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 10(3): 186-187. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85618379003.pdf>

Honorable Congreso Nacional de Bolivia. Ley del Medicamento. Promulgado el 17 de diciembre de 1996. <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18028es/s18028es.pdf>

Instituto de Química Biología. (2010). Alcanfor. Monografías. <https://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha114.htm>

Illodo, Sobrino, Fandiño (2017). Definición del dolor, Taxonomía. En A. Carregal, Manual básico de dolor de la SGADOR para residentes. 13. Recuperado 29 de agosto de 2023, de https://sgador.com/wp-content/uploads/2018/04/Manual-SGADOR-24x17_WEB_20-03.pdf

ICH. (Noviembre de 2005). ICH Harmonised guideline. Obtenido de Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>

ICH. (24 de marzo de 2022). ICH Harmonised guideline. Obtenido de Analytical Procedure Development Q14: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q14_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf

Ministerio de sanidad, política social e igualdad. (2013). Ficha Técnica Termosan pasta cutánea. 4. Recuperado 6 de septiembre de 2023, de https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/12457/12457_ft.pdf

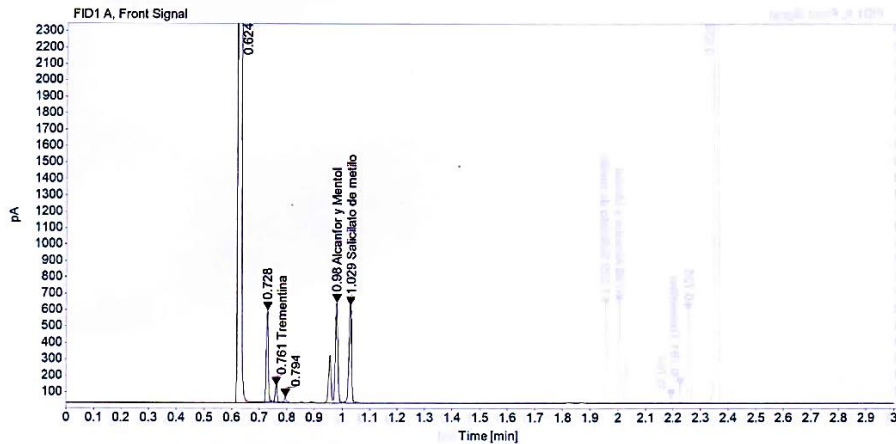
- OMS, OIT y INSST. (2003). Alcanfor Sintético. International labour Organización. Obtenido de http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=1021&p_version=2&p_lang=es.
- OMS. (1997). Organización Mundial de la Salud. Agencia Nacional de Medicamentos y Tecnologías (AGEMED). Obtenido de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para la industria de productos farmacéuticos. <https://www.minsal.cl/portal/url/item/daf78c5e3a829786e040010165016a3a.pdf>
- OMS. (2010). Organización Mundial de la Salud. Informe 44 de la OMS, Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos.
- Prieto, J. M. (2007). Antiinflamatorios No Esteroides (AINES). *Cient Dent*, 4(3), 204. <https://www.yumpu.com/es/document/read/27071991/antiinflamatorios-no-esteroides-aines-coem>.
- USP 42. (2019). Farmacopea de los Estados Unidos de América. Rockville: Validación de procedimientos farmacopéicos. 8387.
- Rivera-Ordoñez, A. (2006). AINES: Su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 29(1), 38-39. <https://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2006/cma061h.pdf>.
- Sanjuanelo, A. B. (2013). Fiebre: actualización en el uso de antipiréticos. *Precop*, 11(4), 26-35. [https://www.researchgate.net › publication › links](https://www.researchgate.net/publication/links).
- Solans, M., & del Pozo, A. (2009). Cosmética y práctica deportiva (II). Preparados refrescantes. *Offarm*, 28(3), 72-74. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-cosmetica-practica-deportiva-ii-preparados-13133627>

M. ANEXOS

ANEXOS 1: EVALUACIÓN DE TEMPERATURA DE HORNO

Gráfica 1

Corridas cromatográficas con una Temperatura de 150°C

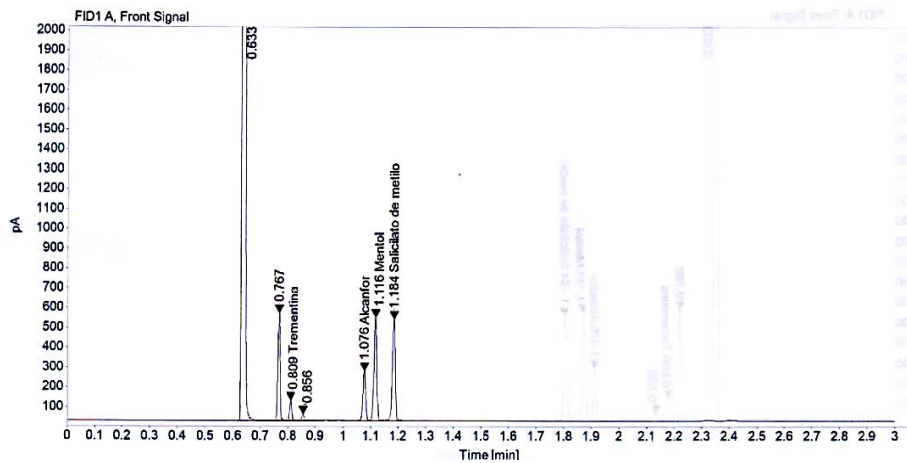


Nota: Picos de principios activos a 150°C el pico del Alcanfor y Mentol no salen resueltos.

Fuente: Software ChemStation de GC Agilent Technologies 7890B.

Gráfica 2

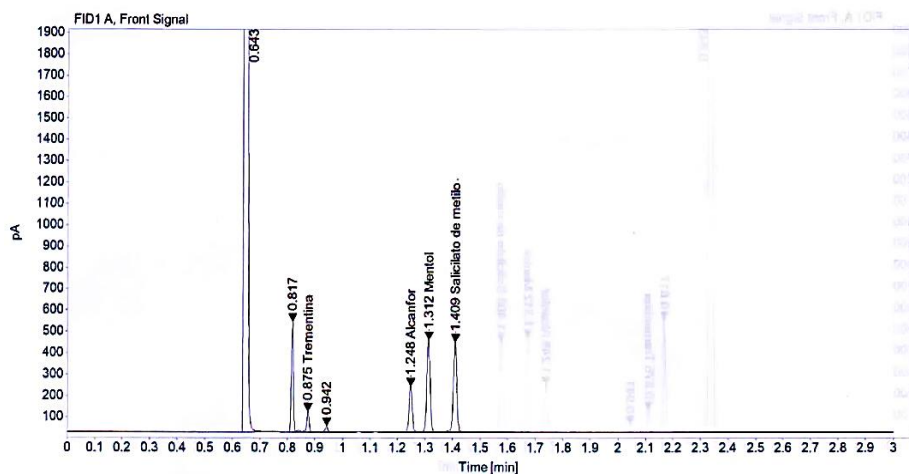
Corridas cromatográficas con una Temperatura de 140°C



Nota: Picos de principios activos a 140°C los picos no presentan una buena resolución de picos 24,6 para Alcanfor; 3,2 para mentol; 5,7 para Salicilato de metilo Fuente: Software ChemStation de GC Agilent Technologies 7890B.

Gráfica 3

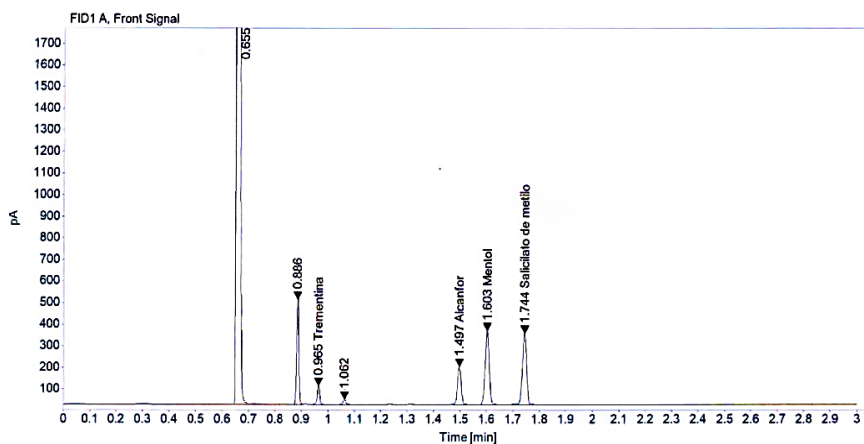
Corridas cromatográficas con una Temperatura de 130°C



Nota: Picos de principios activos a 130°C los picos presentan una mejora en la resolución de picos 31,3 para Alcanfor; 4,8 para mentol; 7,2 para Salicilato de metilo Fuente: Software ChemStation de GC Agilent Technologies 7890B.

Gráfica 4


Corridas cromatográficas con una Temperatura de 120°C



Nota: Picos de principios activos a 120°C los picos presentan una buena resolución de picos >40,0 para Trementina; 40,4 para Alcanfor; 6,6 para mentol; 8.3 para Salicilato de metilo Fuente: Software ChemStation de GC Agilent Technologies 7890B.

ANEXOS 2 CARÁTULA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDARIZADO

Gráfica 5

	INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD	PT-CM-167 Versión: 1 Vigente desde: 2023-05-31 Página 1 de 7
	Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos Biodeponibilidad Área de Control de Calidad de Medicamentos	
	CUANTIFICACIÓN DE TREMENTINA, ALCANFOR, MENTOL Y SALICILATO DE METILO, EMULSIÓN TÓPICA POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA (GC)	

CONTENIDO



1. OBJETIVO	2
2. ALCANCE	2
3. RESPONSABILIDADES	2
4. FRECUENCIA	2
5. DOCUMENTOS DE REFERENCIA	2
6. PROCEDIMIENTO	2
6.1 Materiales	2
6.2 Equipos	2
6.4 Desarrollo	3
6.5 Cálculos	5
7. FORMULARIOS	5
8. ANEXOS	5

DOCUMENTO CONTROLADO

Nº: 4 FECHA: 31/05/2023

ÁREA: Lab. Control de Calidad y Biodeponibilidad

LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DE
MEDICAMENTO Y BIODEPONIBILIDAD

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Rosa Callisaya Mamaní		
30/05/2023	31/05/2023	31/05/2023

Procedimiento para la cuantificación de Trementina, Alcanfor, Mentol y Salicilato de metilo, emulsión tópica por Cromatografía gaseosa (GC).

**ANEXOS 3 DATOS PRIMARIOS PARA EL DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO
ANALÍTICO**



Fuente: Elaboración propia QR