



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

INFORME TÉCNICO DE LA OPCION CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

ESTANCIA INDUSTRIAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO FARMACÉUTICO

PRESENTA:

AYDED VÁZQUEZ MORENO

Asesor externo: M. en C. Olivia Margarita Pérez Díaz

Asesor Interno: M. en C. Gloria López Jiménez

México, D.F. Mayo de 2008.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es uno de los mayores logros de mi vida y creo que vale la pena compartir y agradecer a todas esas personas que me ayudaron a hacerlo realidad.

Primero quiero agradecer a esa persona que me dio la vida y que me impulsó a seguir adelante en todos los momentos difíciles de mi vida, mi Madre.

A mis hermanos Rogelio y Henry porque gracias a su enorme sacrificio pude seguir con mis estudios profesionales.

A mi hermana Noemí por esas charlas de orientación y por esos momentos en los cuales me demostraste cuanto te importaba que terminara la carrera.

A mi hermano Manuel por la infancia tan bonita que juntos vivimos.

A mis amigos de la UPIBI:

A Huicho, la tía, la muralla, Loby, Lore, y Lupe gracias por esos buenos momentos que pasamos juntos en el gym, el spring y demás lugares a los que acudíamos para relajarnos.

A esa persona que me ayudó siempre desde que entramos a la UPIBI, que estuvo conmigo en los momentos difíciles, y que siempre me demostró que estaba conmigo pasara lo que pasara, gracias bursho!

A las bubble gummers porque gracias a esos buenos partidos demostramos que no hay imposibles y que cuando se quiere se puede.

A mis compañeros de Keton:

A la Química Olivia porque gracias a su enorme comprensión y confianza que depositó en mí, contribuyó en gran parte para que esto se hiciera realidad.

A Blanca, Lulú, Consuelo, Jazael, Dionísio, Ricardo que me apoyaron y que de alguna forma me alentaron para que continuara con mis estudios.

Al Instituto Politécnico Nacional por darme el gran orgullo de llamarme politécnica!

“La técnica al servicio de la patria”

VALIDACIÓN DE METODOS ANALÍTICOS

Ayded Vázquez Moreno

*M. en C. Olivia Margarita Pérez Díaz *M. en C. Gloria López Jiménez

Palabras Clave: Validación, Metodología Analítica, Linealidad, Precisión, Exactitud, Especificidad.

INTRODUCCION. En muchas situaciones cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición (método analítico). Por ello las empresas de transformación (principalmente farmacéuticas) requieren de este tipo de metodologías, pudiendo utilizar metodologías farmacopeicas o bien, dedicar tiempo para su desarrollo, partiendo del hecho de que deben cumplir con el atributo de confiabilidad. Como en muchas de las actividades de la industria farmacéutica se hace uso del método científico para alcanzar este atributo, es necesario llevar a cabo en la mayoría de las ocasiones estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo. Un proceso que permite cumplir este fin es la validación.

METODOLOGIA. LINEALIDAD DEL SISTEMA. Un analista debe preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración de la solución de referencia. La concentración central debe ser igual al 100%. Medir la respuesta analítica. **PRECISIÓN DEL SISTEMA.** Un analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del análito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada que represente los 100% de la muestra procesada para su medición. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones. **ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.** Se deben establecer las posibles sustancias interferentes y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método bajo las mismas condiciones de análisis. **EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO.** Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado adicionarle la cantidad de análito correspondiente al 100% de éste en la muestra. Determinar la cantidad recuperada del análito.

RESULTADOS Y DISCUSION *Resultados obtenidos durante la validación de la metodología analítica para determinar la valoración de amoxicilina en suspensión.*

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$	0.9955
Precisión del sistema	$CV \leq 1.5\%$	1.3997
Especificidad del método	La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.	Cumple
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.98$	0.9851
Precisión del método	$CV \leq 3\%$	2.2349%
Exactitud y repetibilidad del método	El IC(μ) debe ser del 97-103%.	Superior 102.76 Inferior 97.70

Los resultados obtenidos del análisis para la valoración espectrofotométrica de amoxicilina se encuentran dentro de los límites de especificación. Los parámetros establecidos para la validación del método analítico, se encuentran dentro de especificación, lo cual nos indica la confiabilidad del método para determinar el contenido de amoxicilina en una dosis de suspensión de 250mg.

CONCLUSIONES

Se cumplió con el objetivo de este trabajo ya que permitió establecer evidencias documentadas de que el método en estudio es confiable y reproducible ya que los parámetros establecidos se encuentran dentro de especificaciones. El método analítico propuesto para determinar el contenido de amoxicilina por medio de una valoración espectrofotométrica en una dosis de suspensión cumple con los parámetros establecidos para los cuales fue diseñado, lo cual nos permite avalar los resultados obtenidos en las posteriores valoraciones y así poder asegurar la calidad del producto.

BIBLIOGRAFIA

1. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 8ª. Ed. México (2004).
2. Reglamento de Insumos para la salud (2007).
3. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la producción de medicamentos.



ÍNDICE

Lista de Tablas

Lista de Figuras

	Pág.
Introducción.....	1
Validación de un método analítico.....	2
Clasificación de métodos analíticos.....	3
Antecedentes.....	5
Misión.....	6
Visión.....	6
Ubicación de la planta.....	7
Justificación.....	7
Objetivos.....	8
Definiciones.....	9
Metodología.....	14
Linealidad del sistema.....	14
Precisión del sistema.....	14
Especificidad del método.....	14
Linealidad del método.....	15
Precisión del método.....	15
Exactitud y repetibilidad del método.....	16



Resultados.....	17
Análisis de resultados.....	26
Conclusiones.....	26
Anexos.....	27
Bibliografía.....	36



LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro para la linealidad del sistema	18
Tabla 2. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro para la precisión del sistema	19
Tabla 3. Resultados obtenidos en el espectrofotómetro para la especificidad del método.	19
Tabla 4. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro para la linealidad del método.	20
Tabla 5. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro para la precisión del método.	21
Tabla 6. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro para la exactitud y repetibilidad del método.	21
Tabla 7. Resultados obtenidos durante la validación de la metodología analítica para determinar la valoración de amoxicilina en suspensión.	22



LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Linealidad del sistema obtenida en el espectrofotómetro.	23
Figura 2. Precisión del sistema obtenida en el espectrofotómetro.	23
Figura 3. Gráfica de la linealidad del método obtenida en el espectrofotómetro.	24
Figura 4. Gráfica de la precisión del método obtenida en el espectrofotómetro (Analista 1, día 1).	24
Figura 5. Gráfica de la exactitud y repetibilidad del método obtenida en el espectrofotómetro.	25
Figura 6. Grafica del registro de la especificidad obtenida en el espectrofotómetro.	25



INTRODUCCION

En muchas situaciones cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición (método analítico). Por ello las empresas de transformación (principalmente farmacéuticas) requieren de este tipo de metodologías, pudiendo utilizar metodologías farmacopeicas o bien, dedicar tiempo para su desarrollo, partiendo del hecho de que deben cumplir con el atributo de confiabilidad. Como en muchas de las actividades de la industria farmacéutica se hace uso del método científico para alcanzar este atributo, es necesario llevar a cabo en la mayoría de las ocasiones estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo. Un proceso que permite cumplir este fin es la validación.

Como es bien sabido todo producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos y no menos importantes, los éticos, por lo que si un método analítico, que finalmente es el medidor de las características críticas de calidad del producto, no es confiable, se corre el grave riesgo de afectar al usuario final que es un paciente.

Desde este enfoque la validación de métodos analíticos es un sistema involucrado en los procesos de fabricación en el área de calidad de la empresa y bajo la filosofía de Validación, las autoridades regulatorias verifican que las empresas sustenten estos sistemas con actividades documentadas, como se indica en la NOM-059 SSA1 numerales 14.2.2.5, 14.3.1, 14.3.2 y en otros lineamientos regulatorios internacionales.

El objetivo final de un dictamen de calidad, es la liberación o no liberación de un producto sobre las especificaciones previamente establecidas. Esta decisión es tomada generalmente por el profesional farmacéutico, en gran medida esta dada por los resultados obtenidos al aplicar uno o diversos métodos analíticos; si estos no son farmacopéicos y no están validados, su decisión corre el riesgo de ser errónea y afectar al usuario del producto y por ende, a la misma empresa. La validación le proporciona, a quien aplica la metodología, una seguridad de la confiabilidad de dichos métodos y puede tomar la decisión final con certeza. La validación de métodos analíticos también impacta



en otras áreas relacionadas a la calidad de un producto (estabilidad, limpieza de equipos, entre otras).

No se puede pasar por alto el hecho de que el factor mas importante durante la validación de todo método analítico es siempre el criterio del profesional, responsable de esta decisión, criterio que es necesario aplicar después de tomar en cuenta todos los factores relacionados con el o los principios activos, concentraciones, forma farmacéutica, tipo de muestra, método de análisis, propósito de la técnica analítica, instrumentación, sustancias relacionadas, etc., estos requisitos constituyen únicamente una guía para dar al químico un soporte técnico adecuado para resolver cada caso particular.

La validación se define como la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.

Los objetivos de la validación son:

- a) Confiabilidad en todos los factores que directa o indirectamente influyen en la calidad del producto.
- b) Seguridad, eliminar todo tipo de riesgo o confusión.
- c) Efectividad, basada en la reproducibilidad de los productos y controles.

Un sistema validado es un sistema estable, capaz y confiable, y es así como nos interesa mantenerlo, dado que estas características son esenciales para mantener los altos niveles de calidad. Un sistema no validado es un sistema fuera de control.

VALIDACION DE UN METODO ANALÍTICO

Existen varias definiciones de validación de un método analítico, como las siguientes:

- ❖ Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aportaciones analíticas deseadas.
- ❖ Evaluación sistemática de un procedimiento analítico mediante el cual se documentan pruebas de que el método de análisis cumple con un propósito.



- ❖ Procedimiento mediante el cual se prueba la exactitud y confianza de un método analítico y se demuestra que se puede aplicar en un laboratorio.

En la práctica de laboratorio se utilizan diferentes tipos de validación: validación prospectiva, validación retrospectiva y revalidación.

- ♣ Validación prospectiva: Se aplica cuando se elabora un método analítico. Es típica de los laboratorios de investigaciones y desarrollo comprendidos en el estudio de todos los atributos analíticos necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método.
- ♣ Validación retrospectiva: Se aplica a métodos no validados previamente y de los que se tiene una amplia historia de resultados. Suele efectuarse en los laboratorios de control.
- ♣ Revalidación: Se emplea cuando un método analítico, previamente validado se ha introducido un cambio significativo. Los parámetros analíticos a estudiar se deciden en función del tipo de cambio efectuado.

CLASIFICACIÓN DE METODOS ANALITICOS

Los métodos se clasifican bajo los siguientes criterios:

- 1) En función de su estado regulatorio en:
 - a) Métodos farmacopéicos: Todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP, Europea, etc.)
 - b) Métodos no farmacopéicos: Aquellos métodos no compendiados en una farmacopea
- 2) En función de su aplicación (NOM 059 SSA1 y NOM-073-SSA1)en:
 - a) Métodos para producto a granel
 - b) Métodos para producto terminado
 - c) Métodos para materia prima



- d) Métodos indicadores de estabilidad
- 3) En función de la naturaleza de la respuesta analítica en:
 - a) Métodos físico-químicos: Cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones -OH , consumo de un acomplejante, etc.).
 - b) Métodos biológicos: Cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de un microorganismo, protección, muerte, etc.).
- 4) En función de su propósito analítico en:
 - a) Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia).
 - b) Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.
 - c) Métodos para identificar el analito
- 5) En función de la naturaleza del sistema de medición se clasifican en:
 - a) Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido (cromatógrafo de líquidos, cromatógrafo de gases, espectrofotómetros, etc.).
 - b) Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido (buretas, medidor de halos, potenciómetros, etc.)



Laboratorios Keton de México S.A. de C.V.

Giro: Farmacéutica

ANTECEDENTES

Laboratorios Keton de México es una empresa mexicana con 48 años ininterrumpidos en el mercado farmacéutico y 12 años en la maquila de antibióticos betalactámicos y cefalosporínicos.

La Dirección de Laboratorios Keton de México S. A. de C. V. se responsabiliza y adquiere el compromiso al establecer y desarrollar un Sistema de Calidad basado en la normatividad vigente.

Mediante la aplicación de la Política de Calidad a todas las áreas de Laboratorios Keton de México han conseguido un máximo de calidad en sus productos. Todo el personal de la organización ha desarrollado una mentalidad de constante mejora en su puesto de trabajo, detectando no sólo los fallos que se produzcan y sus causas, sino reconociendo a tiempo fallos potenciales y eliminándolos consecuentemente; todo esto con el fin de conseguir los objetivos generales.

- Satisfacer las necesidades del cliente en lo relativo a la calidad para la seguridad y confiabilidad del producto.
- Cumplir con los requisitos específicos del cliente y las normativas legales.
- Prevenir los fallos antes de que ocurran.
- Reducir los Costos Totales de Calidad.
- Tener óptimas relaciones con nuestros clientes y proveedores a base de cabal cumplimiento.



Para cumplir estos objetivos, la Dirección de Laboratorios Keton de México S. A. de C. V. es consciente que además de proporcionar los medios materiales y humanos adecuados, el personal debe entender y aplicar las directrices que emanan de los documentos que integran el Sistema de Calidad. Para conseguirlo, apoya y alienta a todas las personas de la Organización.

MISIÓN

Consiste en añadir valor a los productos y servicios que se ofrecen a los clientes, maquilando exitosamente sus productos, en los cuales se reflejen los estándares de calidad.

Proporcionar a los empleados un lugar agradable de trabajo para desempeñar eficientemente sus actividades.

Por ser una empresa farmacéutica, la misión es proporcionar productos de calidad para ayudar a mejorar la salud de la comunidad.

VISIÓN

Ser una empresa líder en la maquila de productos betalactámicos y cefalosporínicos.

Trabajar en la mejora continua para tener tecnología de vanguardia.

Contar con el personal calificado para el mejor desempeño de nuestro trabajo.

Ser una empresa socialmente responsable.

Formar como empresa parte de una red de transparencia para tener una conducta socialmente responsable.

Respetar las normas y los estándares de nuestro código de conducta.

Fomentar la mejora continua con nuestros empleados y nuestros clientes cuidando la calidad del producto y protegiendo el medio ambiente.



UBICACIÓN DE LA PLANTA

- Laboratorios Keton de México S.A. de C.V. se encuentra ubicado en el distrito federal en calle lago Xochimilco N° 65 Col. Anahuac, Delegación Miguel Hidalgo.

JUSTIFICACIÓN

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente en una muestra. Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como todo proceso de medición, este debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido. La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito.

Esta actividad puede ser justificada por los siguientes aspectos:

MORAL Y ÉTICA

El profesional farmacéutico es el responsable de los procesos farmacéuticos y por lo tanto de la calidad de estos. Todo producto farmacéutico (materias primas, producto intermedio, producto a granel y producto terminado) debe satisfacer requisitos y para ello se utilizan métodos para medir componentes específicos en el producto; lo cual es llevado a cabo con métodos analíticos.

Los métodos de prueba usados para verificaciones analíticas deben cumplir con estándares adecuados de exactitud, precisión y confiabilidad.

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Los métodos analíticos están definidos como un sistema crítico en el aseguramiento de calidad en una empresa farmacéutica ya que impactan de manera directa en la calidad de un producto.



ECONÓMICA

La carrera de muchas empresas por alcanzar una productividad elevada a costos menores, está determinada, entre otros factores, al dictamen del producto en menor tiempo, utilizando métodos de prueba de menor costo, mantenimiento o tiempo de análisis entre otros.

REGULATORIA

Reglamento de insumos para la salud, artículo 15 fracción III

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993

Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998

Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993

Las regulaciones anteriores determinan la obligación de validar métodos analíticos. Estas regulaciones podrían ser modificadas, por lo que es importante estar actualizados.

OBJETIVOS

- Establecer por estudios de laboratorio que el método analítico para la valoración de amoxicilina, por sus características de desempeño cumple con los requerimientos para los cuales fue diseñado.
- Evaluar los parámetros en la validación de métodos analíticos.
- Proveer confiabilidad en los resultados producidos por los métodos.



DEFINICIONES

- ★ **Adecuabilidad del sistema:** Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.
- ★ **Analito:** Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.
- ★ **Calibración:** Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.
- ★ **Documentación:** Conjunto de información que sustenta una actividad realizada
- ★ **Especificaciones:** Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.
- ★ **Especificidad:** Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.
- ★ **Estudio colaborativo:** Reproducibilidad realizada en distintos laboratorios, por diferentes químicos.
- ★ **Exactitud:** Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero, sea como un valor de referencia aceptado y el valor encontrado obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.



- ★ **Estabilidad analítica de la muestra:** Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del análisis, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

- ★ **Intervalo:** Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del análisis (incluyendo éstas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.

- ★ **Ley de Lambert-Beer:** Se refiere a la relación entre la intensidad de la energía radiante transmitida y la concentración de una disolución irradiada. Al atravesar una distancia fija, la pérdida de intensidad de energía radiante por incremento de sustancia disuelta es proporcional a la intensidad de la radiación incidente.

- ★ **Limite de cuantificación:** Concentración mínima del análisis, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

- ★ **Limite de detección:** Concentración mínima del análisis en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

- ★ **Linealidad:** Capacidad para arrojar resultados del análisis que sean proporcionales ya sea de manera directa o mediante la transformación matemática bien definida a la concentración del análisis en muestras, dentro de un intervalo determinado.

- ★ **Metodología de prueba:** Procedimiento o grupo de procedimientos para determinar si un producto o materia prima cumple con las especificaciones establecidas.

- ★ **Método analítico:** Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.



- ★ **Método analítico desarrollado internamente:** Método desarrollado por el propio laboratorio.

- ★ **Método analítico indicativo de estabilidad:** Método cuantitativo capaz de detectar variaciones en las propiedades del material evaluado, debidas a las condiciones de almacenaje.

- ★ **Método analítico oficial:** Método que aparece en la literatura oficial reconocida.

- ★ **Método analítico no oficial:** Método que no aparece en la literatura oficial reconocida.

- ★ **Muestra:** Porción del material a evaluar.

- ★ **Muestra analítica:** Porción del material a evaluar de acuerdo al método analítico.

- ★ **Muestra adicionada:** Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del análito.

- ★ **Parámetros de desempeño:** Parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación.

- ★ **Placebo analítico:** Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del análito.

- ★ **Placebo adicionado:** Muestra de un placebo analítico al cual se le adiciona una cantidad conocida del análito.

- ★ **Precisión:** Grado de concordancia entre resultados analíticos de pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica de manera repetida a muestras múltiples de una muestra homogénea.



- ★ **Precisión intermedia:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días.

- ★ **Proporcionalidad:** Relación establecida por una ecuación matemática entre los resultados obtenidos por dos métodos analíticos.

- ★ **Protocolo de validación:** Descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.

- ★ **Prueba de identificación:** Asegura la identidad de un análisis en una muestra, mediante la comparación de una propiedad de la muestra con la de un estándar de referencia.

- ★ **Recobro:** Cantidad del análisis determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico.

- ★ **Repetibilidad:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

- ★ **Reproducibilidad:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

- ★ **Revalidación:** Comprobación de que el método analítico mantiene su desempeño cuando existen cambios en la composición del producto, en el método analítico, o cambios críticos en los procesos de fabricación.

- ★ **Robustez:** Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.



- ★ **Sustancia de referencia:** Sustancia de uniformidad recocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con la sustancia en evaluación.

- ★ **Sustancia de referencia primaria:** Sustancia que es designada o reconocida por tener la más alta calidad metrológica, cuyas propiedades se aceptan sin referencia a otras sustancias.

- ★ **Sustancia de referencia secundaria:** Sustancia cuyas propiedades se asignan por comparación con una sustancia de referencia primaria, o bien, cuando es certificada mediante un procedimiento científicamente reconocido.

- ★ **Tolerancia:** Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser: equipos, columnas. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia, se refiere a factores externos al método.

- ★ **Validación:** Es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.

- ★ **Validación del método analítico:** Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.



METODOLOGÍA

En función de la aplicación para la presente metodología analítica se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño. (Ver anexo 1)

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Un analista debe preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración de la solución de referencia ya sea por dilución o por pesadas independientes. La concentración central debe ser igual al 100% en la muestra procesada para su medición. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración contra respuesta analítica.

Calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada en el origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). (Ver anexo 2)

Criterios de Aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

$IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Un analista debe preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada que represente los 100% de la muestra procesada para su medición, preparadas por dilución o por pesadas independientes. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones. Calcular el Coeficiente de variación (CV) y la desviación estándar (S). (Ver anexo 3)

Criterios de aceptación:

$$CV \leq 1.5\%$$

ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

Partiendo de la experiencia en el análisis de la muestra, se deben establecer las posibles sustancias interferentes y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta al método bajo las mismas condiciones de análisis.

Criterios de aceptación:

La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.



LINEALIDAD DEL MÉTODO

Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. Seleccionar al menos dos niveles, superior e inferior de la cantidad del análito y preparar el placebo adicionado al menos por triplicado a cada nivel. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones. Determinar la cantidad recuperada del análito.

Reportar la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada, calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada en el origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), el intervalo de confianza para la ordenada en el origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de la regresión ($CV_{y/x}$).

Calcular el porcentaje de recobro al obtener el cociente de cada cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro. (Ver anexo 4)

Criterios de Aceptación:

-Cantidad adicionada contra cantidad recuperada

$$r^2 \geq 0.98$$

El $IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad.

El $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero.

El $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro, no debe ser mayor del 3%.

-Porcentaje de recobro

El $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo de 97-103%

El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 3%.

PRECISION DEL MÉTODO

Analizar por triplicado una muestra del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100% en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizar de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos.

Calcular la media aritmética, la desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) empleando todos los resultados obtenidos. (Ver anexo 5)

Criterios de Aceptación:

$$CV \leq 3\%$$



EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO

Un analista debe preparar el placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo analítico equivalente a una muestra analítica por sextuplicado adicionarle la cantidad de análisis correspondiente al 100% de éste en la muestra. Determinar la cantidad recuperada del análisis.

Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro IC(μ). (Ver anexo 6)

Criterios de aceptación:

El IC(μ) debe ser del 97-103%.

El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 3%.



RESULTADOS

Registro de las características generales del equipo empleado en la validación y del analito en estudio.

SUSTANCIA	CARACTERÍSTICAS
Amoxicilina trihidratada (Estándar)	Lote: F356898 Potencia: 859.67 μ /mg Proveedor: Productos farmacéuticos Longitud de onda: 272 nm

SUSTANCIA	CARACTERÍSTICAS
Susp. de Amoxicilina de 250mg. (Muestra)	Proveedor: Chinoin Longitud de onda: 272 nm

ESPECTROFOTOMETRO UV/VIS		
Código: CQ-ESP-05	Marca: BECKMAN	Modelo: DU7400i
No. de serie: 4300970	Ubicación: Área de Instrumentos	
Fecha de Calibración: 30-OCT-06	Próxima calibración: 30-ABR-07	



Tabla 1. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro para la linealidad del sistema.

Concentración de Amoxicilina (µg/mL)	Absorbancia (nm)
80	0.2401
80	0.2343
80	0.2254
90	0.2694
90	0.2582
90	0.2579
100	0.2867
100	0.2838
100	0.2812
110	0.3243
110	0.3238
110	0.3109
120	0.3528
120	0.3483
120	0.3429

**Tabla 2.** Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro para la precisión del sistema

Solución	Concentración de Amoxicilina (µg/mL)	Absorbancia
1	100	0.3134
2	100	0.3113
3	100	0.3120
4	100	0.3122
5	100	0.3133
6	100	0.3133

Tabla 3. Resultados obtenidos en el espectrofotómetro para la especificidad del método.

Muestra	Observación
Excipiente 1	No se presenta en el barrido realizado
Excipiente 2	No se presenta en el barrido realizado
Excipiente 3	No se presenta en el barrido realizado
Excipiente 4	No se presenta en el barrido realizado
Excipiente 5	No se presenta en el barrido realizado
Excipiente 6	No se presenta en el barrido realizado
Excipiente 7	No se presenta en el barrido realizado
Excipiente 8	No se presenta en el barrido realizado
Muestra	Presenta espectro característico
Estándar	Absorbe a la misma longitud de onda que el estándar.



Tabla 4. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro para la linealidad del método.

Concentración de Amoxicilina ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia muestra (nm)
80	0.2242
80	0.2348
80	0.2359
90	0.2697
90	0.2706
90	0.2720
100	0.2997
100	0.3012
100	0.3022
110	0.3259
110	0.3256
110	0.3265
120	0.3465
120	0.3467
120	0.3484



Tabla 5. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro para la precisión del método.

		Analista	
		1	2
DIA	1	0.3030	0.3115
		0.3015	0.3018
		0.2998	0.2962
	2	0.3095	0.3129
		0.3025	0.3014
		0.3180	0.3141

Tabla 6. Absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro para la exactitud y repetibilidad del método.

Concentración de Amoxicilina ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia muestra (nm)
100	0.3039
100	0.3040
100	0.3051
100	0.3166
100	0.3000
100	0.2957



Tabla 7. Resultados obtenidos durante la validación de la metodología analítica para determinar la valoración de amoxicilina en suspensión.

Parámetro de desempeño	Prueba	Criterio de Aceptación	Resultado
Linealidad del sistema	Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98$	0.9955
	Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).	$IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero	Superior: 0.0038 Inferior: 0.0020
Precisión del sistema	Coefficiente de variación	$CV \leq 1.5\%$	1.3997
Especificidad del método	Especificidad	La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito.	Cumple
Linealidad del método	Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 \geq 0.98$	0.9851
	Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).	El $IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad.	Superior: 1.0076 Inferior: 0.9895
	Coefficiente de variación de la regresión.	El $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro, no debe ser mayor del 3%.	0.7050 %
	Coefficiente de variación de la regresión	El coeficiente de variación no debe ser mayor al 3% ($CV < 3\%$)	0.6703%
	Intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro	El $IC(\mu)$ debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo de 97-103%	Superior: 100.1855 Inferior: 99.5198
Precisión del método	Coefficiente de variación	$CV \leq 3\%$	2.2349%
Exactitud y repetibilidad del método	Intervalo de confianza para la media poblacional	El $IC(\mu)$ debe ser del 97-103%.	Superior 102.76 Inferior 97.70
	Coefficiente de variación del porcentaje de recobro	El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 3%.	2.37%

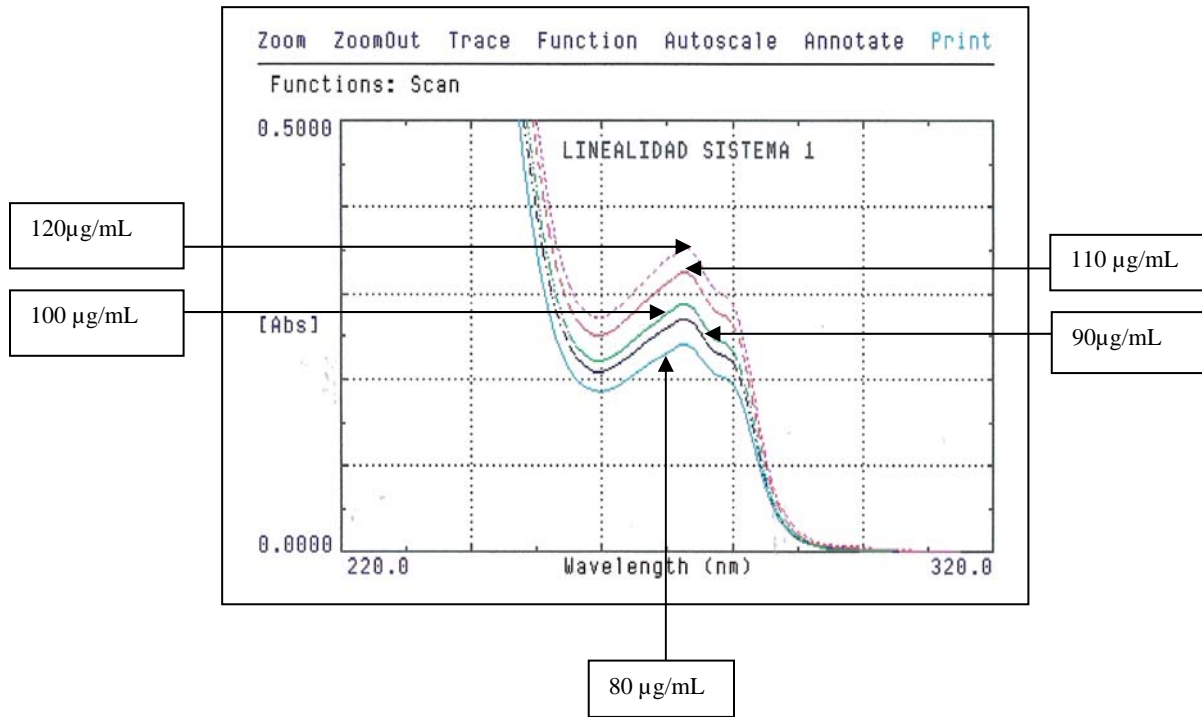


Figura 1. Figura de la Linealidad del sistema obtenida en el espectrofotómetro.

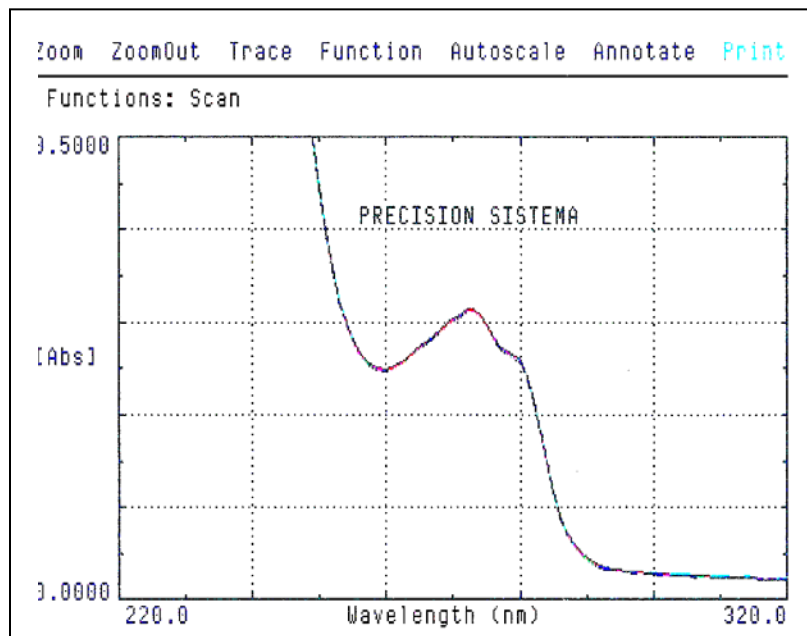


Figura 2. Figura de la Precisión del sistema obtenida en el espectrofotómetro.

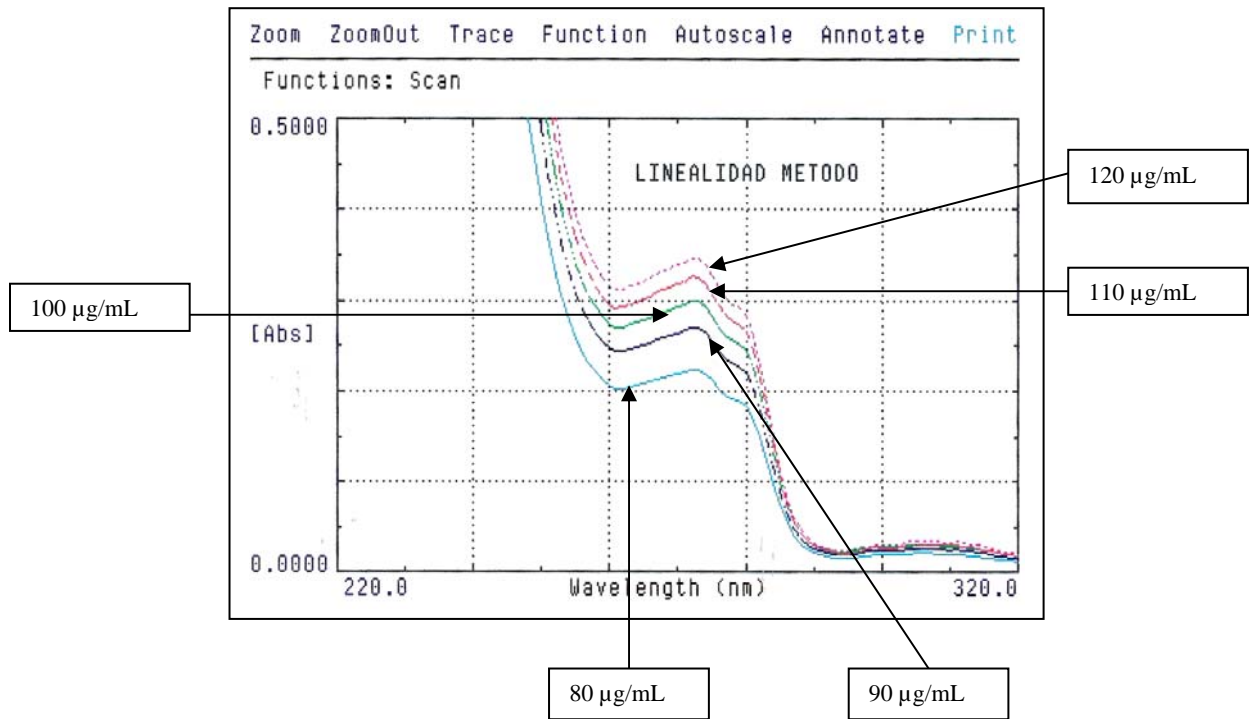


Figura 3. Figura de la linealidad del método obtenida en el espectrofotómetro.

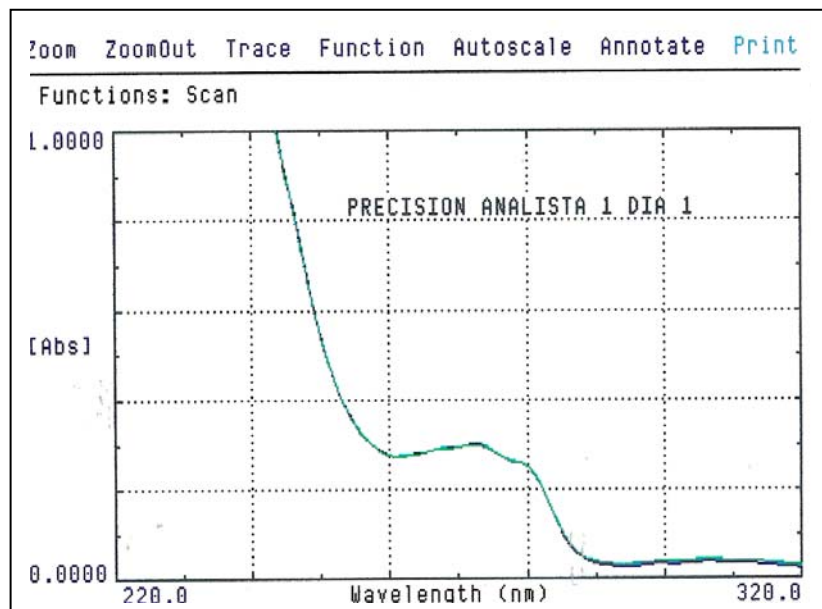


Figura 4. Figura de la precisión del método obtenida en el espectrofotómetro (Analista 1, día 1).

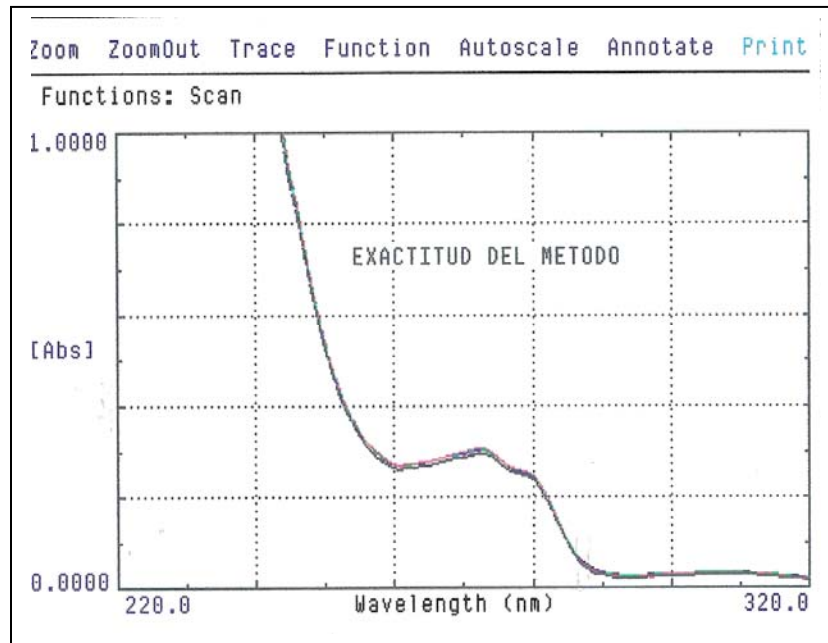


Figura 5. Figura de la exactitud y repetibilidad del método obtenida en el espectrofotómetro.

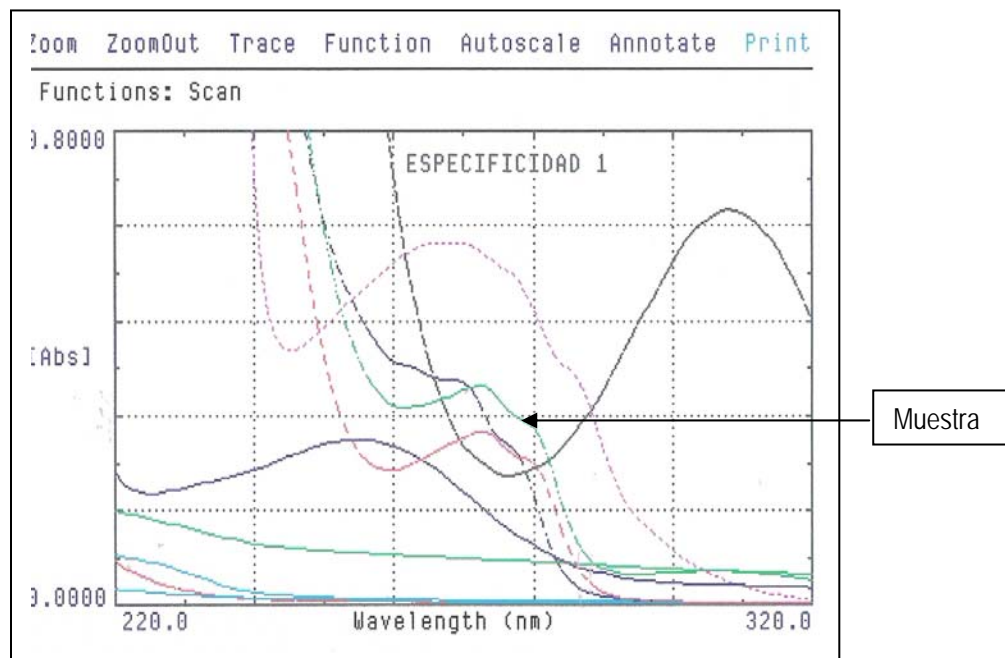


Figura 6. Figura del registro de la especificidad obtenida en el espectrofotómetro.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos del análisis para la valoración espectrofotométrica de amoxicilina se encuentran dentro de los límites de especificación.

Los parámetros establecidos para la validación del método analítico, se encuentran dentro de especificación, lo cual nos indica la confiabilidad del método para determinar el contenido de amoxicilina en una dosis de suspensión de 250mg.

En el estudio de la especificidad del método no se observa ninguna interferencia al momento de realizar los barridos, es decir, no existe la presencia de compuestos que interfieran en la lectura, se observa que la respuesta del método únicamente corresponde al analito en estudio (amoxicilina).

En el estudio de la linealidad del método se observa que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del analito, dentro del intervalo de 80 μ g/mL-120 μ g/mL.

En la exactitud y repetibilidad del método se obtuvieron valores que son concordantes con los valores de referencia empleando el método.

CONCLUSIONES

Se cumplió con el objetivo de este trabajo ya que permitió establecer evidencias documentadas de que el método en estudio es confiable y reproducible ya que los parámetros establecidos se encuentran dentro de especificaciones.

El método analítico propuesto para determinar el contenido de amoxicilina por medio de una valoración espectrofotométrica en una dosis de suspensión cumple con los parámetros establecidos para los cuales fue diseñado, lo cual nos permite avalar los resultados obtenidos en las posteriores valoraciones y así poder asegurar la calidad del producto.



ANEXO 1. PARAMETROS DE DESEMPEÑO

PARAMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO/POTENCIA/VALORACION	PRUEBAS DE IMPUREZAS		IDENTIFICACION
		CONTENIDO/VALORACION	LIMITE	
Precisión/ adecuabilidad del sistema	SI	SI	SI	*
Linealidad del sistema	SI	SI	NO	NO
Especificidad	SI	SI	SI	SI
Exactitud y repetibilidad	SI	SI	NO	NO
Linealidad del método	SI	SI	NO	NO
Precisión del método o precisión intermedia	SI	SI	NO	NO
Estabilidad analítica de la muestra	*	*	NO	NO
Limite de detección	NO	NO	SI	NO
Limite de cuantificación	NO	SI	NO	NO
Robustez	*	*	*	NO
Tolerancia	*	*	*	NO

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

**ANEXO 2. FORMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA.****A) FORMULAS****Pendiente**

$$b_1 = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n=numero de mediciones (concentración-respuesta analítica)

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de determinación.

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

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$t_{0.975, n-2}$ =Referirse al anexo 7, para determinar el valor de la t de Student



B) PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

Estos datos se utilizan únicamente para ejemplificar los cálculos.

1) Tabular los resultados

Solución	x (µg/mL)	y (absorbancia)
1	80	0.5194
2	80	0.5172
3	80	0.5147
4	90	0.7800
5	90	0.7846
6	90	0.8063
7	100	1.5917
8	100	1.5844
9	100	1.5837

2) Calcular $\sum x$, $\sum y$, $\sum x^2$, $\sum y^2$, $\sum xy$ y determinar n:

$$\sum x = 80 + 80 + \dots + 120 = 900$$

$$\sum y = 0.5194 + 0.5172 + \dots + 1.5837 = 8.682$$

$$\sum x^2 = 80^2 + 80^2 + \dots + 120^2 = 92400.00$$

$$\sum y^2 = 0.5194^2 + 0.5172^2 + \dots + 1.5837^2 = 10.228243$$

$$\sum xy = 80 \cdot 0.5194 + 80 \cdot 0.5172 + \dots + 120 \cdot 1.5837 = 932.37$$

$$n = 9$$

3) Calcular b_1 , b_0 , y r^2 .

4) Calcular $S_{y/x}$ y S_{b1}

5) Determinar en el anexo 7 $t_{0.975, n-2}$ y calcular $IC(\beta_1)$.



ANEXO 3. FORMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO PARA PRECISIÓN DEL SISTEMA.

A) FORMULAS

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación Estándar

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

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

B) PROCEDIMIENTO DE CALCULO

1) Tabular los resultados

Propiedad medida (Absorbancia) de la solución de referencia (y).

1.0520
1.0462
1.0566
1.0568
1.0554
1.0498

2) Calcular $\sum y$, $\sum y^2$ y determinar n.

$$\sum y = 1.0520 + 1.0462 + \dots + 1.0498 = 6.3168$$

$$\sum y^2 = 1.0520^2 + 1.0462^2 + \dots + 1.0498^2 = 6.650417$$

3) Calcular la media aritmética y S.

4) Calcular el CV.

**ANEXO 4. FORMULAS Y PROCEDIMIENTO DE CALCULO PARA LINEALIDAD DEL METODO.**

A) FORMULAS

Pendiente

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n=numero de mediciones (cantidad adicionada-cantidad recuperada).

Ordenada al origen

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coeficiente de determinación

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

Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$
$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$$

$$S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$
$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$



Coefficiente de variación de regresión.

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

B) PROCEDIMIENTO DE CALCULO

1) Tabular los resultados.

Cantidad adicionada (x)- Cantidad recuperada (y).

Placebo analítico adicionado	x (mg/mL)	y (mg/mL)
1	1.860	1.857
2	1.860	1.855
3	1.860	1.861
4	2.479	2.482
5	2.479	2.485
6	2.479	2.491
7	3.099	3.126
8	3.099	3.115
9	3.099	3.122

2) Calcular $\sum x$, $\sum y$, $\sum x^2$, $\sum y^2$, $\sum xy$ y determinar n.

3) Calcular b_1 , b_0 , y r^2 .

4) Calcular $S_{y/x}$ y S_{b1}

5) Determinar en el anexo 7 $t_{0.975,n-2}$ y calcular IC(β_1).



ANEXO 5. FORMULAS Y PROCEPARA EL CÁLCULO DE LA PRECISION DEL METODO.

A) FORMULAS

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

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

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

n= numero de muestras de contenido/potencia/valoración

B) PROCEDIMIENTO DE CALCULO

1) Tabular los resultados

		Analista	
		1	2
DIA	1	0.3030	0.3115
		0.3015	0.3018
		0.2998	0.2962
	2	0.3095	0.3129
		0.3025	0.3014
		0.3180	0.3141

- 2) Calcular $\sum y$, $\sum y^2$ y determinar n.
- 3) Calcular la media de todos los datos (12) y S.
- 4) Calcular el CV.



ANEXO 6. FORMULAS PARA EL CÁLCULO DE LA EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL METODO.

A) FORMULAS

Media aritmética

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

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

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$t_{0.975, n-1}$ = Referirse al anexo 7, para determinar el valor de la t Student.

n = número de recobros

B) PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO.

1) Tabular los resultados.

Placebo analítico adicionado	Cantidad adicionada	Cantidad recuperada	% de recobro (y)
1	50.00	50.04	100.08
2	50.10	50.39	100.58
3	50.00	50.11	100.22
4	49.90	49.89	99.98
5	50.00	50.23	100.46
6	50.00	49.93	99.86

y = Es el cociente porcentual de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada.

- 2) Calcular $\sum y$, $\sum y^2$, y determinar n.
- 3) Calcular la media y la desviación estándar.
- 4) Calcular el CV.
- 5) Determinar en el anexo 7 $t_{0.975, n-1}$ y calcular $IC(\mu)$

ANEXO 7. TABLA ESTADÍSTICA DE LA DISTRIBUCIÓN t DE STUDENT.

GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$	GRADOS DE LIBERTAD	$t_{0.975}$
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993
25	2.060	50	2.009	75	1.992

Los grados de libertad se fijan con base a la fórmula indicada en el subíndice del símbolo de la t Student.



BIBLIOGRAFIA

1. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 8ª. Ed. México (2004).
2. Reglamento de Insumos para la salud (2007).
3. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la producción de medicamentos.
4. NOM-177 SSA1 1998 “Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable”.
5. NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de medicamentos.
6. Guía de validación de métodos analíticos, CNQFB.
7. Diseño y análisis de experimentos, Montgomery D.C. Grupo Editorial Iberoamerica. 3ª Ed. México. 1991.

