

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**



**Desarrollo y validación de la técnica analítica por
Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C.)
para la determinación de contenido de vitamina D₃
Colecalciferol en suspensión oral, Lima 2010.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

Bach. FLORES SOTO, YOVANA ROSALÍA

AYACUCHO - PERÚ

2011

*A mis padres
Paulina y Faustino por ser mis guías
para salir adelante.*

AGRADECIMIENTO

A mí Alma Mater la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, primera casa superior de estudios en nuestra ciudad, por ser forjadora de nuestra formación y realización profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica que permitió formarme profesionalmente.

A los docentes de mí alma mater por su valiosa enseñanza y orientación que día a día forman profesionales muy competentes para el mercado laboral.

Al Servicio de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por brindarme su apoyo y las facilidades para desarrollar el trabajo de investigación.

A mis asesores Mg. Maricela López Sierralta (asesor interno) y MSc. León Faustino Villegas Vílchez (asesor externo) por su orientación, enseñanza impartida para el desarrollo de este proyecto.

A mis hermanos, tíos: Vicenta y Alberto Flores y a todos aquellos quienes me brindaron su apoyo, consejos y orientaciones en el desarrollo de este proyecto y en el proyecto de mi vida.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Calidad	4
2.3. Control de calidad.....	4
2.4. Buenas prácticas de laboratorio.....	5
2.5. Validación	5
2.6. Análisis instrumental	11
2.6.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	11
2.7. Suspensión	12
2.8. Vitamina D ₃	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Lugar de ejecución.....	15
3.2. Población	15
3.3. Muestra.....	15
3.4. Unidad muestral.....	15
3.5. Recepción de la muestra.....	15
3.6. Desarrollo de la técnica analítica.....	16
3.7. Técnica analítica por HPLC.....	17
3.8. Diseño metodológico.....	18
3.9. Análisis estadístico.....	25
IV. RESULTADOS	30
V. DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	52
VII. RECOMENDACIONES.....	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS	

Desarrollo y validación de técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C.) para la determinación del contenido de vitamina D₃ Colecalciferol en suspensión oral. Lima. 2010.

Autor : Bach. FLORES SOTO, Yovana Rosalía

Asesores: Mg. Maricela, LOPEZ SIERRALTA

MSc. León Faustino, VILLEGAS VILCHEZ

RESUMEN

La validación y el desarrollo de una técnica analítica es parte integral de sistema de control de calidad, porque este confiere fiabilidad a los resultados obtenidos en el laboratorio de análisis. Para la cual se propone una técnica alternativa en la cuantificación de vitamina D₃ Colecalciferol en suspensión oral debido a que esta no se encuentra en las monografías oficiales como: Farmacopea de los Estados Unidos (USP), Farmacopea Británica (BP), normas peruanas. El estudio descriptivo se realizó en los meses de Enero a Junio del año 2010 en el laboratorio del Servicio de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia-Lima.

Los parámetros de validación evaluados son: Especificidad, linealidad e intervalo, exactitud, precisión, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y robustez. La especificidad se determinó por evaluación visual de los cromatogramas evidenciándose que la fase móvil, diluyente, placebo y productos de degradación no interfieren en el análisis de contenido de vitamina D₃.

La linealidad se determinó por regresión lineal en un intervalo del 80% al 250% obteniéndose un coeficiente de correlación de: 0.999 tanto para estándar como para la muestra demostrando así la linealidad del sistema y método.

En la exactitud se obtuvo el porcentaje de recuperación promedio que fue de: 99.85% quedando demostrado que no existe diferencia significativa entre las cantidad recuperada y añadida.

En la precisión se determinó el coeficiente de variación: CV del sistema: 0.776% CV del método: 0.777% encontrándose dentro de los límites especificados.

El LD fue de: 0.949 UI/mL y el LC fue de: 2.903 UI/mL, La robustez de la técnica analítica se obtuvo un CV. 0.7641% indicando una buena aptitud del sistema, Por lo tanto, se concluye que la técnica analítica es confiable ya que los resultados obtenidos demuestran y respaldan la determinación de contenido de vitamina D₃ en suspensión oral cumpliendo los parámetros establecidos por las monografías oficiales (USP 32).

Palabras clave: técnica analítica, vitamina D₃, validación, HPLC.

ABSTRACT

The validation and the development of an analytic technique is integral part of quality control system, because this it confers reliability to the results obtained in the analysis laboratory. For which intends an alternative technique in the vitamin quantification D₃ Cholecalciferol in oral suspension because this it is not in the official monographs as: Pharmacopeia of the United States (USP), British Pharmacopeia (BP), Peruvian norms. The descriptive study was carried out in the months of January to June of the year 2010 in the laboratory of the Service of Quality control of the Peruvian University Cayetano Heredia-Lima.

The valued validation parameters plows: Specificity, linealidad and interval, accuracy, precision, detection limit (LD), quantification limit (LC) and robustness. The specificity was determined by visual evaluation of the cromatogramas being evidenced that the mobile phase, diluter, placebo and degradation products don't interfere in the analysis of vitamin content D₃.

The linealidad was determined by lineal regression in an interval from 80% to 250% being obtained a correlation coefficient of: 0.999 so much for standard as for the sample demonstrating this way the linealidad of the system and method.

In the accuracy the percentage of recovery average was obtained that was of: 99.85% being demonstrated that significant difference doesn't exist among the recovered and added quantity. In the precision the variation coefficient was determined: CV of the system: 0.776% CV of the method: 0.777% being inside the specification limits.

The LD was of: 0.949 UI/mL and the LC were of: 2.903 UI/mL, The robustness of the analytic technique was obtained a CV. 0.7641% indicating a good aptitude of the system, therefore, you concludes that the analytic technique is reliable since the obtained results demonstrate and they support the determination of vitamin content D₃ in oral suspension completing the parameters settled down by the official monographs (USP 32).

Password: analytic technique, vitamin D₃, validation, HPLC.

I. INTRODUCCIÓN

Todos los productos farmacéuticos elaborados en la industria farmacéutica están sometidos a un conjunto de exigencias para demostrar su calidad es así que el laboratorio de control de calidad realiza rigurosos análisis que requieran técnicas analíticas validadas para establecer su calidad.

La validación se define como el establecimiento de pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados.

La validación de una técnica analítica es importante debido a que forma parte de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), es por ello que las entidades como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID) y monografías oficiales como la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), Farmacopea Británica (BP), la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) y la Conferencia Internacional sobre la Armonización (ICH), consideran la necesidad de validar nuevos procedimientos analíticos.

En la actualidad los laboratorios farmacéuticos de acuerdo a sus necesidades y dificultades en la determinación de la calidad de un producto optan por dar como solución la elaboración de nuevos procedimientos analíticos y con ello reducir trabajos innecesarios, repeticiones y costos elevados.

La USP 32 describe diversos procedimientos para el análisis cuantitativo de vitamina D₃ en diversas formas farmacéuticas, pero no describe una técnica aplicable a suspensiones orales, es por ello. La necesidad de desarrollar una técnica analítica por Cromatografía Líquida de alta Eficiencia (H.P.L.C) para obtener resultados confiables y que cumpla con los parámetros de validación demostrando así su validez.

Para proporcionar la evidencia de la eficacia del análisis de cuantificación nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo general:

1. Desarrollar y validar la técnica analítica para la determinación de contenido por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, (H.P.L.C) de vitamina D₃ (Colecalciferol) en una suspensión oral y documentar los resultados obtenidos.

Objetivos específicos:

1. Determinar la especificidad y selectividad de la técnica analítica para el contenido por H.P.L.C de vitamina D₃.
2. Determinar la linealidad e intervalo de la técnica analítica para el contenido por H.P.L.C de vitamina D₃.
3. Determinar la exactitud de la técnica analítica para el contenido por H.P.L.C de vitamina D₃.
4. Determinar la precisión de la técnica analítica para el contenido por H.P.L.C de vitamina D₃.
5. Determinar el límite de detección y cuantificación de la técnica analítica para el contenido por H.P.L.C. de vitamina D₃.
6. Determinar la robustez de la técnica analítica para el contenido por H.P.L.C de vitamina D₃.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES.

Pérez (2010), realizó el estudio de validación de la metodología para la determinación de vitamina A en alimentos infantiles instantáneos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), donde señala que la metodología es buena y aplicable para la determinación de vitamina A en alimentos infantiles instantáneos.

Prado (2008), realizó el desarrollo y validación de la técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C) para la determinación de contenido de Ciprofloxacino 3mg/1mL y Dexametasona 1mg/1mL en suspensión oftálmica, donde concluye que el método analítico es confiable ya que los resultados obtenidos demuestran y respaldan la determinación de contenido de Ciprofloxacino y Dexametasona en suspensión oftálmica.

Bellido (2007), desarrolló la validación del método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para la determinación cuantitativa del Ambroxol Clorhidrato en jarabe, concluyendo que el método por HPLC descrito y evaluado es adecuado para la cuantificación del Ambroxol Clorhidrato en jarabe.

Huamaní (2005), en su trabajo de validación de métodos de disolución por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) de Paracetamol y Diclofenaco Sódico en comprimidos recubiertos, demostró que las condiciones de disolución

y técnica analítica son confiables ya que los resultados obtenidos demuestran y respaldan la cuantificación del Paracetamol y Diclofenaco sódico por completo. Morales (2004), en su trabajo: Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para el Enalapril 10mg tabletas recubiertas, demostró la aplicabilidad del método analítico propuesto por la USP 26 aun introduciendo cambios significativos en el análisis del Enalapril por HPLC en el Perú.

2.2. CALIDAD.

Según la Organización Internacional de Estandarización (ISO), el concepto de calidad está referida a “La totalidad de los rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas e implícitas” (Blanco, 2001), (Compañó, 2002).

La calidad no es inmediata, sino que sólo es alcanzada si es adoptada “a priori” una larga serie de medidas que son conformes. (ISO, 1986), (ISO, 1987).

Es el grado de satisfacción que ofrecen las características del producto en relación con las exigencias del consumidor al que este se destina. Los atributos o características fundamentales de un producto farmacéutico son: identidad, pureza, potencia, eficacia, seguridad, estabilidad (Vila, 1997).ç

2.3. CONTROL DE CALIDAD.

Conjunto de procedimientos, técnicas y actividades operativas, destinadas a medir, confrontar y verificar que un producto cumpla con las características y especificaciones planificadas; con una serie de ensayos, análisis o medidas que se realizan sobre un determinado producto para ver si cumple con la calidad especificada (UPCH, 2004).

Son las actividades y técnicas operacionales que son empleadas para cumplir los requisitos de calidad. El control de calidad involucra tanto el seguimiento (monitoreo) del proceso, como la eliminación de las causas de un desempeño insatisfactorio para lograr la calidad (ISO, 1986), (ISO, 1987).

2.4. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO (BPL).

Es un conjunto de normas y reglas, de procedimientos operacionales y prácticas establecidas y promulgadas por determinados organismos como la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), o la Food and Drug Administration (FDA), y de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), que se consideran de obligado cumplimiento para asegurar la calidad e integridad de los datos producidos en determinados tipos de investigaciones o estudios. Dichas normas buscan el aseguramiento de la calidad de un laboratorio bajo criterios de orden y disciplina de trabajo, con la finalidad que los resultados que se obtengan de éste reúnan las condiciones de calidad y seguridad (Compañó, 2002).

Las BPL están relacionados con la organización, proceso y condiciones bajo las cuales se planifican, realizan, controlan, registran e informan los estudios de los laboratorios. Las BPL pretenden promocionar la calidad y validez de los datos de análisis. Es decir si el trabajo experimental se dirige cumpliendo las BPL, debería ser posible para un inspector en un futuro, observar los registros de trabajo y determinar fácilmente, porqué, cómo y por quién realizó el trabajo, quien llevaba el control, que equipamiento utilizó, etc.(Trillo, 1993).

2.5. VALIDACIÓN.

Se llama validación a la obtención de pruebas o evidencias convenientemente documentadas, demostrando que un método de fabricación o control es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos (Castro y col, 1999).

Validación es el proceso por el cual se establece, mediante estudios y análisis de laboratorio, que las características de desempeño analítico de un procedimiento cumpla los requisitos previstos (USP 32, 2009).

El objetivo de la validación de un método analítico es demostrar que ésta es adecuado para la finalidad prevista (ICH, 1995).

Los documentos de la ICH aconsejan sobre la necesidad de realizar una nueva validación en las siguientes circunstancias: cambios en la síntesis del fármaco, cambios en la composición del producto farmacéutico y cambios en el procedimiento analítico (USP 32, 2009).

“Validación es la confirmación por examinación y la provisión de evidencia objetiva de que los particulares requisitos para un uso especial previsto son satisfactorios” (ISO/IEC17025, 2005).

2.5.1. TIPOS DE VALIDACIÓN:

- **VALIDACIÓN PROSPECTIVA.**

Se aplica cuando se desarrolla un nuevo método analítico y se lleva a cabo de acuerdo con un protocolo establecido y planificado. Comprende el estudio de todos los criterios para demostrar el buen funcionamiento e idoneidad del método (Castro y col, 1999).

- **VALIDACIÓN RETROSPECTIVA.**

Para métodos repetidamente utilizados y no validados anteriormente y de los que se tiene documentación suficiente para probar la bondad del método (Castro y col, 1999).

Está basada principalmente en la revisión y análisis de la información histórica del mismo, se realiza en productos que se encuentran en el mercado, cuyo

proceso de manufactura se considera estable y cuando las características de los productos, económicamente no justifica hacer una validación prospectiva o con carácter concurrente (Espinoza, 2000).

- **VALIDACIÓN CONCURRENTE.**

Se basa en la información obtenida durante el desarrollo del mismo; aquí se toma en cuenta:

- a) Monitoreo de variables críticas en el proceso, para demostrar que el mismo se encuentra bajo control.
- b) Se recolecta datos sobre el proceso productivo.
- c) Se requiere como mínimo tres lotes consecutivos (Espinoza, 2000)

- **REVALIDACIÓN.**

Repetición parcial o total de una validación debido a cambios efectuados que puedan afectar a la bondad del método validado (DIGEMID, 1995), (Castro y col, 1999).

Se aplican en métodos previamente validados, pero que deben volver a evaluarse por variaciones de algún factor instrumental, de la matriz de la muestra o de la composición relativa del análisis, los criterios a estudiar se deciden en función del tipo de cambio efectuado (Aparicio, 1995).

2.5.2. DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN.

Según la USP 32 (2009), los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad es necesario que requieran diferentes esquemas de validación, para lo cual se indican las diferentes categorías a continuación:

- **Categoría I.**

Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de los fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en los productos farmacéuticos terminados.

- **Categoría II.**

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.**

Procedimiento analítico para la determinación de las características de desempeño por ejemplo disolución, liberación de fármacos.

- **Categoría IV.**

Pruebas de identificación.

TABLA 1. Características de desempeño analítico.

Características de Desempeño Analítico	categoría II				
	Categoría I	Análisis Cuantitativos	Pruebas de Limite	Categoría III	Categoría IV
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

* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba

FUENTE: USP32 NF27. Farmacopea de los Estados Unidos de América 2009.

2.5.3 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO:

A. ESPECIFICIDAD – SELECTIVIDAD.

Los documentos ICH, la definen como la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulte previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz (USP 32, 2009), (Huamani, 2005).

Especificidad. Capacidad de detectar el analito sin interferencias de ningún otro compuesto.

Selectividad. Capacidad de detectar el analito separadamente de sustancias químicas diferentes presentes en la muestra (USP 32, 2009).

B. LINEALIDAD E INTERVALO.

Linealidad. Es la capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado (USP 32, 2009).

Intervalo. Es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad, se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba. La ICH recomienda que, para establecer la linealidad se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones (USP 32, 2009).

C. EXACTITUD.

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo. Los documentos ICH recomiendan que se evalúe la exactitud analizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración. La exactitud puede expresarse como porcentaje de recuperación la cual debe estar entre un 98% y 102% (USP 32, 2009), (Douglas, 2005).

D. PRECISIÓN.

Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión puede ser utilizada como medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad (USP 32, 2009).

Se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (RSD) (Castro y col, 1999). Se puede distinguir dos tipos de estudio.

Repetibilidad. Es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos, en un corto intervalo de tiempo (Castro y col, 1999).

Reproducibilidad. Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra, pero en condiciones diferentes como diferentes analistas, aparatos, días, etc.

En análisis de producto terminado suelen darse coeficientes de variación inferiores al 2-3% en el ensayo de repetibilidad y del 4-5% en el ensayo de reproducibilidad (Castro y col, 1999).

E. ROBUSTEZ.

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, la robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico.

En la robustez del método se emplea las pruebas de aptitud del sistema, cuyos indicadores son el número de platos teóricos(N), resolución(R), factor de cola (T), desviación estándar de cinco inyecciones repetidas del analito (USP 32, 2009).

F. LÍMITE DE DETECCIÓN.

Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito en la muestra (USP 32, 2009), (Quattrocchi, 1992).

G. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se pueda determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales establecidas. Se expresa habitualmente en forma de concentración de la muestra (USP 32, 2009).

2.6. ANÁLISIS INSTRUMENTAL.

2.6.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA. (HPLC).

Es la separación de los compuestos de una mezcla por su distribución entre una fase fija y otra móvil (Kieffer, R. 1993).

Es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Los solventes empleados deben tener alto poder solubilizante, baja reactividad, seguridad, alta pureza, donde los componentes de la mezcla interactúan en distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil (USP 32, 2009), (Romero, 2002)

El Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (HPLC), tiene las siguientes partes:

- Reservorio de fase móvil. Contiene la fase móvil filtrada y desgasificada.
- Sistema de bombeo. Controla el caudal y regula la presión.
- Sistema de inyección. Efectúa la inyección de la muestra.
- Horno. Controla la temperatura de la columna.
- Columna. Es el corazón del Cromatógrafo.

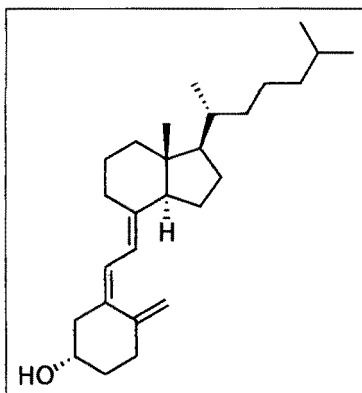
- Detector. Produce una señal característica.
- Registrador. Emite el resultado en forma de cromatogramas (USP 32, 2009), (García, 1991).

2.7. SUSPENSIÓN.

Forma farmacéutica líquida, la cual tiene un sistema bifásico donde se suspende un sólido finamente dividido disperso en un líquido; cuyas partículas tienen como límite inferior de tamaño de partícula 0,1 μm . Se requiere de un conocimiento del comportamiento de las partículas en los líquidos, de los agentes suspensores, de los agentes saporíferos y de los colorantes para producir una suspensión adecuada. Las suspensiones deben de poseer ciertas propiedades básicas; la fase dispersa debe sedimentar lentamente o no sedimentar y re-dispersarse con rapidez al agitar. Las partículas no deben de aglomerarse al sedimentar y la viscosidad debe permitir que la preparación pueda verterse con facilidad; la estabilidad química de la suspensión es un factor esencial; además el producto debe tener una apariencia atractiva y ser resistente a la contaminación microbiana (Remington, 1998).

2.8. VITAMINA D₃:

NOMENCLATURA: 9,10 - secocholesta - 5, 7, 10(19) - trien-3-ol; olevitamin D₃; choilecalciferol; colecalciferol (The Merck Index, 2001).



FIGURANº 01. ESTRUCTURA MOLECULAR DE VITAMINA D₃,
FUENTE: (THE INDEX MERCK, 2011)

- Formula molecular. (C₂₇H₄₄O).
- Peso molecular. 284.64 g/mol.
- Solubilidad. Soluble en solventes orgánicos usuales, ligeramente soluble en aceites vegetales. Insoluble en agua. Rango de uv, máximo (alcohol o hexano): 264.5 nm (The Merck Index, 2001).
- Especificaciones: 90 - 200% de vitamina D₃ como solución oral (USP 32, 2009).

La vitamina D₃ es un heterolípido insaponificable del grupo de los esteroides. Es una provitamina soluble en grasas. La vitamina D₃ se encarga de regular el paso de calcio a los huesos, la vitamina representa un papel importante en el mantenimiento de los órganos y sistemas a través de múltiples funciones como: la regulación de los niveles de calcio y fósforo en sangre, promoviendo la absorción intestinal de los mismos a partir de los alimentos y la reabsorción de calcio a nivel renal (Goodman y Gilman, 2007).

La vitamina D₃ es la vitamina D natural hallados en los aceites de pescado y es la que se sintetiza en la piel del hombre y de los animales luego de la exposición de la misma a los rayos solares. También puede formarse por irradiación del 7-dehidrocolesterol; por medio de reacciones fotoquímicas complejas la unidad internacional aceptada para las vitaminas antirraquíticas es 0.025 µg de vitamina D₃ pura, cristalina, la dosis preventiva se considera que es de 400 UI por día (Braverman, 1980), (Tyler, 1979).

Es una prohormona que en el organismo se convierte en diferentes metabolitos activos que funcionan como hormonas regulando las actividades de diversas células. Su acción principal es mantener el calcio plasmático dentro de los niveles normales, para lo cual reduce la excreción de calcio, y moviliza el calcio óseo (Ahumada, 2002), (Flórez, 2003).

2.8.1. ABSORCIÓN BIOTRANSFORMACIÓN Y EXCRECIÓN.

La vitamina D₃ se absorbe en el intestino delgado, la bilis es esencial para la absorción adecuada, el principal componente en este sentido de la bilis es el ácido desoxicolato. La vía principal de excreción de la vitamina es la bilis y solo un porcentaje pequeño se excreta por la orina (Goodman y Gilman, 2007).

La vitamina D₃ aumenta la absorción intestinal tanto de calcio como de fosfatos y acrecienta la reabsorción de fosfatos en el riñón. Resulta entonces esencial para la deposición normal de fosfato de calcio en los huesos (Tyler, 1979).

El exceso de vitamina se deposita en el tejido graso, se metaboliza en el hígado dando metabolitos inactivos y se excreta por la bilis (Ahumada, 2002).

2.8.2. ACCIONES FISIOFARMACOLÓGICAS.

- Intestino. Facilita la absorción de calcio y fosfatos.
- Hueso. Facilita la mineralización, su déficit causa raquitismo, osteomalacia, su exceso produce hipercalcemia.
- Riñón. Facilita la reabsorción de calcio (Ahumada, 2002), (Flórez, 2003).

2.8.3. USOS TERAPEUTICOS DE LA VITAMINA D₃.

1. Profilaxia y cura del raquitismo de origen nutricional.
2. Tratamiento del raquitismo metabólico y osteomalacia, particularmente en casos de insuficiencia renal crónica. Osteodistrofia renal.
3. Prevención y tratamiento de la osteoporosis.
4. Hipoparatiroidismo (Flórez, 2003), (Ahumada, 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.

El presente trabajo se realizó en el Área de Fisicoquímica del Servicio de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia ubicada en la avenida Honorio Delgado 430 – Urb. Ingeniería del distrito de San Martín de Porres–Lima. Durante los meses de enero a junio del 2010.

3.2. POBLACIÓN: 500 unidades de suspensiones orales de vitamina D₃ pertenecientes al lote: 104450, con fecha de vencimiento: abril 2013 del Departamento de Producción - Laboratorios Industria Especializada S.A. (IESA).

3.3. MUESTRA: 40 frascos de suspensiones orales de vitamina D₃ y 5 frascos de placebo.

3.4. UNIDAD MUESTRAL: Suspensiones orales de vitamina D₃, frasco x 60 mL que contiene 250UI de vitamina D₃/5 mL, y placebo frasco x 60 mL.

3.5. RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: Se recibió 50 frascos de suspensiones orales de vitamina D₃ pertenecientes al lote: 104450 y 10 frascos de placebo del mismo lote con 200 mg de estándar secundario de vitamina D₃ cuyo lote fue: 575AO y una potencia de 107760 UI/g del departamento de producción - Laboratorios: IESA, las cuales fueron distribuidas de la siguiente manera:

1. Desarrollo de técnica.

20 frascos de suspensiones orales de vitamina D₃ y 3 frascos de placebo.

2. Técnica analítica y parámetros de validación.

20 frascos de suspensiones orales de vitamina D₃ y 2 frascos de placebo.

3. Contramuestra.

10 frascos de suspensiones orales de vitamina D₃ y 5 frascos de placebo.

3.6. DESARROLLO DE LA TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Se desarrolló la técnica analítica teniendo en cuenta la solubilidad del principio activo, la longitud de onda a la cual ésta se absorbe, evaluación de inconvenientes con el placebo, además se empleo técnicas USP y otras técnicas propias del laboratorio como punto de referencia, de tal modo que se realizó un pool de 20 frascos de muestra, un pool de 3 frascos de placebo, y un estándar secundario de vitamina D₃ con lote: 575AO detallándose a continuación las técnicas empleadas:

1. Se disolvió 10 mg principio activo, 10 mL muestra y 10 mL de placebo en fias de 25 mL con una mezcla de tetrahidrofurano (THF) y acetonitrilo (ACN) en una proporción de (1:1) como solución de dilución, una vez enrasadas se filtró una porción aproximadamente de 2 mL en viales HPLC, donde se empleó una fase móvil de: n-hexano, metanol y acetonitrilo (7:46.5:46.5) con un volumen de inyección de 25 µL, velocidad de flujo de 1 mL/mim, longitud de onda de 265 nm, empleando una columna L1, temperatura entre 20- 25°C y un tiempo de recorrido de 2 horas.

2. Se realizó una extracción con n-hexano en 3 peras de decantación las cuales fueron distribuidas para 10 mg de estándar, 10 mL de placebo y 10 mL de muestra, a la cuales se les añadió 20 mL agua, 10 mL alcohol, y 25 mL de n-hexano, se agitó fuertemente y una vez separada las fases se recolectó la fase hexánica en un matraz. Nuevamente se realizó la extracción con 25 mL de n-

hexano, con n- hexano recolectado se llevó a evaporación en baño maría a 45°C, reconstituyendo las muestras en 5 mL de alcohol isopropílico las cuales se filtró y colocó en viales de HPLC, donde se empleó una fase móvil de metanol: agua (75:25), una columna C18 equivalente a una L1, longitud de onda de 265 nm, volumen de inyección de 25 µL, velocidad de flujo de 1.5 mL/min, temperatura entre 20- 25°C y un tiempo de recorrido de 2 horas.

3. Se pesó 10 mg de estándar, 10 mL de muestra y 10 mL de placebo a las cuales se añadió 15 mL de agua como medio dispersante y 25 mL de n- hexano para la extracción del principio activo, la fase n-hexanica fue filtrada en viales HPLC donde se utilizó una fase móvil de: acetonitrilo: metanol (80:20) a una longitud de onda de 265 nm, con una columna C8 equivalente a una L7, volumen de inyección de 25 µL, una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. temperatura entre 25- 30°C y tiempo de recorrido de 2 horas.

3.7. TÉCNICA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Se preparó un pool de 20 frascos de suspensiones orales de vitamina D₃ y un pool de 2 frascos de placebo pertenecientes al lote: 104450, se empleó un estándar secundario de vitamina D₃ cuyo lote es: 575AO con una potencia de 107760 UI/g empleándolo en la técnica y parámetros de validación.

3.7.1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DEL ESTÁNDAR:

Se pesó aproximadamente 23.2 mg de vitamina D₃ (equivalente a 2500 UI), a la cual se agregó 15 mL de agua como dispersante, luego se procedió a agitar por rotación manual por espacio de 5 minutos y transcurrido el tiempo se añadió 50 mL de n-hexano volumétricamente, nuevamente se agitó fuertemente por espacio de 10 minutos observándose la formación de dos fases una acuosa y la otra hexánica, se tomó la parte hexánica para los análisis, concentración: 50 UI/mL.

3.7.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE DE LA MUESTRA:

Se pesó un volumen de 50 mL de suspensión de vitamina D₃ (equivalente a 2500 UI), se agregó 15 mL de agua como dispersante, se procedió a agitar por rotación manual por espacio de 5 minutos y trascurrido el tiempo se añadió 50 mL de n-hexano volumétricamente, nuevamente se agitó fuertemente por espacio de 10 minutos observándose la formación de dos fases una acuosa y la otra hexánica, se tomó la parte hexánica para los análisis, concentración: 50 UI/mL.

3.7.3. SISTEMA CROMATOGRÁFICO:

Fase móvil	: Acetonitrilo: Metanol (80:20)
Columna cromatográfica	: zorbaxEclipse XDB -C8 (4.6 x150mn, 5µm)
Longitud de onda	: 265 nm.
Velocidad de flujo	: 1.5mL/min.
Volumen de inyección	: 25 µL.
Temperatura	: 25-30°C

3.7.4. PROCEDIMIENTO:

Se inyectó por separado las soluciones del estándar y muestra, registrándose así las áreas de los cromatogramas correspondientes calcular la cantidad de vitamina D₃ presentes en la muestra aplicando la siguiente fórmula:

$$\left[\text{vit D}_3 \text{ (UI/mL)} = \frac{\text{Área de MTA} \times \text{peso ST} \times \text{Potencia ST} \times \text{vol. dilución MTA} \times \text{Densidad MTA}}{\text{Area ST} \times \text{Vol. dilución ST} \times \text{peso MTA}} \right]$$

3.8. DISEÑO METODOLÓGICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

3.8.1. DESARROLLO DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.

3.8.1.1. ESPECIFICIDAD – SELECTIVIDAD.

1. Identificación de los picos pertenecientes al estándar y muestra de vitamina D₃.

Preparación del estándar.

De la solución madre del estándar se cogió 2mL de la capa hexánica y fue diluida en 5 mL con diluyente (n-hexano) obteniendo una concentración de 20 UI/mL., correspondiente al 100%.

Preparación de la muestra.

De la solución madre de la muestra se cogió 2 mL de la capa hexanica y fue diluida en 5 mL con diluyente (n-hexano) obteniendo una concentración de 20 UI/mL., correspondiente al 100%.

2. Identificación de los picos pertenecientes al placebo, diluyente, fase móvil y productos de degradación.

Preparación del placebo. Se pesó 10 mL de placebo provenientes de un pool de 2 frascos en una fiola a la cual se añadió 15 mL de agua para dispersarla y se agitó por espacio de 5 min. Trascurrido el tiempo se añadió 25 mL de n-hexano y nuevamente se agitó fuertemente por 10 min. Se agregó 1 g de cloruro de sodio para acelerar la separación de las fases del cual se cogió 2 mL de la fase hexánica para ser filtrada y colocada en un vial, e inyectados en el HPLC.

Preparación de la fase móvil. Se realizó una mezcla de 10 mL de acetonitrilo y metanol grado HPLC cuya proporción fue de 80:20 respectivamente, del cual se cogió y filtró 2 mL de mezcla en un vial para ser inyectados en el HPLC.

Diluyente. Se filtró y colocó 2 mL de n-hexano en un vial para ser inyectado en el HPLC.

Preparación de productos de degradación. Se cogió 25 mL de muestra en 3 frascos, donde el primer frasco fue sometido a temperaturas elevadas de 60-80°C en estufa por 8 horas diarias por 3 días, el segundo frasco fue sometido a oxidación con 15 mL peróxido de hidrogeno, el tercer frasco fue sometido a exposición de 10 horas diarias a luz blanca por espacio de una semana, para así obtener productos de degradación. Cumplido dicho objetivo se procedió a tomar 10 mL de cada muestra en diferentes fiolas a las cuales se les añadió 15 mL de agua, se procedió a agitarlas por 5 minutos, trascurrido el tiempo se les añadió 25 mL de n-hexano y nuevamente se agitó por 10 min. Se filtró y colocó 2 mL de la parte hexánica en viales, las cuales fueron evaluados en el equipo del HPLC.

3.8.1.2. LINEALIDAD E INTERVALO.

1. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se realizó 7 diluciones de la solución madre del estándar para obtener soluciones en el siguiente intervalo: 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250% que establecieron la curva de calibración, obteniéndose como el 100% la concentración de 20 UI/mL. Las cuales fueron analizadas por triplicado.

Estándar 80%. Se midió 1.6 mL de la solución madre del estándar en una fiola de 5mL, mezclar y enrasar a volumen con diluyente. Concentración: 16 UI/mL.

Estándar 90%. Se midió 1.8 mL de la solución madre del estándar en una fiola de 5 mL, mezclar y enrasar a volumen con diluyente. Concentración: 18 UI/mL.

Estándar 100%. Se midió 2 mL de la solución madre del estándar en una fiola de 5 mL, mezclar y enrasar a volumen con diluyente. Concentración: 20 UI/mL.

Estándar 125%. Se midió 2.5 mL de la solución madre del estándar en una fiola de 5 mL, mezclar y enrasar a volumen con diluyente. Concentración: 25 UI/mL.

Estándar 150%. Se midió 3 mL de la solución madre del estándar en una fiola de 5 mL, mezclar y enrasar a volumen con diluyente. Concentración: 30 UI/mL.

Estándar 200%. Se midió 4 mL de la solución madre del estándar en una fiola de 5 mL, mezclar y enrasar a volumen con diluyente. Concentración: 40 UI/mL.

Estándar 250%. Se midió 5 mL de la solución madre del estándar filtrarla y colocarlo en viales para ser inyectados en el equipo. Concentración: 50 UI/mL.

2. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Se realizó 7 diluciones de la solución madre de la muestra para obtener soluciones en el siguiente intervalo: 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250% que establecieron la curva de calibración, teniéndose como el 100% la concentración de 20 UI/mL. Las cuales fueron analizadas por triplicado. Realizar las diluciones del mismo modo que la del estándar y así obtener las mismas concentraciones.

3.8.1.3. EXACTITUD.

Para la evaluación de este parámetro se realizó por el método de adición de estándar, para el cual se añadió cantidades conocidas de estándar a diferentes muestras dentro del intervalo dado de: 80%, 100%, 150%, 200%, 250%, el cuál se efectuó de la siguiente manera:

1. Preparación de la solución muestra de referencia.

Se pesó volumétricamente 10ml de la muestra (500 UI) en una fiola a la cual se le añadió 15 mL de agua, se agitó por 5 min. Para su dispersión, posteriormente se le añadió 25 mL de n-hexano, se agitó fuertemente por 10 min. Obteniendo así la concentración de 20 UI/mL en la capa hexánica, correspondiente al 100%.

2. Preparación de 5 niveles de concentración con adición de estándar.

Adición del 80%. Se pesó 10 mL volumétricamente en una fiola equivalente al 100% a la cual se le añadió una cantidad pesada aproximada de 3.711 mg de estándar que equivalente al 80% obteniéndose así un 180% de concentración final.

Adición del 100%. Se pesó 10 mL volumétricamente en una fiola equivalente al 100% a la cual se le añadió una cantidad pesada aproximada de 4.63 mg de estándar que equivalente al 100% obteniéndose así un 200% de concentración final.

Adición del 150%. Se pesó 10 mL volumétricamente en una fiola equivalente al 100% a la cual se le añadió una cantidad pesada aproximada de 6.95 mg de estándar que equivalente al 150% obteniéndose así un 250% de concentración final.

Adición del 200%. Se pesó 10 mL volumétricamente en una fiola equivalente al 100% a la cual se le añadió una cantidad pesada aproximada de 9.27 mg de estándar que equivalente al 200% obteniéndose así un 300% de concentración final.

Adición del 250%. Se pesó 10 mL volumétricamente en una fiola equivalente al 100% a la cual se le añadió una cantidad pesada aproximada de 11.59 mg de estándar que equivalente al 250% obteniéndose así un 350% de concentración final.

$$\left(\%R = X_h \times 100 / X_a \right)$$

%R: Porcentaje de recuperación,

Xh: Cantidad de analito hallada,

X_a : Cantidad de analito agregada.

El porcentaje de recuperación debe estar entre el 98-102%

3.8.1.4. PRECISIÓN.

1. Precisión del sistema.

De la solución madre del estándar se cogió 2 mL de la capa hexánica, la cual se llevó a enrase en una fiola de 5 mL para obtener la concentración de 20 UI/mL equivalente a nuestro 100%.

2. Precisión del método.

2.1. Repetibilidad:

Se preparó cinco niveles de concentración de muestra para determinar la precisión las cuales fueron al 80%, 100%, 150%, 200%, 250%. Se pesaron volumétricamente 8, 10, 15, 20, 25 mL respectivamente para estos cinco niveles de concentración, a las cuales se le añadieron 15 ml de agua para su dispersión, se agitó por espacio de 5 min, transcurrido el tiempo se añadió 25 mL de diluyente y nuevamente se agitó por 10 min. Obteniéndose así en la capa hexánica las concentraciones deseadas. Las cuales fueron inyectadas por triplicado.

2.2. Reproducibilidad:

Se realizó la preparación de los cinco niveles de concentración por dos analistas diferentes, realizando el procedimiento citado en el ensayo de repetibilidad, las cuales fueron inyectadas por triplicado.

3.8.1.5. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Se preparó cinco niveles de concentración a partir de la solución madre del estándar para establecer los límites de detección y cuantificación siendo estas las siguientes: 5%, 12.5%, 25%, 50%, 75%. Las cuales fueron analizadas por

triplicado. Obteniéndose así una ecuación lineal.

Estándar 5%. Se midió 100 μL de solución madre del estándar en una fiola de 5 mL, mezclar y enrasar con diluyente a aforo. Concentración: 1 UI/mL.

Estándar 12.5%. Se midió 250 μL de solución madre del estándar en una fiola de 5mL, mezclar y enrasar con diluyente a aforo. Concentración: 2.5 UI/mL.

Estándar 25%. Se midió 500 μL de solución madre del estándar en una fiola de 5mL, mezclar y enrasar con diluyente hasta aforo. Concentración: 5 UI/mL.

Estándar 50%. Se midió 1 mL de solución madre del estándar en una fiola de 5mL, mezclar y enrasar con diluyente a aforo. Concentración: 10 UI/mL.

Estándar 75%. Se midió 1.5 mL de solución madre del estándar en una fiola de 5mL, mezclar y enrasar con diluyente a aforo. Concentración: 15 UI/mL.

Límite de detección.

$$\left(LD = 3.3S/b \right)$$

Límite de cuantificación.

$$\left(LC=10S/b \right)$$

Dónde.

S: la ordenada en el origen de la curva de calibrada,

b: pendiente de la curva calibrada.

3.8.1.6. ROBUSTEZ.

Evaluación de la prueba de aptitud del sistema. Se procedió a inyectar repetidas veces el estándar al 100% de prueba para determinar los parámetros de:

- Platos teóricos (N).
- Resolución(R).
- Factor de cola (T).
- Coeficiente de variación (RSD <2%).

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

1. LINEALIDAD

La linealidad se determinó mediante la ecuación de la recta

$$\left(Y = bx + a \right)$$

Y : respuesta cromatográfica

b : pendiente de la recta, ángulo de inclinación de la recta.

X : concentración del analito

a : Intercepto

“b” se obtiene de:

$$\left(b = \frac{\frac{\sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n}}{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n}} \right)$$

“a” se obtiene de:

$$\left(a = \frac{\sum y - b \sum x}{n} \right)$$

Coefficiente de correlación r: indica el grado de relación o ligación existente entre las variables x (concentración) e y (Respuesta en Área). Si es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada, en análisis químicos se obtienen valores mayores o iguales a 0.99.

Test de hipótesis para el coeficiente de correlación "r".

H_0 : r es igual a 0

H_a : r es diferente de 0

Criterio de aceptación: "r" no debe ser significativamente diferente de 1

$$r = \frac{\sum y - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sqrt{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}}$$

Coefficiente de determinación r^2 : Indica la proporción de la varianza total de y .

Test de hipótesis para demostrar la regresión lineal en función del coeficiente de correlación.

H_0 : No hay correlación entre x e y

H_a : hay correlación entre x e y

Criterio de aceptación: si el valor de t experimental es mayor al del t de tabla calculada para $n-2$ grados de libertad y un nivel de significancia del 95% (probabilidad $\alpha=0.05$) entonces existe una correlación lineal significativa

Donde:

$$t_{exp} = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Test de linealidad: criterio de aceptación: $RSD \leq 5\%$

$$\left(f = y/x \right)$$

Significancia estadística de la varianza de la pendiente "b".

Test de hipótesis ($\alpha = 0.05$), para la pendiente "b"

$H_0: b = 0$

$H_a: b \neq 0$

Criterio de aceptación "b" debe ser significativamente diferente de cero. Donde:

Varianza de la pendiente:

$$\left(S_b^2 = \frac{S_{xy}^2}{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n} \right)$$

Varianza del error experimental total: s_{xy}

$$\left(S_{xy}^2 = \frac{\sum y^2 - a\sum y - b\sum xy}{n - 2} \right)$$

Desviación estándar de la pendiente: Limite de confianza

$$\left(b \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_b \right)$$

Donde: t_{tabla} es el valor de la distribución de t- Student para (n-2) grados de libertad a la probabilidad del 95% ($\alpha = 0.05$)

cálculo del valor del $t_{\text{experimental}}$

$$\left(t_{\text{exp}} = |b| / S_b \right)$$

Criterio de aceptación. Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$ para $\alpha=0.05$ y $(n-2)$ grados de libertad, entonces b es significativamente diferente de cero y rechaza la hipótesis nula H_0 .

Test de proporcionalidad.

Significancia estadística de la varianza del intercepto "a" $H_0: a = 0$

Varianza del intercepto:

$$\left(S^2_a = S^2_b \cdot (\sum x^2 / n) \right)$$

Límite de confianza del intercepto:

$$\left(a \pm t_{\text{tabla}} \cdot S_a \right)$$

Donde t_{tabla} es el valor de la distribución de t -student para $(n-2)$ grados de libertad con una probabilidad del 95% ($\alpha=0.05$).

Cálculo de $t_{\text{experimental}}$:

$$\left(t_{\text{exp}} = |a| / S_a \right)$$

Criterio de aceptación: si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ para ($\alpha=0.05$) y $(n-2)$ grados de libertad, entonces el valor de "a" es aceptable y existe una correlación lineal significativa

EXACTITUD.

Se determinó mediante la aplicación de t de Student

Criterio de aceptación. Si el t experimental es menor al t de tabla para (n-1) grado de libertad y un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05$), entonces no existe diferencia significativa entre la recuperación media y la cantidad añadida

$$\left(T_{EXP} = \frac{(100-R) \cdot \sqrt{n}}{RSD} \right)$$

R: Porcentaje de recuperación promedio de todos los datos

n: Numero de datos o mediciones

RSD: Desviación estándar relativa total de mediciones.

PRECISIÓN.

Se expresa matemáticamente como la desviación estándar (S) o como desviación estándar relativa (RSD).

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

$$\left(RSD = S / \bar{X} \cdot 100 \right)$$

Intervalo de confianza del 95% individual de la media

$$\left(\mu = \bar{X} \pm t_{tabla} \cdot n^{1/2} \cdot S \right)$$

IV. RESULTADOS

TABLA Nº 01. Desarrollo de la técnica analítica para la determinación de vitamina D₃ empleando diferentes tratamientos, Lima 2010.

TMT	MTA	DILUY.	λ (nm)	COLUMNA	FASE MOVIL	V.OL. INYECCIÓN	VELOC. DE FLUJO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min).	RESULTADO
1	Estándar Placebo Muestra	THF: ACN: 1:1	265	L1	MeOH: ACN: hexano (46.5:4 6.5:7)	25 UL	1.0 mL/min	5.362 * *	INADECUADO
2	Estándar Placebo Muestra	5mL de alcohol isopropílico	265	C18	MeOH: AGUA (75:25)	25 UL	1.5 mL/min	5.212 * *	INADECUADO
3	Estándar Placebo Muestra	25mL n- hexano	265	C8	MeOH: ACN (20:80)	25 UL	1.5 mL/min	3.341 * 3.337	ADECUADO

* no se obtuvo tiempo de retención

- MeOH: Metano; ACN: Acetonitrilo; THF: Tetrahydrofurano.
- Inadecuado: debido a que existen interferencias del placebo en la muestra para la determinación del analito.
- Adecuado: debido a que no existe interferencia del placebo en la determinación del analito.
- Todos los tratamientos se realizó con un tiempo de corrida de 2 horas para cada muestra.

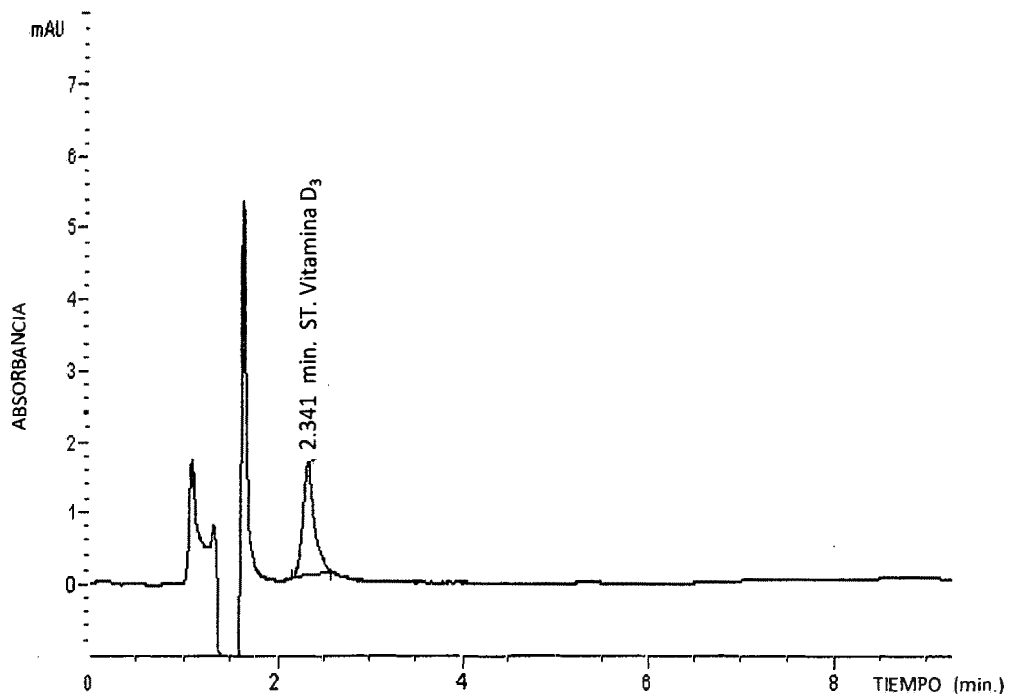


GRÁFICO N° 01. Cromatograma obtenido por H.P.L.C del estándar de vitamina D₃ Colecalciferol 20 UI/mL, mostrando el tiempo de retención; Lima 2010.

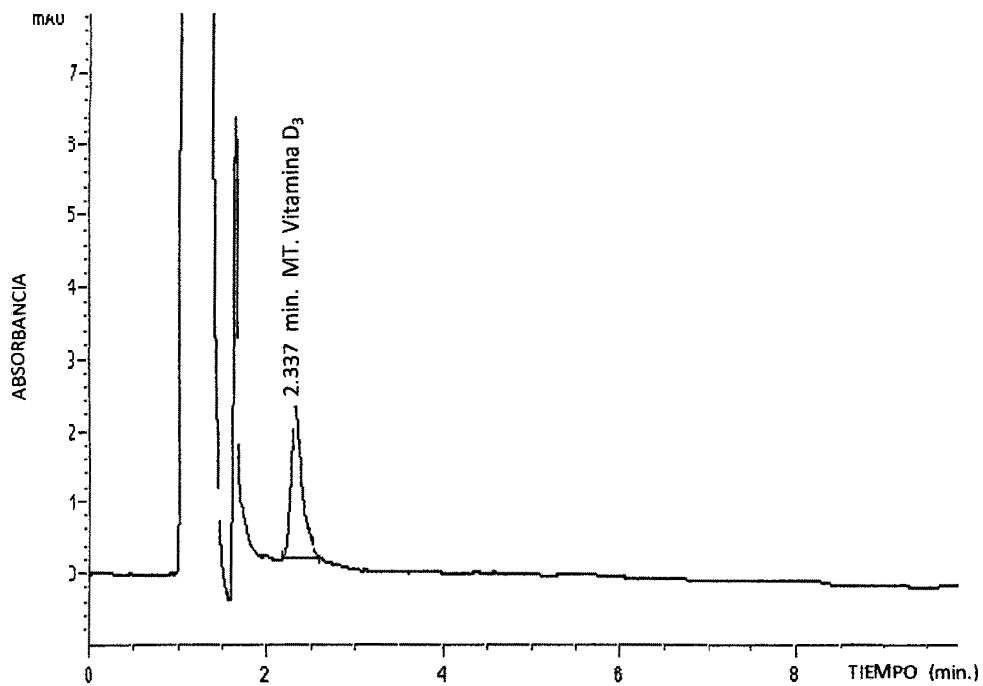
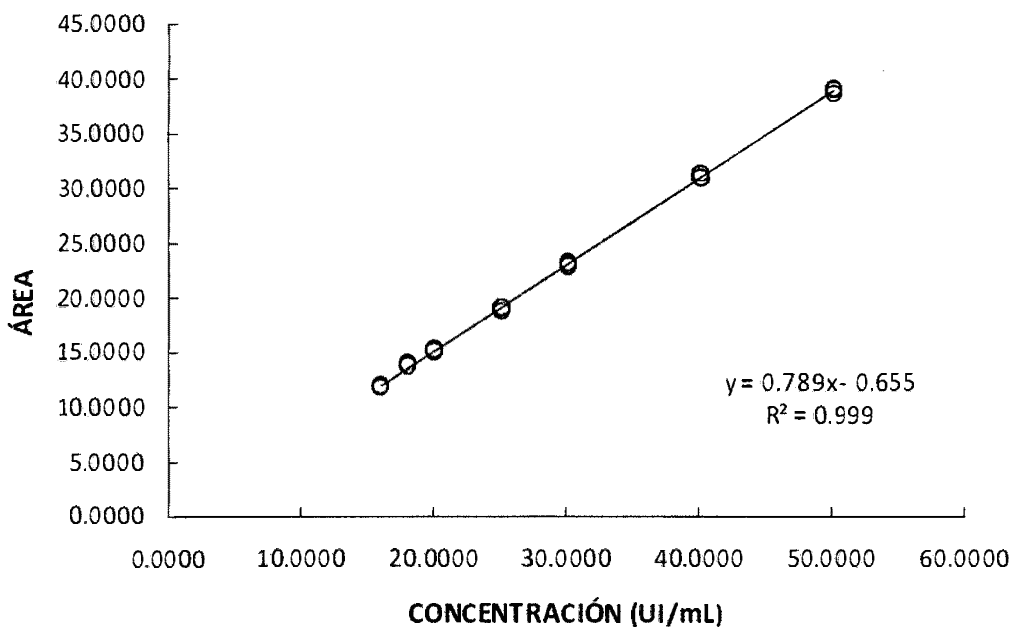
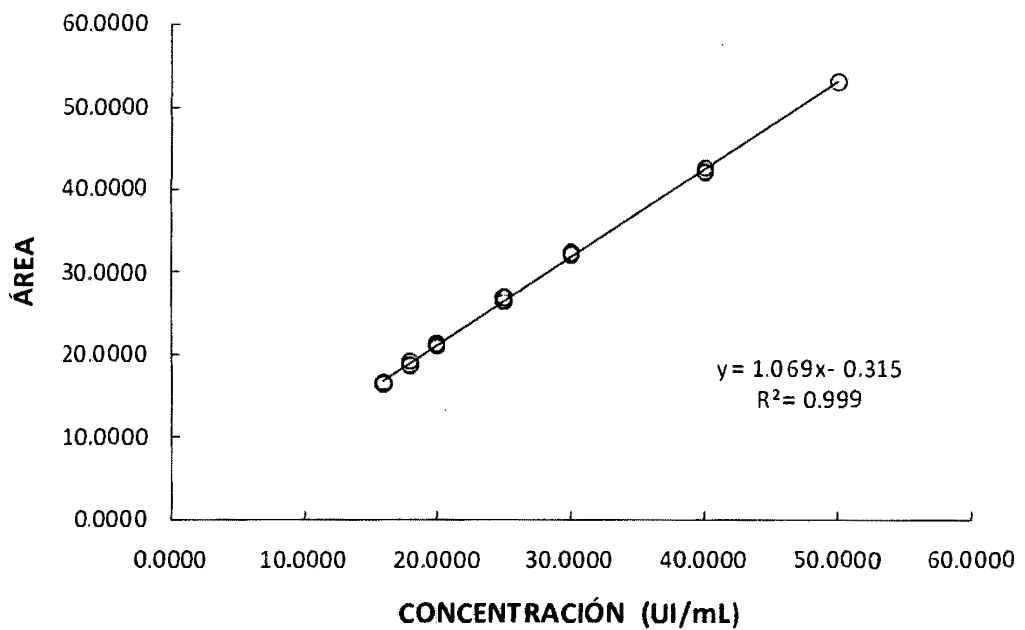


GRÁFICO Nº 02. Cromatograma obtenido por H.P.L.C de la muestra de vitamina D₃ Colecalciferol 20 UI/mL, mostrando el tiempo de retención; Lima 2010.



Datos de la recta: pendiente 0.789, intersección -0.655, coeficiente de determinación 0.999, coeficiente de correlación 0.999, suma de cuadrados residuales 0.7761, Lima 2010

GRÁFICO Nº 03. Curva de regresión lineal para determinar la linealidad de las soluciones estándar de vitamina D₃ Colecalciferol en el intervalo de 16 – 50 UI/mL. (80%-250%), Lima 2010.



Datos de la recta: pendiente 1.069, intersección -0.315, coeficiente de determinación 0.999, coeficiente de correlación 0.999, suma de cuadrados residuales 1.61023, Lima 2010.

GRÁFICO N° 04. Curva de regresión lineal para determinar la linealidad de las soluciones muestra de vitamina D₃ Colecalciferol en el intervalo de 16 –50 UI/mL. (80%-250%), Lima 2010.

TABLA Nº 02. Evaluación de los parámetros estadísticos para establecer la linealidad del estándar y muestra de vitamina D₃ Colecalciferol, Lima 2010.

PARAMETROS ESTADISTICOS	RESULTADO	
	ESTANDAR	MUESTRA
> TEST DE HIPÓTESIS PARA EL COEFICIENTE DE CORRELACION "r"		
$t_{\text{Experimental}}$	137.7026	137.703
t_{tabla}	2.0930	2.0930
criterio de aceptación $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$	CUMPLE	CUMPLE
> TEST DE LINEALIDAD		
Promedio (X) de f	0.7628	1.0560
Desviación estándar (S) de f	0.0121	0.0148
Desviación estándar relativa (CV) de f	1.5926	1.4026
Criterio de aceptación $CV \leq 5\%$	CUMPLE	CUMPLE
> TEST DE SIGNIFICANCIA DE LA VARIANZA DE LA PENDIENTE "b"		
Varianza	0.0001	0.00029
Desviación estándar	0.0107	0.01689
Límite de confianza inferior	0.7666	1.03365
Límite de confianza superior	0.8114	1.10435
$t_{\text{experimental}}$	73.6810	73.6810
t_{tabla}	2.0930	2.0930
Criterio de aceptación $T_{\text{exp}} > T_{\text{tabla}}$	CUMPLE	CUMPLE
> TEST DE PROPORCIONALIDAD DE LA VARIANZA DEL INTERCEPTO "a"		
Varianza	0.1091	0.26918
Desviación estándar	0.3304	0.51883
Límite de confianza inferior	-1.3464	-1.40091
Límite de confianza superior	-0.0364	-0.27965
$t_{\text{experimental}}$	1.9827	0.60714
t_{tabla}	2.0930	2.0930
Criterio de aceptación $T_{\text{exp}} < T_{\text{tabla}}$	CUMPLE	CUMPLE

TABLA Nº 03. Porcentaje de recuperación de la vitamina D₃ Colecalciferol en función de la cantidad hallada para la determinación de la exactitud del método. Lima 2010.

Muestra (g)	Cantidad agregada (mg)	Área	Cantidad hallada (mg)	% Recuperación
80%	3.8	32.0920	3.7446	99.52
	3.8	32.2942	3.7981	100.93
	3.8	32.2696	3.7916	100.76
100%	4.8	36.1005	4.7475	99.54
	4.8	36.2070	4.7757	100.13
	4.8	36.1158	4.7516	99.62
150%	6.9	45.6806	6.9187	100.39
	6.9	45.2196	6.8025	98.70
	6.9	45.3936	6.8464	99.34
200%	9.3	54.9996	9.295	100.06
	9.3	55.0924	9.3185	100.31
	9.3	54.5402	9.1785	98.92
250%	11.6	63.9435	11.616	100.14
	11.6	63.5910	11.5264	99.37
	11.6	63.9144	11.6086	100.07
Promedio				99.85
Desviación				0.64
Desviación estándar relativa (RSD)				0.64
Número de datos (n)				15.00
Grados de libertad (gl)				14.00
t experimental				1.72
t tabla($\alpha = 0.05$;gl 14)				2.15
<i>t experimental < t tabla</i>				

Especificación: porcentaje de recuperación según la USP 32 se debe encontrar entre 98-102% intervalo de confianza (98.4861 - 101.2206) % .Lima2010

TABLA N° 04. Variabilidad de respuestas de la solución estándar al 100% de vitamina D₃ colecalciferol para evaluar de la precisión del sistema. Lima 2010.

Nº DE INYECCIONES	MUESTRA(%)	ÁREA
1	100%	15.3328
2	100%	15.2057
3	100%	15.0598
4	100%	15.2106
5	100%	15.3221
6	100%	15.0862
<i>PROMEDIO (X)</i>		15.1820
<i>DESVIACIÓN (S)</i>		0.1180
<i>DESVIACIÓN ESTANDAR REALTIVA (RSD)</i>		0.7769
Muestra 100% (20UI/mL), Especificaciones RSD ≤2%		

TABLA Nº 05. Resultados del ensayo de repetibilidad de la muestra en función del % hallado a en el intervalo de 16UI/mL - 50 UI/mL (80%-250%) para determinar la precisión del metodo, Lima 2010.

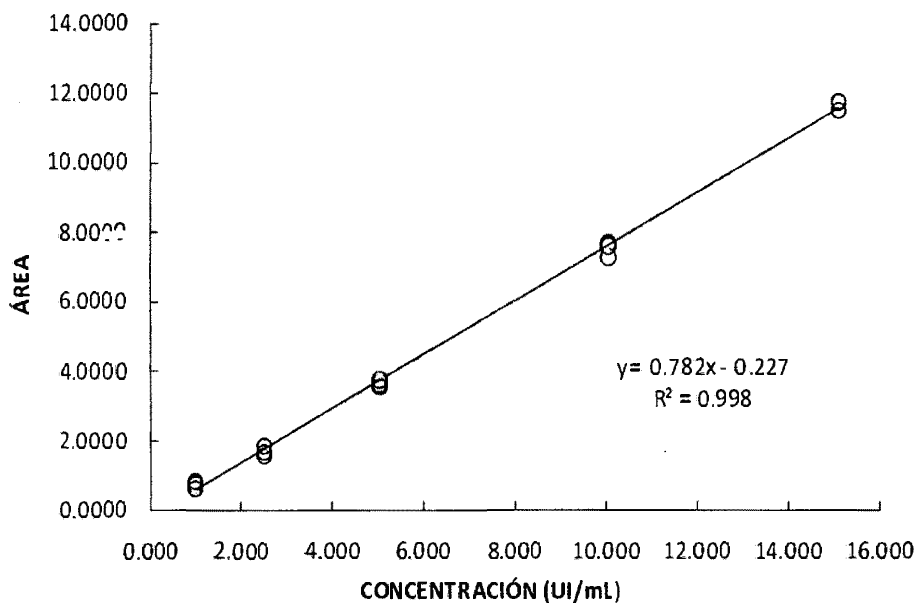
Muestra (%)	Cantidad pesada (g)	Área	Cantidad hallada (UI/mL)	% Hallado
80%	11.3921	15.7580	306.046	122.418
	11.3921	15.3722	298.553	119.421
	11.3921	15.6357	303.669	121.468
100%	14.3109	19.6882	304.388	121.755
	14.3109	19.5702	302.564	121.026
	14.3109	19.5906	302.879	121.152
150%	23.5886	32.0513	300.630	120.252
	23.5886	32.4980	304.819	121.928
	23.5886	32.3289	303.234	121.293
200%	29.1652	39.7897	301.852	120.741
	29.1652	39.9012	302.698	121.079
	29.1652	40.5046	307.275	122.910
250%	35.1505	48.0835	302.659	121.063
	35.1505	47.5269	299.155	119.662
	35.1505	48.3928	304.605	121.842
<i>Promedio (X)</i>				121.201
<i>Desviación (S)</i>				0.943
<i>Desviación estándar relativa (RSD)</i>				0.778

Cantidad declarada: 250 UI/5mL, especificaciones:(90 - 220) % de lo declarado, intervalo de confianza (119.1783– 123.2230) %.Lima 2010.

TABLA N° 06. Ensayo de reproducibilidad establecida por dos analistas en un intervalo de 16UI/mL- 50 UI/mL (80%- 250%), para determinar la precisión del método. Lima 2010.

Muestra	Cantidad pesada Analista 1 (g)	Cantidad pesada Analista 2 (g)	% Hallado Analista 1	% Hallado Analista 2
80%	11.3921	11.0221	122.418	120.404
80%	11.3921	11.0221	119.421	121.723
80%	11.3921	11.0221	121.468	121.767
100%	14.3109	14.3202	121.755	121.844
100%	14.3109	14.3202	121.026	121.305
100%	14.3109	14.3202	121.152	120.991
150%	23.5886	23.5602	120.252	122.248
150%	23.5886	23.5602	121.928	121.737
150%	23.5886	23.5602	121.293	121.356
200%	29.1652	30.7652	120.741	121.818
200%	29.1652	30.7652	121.079	121.351
200%	29.1652	30.7652	122.910	121.350
250%	35.1505	37.1865	121.360	121.807
250%	35.1505	37.1865	119.662	122.139
250%	35.1505	37.1865	121.842	121.917
<i>PROMEDIO</i>			121.220	121.584
<i>DESVIACIÓN</i>			0.943	0.470
<i>DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA (RSD)</i>			0.778	0.387
<i>DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA (RSD)</i>			0.622	

Cantidad declarada: 250 UI/5mL, especificaciones:(90 - 220) % de lo declarado, intervalo de confianza (119.1783– 123.2230) %., desviación estándar relativa RSD entre dos analistas ≤ 4% Lima 2010.



Datos de la recta: pendiente 0.782, intersección -0.227, coeficiente de determinación 0.998, coeficiente de correlación 0.998, suma de cuadrados residuales 0.379, límite de detección 0.949 UI /mL, límite de cuantificación 2.903 UI/ mL. Lima 2010.

GRÁFICO N° 05. Curva de calibración para establecer el límite de detección y el límite de cuantificación de la vitamina D₃ colecalciferol en los intervalos de 1UI/mL-15UI/mL (5% -7 5%). Lima 2010.

TABLA Nº 07. Inyecciones repetidas del estándar en la prueba de aptitud del sistema cromatográfico, para evaluar de la robustez y calificación instrumental, Lima 2010.

Nº DE INYECCIONES	MUESTRA(%)	ÁREA
1	100%	15.3328
2	100%	15.2057
3	100%	15.0598
4	100%	15.2106
5	100%	15.3221
6	100%	15.0862
7	100%	15.0571
8	100%	15.0603
9	100%	15.3131
10	100%	15.1047
<i>PROMEDIO (X)</i>		15.1752
<i>DESVIACIÓN (S)</i>		0.1159
<i>DESVIACIÓN ESTANDAR RELATIVA</i>		0.7641

Muestra 100% (20UI/mL), Especificaciones RSD ≤2%

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló y evaluó todos los parámetros establecidos en la USP 32 para la categoría I tales como: Especificidad - selectividad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y robustez; donde los resultados se encuentran dentro de los límites de especificación.

En la Tabla Nº 01, se observan los datos para el desarrollo de la técnica analítica para la determinación de vitamina D₃ en la cual el estándar, placebo y muestra fueron sometidos a diferentes medios de ensayo, columnas y fases móviles. En el Tratamiento 1, se aplicó lo mencionado en la USP 32 para vitaminas oleosolubles e hidrosolubles con minerales en solución oral, observándose un tiempo retención para el estándar de 5.362 minutos, pero en la muestra y placebo se obtuvo una serie de picos acoplados que dificultaron la identificación de la vitamina D₃ resultando ser así una técnica inadecuada por la presencia de interferentes del placebo en la muestra está presencia posiblemente se deba a la miscibilidad del tetrahidrofurano y acetonitrilo con el agua y otros compuestos polares. El Tratamiento 2, se obtuvo un tiempo de retención del estándar de 5.212 minutos, pero en la muestra y placebo se obtuvo una serie de picos acoplados que dificultan la identificación de la vitamina D₃ resultando ser así una técnica inadecuada, debido a que en el proceso de extracción de la muestra se

ve afectada por la presencia de interferentes posiblemente provenientes del placebo, arrastrados en el momento de la extracción, posiblemente se deba a la miscibilidad del n-hexano y el alcohol, asimismo el alcohol es miscible con algunos compuestos solubles en agua. Finalmente en el Tratamiento 3, se observa una técnica analítica adecuada para la determinación de vitamina D₃, debido a que se identificó el tiempo de retención de vitamina D₃ en el estándar que fue de 3.341 minutos y en la muestra de 3.337 minutos, siendo así que el placebo no interfiere en su identificación y cuantificación, además se realizó adición de estándar al placebo donde se puede recuperar el analito con una alta exactitud, el agua empleada solo fue para dispersar la muestra que poseía una alta densidad al igual que el placebo, la extracción con n- hexano nos permitió recoger solo algunas sustancias miscibles en ella, se empleó cloruro de sodio para romper la emulsión formada obteniendo así una solución de n-hexano limpia.

En el Gráfico N° 01, se observa el cromatograma perteneciente al estándar en el que el pico de la vitamina D₃ tiene un tiempo de retención de 2.341 minutos y en el Gráfico N° 02, se observa el cromatograma perteneciente a la muestra en el que el pico de la vitamina D₃ tiempo un de retención de 2.337 minutos, además en los Anexos N° 01, 02 y 03 se observan los picos del: placebo, fase móvil, diluyente, como posibles "interferentes", sin embargo, estos picos no influyen en la identificación de la vitamina D₃ debido a que no presentan ninguna señal emitida en el tiempo de retención del principio activo, y en los Anexos 04, 05 y 06 observamos que no se encuentran productos de degradación, que interfieran en la identificación de la vitamina D₃ por lo tanto la técnica analítica es específica y selectiva.

Morales (2004), en su trabajo para la determinación del Enalapril en tabletas por HPLC menciona que el método analítico empleado es selectivo y específico

debido a que los excipientes de la formulación no interfieren en la determinación del principio activo, ya que no se detecta ninguna respuesta significativa en el cromatograma obteniendo un valor de 0% de señal siendo el máximo de 0.5%.

En el Gráfico N° 03, se observa un modelo lineal perteneciente a los datos del estándar, cuya ecuación de la recta es $y = 0.789X - 0.655$, con un coeficiente de correlación $r = 0.999$, siendo el valor mínimo de 0.995, donde el valor de r debe aproximarse a la unidad la cual indica el grado o intensidad de asociación entre las variables X e Y , se halló un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.999$, el cual indica que el 99.9% de la variación en la respuesta Y se debe a la influencia de la variable X , por lo tanto; los valores hallados indican que existe una relación lineal entre las variables concentración (x) y respuestas (y). Bellido (2007), en su trabajo de validación para la determinación de Ambroxol en jarabe por HPLC, reporta un coeficiente de determinación de: 0.9998, lo cual menciona que existe una correlación con una probabilidad del 99.98% entre las variables.

En el Gráfico N° 04, se observa un modelo lineal perteneciente a los datos de la muestra, cuya ecuación de la recta es $y = 1.069X - 0.315$, con un coeficiente de correlación $r = 0.999$, siendo el valor mínimo de 0.995, donde el valor de r debe aproximarse a la unidad la cual indica el grado o intensidad de asociación entre las variables X e Y , se halló un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.999$, lo cual indica que el 99.9% de la variación en la respuesta Y se debe a la influencia de la variable X , por lo tanto los valores hallados indican que existe una relación lineal entre las variables concentración (x) y respuestas (y). Bellido (2007), en su trabajo de validación para la determinación de Ambroxol en jarabe por HPLC, reporta un coeficiente de determinación de: 0.9997, y menciona que existe una correlación con una probabilidad del 99.97% entre las variables.

Morales (2004), en su trabajo para la determinación del Enalapril en tabletas recubiertas por HPLC, reportó un valor de $r = 0.99970$ y un valor de $r^2 = 0.9994$

con lo que demuestra que existe una relación lineal entre las variables concentración y respuestas.

En la Tabla N° 02, para confirmar la regresión lineal del estándar y muestra se aplicó un test de regresión (t-Student) mencionada en Quattrocchi (1992), donde debe cumplirse: el valor de $t_{exp} > t_{tabla}$ con una probabilidad de cometer error de ($\alpha = 0.05$) para $n - 2$ grados de libertad y un nivel de significancia del 95%, encontrando así un t_{exp} (137.7026) $>$ t_{tabla} (2.093) para el estándar y un t_{exp} (137.703) $>$ t_{tabla} (2.093) para la muestra con lo que queda demostrado que existe una correlación lineal significativa entre x e y ($r \neq 0$). Así mismo se determinó el coeficiente de variación o (RSD) de los factores de respuesta " f " siendo el valor máximo 5%, donde el estándar obtuvo un RSD $f = 1.59\%$, y la muestra obtuvo un RSD $f = 1.40\%$, lo cual demuestra la condición de proporcionalidad ya que los valores superiores a 5% indican falta de linealidad; tal como se menciona Castro (1999). En la evaluación de la varianza de la pendiente " b " donde debe cumplirse: $t_{exp} > t_{tabla}$, se halló un t_{exp} (73.6810) $>$ t_{tabla} (2.093) para el estándar y un t_{exp} (63.2910) $>$ t_{tabla} (2.093) para la muestra, con ello estos valores demuestran una relación lineal significativa, entonces " b " es significativamente diferente de cero. Además el valor positivo del límite de confianza inferior indica que a un nivel del 95% la pendiente: $b > 0$. Finalmente se evaluó la varianza del intercepto " a " donde debe cumplirse: $t_{exp} < t_{tabla}$, y se halló un t_{exp} (1.9827) $<$ t_{tabla} (2.093) para el estándar y un t_{exp} (0.6071) $<$ t_{tabla} (2.093) para la muestra, lo cual indican una relación lineal entre las variables, se observa además que el valor cero se encuentra dentro de los intervalos de confianza para el intercepto, quedando estadísticamente demostrado la linealidad del estándar (sistema) y linealidad de la muestra (método). En estudios similares se observan resultados que respaldan la confiabilidad de nuestros resultados tales como: Prado (2008), quien trabajó en la cuantificación de

Dexametasona y Ciprofloxacino en suspensión oftálmica por HPLC, donde reporta valores de: $t_{exp} (109.01) > t_{tabla} (2.160)$ para la correlación del sistema y valores de $t_{exp} (48.995) > t_{tabla} (2.365)$ para la correlación de la muestra, valores de $RSD_{(estándar)} f = 1.34$ y $RSD_{(muestra)} f = 1.0378\%$ menores al límite especificado de 5%, en la evaluación de la varianza de "b" obtiene un $t_{exp} (109.07) > t_{tabla} (2.160)$, para el estándar y un $t_{exp} (48.9952) > t_{tabla} (2.365)$, para la muestra, finalmente en la evaluación del intercepto "a" donde se obtiene un $t_{exp} (2.127) < t_{tabla} (2.160)$ para el estándar y un $t_{exp} (2.274) < t_{tabla} (2.365)$ para la muestra demostrando así la condición de linealidad establecida entre las variables X e Y en el sistema y método.

En los Anexos 08 y 09, se observan el intervalo establecido tanto para el estándar como para la muestra las cuales fueron del: 80% - 250% cumpliendo las especificaciones mínimas de (80 - 120)% establecidas para producto terminado, la cual se determinó con precisión, exactitud, y linealidad. Por lo tanto cumple con los parámetros establecidos por la USP 32.

Prado (2008), trabajó en la cuantificación de Dexametasona y Ciprofloxacino en suspensión oftálmica por HPLC donde menciona que el intervalo establecido cumple con los criterios de linealidad, exactitud y precisión del método.

En la Tabla N° 03, se determinó el porcentaje de recuperación media que fue de 99.85%, la cual se encuentra dentro de los límites establecidos (98% - 102%), se obtuvo una desviación estándar relativa (RSD) de 0.64% siendo el valor máximo 2%. Para demostrar que no hay diferencia significativa entre la recuperación media y el 100% se aplicó el test estadístico de t- Student, donde debe cumplirse: el valor de $t_{exp} < t_{tabla}$ obteniéndose así un $t_{exp} (1.72) < t_{tabla} (2.15)$ con una probabilidad de cometer error de ($\alpha = 0.05$) para n - 1 grado de libertad y un nivel de significancia del 95%, esto corrobora que el método posee una alta

exactitud y que no existe diferencia significativa entre el valor medio hallado y el valor agregado (100%).

Prado (2008), trabajó en la cuantificación de Dexametasona y Ciprofloxacino en suspensión oftálmica por HPLC, determinó un porcentaje de recuperación de 100.53% para Ciprofloxacino y 100.27% para Dexametasona. Las cuáles también se encuentran dentro de los límites establecidos, además obtuvo un t_{exp} (1.1726) < t_{tabla} (2.776) para el Ciprofloxacino y un t_{exp} (1.5547) < t_{tabla} (2.776) para Dexametasona, mencionando que la cantidad agregada de analito y la recuperada no son estadísticamente diferentes por lo tanto la exactitud es correcta.

Bellido (2007), en su trabajo de validación para la determinación de Ambroxol en jarabe por HPLC, reportó un valor de t_{exp} (1.650) < t_{tabla} (2.306) lo cual significa que no existe diferencia significativa entre el valor medio hallado y el 100%.

Morales (2004), en su trabajo para la determinación del Enalapril en tabletas recubiertas por HPLC, encontró un porcentaje de recuperación de 99.88% y una desviación estándar (RSD) de 0.83% mencionando que el valor máximo de 3.9%, además halló un t_{exp} (0.43) < t_{tabla} (2.306) demostrando así la exactitud del método.

En la Tabla Nº 04, se estudió de precisión del sistema la cual mostró una buena repetibilidad obteniéndose un promedio de área de 15.1820 correspondiente al 100% (20 UI/mL) y una desviación estándar relativa (RSD) de 0.7769% siendo el valor máximo 2%, valor normalmente aceptado para la precisión e indica una buena repetibilidad, por lo tanto la técnica analítica es repetible.

En la Tabla Nº 05, en el ensayo de repetibilidad de la muestra se obtuvo un promedio de porcentaje hallado de: 121.201% encontrándose dentro de las especificaciones establecidas para el producto (90 – 220) % de lo declarado, y

una desviación estándar relativa (RSD) de 0.778% siendo el valor máximo 2% valor normalmente aceptado para la precisión e indica una buena repetibilidad.

En la Tabla N° 06, para el ensayo de reproducibilidad dada por dos analistas se obtuvo los siguientes promedios de porcentajes hallados: 121.220% y 121.584% y una desviación estándar relativa (RSD) del 0.622%, siendo el valor máximo 4% valor normalmente aceptado para la precisión, por lo tanto la técnica analítica es reproducible. Bellido (2007), en su trabajo de validación para la determinación de Ambroxol en jarabe por HPLC, reportó una desviación estándar relativa de 0.4464% para el ensayo de repetibilidad para un criterio de aceptación de no más de 2%, y una desviación estándar relativa de 0.465 % para un criterio de aceptación de no más de 5.5%, demostrando así que el método es repetible y reproducible. Prado (2008), trabajó en la cuantificación de Dexametasona y Ciprofloxacino en suspensión oftálmica por HPLC, determinó una desviación estándar relativa (RSD) de 0.19% para Ciprofloxacino y un (RSD) de 0.4251% para la Dexametasona las cuales se encuentran dentro del límite de aceptación para la precisión del sistema, cuyo desviación estándar relativa debe ser menor al 2%. Halló un RSD de 0.59% para Ciprofloxacino y un RSD de 0.84% para Dexametasona mencionando que los valores de aceptación se encuentran entre el 4-5% en ensayos de reproducibilidad, concluyendo que el método es repetible y reproducible.

En el Gráfico N° 05, se obtuvo la ecuación de la recta $y = 0.782X - 0.227$, un coeficiente de correlación $r = 0.9989$, siendo el valor mínimo es 0.995 y un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.998$, la cual indica que el 99.8% de la variación en la respuesta Y se debe a la influencia de la variable X. Lo cual demuestra que existe una relación lineal entre las variables concentración (x) y respuestas (y), además en el Anexo N° 10, se observa el intervalo establecido para la evaluación del límite de detección que fue del (5 - 75) %.

En el Anexo Nº 11, se determinó el límite de detección (LD) de 0.949 UI/mL., y límite de cuantificación (LC) de 2.903 UI/mL., las cuales evidencian la mínima cantidad detectable y cuantificable, demostrando así la alta sensibilidad del método a ligeras variaciones de concentración. Estudios similares muestran cantidades pequeñas acerca del límite de detección y cuantificación tal como lo menciona: Prado (2008), en su trabajo de cuantificación de Dexametasona y Ciprofloxacino en suspensión oftálmica por HPLC, halló un límite de detección de 0.133µg/mL y un límite de cuantificación de 0.435 µg/mL., para el Ciprofloxacino; un límite de detección de 0.3571 µg/mL y un límite de cuantificación de 0.4285 µg/mL., para la Dexametasona demostrando así la sensibilidad del método.

En la Tabla Nº 07, para la determinación de la robustez de la técnica analítica se realizó el ensayo de aptitud del sistema donde se obtuvo una desviación estándar relativa de 0.761% la cual indica que las condiciones operativas son adecuadas en el desarrollo de la técnica analítica, con ello se comprobó el adecuado funcionamiento del sistema cromatográfico: de bombeo, inyección, horno, columna y detector. Además en el Anexo Nº 12, se determinó la prueba de aptitud del sistema obteniendo los valores del número de platos teóricos (N) que fue de (2033) la cual evidencia la capacidad de la columna para determinar el analito en estudio, el factor de cola (T) = 0.70 evidencia la simetría del pico, valores superiores a 1.5 indican una falta de simetría que podrían conllevar a resultados erróneos y muy dispersos, el analito en estudio no presenta resolución debido a que no se observa en el cromatograma otro analito con el cual establecer dicha separación.

Prado (2008), en su trabajo de cuantificación de Dexametasona y Ciprofloxacino en suspensión oftálmica por HPLC, obtuvo un valor de número de platos teóricos de 3090 para Ciprofloxacino y 10872 para Dexametasona, simetría de

pico de 0.760 para Ciprofloxacino y una simetría de pico 0.965 para Dexametasona, la resolución establecida entre el Ciprofloxacino y Dexametasona es de 36.206.

Por lo tanto la técnica analítica cumple con todos los parámetros establecidos por la farmacopea de los estados unidos (USP 32), ya que posee una buena especificidad, linealidad, exactitud, precisión y robustez. Con ello todos los resultados obtenidos y documentados permiten asegurar que la técnica analítica es confiable, demostrándose así la utilidad del procedimiento analítico como técnica validada.

VI. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló la técnica analítica por HPLC para la determinación del contenido de vitamina D₃ colecalciferol en suspensión oral, cumpliendo las especificaciones y parámetros de validación de la USP 32, quedando validado y documentado los resultados obtenidos.
2. La técnica analítica es específica y selectiva, debido a que no existe interferencias en su identificación, además se muestra la pureza del pico del estándar al 100%.
3. La técnica analítica es lineal en el intervalo de 80% a 250%, obteniéndose un $r^2 = 0.999$ tanto en el estándar como en la muestra, además cumplió la prueba de t- Student adecuadamente para la pendiente y el intercepto.
4. La técnica analítica es exacta debido a que no hay diferencia significativa entre la recuperación media (R = 99.85%) y el 100%.
5. La técnica analítica es precisa porque se obtienen resultados repetitivos (RSD _{Estándar} = 0.776%, RSD _{muestra} = 0.778%) y además reproducibles (RSD: 0.622%).
6. La técnica analítica es sensible a variaciones ligeras de concentración obteniéndose así el LD: 0.949 UI/mL, LC: 2.903UI/mL.
7. La técnica analítica es robusta presentando un RSD: 0.76% de inyecciones repetidas adecuada, demostrando así las buenas condiciones operativas.

VII. RECOMENDACIONES

1. Es necesario que el personal involucrado en el área de validaciones, desarrollo de técnicas analíticas y/o análisis esté capacitado y recibir capacitación continuamente haciéndoles saber la importancia de su papel dentro del sistema de calidad.
2. Se recomienda validar nuevas técnicas analíticas para productos nuevos y farmacopeicos con la finalidad de optimizar el trabajo de análisis y con ello reducir costos y factores de tiempo.
3. Se recomienda la aplicación de esta técnica analítica para el análisis de cuantificación de vitamina D₃ en suspensión oral.
4. Se recomienda la aplicación de esta técnica analítica para el análisis de cuantificación de vitamina D₃ tabletas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ahumada, I.** (2002) Farmacología práctica para las diplomaturas en ciencias de la salud. Editorial Díaz Santos, S.A. España.
2. **Aparicio, X.** (1995) Aplicación de conceptos de validación de cromatografía (HPLC), industria farmacéutica analítica y biotecnológica. España.
3. **Bellido, N.** (2007) validación de método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para determinación cuantitativa de ambroxol clorhidrato en jarabe. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico de la UNSCH.
4. **Blanco, M.** (2001) Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de la industria farmacéutica Universidad Autónoma de Barcelona. disponible en:
<http://www.servitel.es/programa.htm?informaticaenlaindustriafarmaceutica.htm>
5. **Braverman, J.** (1980) Bioquímica de los alimentos. 2º edición. Editorial El Manual Moderno. México.
6. **Castro, M., Marti, P., Sebastián G.** (1999). Validación de métodos analíticos comisión de Normas de buena fabricación y control de calidad. 1ra edición Editorial sección Catalana. –USA.
7. **Compañó, R.** (2002) Garantía de la calidad en los Laboratorios Analíticos. 3º edición, editorial síntesis, S.A. España.
8. **DIGEMID,** (1995). Primer seminario taller. Sistemas de Registro y Evaluación de calidad de medicamentos y alimentos. Lima.
9. **Douglas, M.** (2005). Control estadístico de la calidad. 3º edición, Editorial Limusa Wiley.
10. **Espinoza, J.** (2000). Plan maestro de validación. IQFarma –Lima –Perú.
11. **Flórez, J.** (2003). Farmacología humana. 4º edición. Editorial Masson, S.A.
12. **García, A.** (1991). Cromatografía de alta resolución. 1ra. Edición. Editorial Limusa, S.A. México DF.

13. **Goodman y Gilman.** (2007). **Las bases farmacológicas de la terapéutica.** Editorial Medica Panamericana. 8va edición. México.
14. **Huamani, M.** (2005) **Validación de métodos de disolución por HPLC de Paracetamol y Diclofenaco Sódico en comprimidos recubiertos.** Lima. Tesis para obtener el título profesional de Química Farmacéutica de la UNSCH.
15. **ICH,** (1995). **International Conference on Harmonisation of. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use** (ente regulador para USA, la comunidad Europea y Japón).
16. **(ISO/IEC 17025),** (2005) **International Organization for Standardization,** Geneva. CH.
17. **ISO,** (1986). **International Organization for Standardization, Quality vocabulary (ISO/IEC Estándar 4802);** Geneva. CH.
18. **ISO,** (1987). **International Organization for Standardization, Quality management and Quality Assurance Standards. Guidelines for Selection and Use (ISO/IEC Standard 9000),** Geneva. CH.
19. **Kieffer, R.** (1993). **¿Por qué la validación? 4ta. Edición.** Edit. Pharmaceutical Technology. USA.
20. **Morales, C.** (2004). **Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para el Enalapril 10 mg tabletas recubiertas.** UNMSM. Lima.
21. **Pérez, R.** (2010). **Estudio de validación de la metodología para la determinación de vitamina A en alimentos infantiles instantáneos por cromatografía de alto rendimiento (HPLC).** INS. Lima. Disponible en:
http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/./estudio_valida_metodo.htm
22. **Prado, C.** (2008). **Desarrollo y validación de la técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C) para la determinación de contenido de Ciprofloxacino 3mg/1mL y Dexametasona 1mg/1mL, en**

suspensión oftálmica. Lima. Tesis para obtener el título profesional de Química Farmacéutica de la UNSCH.

23. **Quattrocchi, O.** (1992). Introducción a la HPLC 1ra. Edición, editorial Artes Gráficos Farro S.A. Buenos Aires.
24. **Remington.** (1998). Farmacia, 20º Edición, Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires-Argentina.
25. **Romero, A.** (2002) Cromatografía. Instituto de Biotecnología –Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).México.
26. **Trillo, C.** (1993). Tratado de farmacia galénica. 1ra.edicion, Luzan 5 S.A. Madrid.
27. **The Merck Index.** (2001). An Encyclopedia of Chemical, Drugs, and Biological, thirteenth edition. Editorial Ataff, USA.
28. **Tyler, E.** (1979). Farmacognosia. 2º edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires.
29. **UPCH.** (2004). Manual de organización y funciones. Servicio de control de calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima.
30. **USP 32,** (2009). Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Internacional (NF27) Copyright © 2009 The United States Pharmacopeial Convención. 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, Estados unidos de América. Oficial desde el 1º de mayo de 2009 hasta el 30 de abril del 2010.
31. **Vila, L** (1997) Tecnología Farmacéutica. Vol. II, Editorial Síntesis S.A. España.

ANEXOS

ANEXO N° 01.

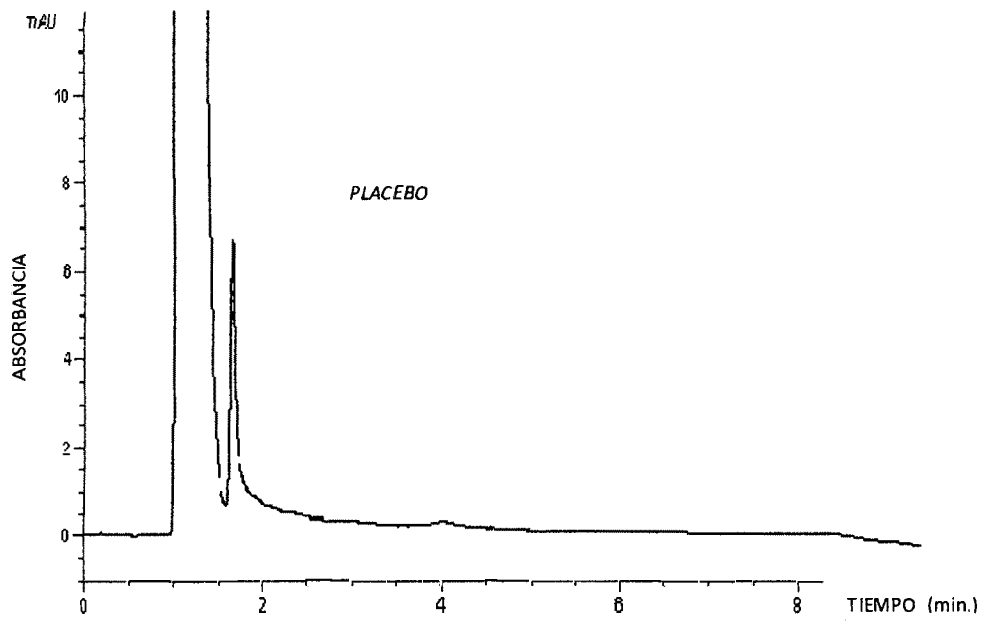


GRAFICO N° 06. Cromatograma obtenida por H.P.L.C del placebo, Lima 2010.

ANEXO N°02.

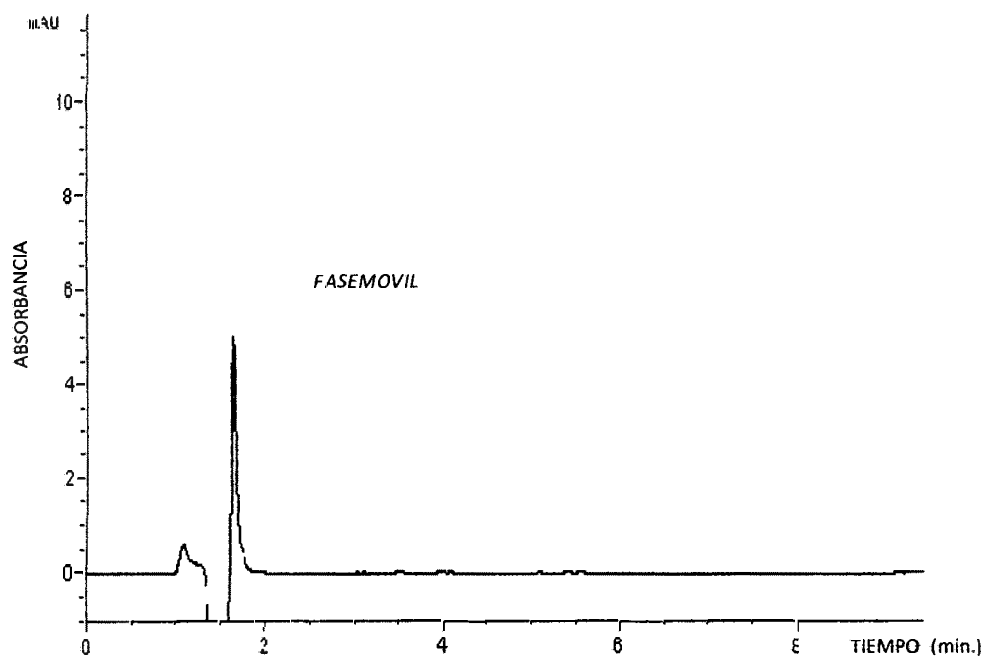


GRAFICO N° 07. Cromatograma obtenida por H.P.L.C de la fase móvil (ACN: MeOH proporción 80:20), Lima 2010.

ANEXO N° 03.

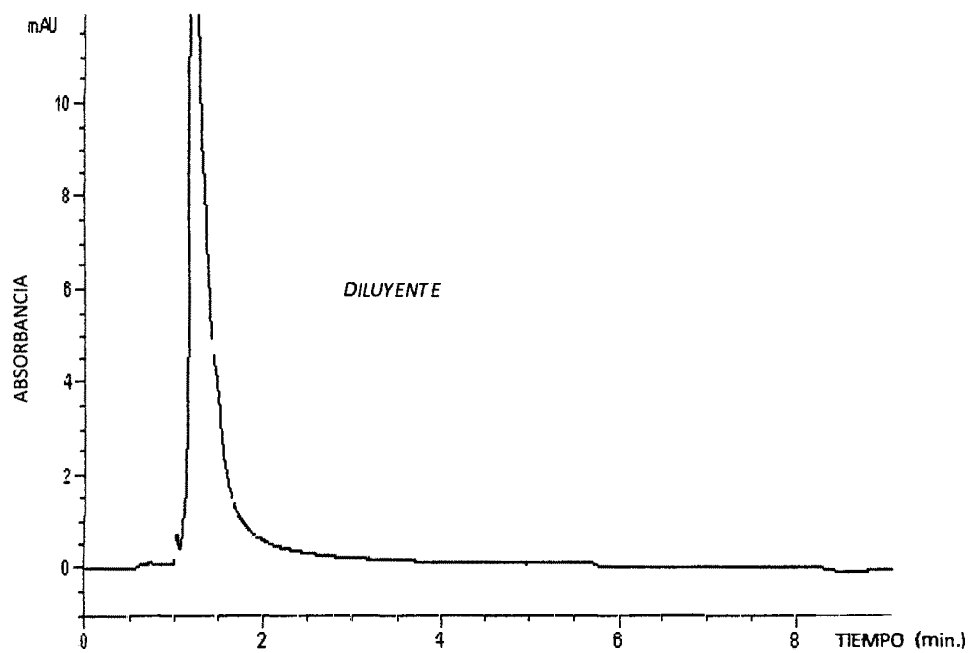


GRAFICO N° 08. Cromatograma obtenida por H.P.L.C del diluyente (n-hexano),

Lima 2010.

ANEXO N°04.

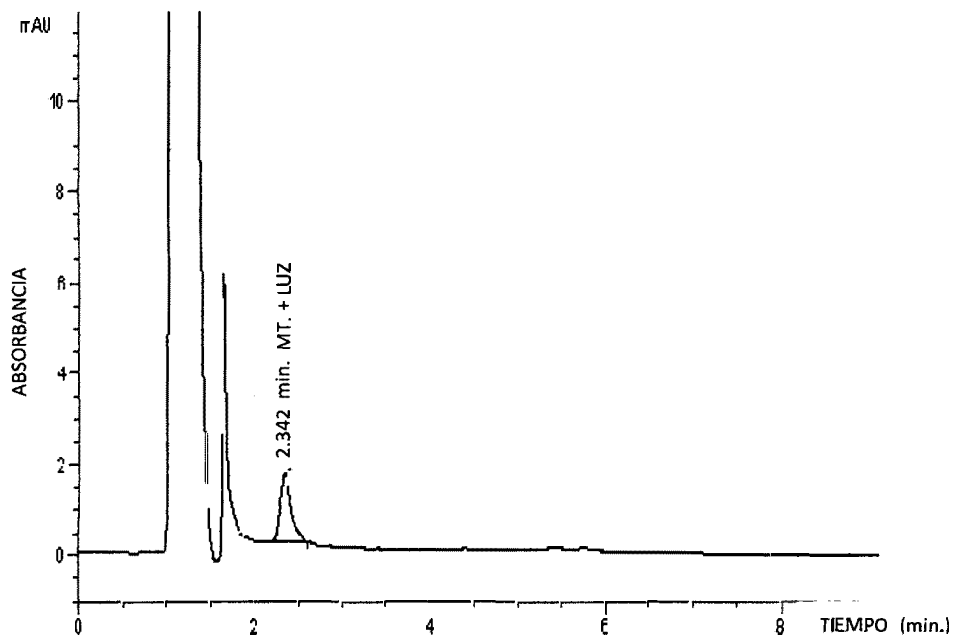


GRAFICO N° 09. Cromatograma obtenida por H.P.L.C de la muestra sometida a luz mostrando el tiempo de retención, Lima 2010.

ANEXO05.

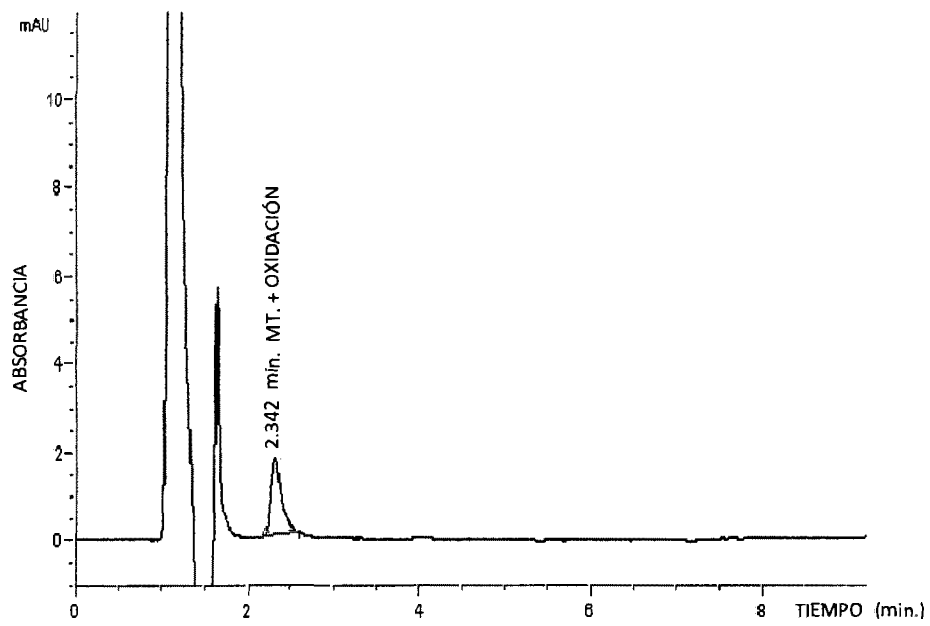


GRAFICO Nº 10. Cromatograma obtenida por H.P.L.C de la muestra sometida a oxidación mostrando el tiempo de retención, Lima 2010.

ANEXO N°06.

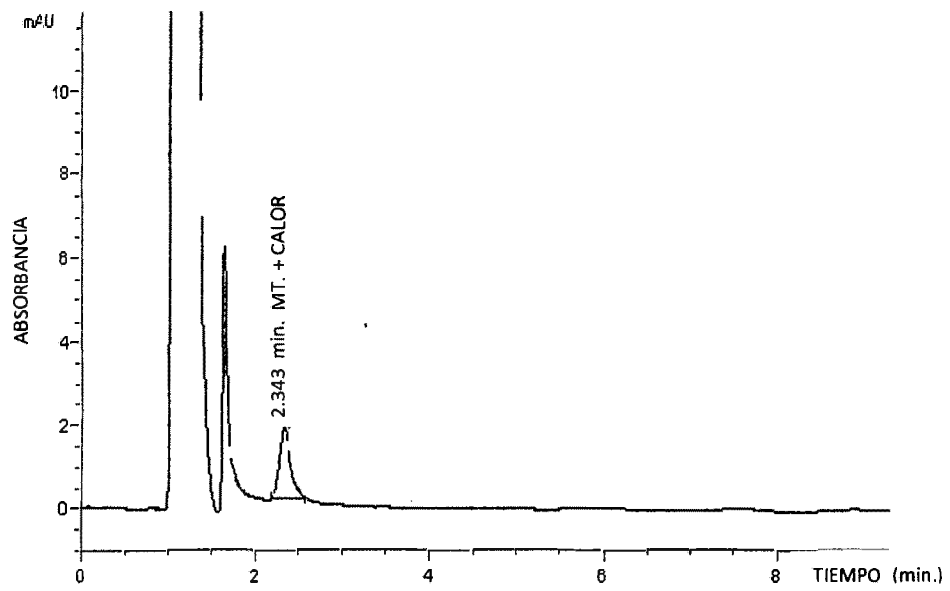


GRÁFICO N° 11. Cromatograma obtenida por H.P.L.C de la muestra sometida a calor mostrando el tiempo de retención, Lima 2010.

ANEXO N°07.



Cp 080-T20-2010 3/3

CERTIFICADO DE ANALISIS

ESTANDAR:	SECUNDARIO
NOMBRE:	VITAMINAD3
N°LOTE:	575AO
POTENCIA:	107760 UI /g (tal cual)
FECHA DE VENCIMIENTO (Día/Mes/Año):	06/2012
NORMA TECNICA:	USP
CONSERVACION:	MANTENER EN ENVASE HERMETICAMENTE CERRADO A TEMPERATURA ENTRE 2°C Y 8°C
VERIFICADO CON:	ESTANDARD PRIMARIO VITAMINA D3 USP LOTE: 00H413 POTENCIA: 998%

LABORATORIOS IESA

Dra. Nancy Martínez Landa
Director Técnico
C.Q.F.P. 03173

ANEXON°08.

TABLA N° 08. Datos de los 7 niveles de concentración del estándar de vitamina D₃ y respuestas (áreas) empleadas para establecer la linealidad del sistema. Lima 2010.

Datos	Muestra (%)	Concentración UI/mL. (X)	Área (Y)	X ²	Y ²	XY
1	80%	16.0690	12.0084	258.2128	144.2012	192.9627
2	80%	16.0690	11.8581	258.2128	140.6150	190.5481
3	80%	16.0690	11.9756	258.2128	143.4160	192.4366
4	90%	18.0780	14.0089	326.8141	196.2493	253.2529
5	90%	18.0780	13.7989	326.8141	190.4107	249.4572
6	90%	18.0780	13.7669	326.8141	189.5264	248.8773
7	100%	20.0860	15.3328	403.4474	235.0954	307.9750
8	100%	20.0860	15.2057	403.4474	231.2130	305.4215
9	100%	20.0860	15.0598	403.4474	226.7961	302.4901
10	125%	25.1080	19.0696	630.4117	363.6485	478.7988
11	125%	25.1080	19.1384	630.4117	366.2768	480.5259
12	125%	25.1080	18.8080	630.4117	353.7394	472.2303
13	150%	30.1300	22.8581	907.8169	522.4941	688.7155
14	150%	30.1300	23.2174	907.8169	539.0463	699.5394
15	150%	30.1300	22.9815	907.8169	528.1498	692.4329
16	200%	40.1730	31.0611	1613.8699	964.7894	1247.8160
17	200%	40.1730	31.0137	1613.8699	961.8514	1245.9146
18	200%	40.1730	31.4306	1613.8699	987.8820	1262.6611
19	250%	50.2160	38.7119	2521.6467	1498.6120	1943.9573
20	250%	50.2160	39.1587	2521.6467	1533.3999	1966.3908
21	250%	50.2160	39.0604	2521.6467	1525.7117	1961.4550
Sumatoria		599.580	459.524	19986.6582	11843.1244	15383.8588
Promedio		28.551	21.882	951.7456	563.9583	732.5647

ANEXO N°09.

TABLA N° 09. Datos de los 7 niveles de concentración de la muestra de vitamina D₃ y respuestas (áreas) empleadas para establecer la linealidad del método. Lima 2010.

DATOS	Muestra	Concentración UI/mL (x)	Área (y)	x ²	y ²	xy
1	80%	16.000	16.5677	256.000	274.4877	265.0827
2	80%	16.000	16.5870	256.000	275.1279	265.3916
3	80%	16.000	16.3500	256.000	267.3225	261.6000
4	90%	18.000	18.6558	324.000	348.0389	335.8044
5	90%	18.000	19.1939	324.000	368.4062	345.4903
6	90%	18.000	18.7144	324.000	350.2295	336.8595
7	100%	20.000	21.3091	400.000	454.0782	426.1822
8	100%	20.000	21.1084	400.000	445.5646	422.1680
9	100%	20.000	20.9375	400.000	438.3785	418.7498
10	125%	25.000	26.6301	625.000	709.1596	665.7512
11	125%	25.000	26.4171	625.000	697.8632	660.4275
12	125%	25.000	26.9110	625.000	724.2030	672.7755
13	150%	30.000	32.0467	900.000	1026.9891	961.4001
14	150%	30.000	32.2970	900.000	1043.0962	968.9100
15	150%	30.000	32.1338	900.000	1032.5792	964.0131
16	200%	40.000	42.6223	1600.000	1816.6596	1704.8916
17	200%	40.000	42.1189	1600.000	1773.9992	1684.7548
18	200%	40.000	42.1483	1600.000	1776.4800	1685.9324
19	250%	50.000	53.0914	2500.000	2818.6957	2654.5695
20	250%	50.000	53.0479	2500.000	2814.0786	2652.39450
21	250%	50.000	53.0811	2500.000	2817.6053	2654.05600
SUMA TOTAL		597.000	631.969	19815.000	22273.043	21007.20499
PROMEDIO		28.429	30.094	943.571	1060.621	1000.34309

ANEXO N°10.

TABLA N° 10. Datos de los 5 niveles de concentración del estándar de vitamina D₃ y respuestas (áreas) empleadas para establecer la linealidad del límite de detección y cuantificación. Lima 2010.

Datos	MTA	CONC. (UI/mL)	Área (Y)	X ²	Y ²	XY	Residuales
1	5%	1.004	0.8219	1.0080	0.6755	0.8252	0.0696
2	5%	1.004	0.6087	1.0080	0.3705	0.6111	0.0026
3	5%	1.004	0.7202	1.0080	0.5187	0.7231	0.0263
4	12.5%	2.511	1.8253	6.3051	3.3315	4.5832	0.0079
5	12.5%	2.511	1.6380	6.3051	2.6830	4.1130	0.0097
6	12.5%	2.511	1.5333	6.3051	2.3510	3.8501	0.0413
7	25%	5.022	3.6143	25.2205	13.0633	18.1511	0.0074
8	25%	5.022	3.5119	25.2205	12.3337	17.6370	0.0354
9	25%	5.022	3.7111	25.2205	13.7719	18.6369	0.0001
10	50%	10.043	7.6072	100.8618	57.8692	76.3989	0.0004
11	50%	10.043	7.2947	100.8618	53.2129	73.2609	0.1102
12	50%	10.043	7.6895	100.8618	59.1283	77.2255	0.0040
13	75%	15.065	11.7341	226.9542	137.6896	176.7745	0.0325
14	75%	15.065	11.7178	226.9542	137.3068	176.5287	0.0269
15	75%	15.065	11.4921	226.9542	132.0688	173.1288	0.0038
<i>sumatoria</i>		100.9350	75.5201	1081.0491	626.3748	822.4479	0.3780
<i>promedio</i>		6.7290	5.0347	72.0699	41.7583	54.8299	0.0252

ANEXO Nº 11.

TABLA Nº 11. Cálculos para la determinación del límite de detección y cuantificación de vitamina D₃. Lima 2010.

NOMBRE	FÓRMULA	RESOLUCIÓN	RESULTADO
LD	$3.3*S/b$	$3.3*0.227/0.782$	0.957 UI/mL
LC	$10*S/b$	$10*0.227/0.782$	2.902 UI/mL

Donde **S** es el intercepto de la curva de calibración, **b** la pendiente de la curva de calibración establecidas a concentraciones inferiores al de la linealidad del método, para determinar el límite de detección y cuantificación

ANEXO N° 12.

TABLA N° 12. Resultados de la adaptabilidad del sistema cromatográfico para evaluar la robustez del método y calificación instrumental. Lima 2010.

PARÁMETROS	ESPECIFICACIONES	RESULTADO
Numero de platos teóricos (N)	MINIMO 2000	2133
Factor cola (tailing) (T)	MAXIMO 1.5%	0.70
Resolución (R)	MINIMO 1.5	*
Desviación estándar relativa (RSD)	MAXIMO 2% para cinco inyecciones repetidas.	0.7641

* La técnica analítica no presenta resolución para la vitamina D₃ puesto que no se observa un segundo analito.

TÍTULO: "Desarrollo y validación de técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C.) para la determinación del contenido de vitamina D₃ Colecalciferol en suspensión oral". Lima 2010.

AUTOR: FLORES SOTO, Yovana Rosalia.

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
Desarrollo y validación de técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C.) para la determinación del contenido de vitamina D ₃ Colecalciferol en suspensión oral. Lima. 2010	Será posible el desarrollo y la validación de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C.) para la determinación del contenido de vitamina D ₃ (colecalciferol) en una Suspensión oral?	<p>OBJETIVO GENERAL: Desarrollar y validar la técnica analítica para la determinación de contenido por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, (HPLC) de vitamina D₃ Colecalciferol en suspensión oral.</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar la especificidad de la técnica • Determinar la linealidad de la técnica analítica • Determinar la exactitud de la técnica analítica • Determinar la precisión de la técnica analítica • Determinar la sensibilidad de la técnica analítica D₃ (colecalciferol) en una suspensión oral y documentar los resultados obtenidos. 	<p>VALIDACIÓN es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ANALÍTICO</p> <ul style="list-style-type: none"> • EXACTITUD • PRECISIÓN • ESPECIFICIDAD • SELECTIVIDAD • LÍMITE DE DETECCIÓN • LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN • LINEALIDAD E INTERVALO • ROBUSTEZ <p>VITAMINA D₃: Es una prohormona que en el organismo se convierte en diferentes metabolitos activos que funcionan como hormonas regulando las actividades de diversas células. Su acción principal es mantener el calcio plasmático dentro de los niveles normales, para lo cual reduce la excreción de calcio, y moviliza el calcio óseo.</p>	El desarrollo y la validación de la técnica analítica para la determinación del contenido por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H-PLC), de vitamina D ₃ colecalciferol en una suspensión oral cumple con los parámetros establecidos.	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE: - Suspensión Oral de vitamina D₃ (colecalciferol).</p> <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Concentración 80% - Concentración 90% - Concentración 100% - Concentración 200% - Concentración 250% <p>VARIABLE DEPENDIENTE: Desarrollo y validación de la técnica analítica para la determinación de contenido por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C.)</p> <p>Indicadores: Cromatogramas, que evidencien los parámetros de validación.</p>	<p>Población: Suspensiones orales que contienen vitamina D₃.</p> <p>Muestra: 50 frascos de suspensiones orales que contienen vitamina D₃ colecalciferol.</p> <p>METODOLOGÍA: -se pesar 23.2 mg de estándar y 50ml de muestra las cuales serán colocadas en folios de 200mL, agregar 15mL de agua y agitar x 5min., luego añadir 50 mL de n-hexano, agitar fuertemente por 20 min. Coger la capa hexánica par a los análisis de los parámetros de validación.</p> <p>Se equipara un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) con las siguientes condiciones velocidad de flujo 1.5ml/ min., a 265 nm de longitud de onda, a 25 uL de volumen de inyección, con una columna cromatográfica (C8). A una temperatura de 30°C.</p> <p>-Se Calculara la cantidad en UI de vitamina D₃, teniendo en cuenta las áreas de los picos y los factores de dilución de las muestras.</p> <p>- con los datos obtenidos se evaluara os parámetros de la validación.</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R. D. Nº 218 – 2011 – FCB – D

Bach: Yovana Rosalía FLORES SOTO

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día Miércoles 17 de Agosto del (2011) dos mil once en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, bajo la presidencia del Magister Químico Farmacéutico Magister José Manuel Diez Macavilca en representación del Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas y la asistencia de los docentes miembros: Magister Maricela López Sierralta (Asesor y Secretaria Docente encargada según Memorando Nº 580-2011-UNSCH FCB) y el Magister Enrique Javier Aguilar Felices (miembro que es 4º jurado calificador); para administrar la tesis titulada: Desarrollo y validación de la técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (H.P.L.C) para la determinación de contenido de vitamina D₃ Colecalciferol en suspensión oral, Lima 2010, de la Bachiller en Farmacia y Bioquímica (Resolución Nº197-2010-UNSCH-co) YOVANA ROSALÍA FLORES SOTO, quién pretende optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica.


El presidente encargado dá inicio al acto de sustentación solicitando a la secretaria académica, la revisión de la documentación en mesa y la lectura de la Resolución Decanal Nº 218-2011-FCB-D, para luego indicar a la sustentante que puede dar inicio a la exposición de su trabajo de investigación en el tiempo correspondiente.

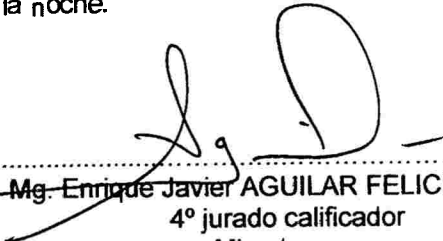
Culminada la exposición por parte de la sustentante el presidente da paso a la segunda etapa del acto de sustentación en la que los miembros de jurado calificador, realizarán las preguntas y observaciones que crean por conveniente, luego del cuál se solicita ala sustentante y público en general que se retiren del auditorio para que el jurado calificador pueda deliberar y así poder realizar la evaluación correspondiente como sigue:

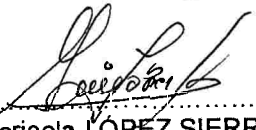
JURADO CALIFICADOR	EXPOSICIÓN	RPTA	PREGUNTAS	PROMEDIO
Mg. José Manuel, DIEZ MACAVILCA	18	18	18	18
Mg. Enrique Javier, AGUILAR FELICES	17	17	17	17
Mg. Maricela, LÓPEZ SIERRALTA	18	18	18	18
			Promedio.	

De la evaluación realizada, la sustentante obtuvo la calificación promedio de DIEIOCHO (18) de lo cual dan Fe los miembros del jurado calificador, estampando su rúbrica al pie de la presente.

Culmina el acto de sustentación siendo las seis de la noche.


Mg. José Manuel DIEZ MACAVILCA
Presidente (e)
Miembro


Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES
4º jurado calificador
Miembro


Mg. Maricela LÓPEZ SIERRALTA
Miembro- asesor
Secretaria Docente (e)