

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**Validación del método analítico para la cuantificación de  
diclofenaco al 1% gel por Cromatografía Líquida de Alta  
Performance (HPLC), Lima - 2023**

Tesis para optar el Título Profesional de:  
**Químico Farmacéutico**

Presentado por:  
**Bach. Roxana Quispe Escalante**

Asesor:  
**Dr. Emilio Germán Ramírez Roca**

**Ayacucho - Perú**

**2024**

A mi familia por ser el incentivo para seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecimiento a mi alma máter la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

A mi asesor, el Dr. Emilio Germán Ramírez Roca, por sus enseñanzas y orientación para el desarrollo de la presente tesis.

A la industria farmacéutica CIFARMA S.A por brindarme el apoyo para el desarrollo de la presente investigación.

Mi gratitud a toda mi familia por su apoyo, aliento e incondicionalidad.

## ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes de estudio	3
2.1.1. Antecedentes internacionales	3
2.1.2. Antecedentes nacionales	5
2.1.3. Antecedentes locales	7
2.2. Redacción del marco teórico	8
2.2.1. Validación de método analítico	8
2.2.2. Verificación	11
2.2.3. Cromatografía líquida de alta performance	12
2.2.4. Antiinflamatorios no esteroideos	14
2.3. Marco legal	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Ubicación	17
3.2. Población y muestra	17
3.2.1. Población	17
3.2.2. Muestra	17
3.3. Procedimiento para la recolección de datos	17
3.3.1. Preparación de las soluciones de trabajo	17
3.3.2. Identificación de diclofenaco sódico	18
3.3.3. Valoración de diclofenaco sódico	18
3.3.4. Validación del método	19
3.4. Tipo de investigación	24
3.5. Diseño de investigación	25
3.6. Análisis de datos	25
IV. RESULTADOS	27

V. DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	49
VII. RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	533
ANEXOS	577

## INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Categoría de validación de métodos analíticos.	09
Tabla 2.	Cantidad de diclofenaco sódico para la prueba de exactitud.	22
Tabla 3.	Concentración de diclofenaco sódico para la prueba de linealidad.	23
Tabla 4.	Concentración de diclofenaco sódico para la prueba de linealidad.	24
Tabla 5.	Evaluación de la aptitud del sistema de la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	29
Tabla 6.	Evaluación de la especificidad en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	30
Tabla 7.	Pruebas de degradación del placebo para la evaluación de la especificidad en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	31
Tabla 8.	Pruebas de degradación de la muestra para la evaluación de la especificidad en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	32
Tabla 9.	Evaluación de la exactitud en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	33
Tabla 10.	Efecto del nivel de concentración sobre la recuperación en la evaluación de la exactitud en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	34
Tabla 11.	Precisión del sistema en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	35

Tabla 12.	Repetibilidad en la precisión del método en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	36
Tabla 13.	Precisión intermedia en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	37
Tabla 14.	Estabilidad del diclofenaco sódico a las 24 horas en la prueba de robustez en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	40
Tabla 15.	Cambio de volumen de inyección en la prueba de robustez en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	41

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Categoría de validación de métodos analíticos	14
Figura 2. Linealidad de sistema en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	38
Figura 3. Linealidad de método en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.	39



## INDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Preparación de soluciones	58
Anexo 2. Especificaciones técnicas del diclofenaco 1 % gel	59
Anexo 3. Cromatograma de la aptitud de sistema	60
Anexo 4. Cromatogramas de especificidad	61
Anexo 5. Cromatogramas de exactitud	65
Anexo 6. Cromatogramas de precisión	67
Anexo 7. Cromatogramas de linealidad	68
Anexo 8. Cromatogramas de robustez	69
Anexo 9. Matriz de consistencia	70

## RESUMEN

El reglamento de la Ley de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios de Perú, establece que, si una técnica analítica no se encuentra en ninguna de las farmacopeas de referencia, se deben presentar los documentos que acrediten la validación de las técnicas analíticas propias. El objetivo de la investigación es validar el método analítico de cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). La muestra de diclofenaco al 1 % gel fue obtenida según el plan de muestreo con un nivel de inspección S-4. Se evaluó la aptitud del sistema, especificidad, exactitud, precisión, linealidad y robustez. Se calculó el área, tiempo de retención, resolución y se comparó con los criterios de especificación para determinar la conformidad de cada prueba. Se evidenció que la prueba de adecuabilidad es conforme con un área de 47977778,6 y tiempo de retención de 10,493 minutos ( $CV \leq 2\%$ ). La especificidad es conforme porcentajes de recuperación de 100,25 y 100,68% y con una resolución de 15,14 min. La precisión es conforme, tanto para la precisión del sistema y del método. El método analítico cumple con la característica de desempeño analítico de linealidad del sistema y del método. La robustez es conforme, tanto para la prueba de estabilidad de 24 horas y de cambio de volumen de inyección. Se concluye que el método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por HPLC cumple con las características de desempeño analítico por lo que el método es confiable y válido.

**Palabras clave:** Diclofenaco, gel, validación, HPLC.

## ABSTRACT

The regulations of the Law of Pharmaceutical Products, Medical Devices and Health Products of Peru establish that, if an analytical technique is not found in any of the reference pharmacopoeias, documents must be presented that prove the validation of the analytical techniques. The objective of the research is to validate the analytical method of quantification of diclofenac 1% gel by high performance liquid chromatography (HPLC). The sample of diclofenac 1% gel was obtained according to the sampling plan with an S-4 inspection level. The suitability of the system, specificity, accuracy, precision, linearity and robustness was evaluated. The area, retention time, and resolution were calculated and compared to the specification criteria to determine the compliance of each test. It was evident that the suitability test complies with an area of 47977778.6 and a retention time of 10.493 minutes ( $CV \leq 2\%$ ). The specificity is according to recovery percentages of 100.25 and 100.68% and with a resolution of 15.14 min. The precision is compliant, both for the precision of the system and the method. The analytical method meets the analytical performance characteristic of system and method linearity. The robustness is compliant, both for the 24-hour stability test and the injection volume change test. It is concluded that the analytical method for the quantification of diclofenac 1% gel by HPLC meets the analytical performance characteristics, so the method is reliable and valid.

**Keywords:** Diclofenac, gel, validation, HPLC.

## I. INTRODUCCIÓN

La validación es el procedimiento mediante el cual se asegura que las características de desempeño del proceso satisfacen las aplicaciones analíticas previstas. La validación juega un rol fundamental en las buenas prácticas de manufactura y en el desarrollo de un método de análisis, ya que sin datos fiables y reproducibles sería imposible asegurar la calidad de un determinado producto, razón por la cual es necesario documentar los resultados analíticos obtenidos.<sup>1</sup>

Para formular un producto nuevo es imprescindible emplear métodos analíticos que nos permitan cuantificar al analito en estudio en forma de producto terminado, materia prima o como principio activo, asegurando de esta manera la fiabilidad, estándares de calidad; argumento por el cual se ejecutará la validación del nuevo método analítico de **diclofenaco 1% gel** en el área de investigación y desarrollo de la industria farmacéutica **CIFARMA S.A.** La nueva forma farmacéutica diclofenaco 1% gel se fabricará con altos estándares de calidad, con lo cual se va asegurar la calidad de dicho producto.

La validación de un método analítico es el procedimiento mediante el cual se asegura que dicho método cumpla con los requisitos para su aplicación deseada, la cual se basa en la determinación de diversos parámetros, que se usan según la naturaleza del fármaco en estudio, siendo estas: linealidad, precisión, exactitud, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez e intervalo.<sup>2</sup>

Cabe mencionar que la validación de un método analítico juega un papel importante en la adquisición de pruebas documentadas y demostrativas, de que dicho método es fiable y reproducible.<sup>2</sup>

Hoy en día la validación es un tópico de gran atractivo, esto debido a que las industrias han puesto mayor interés en tópicos de aseguramiento y mejora de la productividad, por tanto la validación es pieza elemental en los procesos de producción.<sup>3</sup>

Por lo tanto, la industria farmacéutica **CIFARMA SA** cuenta con normas nacionales e internacionales y es la única industria tri norma ISO 9001, ISO 14001 y OHSAS 18001 la cual garantiza la calidad de la producción de los medicamentos que ellos producen como diclofenaco 1% gel es un producto nuevo que está en desarrollo por lo cual requiere una técnica analítica nueva y propia de la empresa para su análisis del principio activo del producto.<sup>3</sup>

Por ser técnica propia, se hace necesaria su validación según SOP. Val.010 (Validación de Métodos Analíticos) a fin de verificar que las condiciones de trabajo a ser empleadas garanticen resultados confiables en las industrias farmacéuticas como en la industria farmacéutica CIFARMA S.A. y como todo proceso de medición este debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido.

En tal sentido se abordaron los siguientes objetivos:

**Objetivo general**

Validar el método analítico de cuantificación del diclofenaco al 1% gel por cromatografía líquida de alta performance.

**Objetivos específicos**

- Evaluar el parámetro de aptitud del sistema del método de cuantificación de diclofenaco al 1% gel.
- Evaluar los parámetros de especificidad, exactitud, precisión, linealidad y robustez del método de cuantificación de diclofenaco al 1% gel.

La hipótesis planteada fue que el método analítico de cuantificación del diclofenaco al 1% gel por cromatografía líquida de alta performance cumple con los parámetros de validación.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes de estudio

#### 2.1.1. Antecedentes internacionales

**Ardila A.,<sup>4</sup> y col.**, el 2022 en Colombia, publicaron el estudio del método cromatográfico de alta resolución de la determinación simultánea de diclofenaco e ibuprofeno en aguas. En dicho método se ejecutó la determinación de los parámetros de: exactitud, precisión en términos de repetibilidad, precisión intermedia, límite de cuantificación, límite de detección y la linealidad. Además, cabe mencionar que, para el cálculo de dichos parámetros se emplearon la desviación estándar, desviación estándar relativa, promedio, porcentaje de recuperación, intervalo de confianza y el coeficiente de variación. Los parámetros de precisión y exactitud se determinaron por el uso del análisis factorial de varianza con un nivel de confianza de 95 % y nivel de significancia del 0,05. Finalmente se logra concluir que el método ejecutado si satisface los parámetros y criterios para el cual fue diseñado.

**Valenzuela P.,<sup>5</sup>** el 2020 en Chile, evidenció los resultados de la validación del método analítico de nifedipino comprimidos por cromatografía líquida de alta performance. Los parámetros evaluados son: exactitud, robustez, linealidad, especificidad, rango y estabilidad de soluciones. Los datos evidenciaron que el método satisface los parámetros de exactitud, linealidad y precisión con un valor de 0,08 mg/mL a 0,12 mg/mL. El método analítico no evidencia interferencias y el método es robusto.

**Vargas J.,<sup>6</sup> y Chipantiza N.**, el 2017 en Ecuador, reportó los resultados de la validación del método cromatográfico de alta performance (HPLC) para la cuantificación de ciprofloxacino en tabletas. Así el método propuesto demostró ser lineal en los rangos de concentración de 80 a 120 µg/m de ciprofloxacino, con un coeficiente de correlación lineal de 0,99 y un coeficiente de determinación de 0,99. Además en el ensayo de precisión se obtuvo que no existe diferencia entre los

grupos, tanto en el ensayo de repetibilidad y en el ensayo de precisión intermedia, obteniéndose un coeficiente de variación menor o igual a 2 %. Por último, al evaluar el parámetro de exactitud a tres niveles de concentración se obtuvo un porcentaje de recuperación del 100 %.

**Hernández B.**,<sup>7</sup> el 2014 en México, publicó el estudio de la validación del método analítico por HPLC para la disolución de levonorgestrel 1,5 mg en grageas. Demostró que el método analítico es selectivo, ya que los excipientes no interfirieron en la determinación del activo. El método demostró ser preciso con un coeficiente de variación de 0,4 %; asimismo demostró ser lineal obteniéndose un coeficiente de correlación de 0,999. La reproducibilidad reportó un coeficiente de variación de 0,5 %.

**Velastegui J.**,<sup>8</sup> el 2011 en Ecuador, reportó los resultados del estudio de validación del método analítico por HPLC de la valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral ejecutado por el laboratorio Betapharma S.A. Además, se demostró que el método analítico usado para la valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral cumplía con los parámetros para los que fue elaborado. El análisis de precisión reportó un coeficiente de variación de 1,33 % por debajo del límite permitido. Para el análisis de precisión entre días, se obtuvo un coeficiente de variación de 2,04 %. Además, cabe mencionar que el análisis precisión entre %analistas marco un coeficiente de variación de 1,66 %. En el ensayo de linealidad se obtuvo un valor de coeficiente de determinación de 0,994. El porcentaje de recuperación fue de 97,94 % (rango previsto de 97,5 - 102,5 %). Finalmente, en el ensayo de la robustez del método reportó un coeficiente de variación de 1,5 %.

**Faife A.**,<sup>9</sup> en el año 2009 en Nicaragua, validó el método analítico por HPLC en mupirocina 2 % ungüento. En esta validación se evaluaron los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, especificidad, aptitud de sistema, límite de cuantificación y límite de detección; obteniéndose que el método es selectivo, ya que no se observan productos de degradación. Los parámetros de linealidad de método y linealidad de sistema fueron cercanos a uno; mientras tanto el parámetro exactitud se evidencia por medio del porcentaje de recuperación con un resultado de 100,18%. Finalmente se evaluaron los parámetros de limite de cuantificación de 2,02 ug/mL y el limite de detección fue de 0,66 ug/mL; asegurando de esta manera la validez del método.

**Ortiz K.**,<sup>10</sup> y **López E.**, el 2003 en Nicaragua, desarrollaron y validaron el método

analítico de cuantificación de diclofenaco sódico en tres presentaciones farmacéuticas (tableta, ampollas y supositorio) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). El método analítico usado resulto ser muy dinámico, variable y reproducible esto por fase reversa, además de ser un método sensible frente a una variedad de concentraciones. Este método analítico validado en las condiciones instauradas es factible de ser usado para las diferentes formas farmacéuticas de diclofenaco sódico citadas en esta (ampolla, supositorio, tableta), además de que es un método exacto, preciso y lineal.

### **2.1.2. Antecedentes nacionales**

**Centeno E.,<sup>11</sup> y Rassa E.,** en el año 2021 en la ciudad de Lima, publicó los resultados de la verificación del método analítico de cuantificación del dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL jarabe por HPLC, donde para la aptitud de sistema se obtuvo un  $cv \leq 2\%$  y respecto a los parámetros de precisión, robustez y especificidad los resultados arrojaron valores que satisfacen las especificaciones. Finalmente cabe mencionar que el método es lineal con una ecuación de recta  $y=4137,89x-14,50$ .

**Marron G.,<sup>12</sup>** el 2018 en Arequipa, publicó los resultados del método analítico de disolución y contenido del clorhidrato de cetirizina en cápsulas blandas por HPLC. En esta validación se evaluaron los parámetros de linealidad de método y linealidad de sistema obteniéndose valores de coeficiente de correlación próximos a uno. Asimismo, se evaluaron los parámetros de repetibilidad de método, repetibilidad de sistema y precisión intermedia, cuyos resultados evidenciaron valores de coeficiente de correlación menor o igual al 2,0%. La exactitud del método se evidencio con valores de recuperación de entre 98,0-102,0% para disolución y el análisis de contenido. El método analítico es selectivo obteniéndose valores de algoritmo de pureza de pico  $\geq 0,980$ , además de que tampoco se evidencio presencia de picos interferentes en el cromatograma de la solución placebo.

**Núñez DM.,<sup>13</sup> y Flores GA.,** el 2018 en Lima, reportó el estudio de la validación del método analítico para la cuantificación de levocetirizina diclorhidrato 5 mg/mL en solución oral en gotas por HPLC. Evidenció un coeficiente de correlación de 0,998 para el sistema y de 0,999 para el método. La exactitud del método analítico evidenció valores de recuperación cercano al 100,0 %. Al evaluar el parámetro de precisión se logró obtener un coeficiente de variación de 0,52 % (precisión intermedia) y 0,19 % (repetibilidad).



**Lovatón J.,<sup>14</sup> y Carbajal E.,** en el 2017 en la ciudad de Lima, publicó los resultados del estudio de validación del método analítico de cuantificación de la amoxicilina trihidrato 250 mg/mL en PPSO por cromatografía líquida de alta performance. Entre sus resultados, evidenció que el método fue específico; el método es lineal con un coeficiente de correlación de 0,995 y un coeficiente de los factores de respuesta de 0,664 %. El método demostró ser preciso (con una relación de variación de 0,415 %) y el parámetro de precisión intermedia (obtuvo un coeficiente de variación de 0,314%). El método demostró ser exacto (porcentaje de recuperación de 100,0 %).

**Palomino J.,<sup>15</sup>** el 2017 en Lima, reportó los resultados del estudio de validación de un método analítico para la valoración de clorhidrato de terbinafina en gel 1% por HPLC. El parámetro de límite de cuantificación y límite de detección evidenció resultados de 0,20 y 0,50 partes ppm. La precisión intermedia obtuvo valores de desviación estándar de 0,940% y el parámetro de repetibilidad obtuvo valores de 0,926%. Cabe mencionar que el método analítico no mostró presencia de productos de degradación o excipientes en la materia en análisis, además de obtenerse un factor de respuesta de 0,796% y 0,999 de factor de correlación. El porcentaje de recuperación fue de 100,4%, concluyéndose que el método analítico cumple con el fin para el cual fue elaborado.

**Samaniego J.,<sup>16</sup>** el 2016 en la ciudad de Lima, publicó los resultados del desarrollo y validación del método analítico por cromatografía líquida de alta performance para calificar la equivalencia farmacéutica in vitro de cuatro fármacos que contienen clorfenamina maleato, fenilefrina clorhidrato y paracetamol en tableta. En esta validación se evaluaron perfiles de disolución para cada fármaco, obteniéndose como resultado un  $r \geq 0,99$ ,  $r^2 \geq 0,98$  y coeficiente de variación  $\leq 2\%$ . Seguidamente también se reportó resultados de porcentaje de recuperación de 98 a 102% y coeficiente de variación total  $\leq 2\%$ ; además cabe mencionar que el método es robusto porque no evidencia cambios entre los resultados obtenidos al principio y el resultado obtenido después de 24 horas y preciso porque no se detecta presencia de productos de degradación. Finalmente se concluye que dos de los cuatro fármacos no son equivalentes farmacéuticos.

**Coripuna R.,<sup>17</sup>** el 2013 en Arequipa, reportó los resultados del estudio de la validación del método de HPLC para la determinación del diclofenaco sódico en ampollas. El parámetro de límite de cuantificación obtuvo valores de 5,89  $\mu\text{g/mL}$ , mientras el parámetro de límite de detección dio valores de 4,45  $\mu\text{g/mL}$ . Los

resultados demostraron que el procedimiento analítico propuesto para la validación del diclofenaco sódico en ampollas es selectivo, lineal, exacto y preciso. **Zavala C.**,<sup>18</sup> el 2012 en Trujillo, reportó la validación del método analítico de cuantificación de amoxicilina y ácido clavulánico en amoxicilina 500mg /ácido clavulánico 125mg tableta recubierta. El método analítico es preciso y exacto con valores de (factor de variación de precisión y repetibilidad menor a 2,0%) y (recuperación de 99,90 para amoxicilina y 99,83% para ácido clavulánico. Además, cabe mencionar que la linealidad del sistema y la linealidad del método obtuvieron valores de factor de correlación menor a 0,995%, con lo cual se concluye que el método es lineal.

**Tisnado E.**,<sup>19</sup> el 2010 en Trujillo, reportó su estudio sobre validación de paracetamol y diclofenaco sódico en Doloparamidol® comprimidos recubiertos por cromatografía líquida de alta performance. Demostró que el método es lineal ( $r = 0,9993$ ), preciso (coeficiente de variación igual 0,0979 para el paracetamol y 0,0479 para el diclofenaco sódico), con precisión intermedia (factor de variación de 0,6498 para diclofenaco y 0,3550 para paracetamol). El método analítico evidenció ser exacto (recuperación de 99,5 % para paracetamol y 99,62 % para diclofenaco) y es selectivo. Para ultimar el método analítico en estudio resultó ser consistente y verás para los fines para el cual fue elaborado.

### **2.1.3. Antecedentes locales**

**Velarde M.**,<sup>20</sup> el 2013, publicó el estudio de la validación de un método analítico para la cuantificación de diclofenaco ácido libre en dolfenex 9 mg/5 mL en suspensión oral por HPLC. Se concluyó que el método analítico es preciso, ya que fue reproducible y repetitivo (coeficiente de variación de 0,247 % y 0,235 %, respectivamente); es exacto (100,2 %) del 100%. Además, cabe mencionar que el método analítico es lineal en el rango de 50 a 150 % ( $r^2 = 0,997$ ); también es selectivo porque se puede identificar al analito sin la presencia de otros excipientes y robusto frente a las variaciones de flujo a la mitad (0,6 mL/min) con un factor de variación de 0,239 %.

**Mendoza M.**,<sup>21</sup> el 2011, publicó su tesis sobre la validación del método analítico por cromatografía líquida de alta performance para el análisis cuantitativo de levofloxacin de 500 mg/100mL en inyectable de administración parenteral. El método demostró ser lineal, preciso (repetitivo y reproducible), exacto y selectivo.

## **2.2. Redacción del marco teórico**

Hoy en día resulta de vital importancia la evaluación de un método analítico adecuado para los diferentes análisis del área de control de calidad, en tal perspectiva es importante validar los métodos analíticos, esto con el fin de asegurar la calidad de la materia prima, producto terminado, en tal fin no solo es necesario asegurar la calidad del principio activo sino también es necesario asegurar los altos estándares de calidad en los resultados, esto con el fin de ofrecer resultados confiables y sobre todo reproducibles. Así la validación de los métodos analíticos hoy en día juega un papel primordial en las diferentes áreas de control de calidad de los laboratorios farmacéuticos, con el fin de asegurar la mejora continua en todos los procesos productivos.<sup>22</sup>

### **2.2.1. Validación de método analítico**

La validación de un método analítico se realiza para cumplir con requisitos de las normas internacionales: Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), la norma ISO 17025 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", Organismos Internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), Organización Mundial de la Salud (OMS), la Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización (ICH), Agencia Europea de Medicamentos (EMA). También se valida un método analítico para emitir resultados exactos y precisos, que sean reproducibles para generar la confianza en nuestros clientes.<sup>22</sup>

La validación de una técnica analítica debe estar documentada, además deberá precisar los criterios evaluados, los valores alcanzados y los límites de esta. Cabe mencionar que si fuese una técnica analítica propia esta deberá estar adecuadamente descrita, completa y actualizada con el fin de que pueda ser usada adecuadamente por otro analista.<sup>22</sup>

La validación de técnicas analíticas propias toma como referencia a los estándares de calidad internacional como la (ICH, OMS, EMA), referencias farmacopeicas y guías de calidad de las entidades reguladoras de los países de alta vigilancia sanitaria.<sup>2</sup>

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se asegura que un método satisface los fines para el cual fue elaborado. La validación juega un rol importante en las Buenas Prácticas de Manufactura, ya que por medio de esta se asegura la calidad e integridad de las propiedades del activo. La calidad de los

resultados de la validación del método analítico se verá reflejado en la reproducibilidad de estos, la cual debe estar documentada para su posterior verificación.<sup>1,2</sup>

La validación es un requisito indispensable en el proceso de calidad de un producto la cual según la monografía o farmacopea está sujeta a evaluaciones desde pruebas simples a pruebas más específicas, la cual está sujeta en función de la presentación del activo a evaluar ya sea como materia prima o producto terminado. Teniendo en cuenta estos antecedentes los parámetros a evaluar son la linealidad, especificidad, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y robustez. A continuación, se indican las diferentes categorías citadas por la farmacopea.<sup>1</sup>

**Categoría I:** Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.<sup>1</sup>

**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.<sup>1</sup>

**Categoría III:** Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (p.ej. disolución, liberación de fármacos, etc.).<sup>1</sup>

**Categoría IV:** Pruebas de identificación.<sup>1</sup>

**Tabla 1.** Categorías de validación de métodos analíticos

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativo	Pruebas de límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	*	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

**Fuente:** Farmacopea de los Estados Unidos.<sup>2</sup>

Las diferentes categorías de validación de métodos analíticos se deberán seleccionar adecuadamente en función de las características del activo en estudio con el fin de asegurar que el método seleccionado sea el adecuado y satisfaga los fines para el cual fue diseñado. Así podemos mencionar cuatro métodos físicos. La categoría I que se aplica para validaciones de métodos espectroscópicos

cuantitativo, mientras la categoría II se usa más para evaluar características físicas cualitativas como área superficial, tamaño de partícula, densidad por asentamiento y densidad aparente. La categoría IV se emplea en métodos espectroscópicos para identificación cualitativa.<sup>1,2</sup>

Así la única manera de corroborar que el método seleccionado cumple o no con el fin previsto es observando si los resultados obtenidos satisfacen los resultados previstos, razón por la cual toda validación deberá contar con la documentación necesaria que lo justifique; además cabe mencionar que todo procedimiento de la farmacopea está bajo la supervisión de las normas oficiales. El criterio adecuado y las características del activo en estudio a la hora de seleccionar un método analítico adecuado juega un rol fundamental a la hora de elegir la categoría de validación a emplear.<sup>1,2</sup>

#### **2.2.1.1. Exactitud**

El parámetro de exactitud se define como la cercanía que existen entre los datos obtenidos y el valor verdadero. Así, para calcular este parámetro se puede realizar mediante estudios de recuperación, usando matrices con concentraciones conocidas de elementos; esto se aplica para la categoría I y categoría II. Otra manera de calcular este parámetro es usando patrones USP certificados. La exactitud también puede ser calculada al cotejar los datos obtenidos de la validación estudio frente a un método analítico ya instaurado. Además, cabe mencionar que el método de estándar agregado, también se usa para determinar la exactitud de un método, la cual se fundamenta en hallar la concentración por intersección con la curva.<sup>1</sup>

#### **2.2.1.2. Precisión**

La precisión se define como la conformidad entre los datos obtenidos, cuando se aplica dicho proceso una y otra vez a diferentes porciones de muestra de una muestra homogénea. El resultado parámetro precisión se denota por el factor de desviación estándar relativa o desviación estándar de una serie de medidas.<sup>1</sup>

#### **2.2.1.3. Repetibilidad**

La prueba de repetibilidad se calcula midiendo seis estándares diferentes al 100 % de la concentración del ensayo de valoración. Los analistas también pueden evaluar la repetibilidad a través de tres concentraciones distintas, de las cuales a su vez se hacen tres determinaciones y finalmente se hace la comparación de estas tres determinaciones, obteniéndose concentraciones similares, con lo cual se asegura la repetibilidad del ensayo.<sup>1</sup>

#### **2.2.1.4. Precisión Intermedia**

En esta prueba se somete al método a diferentes factores que podrían afectar la precisión del método como por ejemplo el tipo de instrumento, diferentes analistas, diferentes días; como mínimo se deberá combinar al menos dos de estos para así asegurar la precisión intermedia del método; haciendo un total de seis ensayos.<sup>1</sup>

#### **2.2.1.5. Especificidad**

La especificidad es la capacidad de valorar de manera irrefutable al analito en estudio en presencia de factores como productos de degradación, componentes de la matriz e impurezas.<sup>1</sup>

#### **2.2.1.6. Límite de cuantificación**

La prueba de límite de cuantificación se usa para determinar la presencia de ciertos compuestos que se encuentran en bajas concentraciones en la matriz de la muestra en estudio; dicho límite se valora calculando la desviación estándar multiplicada por diez.<sup>1</sup>

#### **2.2.1.7. Linealidad**

El ensayo de linealidad es una prueba en la que se determina que los valores obtenidos sean proporcionales o directamente proporcionales a los valores de la concentración del activo en estudio dentro de los márgenes establecidos. En esta prueba se preparan cinco estándares a cargo de los analistas y los resultados de estos deberá tener una relación lineal. La evaluación de la curva estándar, se calculará por métodos como la regresión de cuadrados mínimos; además se deberá determinar la pendiente de regresión lineal, la ordenada en el origen y el factor de correlación.<sup>1</sup>

#### **2.2.1.8. Intervalo**

El intervalo se define como el margen entre la concentración mayor y menor, para el cual el método cumple o satisface la linealidad, precisión y exactitud. El intervalo se valora satisfaciendo las condiciones de exactitud y linealidad.<sup>1</sup>

#### **2.2.1.9. Robustez**

La robustez de un método se define como la capacidad de un método analítico de no sufrir cambios frente a variaciones. La robustez de un método se puede evaluar sometiendo al método a ciertos cambios como condiciones de almacenamiento establecidas.<sup>1</sup>

#### **2.2.2. Verificación**

La verificación de un método analítico es corroborar que el procedimiento de la monografía usada sea ejecutado correctamente; el proceso también deberá ser

efectuado de manera precisa, exacta y con sensibilidad adecuada. En ciertos casos será preciso desarrollar, validar un procedimiento y en otros casos no es imprescindible la revalidación completa de un método de la monografía oficial USP.<sup>1</sup>

### **2.2.3. Cromatografía líquida de alta performance**

El método de cromatografía líquida de alta performance se define como un método de separación que consta de una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida.<sup>1</sup>

#### **2.2.3.1. Fase estacionaria**

La fase estacionaria es la zona donde los activos se eluyen por diferentes procesos como adsorción, intercambio iónico y procesos de partición. Cabe mencionar que la fase estacionaria se puede modificar si se le agregan cadenas de hidrocarburos y la mayoría de estas; contienen sílice o micro perlas de polímeros. Esta fase estacionaria a su vez cuenta con un tipo de relleno propio que se identifica con la letra L.<sup>1,2</sup>

#### **2.2.3.2. Columna cromatográfica**

La columna cromatográfica se define como el material de acero inoxidable que contiene a la fase estacionaria. La variación en el tamaño de la columna influye en la elución de los activos, dichos cambios se evidencian en el apartado de aptitud de sistema.<sup>1</sup>

#### **2.2.3.3. Fase móvil**

Se define la fase móvil como la mezcla de disolventes (fase en gradiente ) o un disolvente ( fase normal).<sup>2</sup>

#### **2.2.3.4. Cromatógrafo líquido**

Se define al cromatógrafo líquido como el equipo que tiene por partes a una bomba que impulsa a la fase móvil al sistema de alta presión, un inyector que lleva a la muestra en estudio hacia la fase móvil, una columna que es el material de acero inoxidable que contiene a la fase estacionaria, un instrumento que guarda los datos y un detector.<sup>1</sup>

La manera como se eluyen los disolventes va depender de la técnica empleada, ya sea que se hable de una elución en gradiente, esta se encontrara especificada la cantidad y el tiempo que se va emplear. Para una elución en gradiente el primer paso es saturar y equiparar el detector y la columna con la fase móvil con el fin de lograr una señal invariable.<sup>1</sup>

El cromatograma se define como la representación esquemática de la contestación del detector frente a la concentración del activo en estudio en el efluente.

Se define el volumen de residencia como la magnitud que tarda la elución a gradiente.

El volumen de fase móvil que se necesita para eluir un activo que no se ha contenido se llama volumen muerto (VM). Esta se puede calcular multiplicando la velocidad de flujo (F) por el tiempo muerto (tm).

$$VM = tm \times F$$

El tiempo que se toma para eluir un activo no contenido se denomina tiempo muerto.

Los platos teóricos se definen como la eficacia de la columna; sobre la cual influye la velocidad de flujo, calidad del relleno, el tipo de activo en estudio, temperatura de la fase móvil, espesor de las micro perlas que forman la fase estacionaria, longitud de la columna, uniformidad del relleno de la columna y el diámetro interno de la columna. Los platos teóricos para picos gaussianos se pueden calcular por la fórmula.<sup>1</sup>

$$N = 16 \left( \frac{TR}{W} \right)^2$$

- **N:** Platos teóricos
- **TR:** Tiempo de retención
- **W:** Ancho del pico en su base

Aquellos equipos con integración electrónica los platos teóricos se calculan con la siguiente fórmula.<sup>1</sup>

$$N = 5.54 \left( \frac{TR}{W_{h/2}} \right)^2$$

- **N:** Platos teóricos
- **TR:** Tiempo de retención
- **W<sub>h/2</sub>:** Ancho del pico a la mitad de la altura

Se define el pico como la parte del cromatograma que evidencia la reacción del detector cuando el activo eluye de la columna. Cuando los componentes no logran desunirse se le denomina como pico no resuelto.



## 2.2.4. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Se define los AINES como medicamentos que impiden la producción de las prostaglandinas, para impedir la actividad de la ciclooxigenasa. Este medicamento es usado para tratar problemas inflamatorios, problemas reumáticos, dolor reumático. Los AINES son medicamentos con actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria; que también se usan para curar enfermedades no reumáticas.<sup>23</sup>

### 2.2.4.1. Diclofenaco

El diclofenaco es un fármaco proveniente del ácido fenilacético con la capacidad de impedir la producción de prostaglandinas porque inhibe la actividad de la ciclooxigenasa. Este fármaco tiene características antipiréticas, antiinflamatorias y analgésicas. El diclofenaco es usado para tratar la artritis reumatoide por sus propiedades antiinflamatorias, además de que calma el dolor y el adormecimiento; dicho tratamiento mejora a las dos semanas de su uso, logrando absorberse a la 1 ó 2 horas y su vida media plasmática alcanza la 1,8 a 2,0 horas. El metabolismo de este fármaco es rápido en el hígado, lográndose expelerse por la orina y en una cantidad pequeña por la bilis.<sup>23</sup>

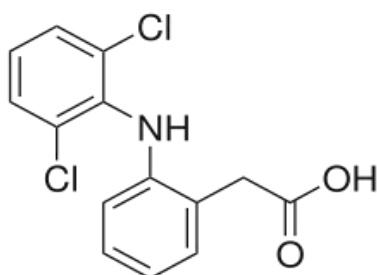


Figura 1. Estructura química del diclofenaco

#### 2.2.4.1.1. Técnicas para la cuantificación del diclofenaco

##### a. Espectrofotometría ultravioleta

En esta técnica se preparan dos medios de disolución una con cambios graduales de pH y la otra propuesta por la USP 27. La USP 27 recomienda emplear un equipo de disolución para liberar el activo en estudio y la cuantificación de esta usando un método espectroscópico UV a una longitud de onda 276 la cual satisface las exigencias de la ICH QB2. Los parámetros analizados fueron la linealidad, precisión, especificidad y exactitud.<sup>24</sup>

##### b. Determinación de diclofenaco por HPLC

La prueba de determinación de diclofenaco colirio al 0,1% por HPLC consiste en desunir al fármaco en estudio por medio de una columna de acero inoxidable de características Lichrospher 100 RP-8 endcapped (5 µm) (250 x 4 mm), a una longitud de onda de 254 nm. Para esta prueba se emplea un mix de una solución

amortiguadora de fosfato de sodio a un pH de 2,5 y una solución de metanol en la magnitud de 34:60. Seguidamente se hace una curva de calibración de 60-140 % la cual no evidencia cambios significativos y obtiene un factor de correlación de 0,9995. El factor de correlación de la prueba de repetibilidad para seis repeticiones fue de 0,39%. Las pruebas de t student y la prueba de Cochran fueron no significativas. El porcentaje de recuperación fue de 100,25 %, el método es exacto, preciso, específico y lineal para las concentraciones propuestas.<sup>25</sup>

### **c. Método potenciométrico**

Para ejecutar el método potenciométrico se prepara una muestra de 450mg de diclofenaco y a ésta se le añade 25 mL del solvente ácido acético glacial para diluir la muestra y seguidamente se procede a valorar la muestra con ácido perclórico 0,1N. Los parámetros evaluados fueron la linealidad, para la cual se elaboró una curva de calibración entre el 50-150% de concentración del principio activo en estudio, obteniéndose un factor de variación de respuesta  $\leq 5\%$  y un factor de correlación  $\geq 0,999$  para la ecuación de la recta  $y=mx+b$ . La t de student calculada frente a la t tabulada deberá ser pequeña para un nivel de significancia del 95%. La prueba de precisión intermedia se evalúa con dos analistas, y las muestras preparadas se hacen diez repeticiones; donde los criterios evaluados fueron F de varianza debe ser menor que la F tabulada para obtener un valor de significación del 95%; mientras tanto la precisión del método se evalúa por medio de los resultados de precisión intermedia y repetibilidad. La prueba de repetibilidad se efectúa en función a diez muestras.<sup>26</sup>

### **2.3. Marco legal**

En el estudio de un nuevo activo farmacéutico, las industrias farmacéuticas emplean métodos analíticos específicos que permiten cuantificar al principio activo de interés. Es por ello, para asegurar la confiabilidad de los resultados, el método analítico es sometido a un proceso de validación. Así métodos nuevos requieren validación completa, métodos farmacopeicos validación parcial o verificación, cambios significativos como cambios de equipo, fórmula, cambios de proveedores de reactivos críticos, requieren de revalidación parcial.<sup>3</sup>

A partir de ello los parámetros o pruebas establecidos según la USP y la OMS señalan cuatro categorías que están en función de la naturaleza del fármaco, haciéndose referencia a la Categoría I: productos terminados o graneles; Categoría II: impureza de fármaco-metales pesados; Categoría III: pruebas de desempeño-disolución y Categoría IV: pruebas de identificación. Además, cabe

mencionar que no existe un modelo único para validar y que los parámetros a evaluar cambian de acuerdo con los requisitos legales de las diferentes organizaciones reguladoras.<sup>3</sup>

El propósito de validar un procedimiento analítico es evidenciar que es idóneo para el propósito para el cual fue diseñado. Así entidades como Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID), la Food and Drug Administration (FDA), Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), Agencia Nacional de vigilancia Sanitaria (ANVISA), Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) y organismos oficiales como International Conference on Harmonisation (ICH), la The United States Pharmacopeia (USP), sugieren y ordenan el validar como un precedente para el adecuado desempeño de las BPL.<sup>3</sup>

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación

El estudio se realizó en el Área de Control de Calidad del laboratorio farmacéutico Cifarma S.A., ubicado en la Carretera Central 1315, distrito de Santa Anita del departamento de Lima en Perú.

#### 3.2. Población y muestra

##### 3.2.1. Población

Diclofenaco al 1 % gel, desarrollado en el laboratorio farmacéutico Cifarma S.A, exclusivamente en el departamento de investigación y desarrollo. El marco muestral fue un lote de 10000 unidades.

##### 3.2.2. Muestra

32 unidades de diclofenaco al 1 % gel (NTP ISO 2859-1- 2009), que fue obtenida según el plan de muestreo con un nivel de inspección S-4.<sup>21</sup>

#### Criterios de Inclusión

- Diclofenaco al 1 % gel del lote que cumplen con las especificaciones técnicas.

#### Criterios de exclusión

- Diclofenaco al 1 % gel del lote que no cumplen con las especificaciones técnicas.

#### 3.3. Procedimiento para la recolección de datos

##### 3.3.1. Preparación de las soluciones de trabajo

**a) Solución de metilparabeno 0,5 mg/mL.** Se tomó una fiola volumétrica de 50 mL, se pesó aproximadamente 25 mg de metilparabeno estándar de referencia, se agregó 30 mililitros de metanol, seguido se sometió a sonicación, con movimiento permanente, hasta diluir plenamente la muestra. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se llevó a volumen con metanol.

**b) Solución estándar.** En un matraz volumétrico de 50 mL, se pesó 25 mg de diclofenaco sódico estándar de referencia, se agregó 20 mL de metanol y se llevó a sonicación, con movimiento permanente, hasta diluir completamente la muestra.

Se agregó 5 mL de tetrahidrofurano y adicionó volumétricamente 5,0 mL de la solución de metilparabeno. Seguido se procedió a realizar movimientos de rotación para así atemperar la muestra. Finalmente se enrazó con metanol y se homogenizó.

**c) Solución muestra.** Se tomó una fiola volumétrica de 100 mL, se pesó cinco gramos de muestra (equivalente a 50 mg de diclofenaco sódico), se agregó 10 mL de tetrahidrofurano y se llevó a un baño de ultrasonido, con agitación constante, durante 10 minutos. Luego, se agitó magnéticamente durante diez minutos. Se agregó 60 mL de metanol y se continuó agitando magnéticamente durante diez minutos. Seguido se atemperó la muestra y finalmente se enrazó con metanol y se agitó para que todo quede uniforme.

Finalmente, las muestras se filtraron usando un filtro de membrana PVDF de dimensión 0,45 µm; pero previamente se eliminaron un par de mililitros.

### **3.3.2. Identificación de diclofenaco sódico**

La identificación de diclofenaco sódico se realizó por cromatografía líquida de alta performance. Se cotejó el tiempo en que eluye el pico de diclofenaco sódico en los cromatogramas de la solución muestra y la solución estándar, según el procedimiento de evaluación de contenido. La especificación consistió en comparar los tiempos que eluye el pico de diclofenaco sódico del cromatograma de la solución muestra con el pico de diclofenaco sódico del cromatograma de la solución estándar, las cuales deberían ser similares.

### **3.3.3. Valoración de diclofenaco sódico**

La valoración de diclofenaco se realizó por cromatografía líquida de alta performance usando un cromatógrafo líquido Agilent modelo 1260. Las condiciones de trabajo fueron H.R ≤ 70 % y a ≤ 25° centígrados. Como fase estacionaria se empleó un material de acero inoxidable con relleno L7 de diámetro 5 µm de dimensiones 4,6 mm x 25 cm con relleno L7 y de 5 µm. La fase móvil es un mix de metanol: solución amortiguadora buffer fosfato pH 2,8 (7:3). Las condiciones cromatográficas correspondieron a una velocidad de flujo de 1 mL/min, volumen de inyección de 20 µL, temperatura de 4 °C, tiempo de corrida de 15 min. La absorbancia se midió a 254 nm.

El contenido de diclofenaco sódico se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Diclofenaco sódico} = \frac{\text{Amp}_2}{\text{Ast}_2} \times \frac{\text{Pst}_2}{50} \times \frac{\text{Pot}_2}{100} \times \frac{100}{\text{Pmp}} \times 100$$

Donde:  $A_{st_2}$  es el área del pico de diclofenaco sódico de la solución estándar de referencia;  $Pot_2$  es la potencia (%) del diclofenaco sódico estándar de referencia  $A_{mp_2}$  es el área del pico de diclofenaco sódico de la solución muestra;  $P_{st_2}$  es el peso (mg) de diclofenaco sódico estándar de referencia; y  $P_{mp}$  es el peso (mg) de la solución muestra.

Se calculó la desviación estándar relativa (o coeficiente de variación) en inyecciones sucesivas para el diclofenaco sódico en la solución estándar.

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

$$DSR \text{ o } CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$$

- **S:** Desviación estándar
- **X<sub>i</sub>:** Datos individuales
- **X:** Promedio
- **DSR:** Desviación estándar relativa

### 3.3.4. Validación del método

#### 3.3.4.1. Adecuabilidad

Se preparó una sola solución estándar (metilparabeno 0,05 mg/mL; diclofenaco sódico 0,5mg/mL) y se inyectó cinco veces, según las condiciones cromatográficas de la valoración. Se calculó el coeficiente de variación ( $\leq$  a 2 %), se reportaron el tiempo de retención, área ( $CV \leq 2 \%$ ); mientras que los platos teóricos ( $N$ ) y asimetría ( $A_s$ ) se reportó a modo de información.

$$N = 16(t_R/W)^2$$

Donde:  $t_R$ : tiempo de retención;  $W_1$ : ancho del pico.

$$A_s = W_{0,05}/2f$$

Donde:  $f$  es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5 % de la altura desde la línea base y  $W_{0,05}$ : ancho del pico al 5 % de la altura.

#### 3.3.4.2. Especificidad

##### 3.3.4.2.1. Evaluación de las interferencia y recuperación

Para la evaluación se preparó por duplicado las siguientes soluciones:

**Diluyente y fase móvil.** Se dispuso a organizar el diluyente y la fase móvil de acuerdo a lo señalado en el procedimiento de la valoración de diclofenaco sódico. Se realizaron dos inyecciones.

**Estándar interno.** Se preparó por duplicado solución de metilparabeno según lo indicado en la preparación de las soluciones de trabajo. Se transfirió 5 mL de la solución de metilparabeno a un matraz volumétrico de 20 mL y se completó a volumen con diluyente.

**Placebo.** Se pesó 5 g de muestra placebo en una fiola volumétrica de 100 mL, seguidamente se añadió 10 mL de tetrahidrofurano y luego se sonicó con movimiento por lo menos 10 minutos. Se añadió 60 mL del solvente metanol y se agitó magnéticamente por 10 minutos, luego se enfrió a temperatura ambiente y se enrazó a volumen con metanol. Se dispuso a ejecutar por duplicado el placebo.

**Solución estándar y muestra.** Se preparó por duplicado solución de metilparabeno según lo indicado en la preparación de las soluciones de trabajo. Se filtró todas las soluciones de trabajo por membrana PVDF de 0,45 µm de diámetro; pero previamente se eliminó los primeros mililitros.

El porcentaje de interferencia del diluyente, la fase móvil, placebo, estándar interno, no deben exceder al 2 % de recuperación; mientras la resolución ( $R$ ) del pico principal con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Cantidad hallada}}{\text{Cantidad agregada}} \times 100$$

$$\text{Resolución} = 2 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

Donde:  $t_{R2} - t_{R1}$ : tiempos de retención de los dos componentes;  $W_1 + W_2$ : ancho de los picos.

Para la evaluación de la especificidad también se realizó pruebas de degradación del placebo y de la muestra.

#### **3.3.4.2.2. Pruebas de degradación de placebo**

Se pesó 5g de placebo en una fiola volumétrica de 100mL, seguido se añadió 10 mL de tetrahidrofurano y se sonicó por 10 minutos con movimiento constante. Se agregó 60 mL de metanol y se continuó agitando magnéticamente durante 10 minutos. Antes de completar a volumen la solución, se varió el procedimiento según la prueba de degradación, como se detalla a continuación:

**a. Degradación térmica.** Se sometió la solución a un baño maría de 70 °C por 1 hora, luego se pasó a atemperar a medio ambiente y finalmente se enrazó a volumen con metanol y se homogenizó.

**b. Degradación ácida.** A la solución se añadió 2,0 mL de una solución de ácido clorhídrico al 2 N, después de 5 minutos se neutralizó con una solución de

hidróxido de sodio 2 N, en cantidad 2 mL. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se llevó a volumen con metanol y se homogenizó.

**c. Degradación alcalina.** Se añadió una solución de hidróxido de sodio 2N en cantidad de 2,0 mL, luego de 5 minutos se adicionó 2,0 mL de ácido clorhídrico 2N, para neutralizar. Finalmente se dejó atemperar a medio ambiente y se enrazó a volumen con metanol y se homogenizó.

**d. Degradación oxidativa.** A la solución se añadió 1 mL de peróxido de hidrogeno 30 volúmenes y se reposó por 5 minutos. Finalmente se atemperó a medio ambiente y luego se enrazó a volumen con metanol y se homogenizó.

**e. Degradación por luz UV a 254 nm.** La solución se expuso a radiación ultravioleta de longitud de onda 254 nanómetros por tres horas. Seguido se dejó atemperar a medio ambiente y se enrazó con metanol a volumen y se homogenizó. Las soluciones se pasan por medio de filtro PVDF de 0,45 µm de diámetro, descartando los primeros mililitros. Todas las pruebas de degradación se realizaron por duplicado.

Las soluciones de trabajo fueron evaluadas teniendo en cuenta el proceso de valoración y el valor porcentual de interferencia en todos los ensayos de degradación del placebo que no debe exceder del 2 % de recuperación.

#### **3.3.4.2.3. Pruebas de degradación de la muestra de diclofenaco 1 % gel**

Para la prueba de degradación se transfirió 5 g de muestra a una fiola volumétrica de 100mL, luego se agregó 10mL de tetrahidrofurano y se llevó a sonicación con movimiento constante durante 10 minutos. Se agregó 60 mL de metanol y se continuó agitando magnéticamente durante 10 minutos. Antes de completar a volumen la solución, se varió el procedimiento según la prueba de degradación, como se detalla a continuación:

**a. Degradación térmica.** Se procedió tal como se detalla en el procedimiento de degradación del placebo.

**b. Degradación ácida.** Se procedió tal como se detalla en el procedimiento de degradación del placebo.

**c. Degradación alcalina.** Se procedió tal como se detalla en el procedimiento de degradación del placebo.

**d. Degradación oxidativa.** Se procedió tal como se detalla en el procedimiento de degradación del placebo.

**e. Degradación por luz UV 254 nm.** Se procedió tal como se detalla en el procedimiento de degradación del placebo.



Las soluciones se filtraron por medio de filtro PVDF de 0,45 µm de diámetro, para lo cual previamente se eliminó los primeros mililitros. Todas las pruebas de degradación se realizaron por duplicado.

Las soluciones se realizaron teniendo en cuenta el proceso de valoración y el valor porcentual de recuperación en todas las pruebas de degradación de la muestra no debe sobrepasar el 2 % de lo teórico. Además, la resolución del pico principal (*R*) con cualquier otro pico no debe ser menor a 1.

### 3.3.4.3. Exactitud

Se prepararon dos soluciones estándar según el procedimiento para la valoración. Se prepararon soluciones de la muestra por triplicado a tres concentraciones (80, 100 y 120 %) y a cada muestra se le adicionó placebo y estándar de diclofenaco sódico según la cantidad indicada en la Tabla 2, luego se le adicionó 10 mL de tetrahidrofurano y finalmente se completó a volumen con metanol. Se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas del procedimiento de valoración.

Se calculó el porcentaje de recuperación (98-102%), el coeficiente de variación ( $\leq 2$  %). Se comparó la recuperación promedio con el 100,0% a través de la prueba de T de Student.

$$t_{exp} = \frac{|100 - \bar{x}| \times \sqrt{n}}{\%CV}$$

Donde: *n*: número de repeticiones; %CV: coeficiente de variación;  $\bar{x}$ : recuperación promedio.

Asimismo, se evaluó el efecto del nivel de concentración sobre el porcentaje de recuperación, a través del Prueba de Cohran.

$$G_{exp} = \frac{S_{máx}^2}{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2}$$

**Tabla 2.** Cantidad de diclofenaco sódico para la prueba de exactitud.

Concentración (%)	Equivalente a	Estándar de diclofenaco sódico (g)	Placebo (g)
80,0	0,40 mg/mL	0,04	4,96
100,0	0,50 mg/mL	0,05	4,95
120,0	0,60 mg/mL	0,06	4,94

Las concentraciones abarcaron el rango de trabajo de este producto (90–110 %).

### 3.3.4.4. Precisión

Se evaluó la precisión del método y la precisión del sistema.

**a. Precisión del sistema.** Preparar una sola solución estándar según el procedimiento de valoración. Se inyectó la solución seis veces bajo las mismas condiciones cromatográficas de la valoración. Se evaluó el coeficiente de variación de las áreas ( $CV \leq 2,0 \%$ ) y la desviación estándar.

**b. Precisión del método.** Se estimó la precisión intermedia y la repetibilidad.

**Repetibilidad.** El primer analista preparó dos soluciones estándar y seis soluciones muestra según el procedimiento de valoración bajo las mismas condiciones cromatográficas. Se evaluó el intervalo de confianza (IC) y el factor de variación ( $CV \leq 2 \%$ ).

$$IC = \bar{x} \pm \frac{t \times S}{\sqrt{n}}$$

Donde:  $\bar{x}$  es el promedio;  $t$  es el valor de Prueba de T de Student (para  $n-1$  grados de libertad y  $\alpha$  igual a 0,05);  $n$  es el número de mediciones y  $S$  es la desviación estándar.

**Precisión intermedia.** Un segundo analista preparó dos soluciones estándar y seis soluciones muestra según lo señalado en el procedimiento de valoración y bajo las mismas condiciones cromatográficas. Se compararon los resultados del factor de variación ( $CV \leq 2 \%$ ) entre uno y otro analista.

### 3.3.4.5. Linealidad

Se evaluó la linealidad del sistema y la linealidad del método.

**a. Linealidad del sistema.** Se pesó por triplicado el estándar de diclofenaco correspondientes a concentraciones de 80, 90, 100, 110 y 120 % (Tabla 3) se determinó el contenido de diclofenaco sódico según el procedimiento de valoración y bajo las mismas condiciones cromatográficas. Se evaluó la curva de calibración, la recta de regresión, análisis de la varianza, factor de correlación ( $r > 0,995$ ), Prueba de T de Student ( $t_{\text{exp}} > t_{\text{tabla}}$ ), factor de determinación ( $r^2 > 0,990$ ) y test de linealidad ( $f < 5 \%$ ).

**Tabla 3.** Concentración de diclofenaco sódico para la prueba de linealidad.

Concentración (%)	Estándar de diclofenaco sódico (mg)	Equivalente a (mg/mL)
80,0	20,0	0,0040
90,0	22,5	0,0045
100,0	25,0	0,0050
110,0	27,5	0,0055
120,0	30,0	0,0060

Las concentraciones abarcaron el rango de trabajo de este producto de 90-110%.

**b. Linealidad del método.** Se pesó por triplicado el estándar de diclofenaco sódico para obtener el estándar a concentraciones de 80, 90, 100, 110 y 120 % (Tabla 4). Se transfirió a una fiola de 100 mL y se adicionó el peso de placebo señalado en la Tabla 4, se agregó 10 mL de tetrahidrofurano y finalmente se llevó a volumen con metanol. Se usaron las mismas condiciones cromatográficas del procedimiento de valoración. Se evaluó la curva de calibración, recta de regresión, Prueba de T de Student ( $t_{exp} < t_{tabla}$ ) el factor de correlación ( $r > 0,995$ ), Prueba de linealidad ( $f < 5 \%$ ), análisis de la varianza y el factor de determinación ( $r^2 > 0,990$ ).

**Tabla 4.** Concentración de diclofenaco sódico para la prueba de linealidad.

Concentración (%)	Estándar de diclofenaco sódico (g)	Equivalente a (mg/mL)	Placebo (g)
80,0	40,0	0,040	4,960
90,0	45,0	0,045	4,955
100,0	50,0	0,050	4,950
110,0	55,0	0,055	4,945
120,0	60,0	0,060	4,940

#### 3.3.4.6. Robustez

Se evaluó la estabilidad de la muestra las 24 horas de preparado y el cambio del volumen de inyección a 10  $\mu$ L.

**a. Estabilidad de las muestras a las 24 h.** Se tomaron como muestras a las seis soluciones muestras y las dos soluciones estándar del proceso de repetibilidad preparadas 24 horas antes y se compararon los resultados obtenidos frente a los resultados de la repetibilidad. Se evaluó el coeficiente de variación ( $CV \leq 3 \%$ ).

**b. Cambio en el volumen de inyección 10  $\mu$ L.** Se preparó dos soluciones estándar y seis soluciones muestra según el procedimiento de valoración, bajo las mismas condiciones cromatográficas excepto el volumen de inyección que se cambiará a 10  $\mu$ L y se compararon los resultados obtenidos frente a los resultados de la repetibilidad. Se evaluó el coeficiente de variación ( $CV \leq 2 \%$ ).

#### 3.4. Tipo de investigación

La investigación es de tipo descriptiva.<sup>27</sup>

### **3.5. Diseño de investigación**

El diseño es el transeccional descriptivo.<sup>27</sup>

### **3.6. Análisis de datos**

Para los análisis de los resultados se utilizó el software Microsoft Excel y el programa SPSS 22.0. Se calculó la Prueba de Cochran y la Prueba de T de Student a un 95% de nivel de confianza, el factor de variación en porcentaje (%CV), factor de desviación estándar relativa (DSR), el factor de correlación de Pearson ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).<sup>28</sup>

## **IV. RESULTADOS**

**Tabla 5.** Evaluación de la aptitud del sistema de la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

Repetición	Metilparabeno				Diclofenaco sódico			
	$t_R$	Área	$N$	$A_s$	$t_R$	Área	$N$	$A_s$
1	3,747	25331999,0	3171,0	1,176	10,493	47970569,0	8400,0	1,102
2	3,747	25322743,0	3161,0	1,175	10,493	47951220,0	8398,0	1,103
3	3,747	25353539,0	3161,0	1,189	10,493	48016873,0	8414,0	1,110
4	3,747	25337127,0	3174,0	1,147	10,493	47945953,0	8404,0	1,090
5	3,747	25343694,0	3171,0	1,175	10,493	48004278,0	8413,0	1,105
<b>Promedio</b>	3,747	25337820,4	3167,6	1,172	10,493	47977778,6	8405,8	1,102
<b>S</b>	0,000	11654,1	6,15	0,015	0,000	31625,9	7,362	0,007
<b>%CV</b>	0,000	0,046	0,19	1,313	0,000	0,066	0,088	0,670
<b>Mínimo</b>	3,747	25322743,0	3161	1,147	10,493	47945953,0	8398,0	1,090
<b>Máximo</b>	3,747	25353539,0	3174	1,189	10,493	48016873,0	8414,0	1,110

Nota: Especificación para el diclofenaco sódico: Área:  $CV \leq 2,0\%$ ;  $t_R$  (tiempo de retención):  $CV \leq 2\%$ ; Conforme;  $N$  (Platos teóricos).  $A_s$  (asimetría);  $DS$ : desviación estándar;  $\%CV$ : porcentaje de coeficiente de variación.

**Tabla 6.** Evaluación de la especificidad en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

Componente	Peso (mg/g)	Factor	$t_R$ (min)	Área		Promedio de Área	Contenido (g/100g)	Recuperación (%)	R (min)
Fase móvil 1	-	0,0200	-	0	0	0	0,00	0,00	0,0
Fase móvil 2	-	0,0200	-	0	0	0	0,00	0,00	0,0
Diluyente 1	-	0,0200	-	0	0	0	0,00	0,00	0,0
Diluyente 2	-	0,0200	-	0	0	0	0,00	0,00	0,0
Placebo 1	5000,93	0,019996	-	0	0	0	0,00	0,00	0,0
Placebo 2	5009,55	0,01996	-	0	0	0	0,00	0,00	0,0
Muestra 1	5003,38	0,019986	9,807	47993725	47956704	47975215	1,0125	101,25	15,11
Muestra 2	5009,63	0,019962	9,807	47839090	47689697	47764394	1,0068	100,68	15,14

Nota: Recuperación: 98,0-102,0 %; Interferencia (Área  $\leq$  2,0 % de Recuperación); R: Resolución: > 1: Conforme  $t_R$ : tiempo de retención.

**Tabla 7.** Pruebas de degradación del placebo para la evaluación de la especificidad en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

Prueba de degradación	Peso (mg/g)	Factor	$t_R$ (min)	Áreas		Promedio de Áreas	Contenido (g/100g)	Recuperación (%)	R (min)
Térmica 1	5002,35	0,019991	-	0	0	0	0,00	0,0000 %	-
Térmica 2	5008,93	0,019964	-	0	0	0	0,00	0,0000 %	-
Ácida 1	5000,77	0,019997	-	0	0	0	0,00	0,0000 %	-
Ácida 2	5009,39	0,019963	-	0	0	0	0,00	0,0000 %	-
Alcalina 1	5004,51	0,019982	-	0	0	0	0,00	0,0000 %	-
Alcalina 2	5019,83	0,019921	-	0	0	0	0,00	0,0000 %	-
Oxidativa 1	4999,90	0,020000	-	0	0	0	0,00	0,0000 %	-
Oxidativa 1	5010,95	0,019956	-	0	0	0	0,00	0,0000 %	-
Exp. UV 1	5003,91	0,019984	-	0	0	0	0,00	0,0000 %	-
Exp. UV 2	5014,99	0,019940	-	0	0	0	0,00	0,0000 %	-

Nota: Interferencia (Área  $\leq$  2,0 % de Recuperación) Conforme; Exp. UV: Exposición a luz UV.



**Tabla 8.** Pruebas de degradación de la muestra para la evaluación de la especificidad en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

Prueba de degradación	Peso (mg/g)	Factor	$t_R$ (min)	Áreas		Promedio de Áreas	Contenido (g/100g)	Recuperación (%)	R (min)
Térmica 1	5001,63	0,019993	9,80	47710856	47600697	47655777	1,01	100,62 %	14,98
Térmica 2	5007,45	0,019970	9,80	47912653	48249971	48081312	1,01	101,40 %	14,98
Ácida 1	5004,58	0,019982	9,81	46932519	46946832	46939676	0,99	99,05 %	16,21
Ácida 2	5011,99	0,019952	9,81	48017037	47962366	47989702	1,01	101,11 %	16,14
Alcalina 1	5004,27	0,019983	9,81	47539194	47600093	47569644	1,00	100,38 %	16,14
Alcalina 2	5011,53	0,019954	9,81	47691138	47722500	47706819	1,01	100,52 %	16,18
Oxidativa 1	5001,05	0,019996	9,82	46892858	46816425	46854642	0,99	98,94 %	16,26
Oxidativa 1	5008,16	0,019967	9,83	47551548	47481193	47516371	1,00	100,19 %	16,32
Exp. UV 1	5003,10	0,019988	9,80	47360824	47328150	47344487	1,00	99,93 %	15,15
Exp. UV 2	5010,10	0,019960	9,79	47656049	47676757	47666403	1,00	100,47 %	15,00

Nota: Recuperación: 98,0-102,0 %; R: Resolución: > 1: Conforme;  $t_R$ : tiempo de retención

**Tabla 9.** Evaluación de la exactitud en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

Solución muestra (%)	St (mg)	Áreas			Recuperación (%)	Recuperación promedio (%)
80,0	40,05	37813628	37548816	37403493	100,57	
80,0	40,30	37418849	37126033	37183587	99,02	99,9
80,0	40,13	37462077	37456585	37567549	100,12	
100,0	49,97	46722434	47141384	46864193	100,59	
100,0	50,08	46765990	46651209	46894229	100,07	100,5
100,0	50,39	47084595	47433644	47589673	100,73	
120,0	60,07	55851680	55947572	56139514	99,85	
120,0	60,08	55969373	55811957	55784159	99,62	99,9
120,0	60,82	57056108	56848559	56614077	100,14	
Promedio					100,1	100,1
S					0,54	0,33
DSR ó CV (%)					0,54	0,33

Nota: Recuperación: 98-102%; CV:  $\leq$  2,0 %

**Tabla 10.** Efecto del nivel de concentración sobre la recuperación en la evaluación de la exactitud en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

Solución muestra (%)	St (mg)	Área promedio	Factor respuesta	S <sup>2</sup>
80,0	40,05	37588646	938542,96	
80,0	40,30	37242823	924139,53	54879175,02
80,0	40,13	37495404	934348,46	
100,0	49,97	46909337	938749,99	
100,0	50,08	46770476	933915,26	10459040,39
100,0	50,39	47369304	940053,66	
120,0	60,07	55979589	931905,92	
120,0	60,08	55855163	929679,81	5954560,33
120,0	60,82	56839581	934554,12	
		Promedio	933987,74	
		S	5007,00	
		CV (%)	0,54	

Nota: Prueba de Cochran (p: 0,05; n-1 grados de libertad;  $t_{tablas}$ : 0,8709;  $t_{exp}$ : 0,7698): Prueba de T de Student (p: 0,05; n-1 grados de libertad; bilateral;  $t_{tablas}$ : 2,306;  $t_{exp}$ : 0,435): Conforme

**Tabla 11.** Precisión del sistema en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

ST	Factor ST	Área	Factor/Área
ST <sub>1</sub>	0,504652	47950245	0,000000010524
ST <sub>2</sub>	0,504652	47970569	0,000000010520
ST <sub>3</sub>	0,504652	47951220	0,000000010524
ST <sub>4</sub>	0,504652	48016873	0,000000010510
ST <sub>5</sub>	0,504652	47945953	0,000000010525
ST <sub>6</sub>	0,504652	48004278	0,000000010513
Promedio		47973189	0,000000010519
S		30438	0,000000000007
CV (%)		0,06	0,06

Nota: Área (CV:  $\leq 2,0$  %): Conforme

**Tabla 12.** Repetibilidad en la precisión del método en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

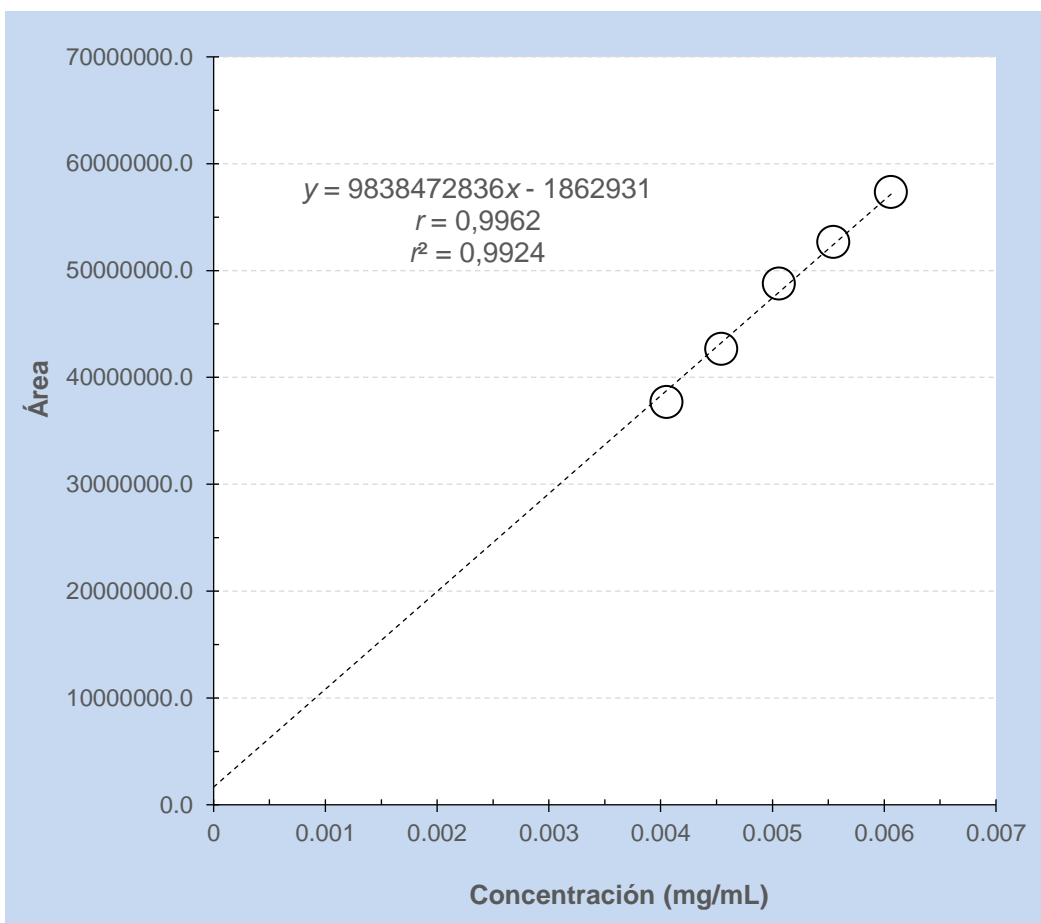
Muestra (mg)	Factor muestra	Área	Área Promedio	Contenido (g/100g)	Recuperación (%)	
5004,96	1,9980180	48618692	48448824	48533758	1,0140	101,40
5003,33	1,9986689	48883854	49034318	48959086	1,0232	102,32
5009,64	1,9961514	49579449	49602145	49590797	1,0351	103,51
5007,48	1,9970125	48696248	48594828	48645538	1,0158	101,58
5008,39	1,9966496	49578456	49607394	49592925	1,0354	103,54
5009,98	1,9960160	49945327	50028845	49987086	1,0433	104,33
				Promedio (%)	1,0278	102,78
				S	0,0119	1,19
				RSD o CV (%)	1,16	1,16
				LI	1,0153	101,53
				LS	1,0403	104,03

Nota: Contenido y recuperación (CV:  $\leq 2,0$  %): Conforme; LI: límite inferior; LS: Límite superior

**Tabla 13.** Precisión intermedia en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

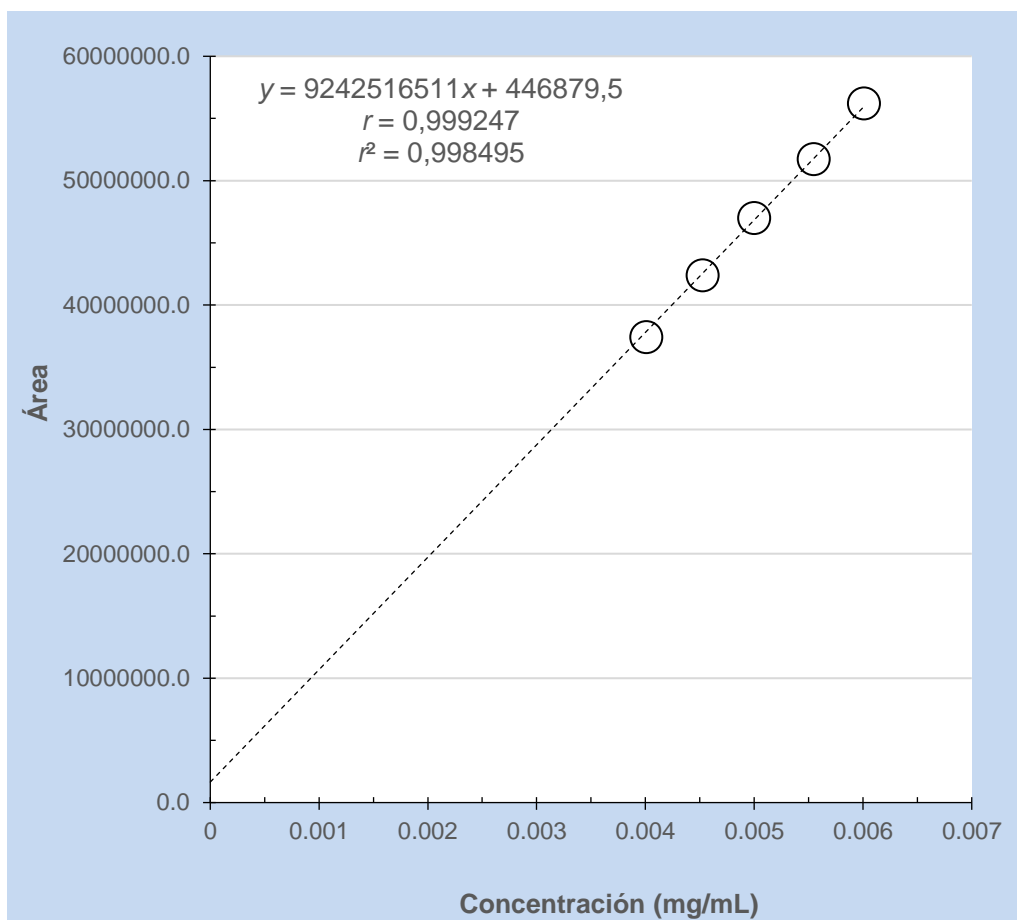
Muestra (mg)	Factor muestra	Áreas		Área Promedio	Contenido (g/100g)	Recuperación (%)
5098,10	1,9615151	6695,6724	6693,8145	6695	1,0159	101,59
5005,53	1,9977904	6558,3755	6560,7412	6560	1,0138	101,38
5050,52	1,9799941	6636,1406	6633,6924	6635	1,0163	101,63
4996,90	2,0012408	6561,7095	6557,7715	6560	1,0156	101,56
5106,76	1,9581888	6696,6006	6698,6836	6698	1,0147	101,47
5022,70	1,9909610	6723,1958	6595,7935	6659	1,0258	102,58
Promedio					1,0170	101,70
S					0,0044	0,44
RSD o CV (%)					0,43	0,43
LI					1,0124	
LS					1,0216	
		1er Analista*	Contenido (g/100g)		1,0278	
		2do Analista	Contenido (g/100g)		1,0170	
Promedio					1,0224	
S					0,0076	
RSD o CV (%)					0,74	

Nota: Contenido (CV  $\leq$  2,0 %): Conforme; \*corresponde al resultado de repetibilidad; LI: límite inferior; LS: Límite superior



Nota: Prueba de linealidad:  $f = 1,5 \%$ : Conforme  
 Análisis de varianza:  $b = 9,8 \times 10^9 \pm 5,1 \times 10^8$ ;  $t_{exp}(41,1) > t_{tabla}(2,16)$ : Conforme  
 Prueba de Proporcionalidad:  $a = -1,8 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^6$ ;  $t_{exp}(1,5) < t_{tabla}(2,16)$ : Conforme  
 Coeficiente de correlación:  $r = 0,9961 > 0,995$ : Conforme  
 Coeficiente de determinación:  $r^2 = 0,9923 > 0,990$ : Conforme

**Figura 2.** Linealidad de sistema en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.



Nota: Prueba de linealidad:  $f = 0,6\%$ : Conforme  
 Análisis de varianza:  $b = 9,2 \times 10^9 \pm 2,1 \times 10^8$ ;  $t_{exp}(92,8) > t_{tabla}(2,16)$ : Conforme  
 Prueba de Proporcionalidad:  $a = 4,5 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^6$ ;  $t_{exp}(0,88) < t_{tabla}(2,16)$ : Conforme  
 Factor de correlación:  $r = 0,9992 > 0,995$ : Conforme  
 Factor de determinación:  $r^2 = 0,9985 > 0,990$ : Conforme

**Figura 3.** Linealidad de método en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performancia.



**Tabla 14.** Estabilidad del diclofenaco sódico a las 24 horas en la prueba de robustez en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

Muestra (mg)	Factor muestra	Áreas		Promedio	Contenido (g/100g)	Recuperación (%)
5004,96	1,9980180	50065694	49849466	49957580	1,0023	100,2
5003,33	1,9986689	50029442	49994063	50011753	1,0037	100,4
5009,64	1,9961514	52656033	52721379	52688706	1,0561	105,6
5007,48	1,9970125	49280258	49322180	49301219	0,9886	98,9
5008,39	1,9966496	51988925	52041642	52015284	1,0429	104,3
5009,98	1,9960160	52442232	52556768	52499500	1,0522	105,2
Promedio					1,0243	102,4
S					0,0294	2,9384
RSD o CV (%)					2,8687	2,8687
LI					1,0124	
LS					1,0216	
		1er Analista*	Contenido (g/100g)	1,0278		
		2do Analista	Contenido (g/100g)	1,0170		
			Estabilidad 24 horas	1,0243		
Promedio					1,0224	
S					0,0076	
RSD o CV (%)					0,5365	

Nota: Contenido (CV ≤ 3,0 %): Conforme; LI: límite inferior; LS: Límite superior

**Tabla 15.** Cambio de volumen de inyección en la prueba de robustez en la validación del método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1 % gel por cromatografía líquida de alta performance.

Muestra (mg)	Factor muestra	Áreas		Promedio	Contenido (g/100g)	Recuperación (%)
5004,96	1,9980180	24319840	24342392	24331116	1,0353	103,5
5003,33	1,9986689	24432550	24453509	24443030	1,0404	104,0
5009,64	1,9961514	25065932	24988486	25027209	1,0640	106,4
5007,48	1,9970125	23965022	23995125	23980074	1,0199	102,0
5008,39	1,9966496	24513491	24572472	24542982	1,0436	104,4
5009,98	1,9960160	24562276	24234583	24398430	1,0372	103,7
				Promedio	1,0401	104,0
				S	0,0143	1,4 297
				RSD	1,3746	1,3746
				LI	1,0251	
				LS	1,0551	
		1er Analista*	Contenido (g/100g)	1,0278		
		2do Analista	Contenido (g/100g)	1,0170		
			Robustez 10 µL	1,0401		
			Promedio	1,0283		
			S	0,0112		
			RSD o CV (%)	1,1211		

Nota: Contenido (CV ≤ 2,0 %): Conforme; LI: límite inferior; LS: Límite superior

## V. DISCUSIÓN

La valoración de la calidad de un producto farmacéutico está bajo la dependencia de reglamentos; así la BPF señala que los métodos usados deben cumplir con los parámetros de confiabilidad y exactitud. Dichas normas forman parte del proceso conocido como validación. La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.<sup>1</sup>

Es así que, el Decreto Supremo Nro. 016-2011-SA que reglamenta Ley de Productos Farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios, Ley Nro. 29459, señala en su artículo 31, en relación a las técnicas analíticas, proceso de fabricación y las especificaciones técnicas que si la técnica analítica no se halla en los libros oficiales de la farmacopea o si en su defecto varia; pues el analista deberá probar con documentación que la validación de la técnica analítica propia cumple con los parámetros establecidos .

En este contexto, el diclofenaco gel 1% es una forma farmacéutica cuya monografía no está incluida en ninguna farmacopea, por lo que se requiere la validación y desarrollo de la técnica analítica que asevere su calidad. Razón por la cual se planteó como objetivo del presente estudio validar el método analítico de cuantificación del diclofenaco 1% gel por cromatografía líquida de alta performance.

Los diversos ensayos farmacopeicos van desde pruebas simples de atributos hasta pruebas más estrictas; razón por la cual ciertos procesos requieren de diseños de validación, que se clasifican en categorías que va desde la categoría I hasta la categoría IV. Para este caso de la validación del método analítico de cuantificación del diclofenaco 1% gel por cromatografía líquida de alta performance, se utilizó las características de desempeño analítico de la Categoría I, referida a procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes

principales de fármacos a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos terminados en incluye medir la exactitud, precisión, especificidad, linealidad e intervalo.<sup>2</sup>

Entre los resultados de este estudio, en la Tabla 5 se presenta la evaluación de la **aptitud del sistema** en la validación del método analítico de la cuantificación del diclofenaco 1% gel por cromatografía líquida de alta performance. Las pruebas de aptitud del sistema se usan para verificar que el sistema cromatográfico es adecuado (adecuabilidad) para el análisis que se pretende efectuar. Para ello se realizaron inyecciones repetidas del estándar de diclofenaco y se compararon entre sí el área y el tiempo de retención, con el fin de resolver si satisface los requerimientos de precisión. En este estudio el área fue de 47977778,6 y el tiempo de retención de 10,493 minutos, con valores de coeficiente de variación menor al 2%, por lo que se determinó la conformidad en el ensayo de adecuabilidad para el método analítico de cuantificación del diclofenaco 1% gel mediante HPLC.

Los ensayos de aptitud de sistema es un segmento muy importante dentro de los métodos analíticos por HPLC ; esto con el fin de aseverar que el método analítico es el propicio para el fin para el cual fue propuesto.<sup>2</sup>

La siguiente característica de desempeño analítico evaluada fue la **especificidad**. La prueba de especificidad se precisa como la competencia de estimar al analito en estudio en presencia de ciertos componentes como productos degradación , componentes de la matriz e impurezas.<sup>2</sup> Para ello, se evaluó las posibles interferencias debido a la fase móvil, al diluyente y placebo. En la Tabla 6, se evidencia que el porcentaje de interferencia para las condiciones evaluadas en función de la recuperación fue de 0,0%, los cuales cumplen con los criterios de conformidad ( $\leq 2\%$ ). Asimismo, se evaluó la especificidad en función al porcentaje de recuperación de diclofenaco en la muestra por duplicado, obteniéndose valores de 101,25 y 100,68%, los cuales se encuentran dentro del límite de especificación (98-102%); así como, la resolución fue de 15,11 y 15,14 min. (especificación:  $> 1$ ). Para la evaluación de la especificidad, también se realizó las pruebas de degradación del placebo y de la muestra. En las pruebas de degradación del placebo, el porcentaje de degradación, no se evidenciaron interferencias en ninguna de las condiciones de degradación (Tabla 7), siendo conforme la prueba de especificidad (Especificación: Área  $\leq 2\%$  de recuperación). Mientras que, en la prueba de degradación de la muestra, el porcentaje de recuperación obtenido no excedió el 2% de su contenido hallado (contenido= 0,01 g/100g) para todas las

condiciones de la prueba de degradación; así como, la resolución del pico principal frente a otro pico no fue inferior a 1 (Tabla 8). Por lo tanto, la especificidad si cumple para el método analítico de cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC.

En la Tabla 9, se presenta las respuestas del ensayo de **exactitud**. El parámetro exactitud se define como la cercanía entre uno y otro resultado respecto al valor verídico.<sup>2</sup> En la Tabla 9, se observa que el porcentaje de recuperación fue de 100,1%, valor que cumple los criterios de especificación de 98,0 a 102,0% de lo declarado. Además, el coeficiente de variación de la recuperación fue de 0,33%, valor menor a 2% (especificación). Para la exactitud, también se evaluó el efecto del nivel de concentración sobre la recuperación, a través de las pruebas estadísticas de G de Cochran y de T de Student. En la Tabla 10, se evidencia un valor de G experimental de 0,7698 y un valor de G de tablas de 0,8709; asimismo, se obtuvo un valor de T experimental de 0,435, menor al valor de T de tablas (2,306), por lo que se acepta la hipótesis nula y se concluye que el método es el porcentaje de recuperación (100,1) es estadísticamente similar al valor referencial (100,0%). Las respuestas del ensayo de exactitud si satisface los requisitos del método analítico de cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC, para el parámetro de exactitud.

Para la evaluación de la **precisión**, se realizó las pruebas de precisión del sistema y la precisión del método (repetibilidad y precisión intermedia). El parámetro precisión se define como el grado de correspondencia entre los resultados, cuando se realizan diversas toma de muestra a una muestra homogénea.<sup>2</sup> En la (Tabla 11) de precisión del sistema se consiguió un valor del factor de variación del área de 0,06%, valor menor al de especificación (< 2%). En la evaluación de la precisión del método, en la prueba de repetibilidad (Tabla 12), se obtuvo un valor de coeficiente de variación del contenido de diclofenaco de 1,16% que cumple con el valor de especificación ( $\leq 2\%$ ); asimismo, el intervalo de confianza del contenido de diclofenaco fue de 1,0153 a 1,0403 mg/100g. En la prueba de precisión intermedia (Tabla 13), se evidenció un valor de coeficiente de variación del contenido de diclofenaco de 0,74% al comparar los resultados de dos analistas, valor que cumple con lo especificado ( $\leq 2\%$ ). Los resultados de la evaluación de la precisión, evidencia que el método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC cumple con la característica de desempeño analítico de precisión.

Para la característica de desempeño de **linealidad** se evaluó la linealidad de sistema y linealidad del método; razón por la cual se halló la ecuación de la recta, coeficiente de determinación y el coeficiente de correlación. Asimismo, se realizó la prueba de linealidad, análisis de varianza de la pendiente y la prueba de proporcionalidad para un nivel de confianza del 95 %. La linealidad se define como la competencia para alcanzar respuestas de razón directa o indirecta; por aplicación de fórmulas matemáticas estrictamente determinadas a la concentración del analito en estudio dentro de intervalos ya definidos.<sup>2</sup>

La evaluación de la linealidad del sistema (Figura 2), se obtuvo en la ecuación de la recta ( $y = 9838472836x - 1862931$ ) un valor de coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,9924 y factor de correlación ( $r$ ) de 0,9962; valores que satisfacen los requisitos de conformidad ( $r^2$  no menor a 0,990 y  $r$  no menor a 0,995); además, el coeficiente de variación del factor de respuesta fue de 1,5% menor al criterio de conformidad (menor a 5%). Al evaluar la significancia del valor de la pendiente ( $b = 9,8 \times 10^9 \pm 5,1 \times 10^8$ ), a través de la prueba de T de Student, se obtuvo un valor de T experimental (41,1) mayor al T de tablas (2,16), por lo que se concluye que la pendiente es estadísticamente diferente de cero, cumpliendo el criterio de conformidad. El valor de la intersección en el eje de las ordenadas de la ecuación de la recta ( $a = -1,8 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^6$ ) se evaluó a través de la prueba de proporcionalidad, mediante la prueba de la prueba de T de Student, en el que se obtuvo un valor de T experimental (1,525) menor al T de tablas (2,16), por lo que se concluye que el valor de la intersección es estadísticamente similar a cero; asimismo, el límite de confianza del valor de intersección incluye estadísticamente al cero ( $-4501501,00 < a < 775637,35$ ), cumpliendo el criterio de conformidad.

En la evaluación de la linealidad del método (Figura 3), se obtuvo una ecuación de la recta ( $y = 9242516511x + 446879,5$  con un valor de coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,998495 y coeficiente de correlación  $r$  de 0,999247, valores que satisfacen los requisitos de conformidad ( $r$  no menor a 0,995 y  $r^2$  no menor a 0,990); además, el coeficiente de variación del factor de respuesta fue de 0,6% menor al criterio de conformidad (menor a 5%). Al evaluar la significancia del valor de la pendiente ( $b = 9,2 \times 10^9 \pm 2,1 \times 10^8$ ), a través de la prueba de T de Student, se obtuvo un valor de T experimental (92,8) mayor al T de tablas (2,16), por lo que se concluye que la pendiente es estadísticamente diferente de cero, cumpliendo el criterio de conformidad. El valor de la intersección en el eje de las ordenadas de la ecuación de la recta ( $a = 4,5 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ ) se evaluó a

través de la prueba de proporcionalidad, mediante la prueba de la prueba de T de Student, el que consiguió un valor de T experimental (0,88) menor al T de tablas (2,16), con lo cual se concluye que el valor de la intersección es estadísticamente similar a cero; asimismo, el límite de confianza del valor de intersección incluye estadísticamente al cero ( $-646114,78 < a < 1539873,80$ ), cumpliendo el criterio de conformidad. Por tanto, se infiere que el método analítico de cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC cumple con la característica de desempeño analítico de linealidad.

En el ensayo de la **robustez**, se halló el factor de variación del contenido de diclofenaco en la prueba de estabilidad a las 24 horas y la prueba de cambio de volumen de inyección realizado por dos analistas. El parámetro de robustez de un método analítico se define como la competencia de no afectarse frente a cambios efímeros, con lo cual nos da un indicativo de la aptitud del método en condiciones normales de uso.<sup>2</sup> La prueba de estabilidad a las 24 horas (Tabla 14) se evidencia que el factor de variación del contenido de diclofenaco fue de 0,5365% menor al criterio de conformidad ( $\leq 3\%$ ) y en la prueba de cambio de volumen de inyección se obtuvo un valor de 1,12%, de igual manera este valor es menor al criterio de conformidad ( $\leq 2\%$ ). Para finalizar se puede decir que el método analítico de cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC cumple con la característica de desempeño analítico de robustez.

Por la naturaleza del estudio, la contrastación de nuestros resultados no sería adecuado realizarlo por característica de desempeño analítico, por lo que es más conveniente realizarlo de manera integral.

Es así como se han reportado diversos estudios sobre la validación de métodos analíticos para la cuantificación de diclofenaco en diferentes formas farmacéuticas, tales como, ampollas,<sup>17</sup> comprimidos recubiertos,<sup>19</sup> tabletas, ampollas y supositorios,<sup>10</sup> y suspensión oral.<sup>20</sup> Estos estudios han establecido que el método de cuantificación de diclofenaco es válido ya que cumplían los criterios de conformidad establecidos para las características de desempeño de exactitud, precisión, especificidad, linealidad y robustez.

Otros estudios han evidenciado que el método de cuantificación de diclofenaco presenta altos niveles de confiabilidad, inclusive en formas farmacéuticas que incluyen dos principios activos, porejemplo diclofenaco e ibuprofeno,<sup>4</sup> diclofenaco más paracetamol.<sup>19</sup>

## VI. CONCLUSIONES

1. El método analítico de cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC satisface los requisitos de desempeño analítico, con lo cual se concluye que el método es válido y confiable.
2. La prueba de adecuabilidad para el método analítico de cuantificación de diclofenaco 1% gel mediante HPLC, es conforme, con un área de 47977778,6 y tiempo de retención de 10,493 minutos; con factor de variación menor al 2%.
3. La especificidad es conforme en el método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC, con porcentajes de recuperación de 100,25 y 100,68% y con una resolución de 15,14 min que cumplen con los límites de especificación.
4. La precisión es conforme para el método analítico de cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC, tanto para la precisión del sistema y del método.
5. El método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC cumple con los requisitos del parámetro analítico de linealidad del método y linealidad del sistema.
6. El método analítico para la cuantificación del diclofenaco 1% gel por HPLC cumple con la característica de desempeño analítico de robustez, tanto para la prueba de estabilidad de 24 horas y la prueba de cambio de volumen de inyección.



## **VII. RECOMENDACIONES**

- Promover el uso de técnicas analíticas para métodos cromatográficos líquidos de alta performance; ya que este tipo de ensayos nos permite obtener resultados con altos estándares de calidad, minimizar errores y reducir tiempos.
- Se sugiere el uso del método analítico de cuantificación del diclofenaco al 1% gel, por otros laboratorios farmacéuticos, ya que es una técnica que cumple con los parámetros de validación.
- Se recomienda persistir con la validación de nuevas técnicas analíticas para productos farmacéuticos nuevos o productos cuya formula no se halla en la farmacopea ya que es un criterio necesario para las entidades sanitarias.

## BIBLIOGRAFÍA

1. United States Pharmacopeial Convention. USP 40 - NF 35 The United States Pharmacopeia and National Formulary 2017. 40ª rev. (USP), 35ª ed. (NF). Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2016.
2. United States Pharmacopeial Convention. USP 37, NF 32: Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario nacional. 37ª rev. (USP), 32ª ed. (NF). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2014.
3. Castillo B y González R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Revista Cubana de Farmacia 1996; 30, [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s00345151996000100009&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=s00345151996000100009&script=sci_arttext) (1996).
4. Ardila A., Balbin Y., Bedoya S., Reyes J., Arriola E y Berrío E. Validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación simultánea de diclofenaco e ibuprofeno en aguas. revion 2022; 35.
5. Valenzuela P. Validación de método analítico para nifedipino comprimidos liberación prolongada por cromatografía líquida de alta eficiencia. Tesis para titulación, Universidad de Concepción. Chile, 2020.
6. Vargas J y Chipantiza N. Validación de un método cromatográfico para cuantificación de ciprofloxacino en tabletas. Trabajo de titulación, Universidad de Guayaquil. Ecuador, 2017.
7. Hernández B. Validación del método analítico por HPLC para disolución de levonorgestrel 1,5 mg grageas. Tesis para titulación, Universidad Veracruzana. México, 2014.
8. Velasteguí J. Validación del método analítico de valoración de amoxicilina en polvo para suspensión producido por Betapharma S.A. mediante HPLC. Tesis para titulación. Ecuador, 2011.
9. Faife A. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta presión para la cuantificación de mupirocina 2% ungüento. Tesis para titulación, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, 2009.
10. Ortiz K y López E. Desarrollo y validación del método analítico de diclofenaco sódico en tres presentaciones farmacéuticas tableta, ampollas, supositorio por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Tesis de licenciatura.
11. Centeno E y Rassa E. Verificación del método analítico para la cuantificación del antitusígeno dextrometorfano bromhidrato 15mg/5mL jarabe por

- cromatografía líquida de alta presión. Tesis para titulación, Universidad María Auxiliadora. Lima-Perú, 2021.
12. Marron G. Validación del método analítico para análisis de disolución y contenido de clorhidrato de cetirizina en capsulas blandas por cromatografía líquida de alta resolución. Tesis para titulación, Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa-Perú, 2018.
  13. Núñez DM y Flores GA. Validación del método analítico para la cuantificación de Levocetirizina Diclorhidrato 5mg/MI solución oral gotas por cromatografía líquida de alta precisión, Universidad Privada Norbert Wiener.
  14. Lovatón J y Carbajal E. Validación de un método analítico para cuantificación de amoxicilina trihidrato 250mg/5ml polvo para suspensión oral por cromatografía líquida de alta resolución. Tesis para titulación, Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima-Perú, 2017.
  15. Palomino J. Validación de un método analítico para la valoración de clorhidrato de terbinafina en gel 1% por cromatografía líquida de alta performance. Tesis para titulación, Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima-Perú, 2017.
  16. Samaniego J. Desarrollo y validación de una técnica analítica por HPLC para calificar la equivalencia farmacéutica in vitro de cuatro medicamentos conteniendo paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas. Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú, 2016.
  17. Coripuna R. Validación del método de cromatografía de alta resolución en la determinación del diclofenaco sódico en ampollas. Tesis para titulación, Universidad Católica de Santa María. Arequipa-Perú, 2013.
  18. Zavala C. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución, para la cuantificación de amoxicilina y ácido clavulánico en el producto Amoxicilina 500mg/Ácido clavulánico 125mg tableta recubierta. Tesis para titulación. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú, 2012.
  19. Tisnado E. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta performance para la cuantificación de paracetamol y diclofenaco sódico en doloparamidol comprimidos recubiertos. Tesis de grado, Universidad Nacional de Trujillo, 2010.
  20. Velarde M. Validación de un método analítico para la cuantificación de Diclofenaco ácido libre en dolfenex 9mg/5ml suspensión oral por cromatografía

- liquida de alta performance (HPLC). Tesis para titulación, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú.
21. Mendoza M. Validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución HPLC para determinación cuantitativa de Levofloxacin 500 mg/100ml inyectable para infusión. Tesis para titulación, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú, 2011.
  22. Juran JM. Planificación para la calidad. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1990.
  23. Fernández P., Moreno A., Leza J., Lizasoain J., Moro M y Portolés A. Farmacología Básica y Clínica. 18th ed.: Editorial Médica Panamericana, 2011.
  24. Soto M. Evaluación del mecanismo de liberación de diclofenaco sódico desde una matriz hidrofílica a base de alginato de sodio. Tesis de grado, Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile, 2007.
  25. García C., Pereda D., Gonzáles A., Montes Y., Cañizares Y., y León G. Determinación de diclofenaco de sodio por cromatografía líquida de alta resolución en un colirio al 0,1 %. Revista Cubana de Farmacia 2009; 43: 1–10, [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034M75152009000300006&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034M75152009000300006&script=sci_arttext&lng=pt) (2009).
  26. García C., García L., Robaina M., Fariña O., Díaz I., y Cataño J. Evaluación del desempeño de los métodos analíticos aplicados en el diclofenaco sódico 100 mg retard de producción nacional. Revista Cubana de Farmacia 2016; 50: 16–29, [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152016000100003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152016000100003) (2016).
  27. Hernández R., Fernández C., y Baptista P. Metodología de la investigación. 5ª ed. México, D.F.: McGraw-Hill, 2010.
  28. Wayne D y León F. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Cuarta edición. México: Limusa Wiley, 2014.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### Preparación de soluciones

**Diluyente:** Metanol Grado Reactivo.

**Solución Amortiguadora Fosfato pH 2,5:**

En un recipiente adecuado para 1 L, pesar exactamente alrededor de 1,4 g de **Sodio Fosfato Monobásico Monohidrato**, agregar 800 mL de Agua Purificada y 0,7 mL de **Ácido Ortofosfórico al 85%**. Agitar hasta disolución total y verificar que la solución anterior tenga un pH =  $2,5 \pm 0,2$ , de ser necesario ajustar con **Ácido Ortofosfórico al 85%** o **Hidróxido de Sodio** al 30%. Llevar a volumen de 1 L con Agua Purificada y homogeneizar.

**Preparación de las soluciones de trabajo**

**Solución de Metilparabeno: (Concentración final aproximada: Metilparabeno 0,5 mg/mL)**

En un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente alrededor de 25 mg de metilparabeno estándar de referencia, agregar 30 mL de metanol y llevar a un Baño de Ultrasonido, con agitación constante, hasta disolución total. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con metanol. Homogeneizar.

**Solución Estándar de Referencia: (Concentración final aproximada: Diclofenaco Sódico 0,5 mg/mL; Metilparabeno 0,05 mg/mL)**

En un matraz volumétrico de 50 mL, pesar exactamente alrededor de 25 mg de diclofenaco sódico estándar de referencia, agregar 20 mL de metanol y llevar a un baño de ultrasonido, con agitación constante, hasta disolución total. Agregar 5 mL de tetrahidrofurano y adicionar volumétricamente 5,0 mL de solución de metilparabeno. Agitar por rotación y enfriar a temperatura ambiente. Llevar a volumen con metanol y homogeneizar.

**Solución Muestra: (Concentración final aproximada: Diclofenaco Sódico 0,5 mg/mL; Metilparabeno 0,05 mg/mL)**

En un matraz volumétrico de 100 mL, pesar exactamente alrededor de 5 g de Muestra (*equivalente a 50 mg de Diclofenaco Sódico*), agregar 10 mL de tetrahidrofurano y llevar a un baño de ultrasonido, con agitación constante, durante 10 minutos. Luego, agitar magnéticamente durante 10 minutos, agregar 60 mL de metanol y continuar agitando magnéticamente durante 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, llevar a volumen con metanol y homogeneizar.

*Filtrar las soluciones de trabajo a través de membrana de filtro PVDF de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro o equivalente, descartando los primeros mililitros.*

## ANEXO 2

### Especificaciones técnicas del diclofenaco 1 % gel

#### 1. Aspecto:

Forma farmacéutica: Gel

Apariencia: Gel homogéneo exento de impurezas visibles.

Color: Blanco.

#### 2. Llenado mínimo promedio: No menor a 30,0 g.

**Llenado mínimo:** Ninguno menor a 27,0 g.

#### 3. pH (10% en agua): 7,5-9,5.

#### 4. Identificación:

**Metilparabeno HPLC:** Informativo

**Diclofenaco sódico HPLC:** El tiempo de retención del pico de diclofenaco sódico en la solución muestra y la solución estándar de referencia, se corresponden.

#### 5. Contenido:

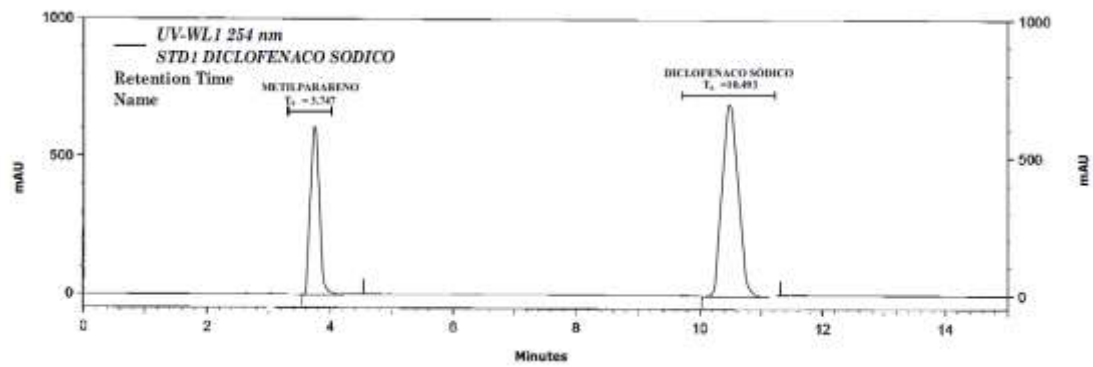
**Metilparabeno (%):** Informativo

**Diclofenaco sódico:** 0,900-1,100 g/100g

**Diclofenaco sódico:** 90,0-110,0 %

### ANEXO 3

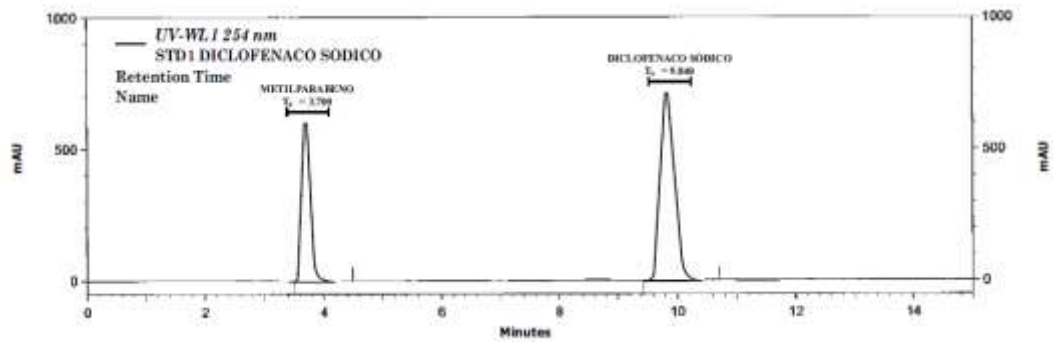
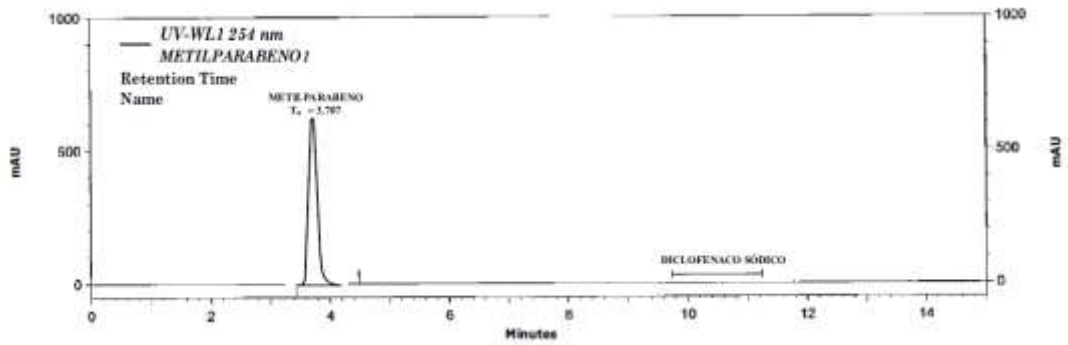
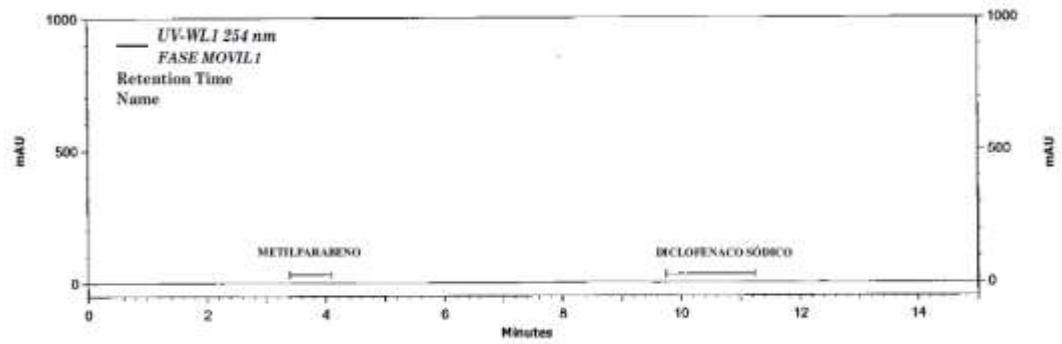
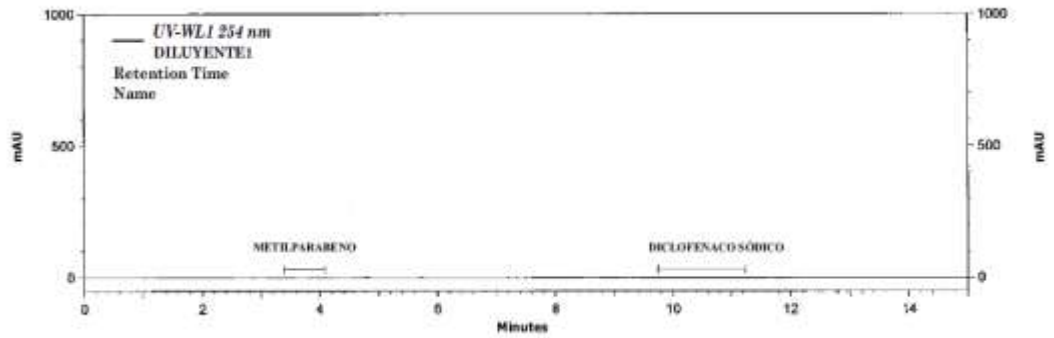
#### Cromatograma de la aptitud de sistema

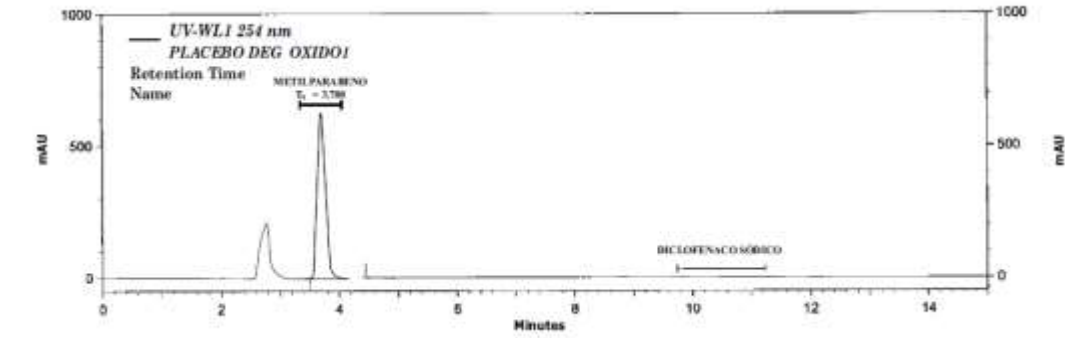
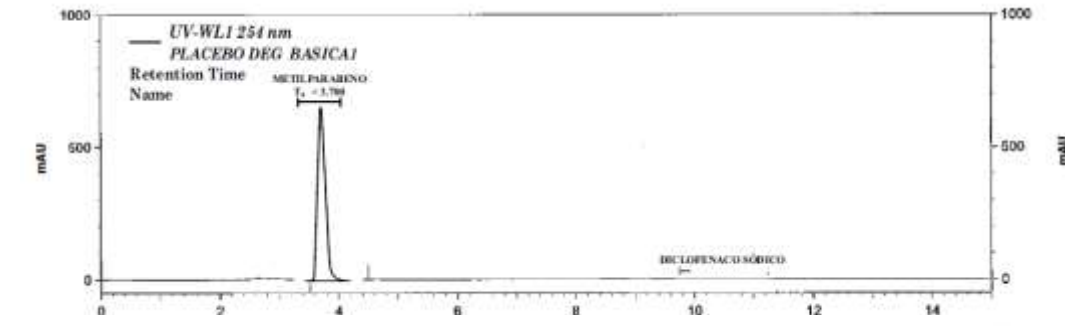
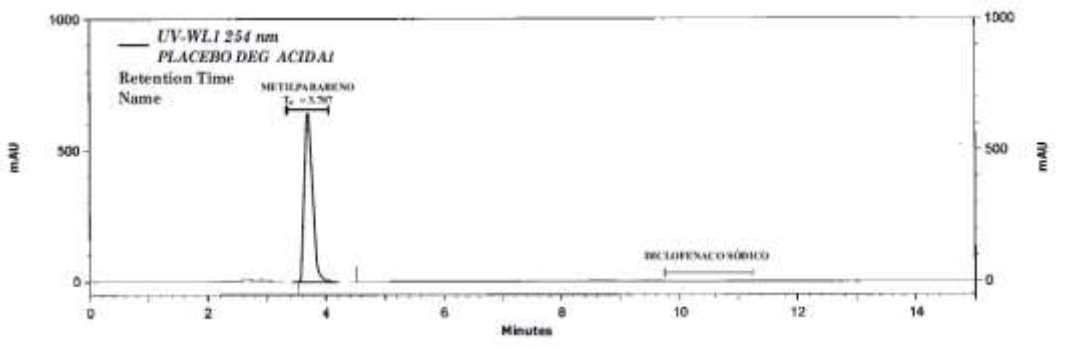
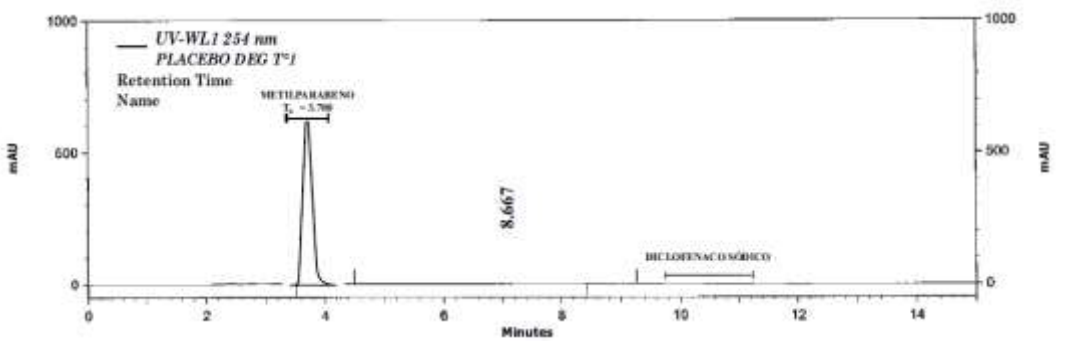
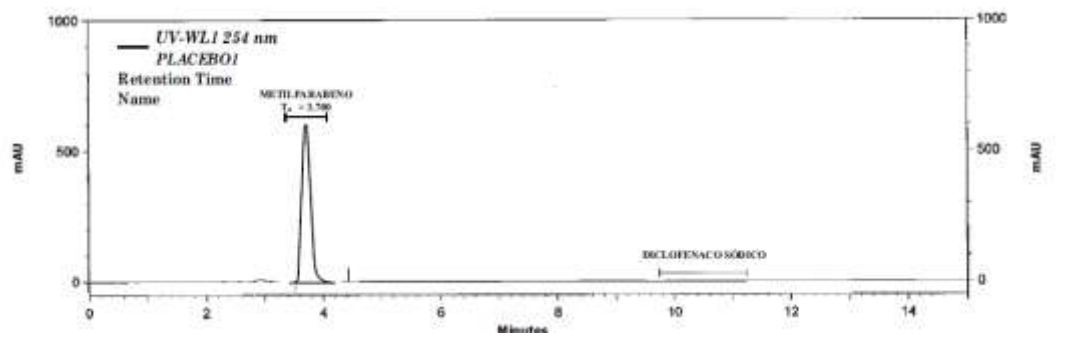


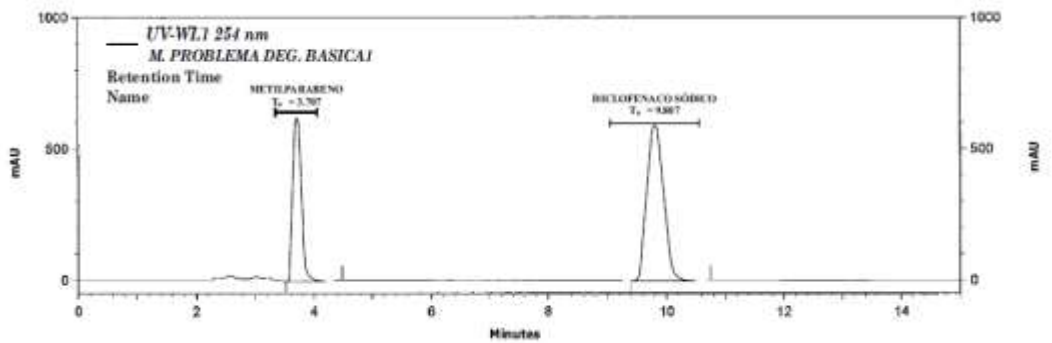
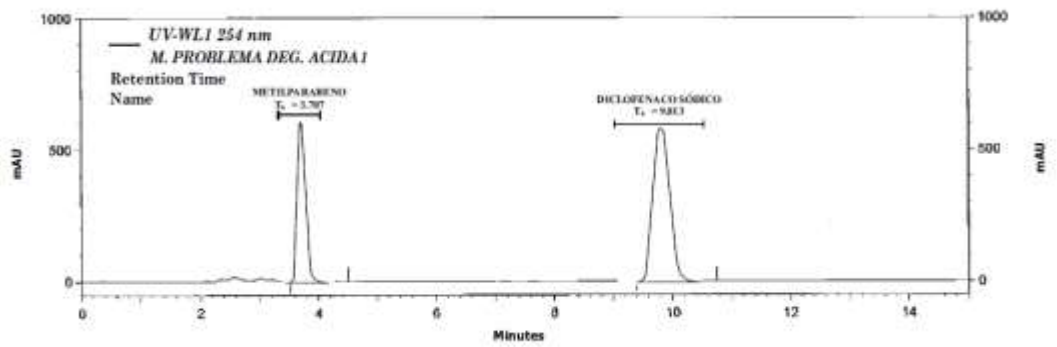
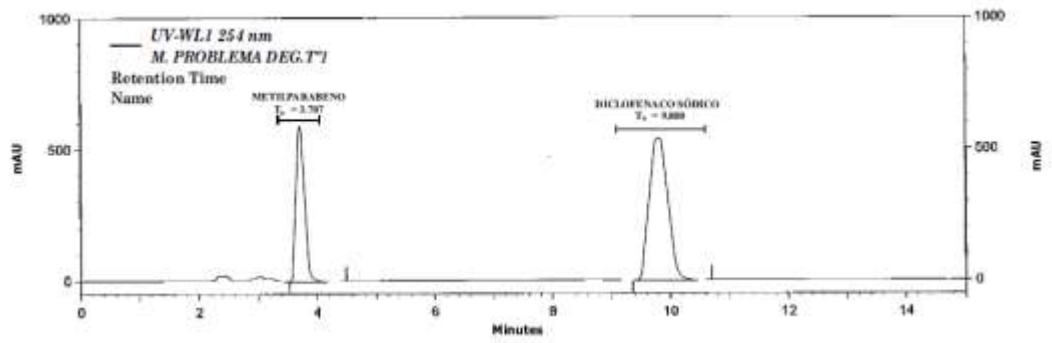
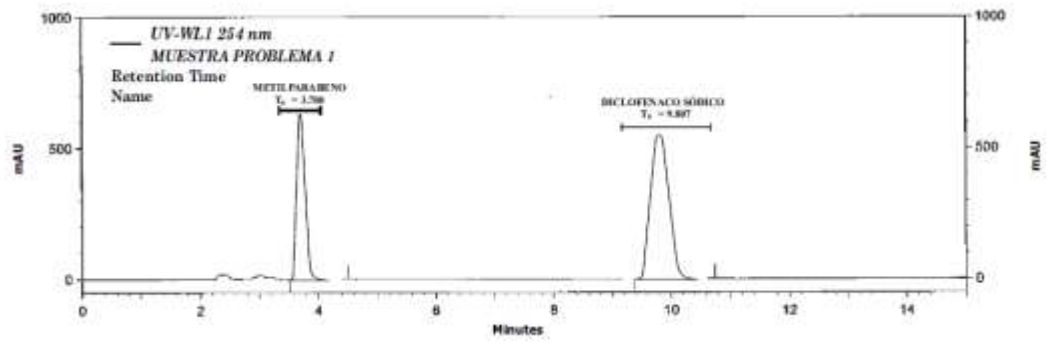
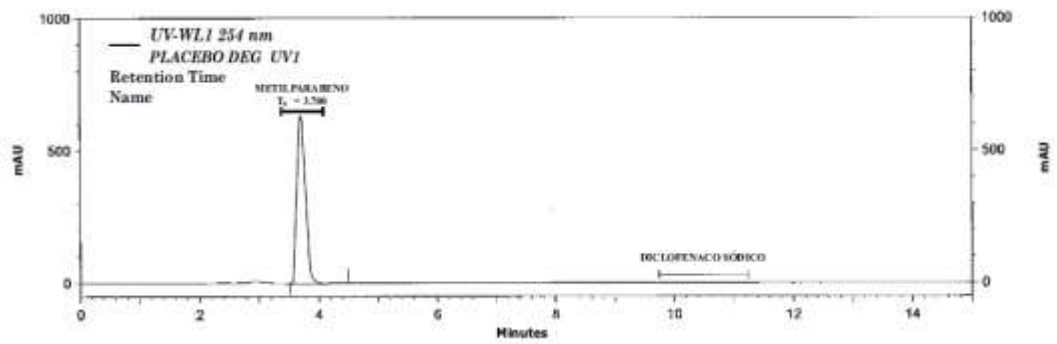


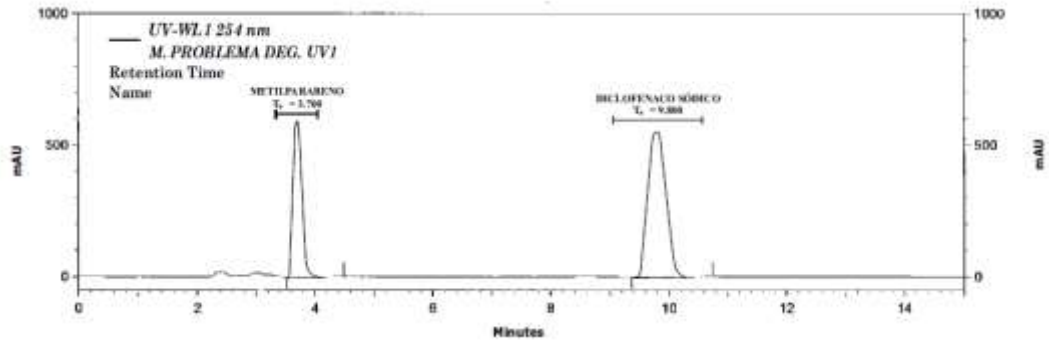
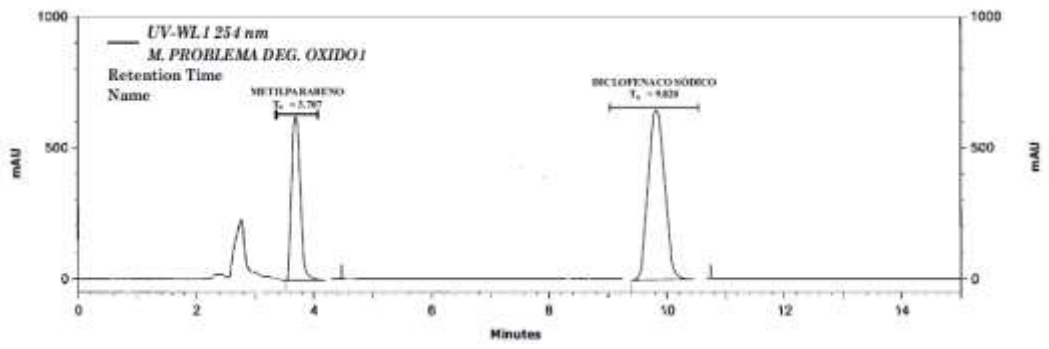
## ANEXO 4

### Cromatogramas de especificidad



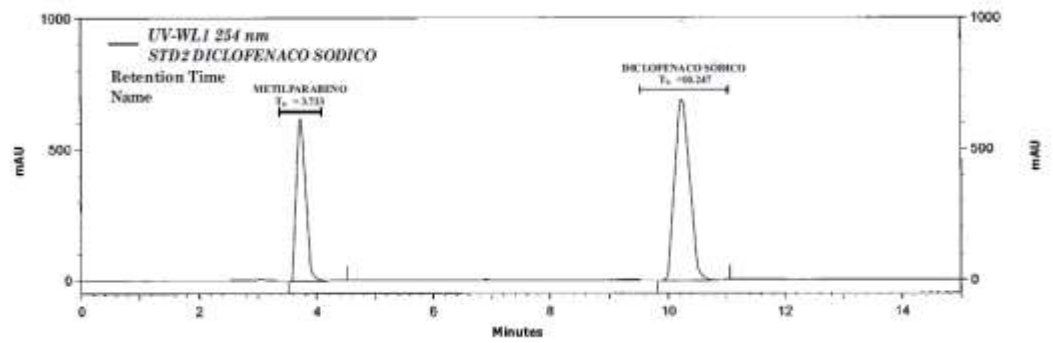
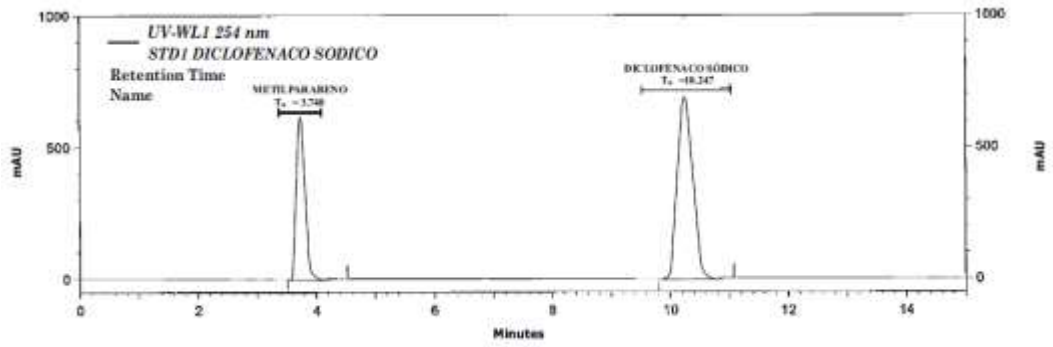
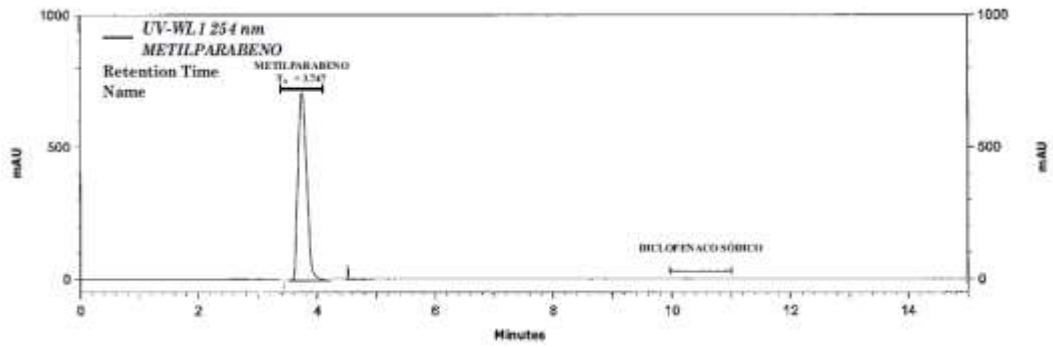
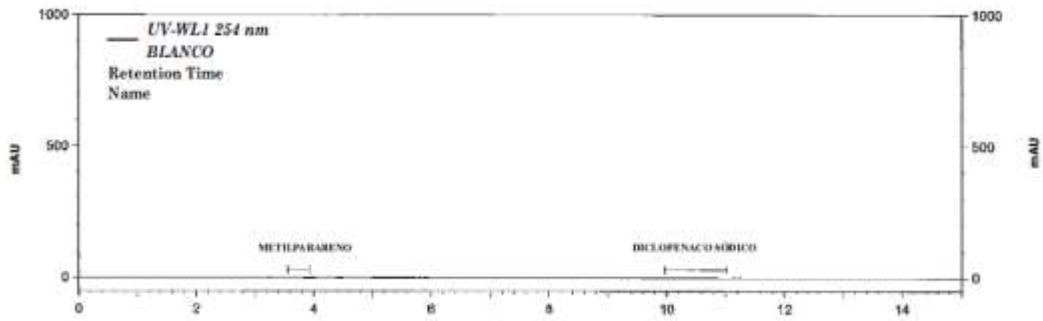


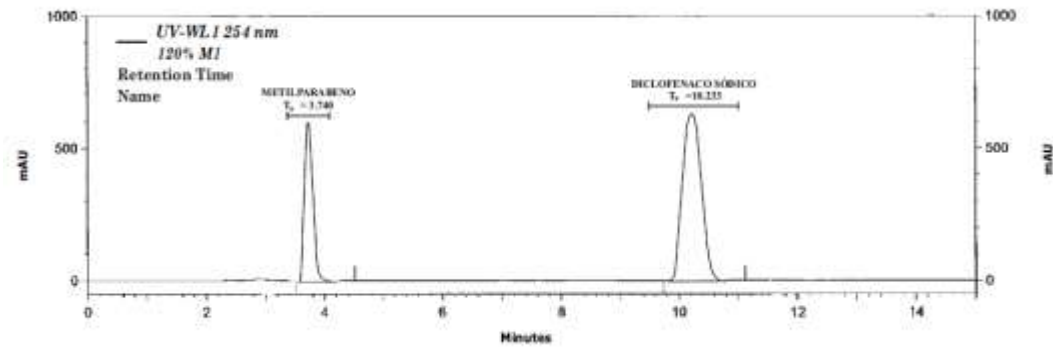
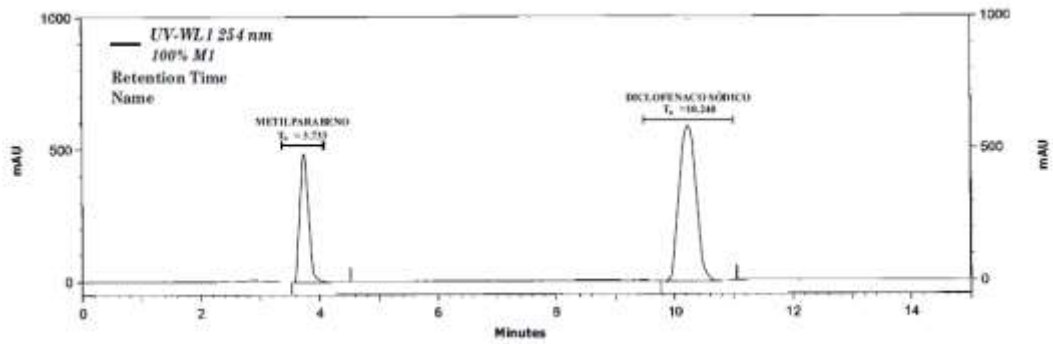
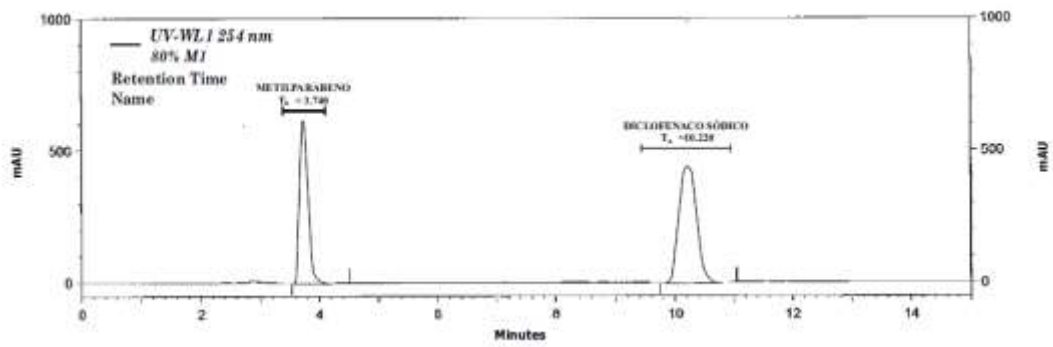




## ANEXO 5

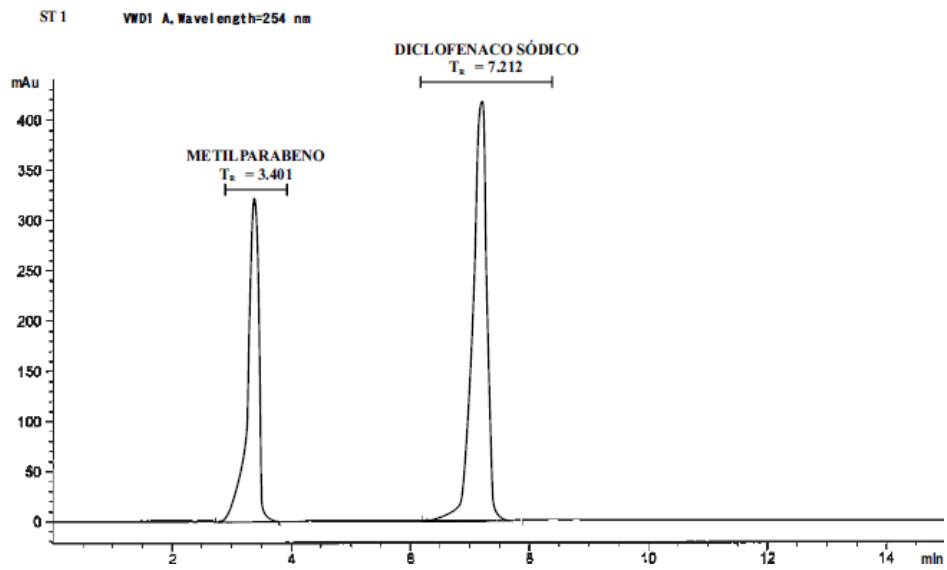
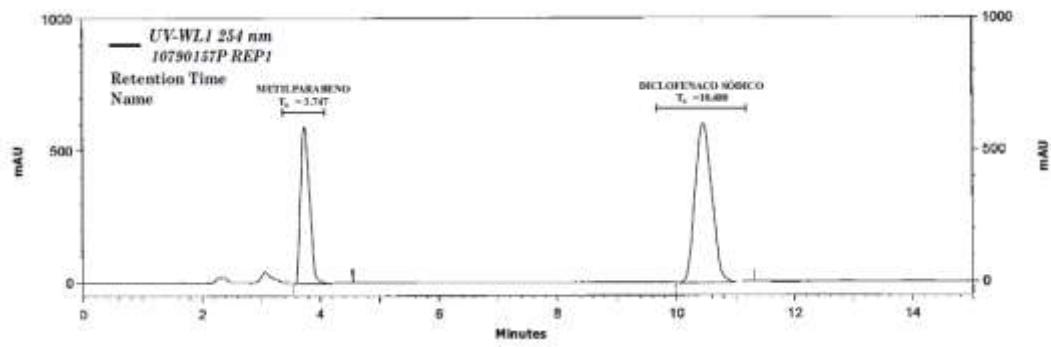
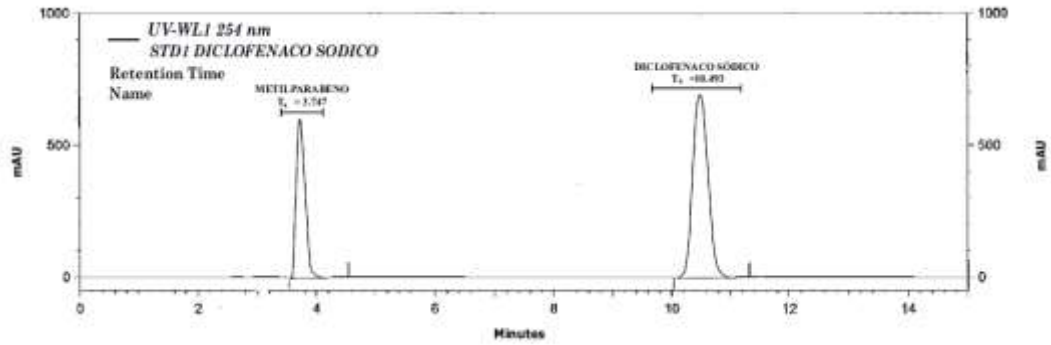
### Cromatogramas de exactitud





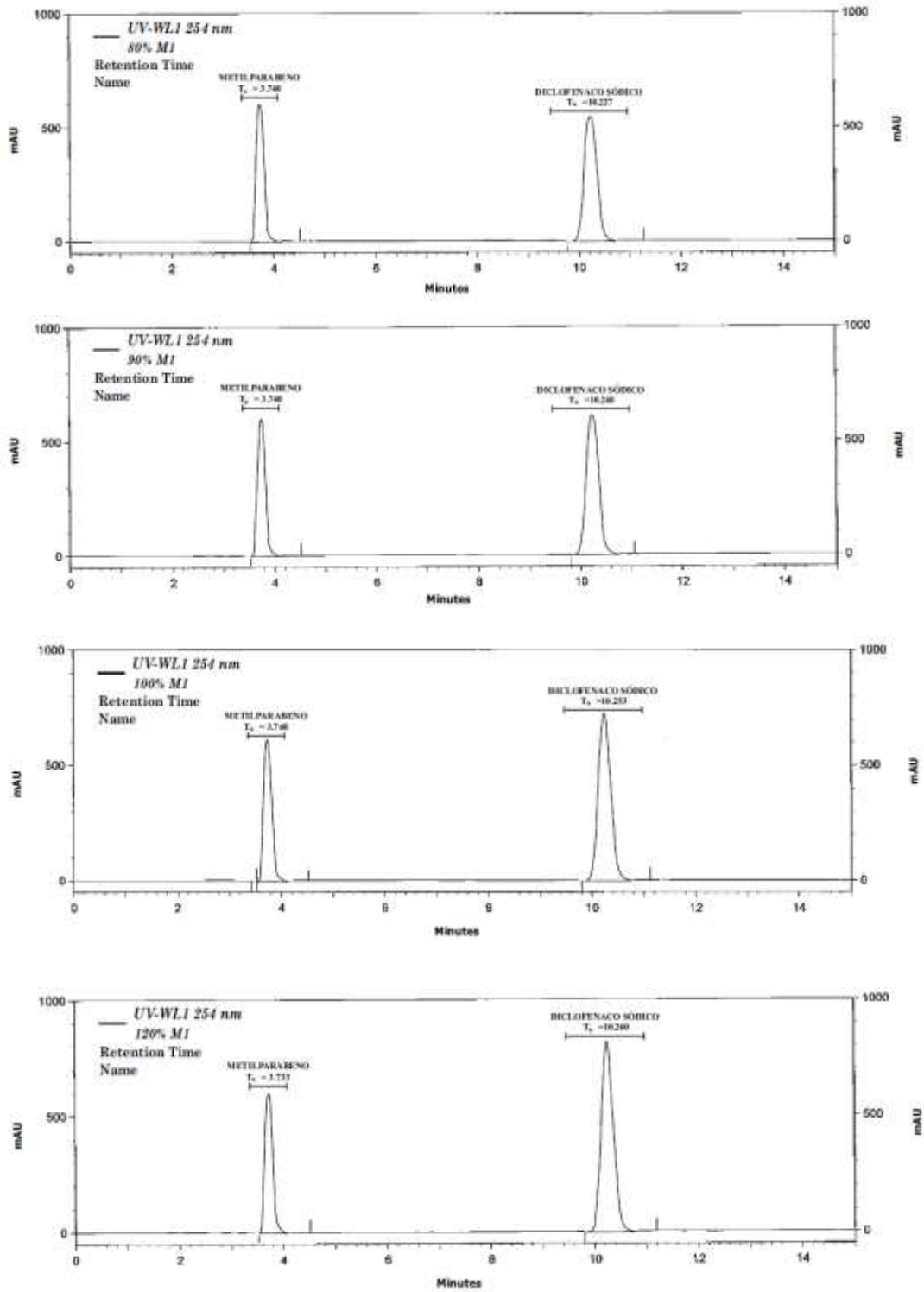
## ANEXO 6

### Cromatogramas de precisión



## ANEXO 7

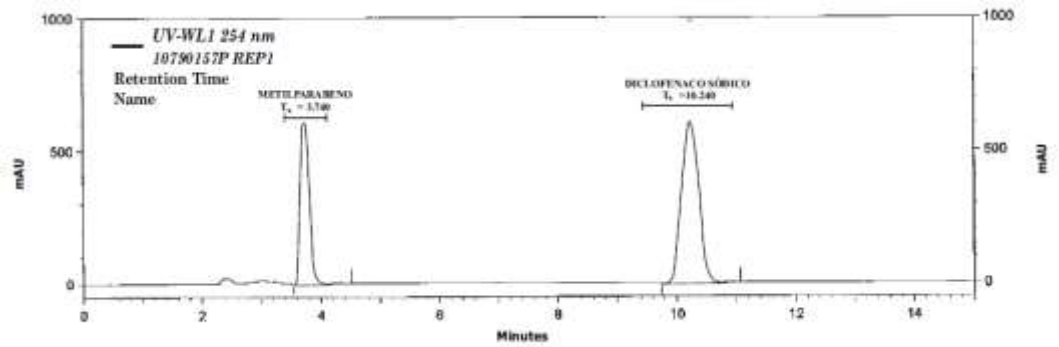
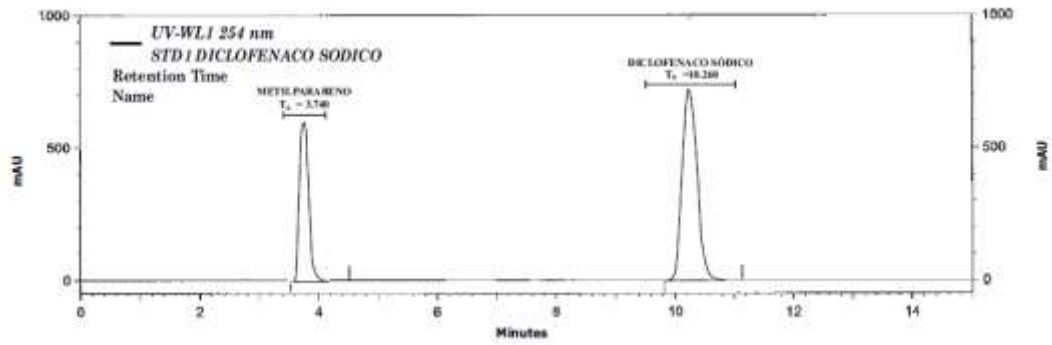
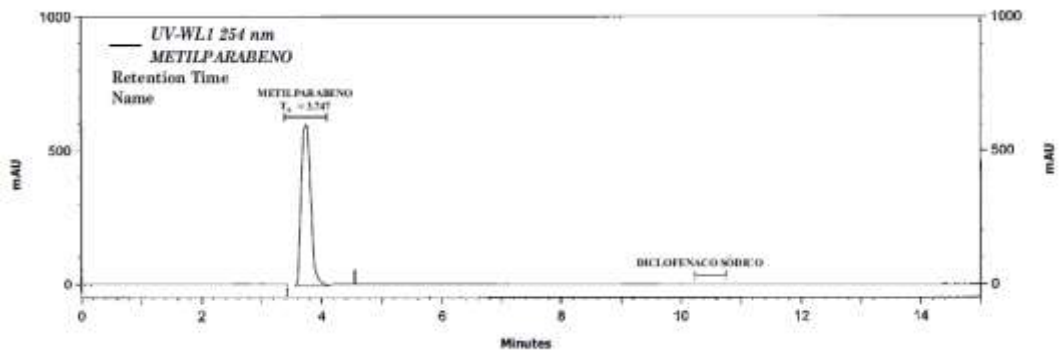
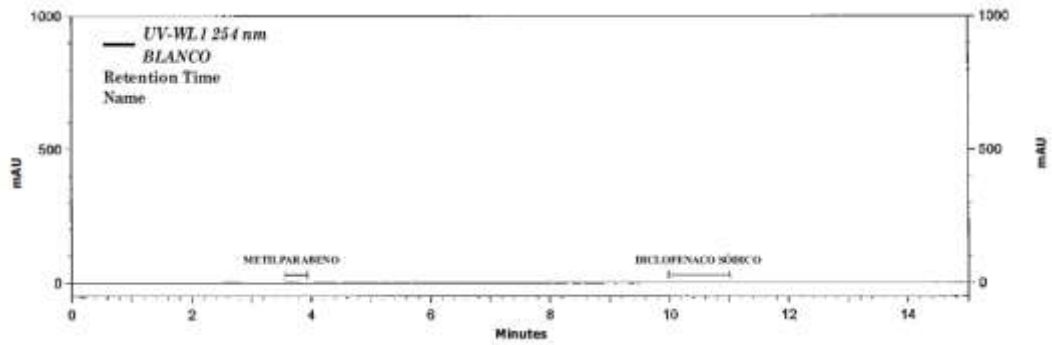
### Cromatogramas de linealidad





## ANEXO 8

### Cromatogramas de robustez



**ANEXO 9**  
**Matriz de consistencia**

<b>Título</b>	<b>Problema</b>	<b>Objetivos</b>	<b>Marco teórico</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>Variables</b>	<b>Metodología</b>
Validación del método analítico para la cuantificación de diclofenaco al 1% gel por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), Lima – 2023.	¿El método analítico de cuantificación del diclofenaco al 1% gel por cromatografía líquida de alta performance cumplirá con los parámetros de validación?	<p><b>Objetivo general:</b> Validar del método analítico de cuantificación del diclofenaco al 1% gel por cromatografía líquida de alta performance.</p> <p><b>Objetivos específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluar el parámetro de aptitud del sistema del método de cuantificación de diclofenaco al 1% gel.</li> <li>• Evaluar el parámetro de especificidad, exactitud, precisión, linealidad y robustez del método de cuantificación de diclofenaco al 1% gel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antecedentes</li> <li>• Validación de método analítico.</li> <li>• Parámetros de validación.</li> <li>• Cromatografía líquida de Alta Performance.</li> <li>• Antiinflamatorios no esteroideos.</li> <li>• Diclofenaco.</li> <li>• Técnicas para la cuantificación de diclofenaco.</li> </ul>	El método analítico de cuantificación del diclofenaco al 1% gel por cromatografía líquida de alta performance cumple con los parámetros de validación.	<p><b>Variable.</b> Parámetro de validación</p> <p><b>Indicadores:</b> Adecuabilidad, especificidad, exactitud, precisión, robustez, linealidad.</p>	<p><b>Población:</b> Lote de 10000 unidades de diclofenaco al 1% gel, desarrollada en el área de investigación y desarrollo de industria farmacéutica CIFARMA S.A.</p> <p><b>Muestra:</b> 32 unidades de diclofenaco al 1% gel, según la NTP ISO 2859-1- 2009, plan de muestreo con un nivel de inspección S-4.</p> <p><b>Diseño</b> <b>no experimental</b> Transeccional descriptivo</p> <p><b>Tipo de investigación:</b> Libre.</p> <p><b>Análisis de datos</b> Se utilizará Microsoft Excel y el programa SPSS 19.0. Se usará pruebas estadísticas, con un nivel de confianza 95%.</p>



de dieciocho (18) para la cual los miembros del jurado evaluador firman al pie del presente, siendo las 10:40 de la mañana, se da por concluido el presente acto académico.



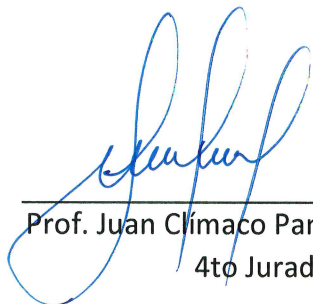
---

Prof. Maricela López Sierralta  
Jurado 1



---

Prof. Pablo Williams Común Ventura  
Jurado 2



---

Prof. Juan Clímaco Paniagua Segovia  
4to Jurado



---

Prof. Emilio Germán Ramírez Roca  
Asesor



---

Prof. Maricela López Sierralta  
Presidente



---

Prof. Daniel Santiago Chávez  
Secretario docente

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

El Instructor en Primera Instancia, designado con RD N° 453-2023-UNSCHFCSA/D, emite la presente

CONSTANCIA

DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

A Roxana QUISPE ESCALANTE, Bachiller de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, en mérito a que la tesis titulada: "Validación del método analítico para la cuantificación de diclofenaco al 1 % gel por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), Lima - 2023." ha alcanzado un índice de similitud de 19 % (diecinueve); cumpliendo satisfactoriamente lo establecido en el Art. 13 del Reglamento de Originalidad de Trabajos de investigación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga mediante el uso del SOFTWARE TURNITIN.

En ese sentido, se emite la presente constancia en señal de conformidad.

Ayacucho, 29 de febrero de 2024.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
E.P. FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
Dr. Marco R. Aronés Jara  
DOCENTE

Prof. Marco R. Aronés Jara  
Docente instructor - Primera instancia

Constancia N° 0006-2024



**UNSCH**

FACULTAD DE  
CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE  
FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD SEGUNDA INSTANCIA:**  
**TESIS DE PREGRADO**

**(C°13-2024-EPFB-UNSCH)**

La que suscribe, directora de escuela y docente instructor en segunda instancia de Tesis de Pregrado, luego de verificar la originalidad de la tesis de la Escuela profesional de Farmacia y bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, en representación de la decana y delegada por Resolución Decanal N° 077-2021-UNSCH-FCSA/D, deja constancia que el trabajo de tesis titulado:

**Validación del método analítico para la cuantificación de diclofenaco al 1 % gel por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), Lima - 2023.**

Presentado por: **Bach. Roxana, Quispe Escalante**

Ha sido sometido al análisis mediante el sistema TURNITIN concluyendo que presenta un porcentaje de **19% de índice de similitud.**

Por lo que, de acuerdo con el porcentaje establecido en el Artículo 13° del Reglamento de Originalidad de Trabajos de investigación de pregrado de la UNSCH. Por tanto, **ES PROCEDENTE** conceder la Constancia de originalidad en segunda instancia.

Ayacucho, 03 de marzo del 2024

  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
  
**Mg. Maricela López Sierralta**  
DIRECTORA  
Docente. Instructor  
Segunda instancia

cc.  
Archivo.

# Validación del método analítico para la cuantificación de diclofenaco al 1 % gel por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), Lima - 2023.

*por Roxana Quispe Escalante*

---

**Fecha de entrega:** 03-mar-2024 10:55p.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2310887631

**Nombre del archivo:** TESIS\_Roxana\_Quispe\_Escalante\_2024.pdf (784.6K)

**Total de palabras:** 15735

**Total de caracteres:** 80189

# Validación del método analítico para la cuantificación de diclofenaco al 1 % gel por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), Lima – 2023.

## INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

19%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

[qdoc.tips](https://qdoc.tips)

Fuente de Internet

2%

2

[repositorio.unsch.edu.pe](https://repositorio.unsch.edu.pe)

Fuente de Internet

2%

3

[repositorio.uigv.edu.pe](https://repositorio.uigv.edu.pe)

Fuente de Internet

2%

4

[doku.pub](https://doku.pub)

Fuente de Internet

2%

5

[dspace.unitru.edu.pe](https://dspace.unitru.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

6

[hdl.handle.net](https://hdl.handle.net)

Fuente de Internet

1%

7

[repositorio.uwiener.edu.pe](https://repositorio.uwiener.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

8

[ri.ues.edu.sv](https://ri.ues.edu.sv)

Fuente de Internet

1%



9	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1 %
10	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1 %
11	1library.co Fuente de Internet	1 %
12	repositorio.unan.edu.ni Fuente de Internet	1 %
13	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	< 1 %
14	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	< 1 %
15	caelum.ucv.ve Fuente de Internet	< 1 %
16	repository.udca.edu.co Fuente de Internet	< 1 %
17	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	< 1 %
18	idoc.pub Fuente de Internet	< 1 %
19	www.scielo.org.co Fuente de Internet	< 1 %
20	es.scribd.com	

Fuente de Internet

< 1 %

21

[www.revfarmacia.sld.cu](http://www.revfarmacia.sld.cu)

Fuente de Internet

< 1 %

22

[repositorio.umsa.bo](http://repositorio.umsa.bo)

Fuente de Internet

< 1 %

23

[repositorio.unicauca.edu.co:8080](http://repositorio.unicauca.edu.co:8080)

Fuente de Internet

< 1 %

24

[repositorio.uma.edu.pe](http://repositorio.uma.edu.pe)

Fuente de Internet

< 1 %

25

[idus.us.es](http://idus.us.es)

Fuente de Internet

< 1 %

26

Submitted to uncedu

Trabajo del estudiante

< 1 %

27

[docplayer.es](http://docplayer.es)

Fuente de Internet

< 1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 30 words

Excluir bibliografía

Activo