



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FARMACÉUTICA

**Diseño, desarrollo y validación del método analítico de
la valoración a microescala de paracetamol por
Espectrofotometría Ultravioleta.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Arturo Belmont Torres

DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Elizabeth G. Sánchez González

ASESOR:
M. en C. Vicente J. Hernández Abad





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, bajo la dirección de la M. en C. Elizabeth G. Sánchez González con la asesoría del M. en C. Vicente J. Hernández Abad, apoyado con recursos del proyecto PAPIIME EN215403, "Implementación de técnicas en microescala en la enseñanza experimental de química en los laboratorios de docencia de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza".

Este trabajo es dedicado a mi Madre, la Licenciada Laura Torres Rojas, quien con su ejemplo, motivación, paciencia y sobre todo su apoyo, además de darme la vida, logro este objetivo, mi formación profesional. A mi Padre Arturo Belmont Chacón por su apoyo y especialmente a mi hermano José Alberto Belmont Torres. A mi familia gracias.

Agradezco su apoyo y confianza a la M. en C. Elizabeth G. Sánchez González y al M. en C. Vicente J. Hernández Abad, y a todos aquellos profesores que contribuyeron positivamente a mi formación.

Gracias de manera especial a mis verdaderos amigos por dejarme entrar en su corazón, que han creído en mí, han compartido mis objetivos y metas, a Héctor Ramírez por su colaboración en la parte experimental de validación, al equipo representativo de fútbol de la FES Zaragoza (99-05), y a la gente nociva que he encontrado en mi camino y no ha creído en mí, gracias, de ellos también he crecido.

“Se va aprendiendo en el camino... - A una naturaleza mezquina se le disimula con inteligencia y se le supera con voluntad -... hasta que la mejor versión de ti mismo coincida con tu último día de vida”

(Arturo Belmont Torres)

INDICE

Contenido

	Pagina
Introducción	1
1. Marco Teórico	2
1.1. Química en microescala	2
1.1.1. La química en microescala en México	2
1.1.2. Ventajas	2
1.1.3. Desventajas	4
1.2. Paracetamol	5
1.2.1. Historia	5
1.2.2. Forma estructural	6
1.2.3. Propiedades físicas y químicas	6
1.2.4. Propiedades farmacológicas	6
1.2.5. Farmacocinética y metabolismo	6
1.2.6. Aplicaciones terapéuticas	6
1.2.7. Efectos tóxicos	6
1.2.8. Método analítico para el paracetamol	7
1.3. Espectrofotometría ultravioleta	8
1.3.1. Definición	8
1.3.2. Usos	8
1.3.3. Equipo	9
1.3.4. Disolventes adecuados para la región ultravioleta	10
1.3.5. Determinaciones cuantitativas en la región ultravioleta	11
1.4. Validación de métodos analíticos	13
1.4.1. Validación	13
1.4.2. Justificación para realizar la validación de un método analítico	13
1.4.3. Parámetros de validación	16
1.4.4. Definición de los Parámetros de Validación	16
1.4.4.1. Precisión del sistema	16
1.4.4.2. Linealidad del sistema	16
1.4.4.3. Especificidad	16
1.4.4.4. Exactitud	16
1.4.4.5. Repetibilidad	16
1.4.4.6. Linealidad del método	16
1.4.4.7. Precisión del método	17
1.4.4.8. Precisión intermedia	17
1.4.4.9. Robustez	17

2.	Planteamiento del problema	18
3.	Objetivos	19
4.	Hipótesis	20
5.	Diseño experimental	21
5.1.	Insumos necesarios para la realización del proyecto	21
5.2.	Metodología del proyecto	22
5.2.1.	Diagrama de flujo	22
5.2.2.	Método analítico	23
5.3.	Métodos en microescala para paracetamol	24
5.3.1.	Microescala al 50%	24
5.3.2.	Microescala al 25%	25
5.3.3.	Microescala al 10%	26
5.4.	Selección del método en microescala a validar	27
5.5.	Metodología de validación	28
5.5.1	Precisión del sistema	28
5.5.1.	Linealidad del sistema	28
5.5.2.	Exactitud y reproducibilidad del método	29
5.5.3.	Linealidad del método	30
5.5.4.	Precisión del método	31
5.5.5.	Robustez	32
6.	Resultados y análisis.	33
6.1.	Ensayos de identidad	33
6.2.	Validación del método analítico de valoración a la escala de 100%	34
6.2.1.	Precisión del sistema	34
6.2.2.	Exactitud y repetibilidad	35
6.2.3.	Precisión del método	36
6.2.4.	Linealidad del método	37
6.2.5.	Linealidad del sistema	39
6.2.6.	Robustez	41
6.2.7.	Resumen de resultados de la validación al 100 %	42

6.3. Resultados de microescalamiento de la valoración de paracetamol	43
6.3.1. Determinación al 100 % balanza analítica	43
6.3.2. Determinación al 100 % en microbalanza	44
6.3.3. Determinación al 50 % balanza analítica	45
6.3.4. Determinación al 50 % en microbalanza	46
6.3.5. Determinación al 25 % balanza analítica	47
6.3.6. Determinación al 25 % en microbalanza	48
6.3.7. Determinación al 10 % balanza analítica	49
6.3.8. Determinación al 10 % en microbalanza	50
6.3.9. Análisis de varianza	51
6.4. Validación del método analítico de valoración a la escala de 25%	57
6.4.1. Precisión del sistema	57
6.4.2. Exactitud y repetibilidad	58
6.4.3. Precisión del método	59
6.4.4. Linealidad del método	60
6.4.5. Linealidad del sistema	62
6.4.6. Robustez	64
6.4.7. Resumen de resultados de la validación al 25 %	65
6.4.8. Comparación gráfica comparativa de respuesta analítica vs. concentración del método a 100 % de escala, (método oficial) y el método a 25 % de escala, utilizando microbalanza.	66
6.4.9. Comparación de gasto de recursos y generación de desechos para ambos métodos, a 100 % de escala, (método oficial) y a 25 % de escala, utilizando microbalanza.	67
7. Conclusiones	69
Bibliografía	70

INTRODUCCION

En los últimos años ha resurgido la idea en todo el país sobre el uso de la química en microescala, sobre todo en los laboratorios de enseñanza a los niveles medio-superior y superior. Esto coincide con la generación de una conciencia ambiental y de racionalidad en la utilización de los recursos naturales.

Los asuntos ecológicos cada día adquieren mayor relevancia, es por ello que las técnicas a nivel microescala son una importante alternativa ya que, además del mencionado aspecto ecológico, favorecen en cuanto a seguridad e higiene en el laboratorio, son económicas y, para el caso de enseñanza experimental de química son, sobre todo, didácticas.

La tendencia a disminuir la escala continúa hasta llegar a lo que actualmente se conoce como microescala; se considera que son mayores las ventajas de las técnicas en microescala que los retos e inconvenientes que se generan. Por ejemplo, estas técnicas son más sencillas y los aparatos más fáciles de montar; se pueden emplear reactivos más costosos, ya que se requieren en menor cantidad; hay una disminución notable de los riesgos originados por la exposición a compuestos tóxicos, irritantes, alergénicos, mutagénicos o cancerígenos; existe una contribución significativa a la preservación de nuestro medio ambiente, al haber una reducción radical entre el 75% y hasta el 99% en la generación de desechos químicos; así como un ahorro considerable de tiempo. Son mínimos los retos e inconvenientes por ejemplo: la necesidad de material especial; de equipos de medición mucho más precisos; el requerimiento de reactivos mucho más puros y la dificultad de efectuar la observación de algunos de los fenómenos notorios en escala mayor.

Una importante aplicación de las técnicas en microescala es en el campo de la química analítica, la cual está dividida en dos campos: el análisis cualitativo, que trata de la identificación de sustancias, y el análisis cuantitativo que se interesa en la determinación de qué cantidad de la sustancia en particular está presente en una muestra.

Para el paracetamol se tiene la técnica de valoración farmacopéica por espectrofotometría ultravioleta, con un gasto considerable de más de 1000 mL de agua y metanol, por lo que el diseño, desarrollo y validación de la técnica de valoración en microescala es aplicable en la industria farmacéutica en el área de control de calidad; a nivel de enseñanza en laboratorio, contribuyendo en el ahorro de materias primas y en el aumento de la seguridad en el laboratorio.

1. Marco Teórico

1.1. Química en microescala

1.1.1. La Química en microescala en México

Conforme a las diversas preocupaciones, sobre todo por el medio ambiente, la seguridad así como los elevados costos de operación se hace presente la necesidad de reducir la escala de los experimentos en los laboratorios.

Hace 50 años, lo común era trabajar en una escala de 50 a 100 g para sólidos y 500 a 2000 mL para líquidos, y no es difícil encontrar experimentos de laboratorio de esa época en escalas de 500 a 1000g de sólido.

Afortunadamente, el uso de estas técnicas ha ido disminuyendo gradualmente; en las décadas de los años cincuenta y sesenta se redujo la escala usual alrededor de 10g. La tendencia a disminuir la escala continúa hasta llegar a lo que actualmente se conoce como microescala.

En las técnicas de microescala las cantidades son menores que 1g o 2 mL, preferentemente alrededor de los 25 a 150 mg para sólidos y de 100 a 200 μ L para líquidos.

Se tiene conocimiento del uso de las técnicas a microescala debido a las múltiples ventajas que ofrece en países como: Estados Unidos, Alemania, Finlandia, Checoslovaquia, Egipto, Australia, etc. ¹

1.1.2. Ventajas

Algunas de las ventajas más relevantes de las técnicas en microescala, de índole ecológica, de higiene, de seguridad y económica con las implicaciones éticas inherentes, son:

- Una mejora impresionante de la calidad del aire en los laboratorios, ya que se puede eliminar casi totalmente la presencia de vapores de disolventes.
- Prácticamente la total desaparición de los accidentes de laboratorio provocados por reactivos cáusticos, inflamables o explosivos y, aún en caso de llegar a ocurrir, su gravedad es mucho menor. ¹⁻³

- Una disminución notable de los riesgos a la salud originados por la exposición a compuestos tóxicos, irritantes, alergénicos, mutagénicos o cancerígenos.
- Una contribución significativa a la preservación de nuestro medio ambiente, al haber una reducción radical entre el 75% y hasta el 99% en la generación de desechos químicos, además de simplificarse su eliminación y reducirse notablemente los costos asociados.
- La reducción radical de costos de operación en los laboratorios, sobre todo en el ahorro de sustancias químicas y en costos del material convencional más pequeño. Actualmente los equipos para microescala cuenta con juntas ensamblables y son relativamente más costosos que los convencionales, pero es de esperarse que conforme aumente su demanda, y consecuentemente la competencia entre los diferentes fabricantes, sus costos bajarán apreciablemente. Indirectamente, los costos también se reducen, ya que la fragilidad del material de microescala es menor porque el grosor del vidrio es algo mayor y la resistencia mecánica en las piezas pequeñas es más alta.⁴⁻⁵

Desde el punto de vista didáctico también hay múltiples ventajas en el uso de la microescala:

- Aunque el trabajo a microescala requiera de técnicas especiales, ninguna es mas difícil de aprender o de aplicar que las técnicas convencionales; de hecho algunas son más sencillas y los aparatos mas fáciles de montar.
- La variedad de experimentos que pueden realizarse en microescala es mas amplia, ya que se pueden emplear reactivos más costosos.
- La habilidad y cuidado en el manejo de sustancias químicas tienden a acrecentarse y las perdidas mecánicas a disminuir.
- Generalmente la atención de los alumnos tiende a concentrarse más, y a afinarse el pensamiento analítico.
- Puede haber un ahorro considerable de tiempo ya que, por una parte, la velocidad de reacción aumenta al incrementarse la relación área/volumen y, por lo tanto, la transferencia de masa. Por otro lado, el cuidadoso desarrollo que han tenido estos experimentos, junto con las posibilidades actuales de hacer análisis fácil y rápidamente a la mezcla de reacción a intervalos cortos, ha hecho que los tiempos de reacción, que en técnicas convencionales eran grandes, se ajusten al tiempo necesario. Es significativa y notable la disminución del tiempo requerido en

microescala para las operaciones mecánicas y purificación de productos, como la extracción, filtración, destilación, secado, etc. ^{1, 2, 4 y 5}

1.1.3. Desventajas.

Más que desventajas, lo que existen son algunos retos e inconvenientes como pueden ser:

- Una mayor necesidad de equipo analítico un tanto sofisticado y costoso, como cromatógrafos de gases y espectrofotómetros de infrarrojo.
- La dificultad de aplicar óptimamente algunas técnicas como destilación fraccionada, destilación al vacío y extracción con embudos de separación. ^{1, 2, 3 y 5}
- La dificultad de efectuar la observación de algunos de los fenómenos notorios en escala mayor, como la transferencia de calor. Por ejemplo, el problema del control de una temperatura baja en una reacción fuertemente exotérmica, que es un reto en escala convencional, en microescala puede pasar prácticamente inadvertido.
- El requerimiento de reactivos mucho más puros, de una escrupulosa limpieza del material y la limitación de no poder usar grasa para sellar juntas esmeriladas, ya que en las técnicas de microescala la misma cantidad de un contaminante es porcentualmente mucho más significativa. De hecho, se puede llegar fácilmente al extremo de que un contaminante, como sería la grasa usada en las juntas, exceda el peso de los reactivos.
- La necesidad de material especial y de equipos de medición mucho más precisos y, por lo tanto, más costosos y delicados, como son las micropipetas graduadas, micropipetas automáticas y balanzas analíticas o semianalíticas. ^{1, 2, 3 y 5}

1.2. Paracetamol

1.2.1. Historia

El paracetamol fue utilizado por primera vez en medicina por Von Mering en 1893. Sin embargo, desde 1949 ha tenido gran popularidad, fecha en la cual se identificó que constituía el metabolito activo de la fenacetina, un analgésico derivado de la anilina. ⁶

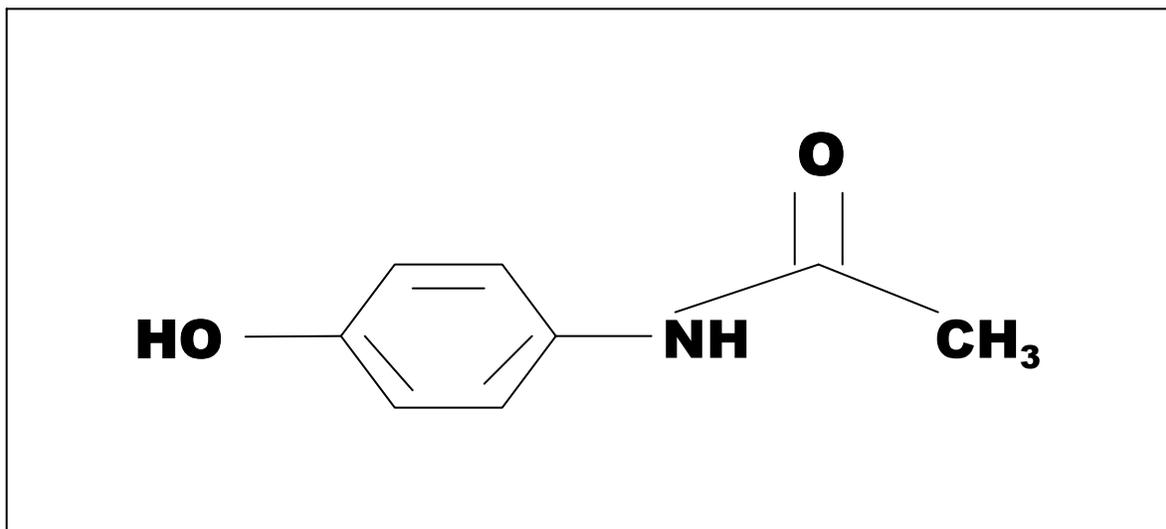
Nombres genéricos: acetaminophen, paracetamol

Nombres Químicos: p-acetaminophenol, N-acetyl-p-aminophenol, p-acetylaminophenol, p-acetamidophenol.

Nombres de marcas registradas: Abensanil, Acamol, Acetalgin, Amadil, Anaflon, Cetadol, Dirox, Febrilix, Panadol, Temlo, Tempra, Tylenol Valadol.

1.2.2. Forma estructural

Figura 1: Estructura de Paracetamol



1.2.3. Propiedades físicas y químicas

Paracetamol

$C_8 H_9 NO_2$

El paracetamol es un polvo blanco, cristalino, inodoro, con sabor ligeramente amargo. Fácilmente soluble en etanol, soluble en acetona, agua caliente e hidróxido de sodio 1N, poco soluble en cloroformo, insoluble en éter. Su temperatura de Fusión es de 168 -171 ° C, con un peso molecular de 151.16 g/mol y un pH de la disolución acuosa saturada de 5.1 – 6.5.^{7-9.}

1.2.4. Propiedades farmacológicas

El paracetamol posee efectos analgésicos y antipiréticos muy similares a los de la aspirina, es útil en el dolor de cabeza, mialgia y dolor posparto, su acción antiinflamatoria es débil; este hecho puede atribuirse a que constituye un inhibidor débil de la ciclooxigenasa en presencia de altas concentraciones de peróxidos que aparecen en lesiones inflamatorias. Aun más, el fármaco en cuestión no inhibe la activación de neutrófilos como lo hacen otros antiinflamatorios no esteroides.⁶

1.2.5. Farmacocinética y metabolismo

El paracetamol se absorbe en forma rápida y casi completa en el tubo gastrointestinal, su concentración plasmática máxima llega en 30 a 60 minutos. Su vida media plasmática es de dos horas.^{6,7}

1.2.6. Aplicaciones terapéuticas

El paracetamol es un sustituto de la aspirina como analgésico antipirético, es particularmente útil en sujetos en quien aquella está contraindicada o cuando sería desventajosa la prolongación del tiempo de sangrado causada por el ácido acetilsalicílico. La dosis empleada regularmente es de 325 a 1000 mg, 650 mg por vía rectal; la dosis diaria total no debe rebasar los 4000 mg. En niños la dosis única es de 40 a 480 mg según la edad y el peso y es mejor no administrar más de 5 dosis en 24 horas. La dosis de 10 mg/Kg de peso también puede utilizarse.⁶

1.2.7. Efectos tóxicos

A dosis terapéuticas recomendadas, el paracetamol suele ser bien tolerado.

A veces surgen erupciones cutáneas y otras reacciones alérgicas. La erupción es por lo regular eritematosa o urticariana pero a veces es mas grave y se acompaña de fiebre medicamentosa y lesiones de mucosa.

El efecto mas grave de la sobredosificación aguda de paracetamol es la necrosis hepática, que depende de la dosis y puede ser mortal. En ocasiones se observa necrosis tubular renal y coma hipoglucémico.⁶

1.2.8. Método analítico para el paracetamol

Numerosos métodos de análisis son reportados para el paracetamol, tanto en formas farmacéuticas, como en fluidos biológicos; se encuentran reportados en la literatura métodos electroquímicos, cromatografía gas líquido, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrofotometría de masas, resonancia magnética nuclear, fluorometría, calorimetría y por supuesto espectrofotometría en la región ultravioleta. Este último, es un método sencillo y económico para su realización, siendo un método en que el espectrofotómetro como instrumento de medición de la respuesta analítica permite medir una señal precisa. Este es un método farmacopéico, es decir es un método analítico oficial, es por ello su importancia para el análisis farmacéutico.

1.3. Espectrofotometría

1.3.1. Definición

La espectrofotometría es una de las técnicas más empleadas en química analítica, tanto para identificar como para cuantificar al analito; la espectrofotometría consiste en la medida de la absorción por las diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática. La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las cortas longitudes de onda de la zona ultravioleta hasta la zona visible del espectro, inclusive. Para mayor comodidad en las referencias, este intervalo espectral puede considerarse como si estuviera constituido por dos zonas, la ultravioleta (190 nm - 380 nm) la visible (380 nm - 780 nm). La espectrofotometría en la zona visible (que antes solía llamarse colorimetría) es la medida de la absorción de la luz visible, que generalmente no es monocromática pero que se selecciona mediante el empleo de filtros pigmentados o de interferencia. Los espectros ultravioleta y visible de una sustancia no tienen, en general, un alto grado de especificidad. Sin embargo, son muy adecuados para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias, constituyen un medio útil adicional de identificación. ^{10 -11}

1.3.2. Usos

El uso de la espectrofotometría de absorción en las zonas visible y ultravioleta como procedimiento de valoración se basa en el hecho de que la absorptividad de una sustancia suele ser una constante independiente de la intensidad de la radiación incidente, la longitud interior de la celda y la concentración, por lo cual, la concentración se puede determinar espectrofotométricamente.

Las desviaciones de lo dicho en el párrafo anterior pueden ser causadas por variables de origen físico, químico o instrumental. Las desviaciones causadas por un error instrumental pueden deberse a variaciones en la abertura de la rendija, luz extraña o radiación policromática.

Ciertos errores pueden deberse también a cambios de concentración en las moléculas del soluto producidos por asociación entre ellas mismas o entre ellas y moléculas del disolvente, así como por disociación o ionización. ^{10 - 11}

Los fabricantes de espectrofotómetros suministran instrucciones detalladas para su empleo. Para conseguir resultados significativos y válidos, el operador de un espectrofotómetro debe conocer bien los límites de su empleo y las posibles causas de error y variación.

Conviene atenerse escrupulosamente al manual de instrucciones en algunos puntos como la conservación, la limpieza, la calibración del instrumento y el modo de usarlo.

Cuando se emplean instrumentos de registro de doble haz, la celda que contiene el disolvente sólo se coloca en el haz de referencia.

La limpieza de las celdas de absorción requiere particular atención. Normalmente, después de tratarlas con un medio de limpieza adecuado, deben enjuagarse las celdas con agua destilada y después con un disolvente orgánico volátil para que se sequen más rápido. Las soluciones en estudio no deben dejarse en las celdas más tiempo del necesario para efectuar la medición.

Al manejar las celdas hay que poner particular cuidado en no tocar nunca las superficies exteriores a través de las cuales pasa el haz de luz. Cuando se introduce en las celdas el disolvente y la solución problema, evitar así mismo que los líquidos contaminen las superficies exteriores.^{10 - 11}

1.3.3. Equipo

Básicamente todos los tipos de espectrofotómetros están diseñados de modo que permitan el paso de una radiación esencialmente monocromática a través de la sustancia problema, convenientemente preparada y hagan posible la medición de la fracción de radiación transmitida.⁶

El espectrofotómetro consta de una fuente de energía de un sistema dispersivo con rendijas para seleccionar la banda de longitudes de onda, una celda o recipiente para la sustancia problema, un detector de la energía radiante y dispositivos acoplados de amplificación, medición y registro

Algunos instrumentos se manejan manualmente mientras que otros están provistos de sistemas automáticos.^{10 - 11}

Hay instrumentos utilizables en la región visible del espectro, por lo general entre 380 nm y 700 nm y en las regiones visibles y ultravioleta, generalmente entre 190 nm y 700 nm.

Se encuentran instrumentos de un solo haz y de doble haz y ambos son igualmente útiles. Según el tipo de aparato que se emplee los resultados pueden hacerse visibles en una escala o en un registrador digital y quedar registrados o impresos.

El aparato debe mantenerse en buenas condiciones de funcionamiento, el sistema óptico ha de estar alojado de manera que se reduzcan al mínimo las posibilidades de errores causados por luz extraña o parásita, lo cual reviste particular importancia en la zona de ondas cortas del espectro.

Las celdas que suelen emplearse en la zona espectral que aquí se trata son celdas de absorción de 1 cm. de vidrio para la región visible o de sílice para la región UV con ventanas.

También pueden emplearse otros espesores. Las celdas utilizadas para la solución problema y para el blanco deben tener la misma transmitancia espectral cuando sólo contienen el disolvente; de lo contrario habrá que hacer la corrección apropiada.^{10 - 11}

1.3.4. Disolventes adecuados para la región ultravioleta.

Muchos disolventes pueden utilizarse para las pruebas y valoraciones en que se emplea la espectrofotometría en la región ultravioleta. Con este fin pueden emplearse agua, alcoholes, cloroformo, hidrocarburos ligeros, éteres y soluciones diluidas de hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico.

Los disolventes difieren respecto a la longitud de onda más baja en la que la disminución de la transparencia impide su empleo. Hay que cerciorarse de que los disolventes no contienen impurezas con capacidad de absorción en la región espectral correspondiente.

Pueden adquirirse disolventes especialmente purificados para determinaciones espectrofotométricas, pero sólo es preciso emplearlos cuando las características espectrales del tipo analítico usual del disolvente son adecuadas para un fin determinado.¹⁰

La absorbancia de la celda del disolvente y su contenido no debe exceder de 0.4 por cm del espesor atravesado por la energía luminosa cuando se mide con referencia al aire a la misma longitud de onda. El disolvente contenido en dicha celda debe ser del mismo lote que el empleado para preparar la solución y ha de estar exento de fluorescencia a la longitud de onda de la medición.

El etanol (750 g/L), el etanol deshidratado, el metanol y el ciclohexano empleados como disolventes deben tener una absorbancia, medida en una celda de 1 cm a 240 nm con referencia al agua, que no exceda de 0.10.¹⁰

1.3.5. Determinaciones cuantitativas en la región ultravioleta.

Las valoraciones espectrofotométricas requieren normalmente una comparación de la absorbancia producida por la solución de la sustancia problema con la absorbancia de una solución de la sustancia de referencia. En estos casos, las mediciones espectrofotométricas se hacen primero con la solución preparada de la sustancia de referencia y después con la solución preparada con la sustancia problema. La segunda medición se práctica lo más rápidamente posible después de la primera utilizando las mismas condiciones experimentales.

Las valoraciones espectrofotométricas suelen hacerse a un máximo de la absorción espectral del compuesto de que se trate.

Como es sabido, los diferentes espectrofotómetros pueden mostrar pequeñas variaciones en la longitud de onda aparente de este máximo. En la práctica, se recomienda emplear la longitud de onda máxima observada realmente en el instrumento que se maneja, de preferencia a la concreta especificada, siempre que la diferencia entre una y otra no pase de ± 0.5 nm en el intervalo de 240 nm-280 nm, de ± 1 nm en el intervalo de 280 nm - 320 nm o de ± 2 nm arriba de los 320 nm. Si la diferencia es mayor, debe ser recalibrado el instrumento.

Los cálculos deben basarse en la cantidad exacta pesada y si la sustancia de referencia utilizada no se ha secado previamente, en el material seco o anhidro.

Para las determinaciones cuantitativas se emplea con frecuencia un instrumento de observación manual; cuando se utiliza un aparato con

registrador debe ponerse especial atención en el calibrado de la escala de absorbancia a la longitud de onda empleada.

Las determinaciones cuantitativas suelen efectuarse a una longitud de onda de más de 235 nm. Cuando deban efectuarse mediciones a longitudes de onda situadas en el intervalo de 190 nm - 210 nm, conviene adoptar precauciones especiales, por ejemplo, purgar el comportamiento de la celda con nitrógeno, utilizar disolventes de calidad espectrofotométrica especial y emplear celdas que sean transparentes en esa región.

Cuando se mide la absorbancia en un máximo de absorción, la anchura de la rendija espectral debe ser pequeña en comparación con la mitad de la anchura de la banda de absorción pues de lo contrario se medirá una absorbancia erróneamente baja. En el caso de algunas sustancias habrá que poner particular cuidado y la anchura de la rendija instrumental empleada deberá ser tal que una reducción ulterior no se traduzca en un aumento en la cifra de absorbancia.

Con el empleo de anchura de rendijas de menos de 0.01 nm pueden plantearse problemas a causa de la difracción del haz luminoso. Cuando las valoraciones se hacen con gran frecuencia se puede omitir el uso de una sustancia de referencia y emplear en cambio una curva patrón adecuada preparada con la sustancia de referencia correspondiente. Así cabe hacerlo cuando, para la sustancia problema, la absorbancia es proporcional a la concentración dentro del intervalo aproximado de 75 a 125 por ciento de la concentración final empleada en la valoración. En esas circunstancias, se debe interpolar en la curva patrón la absorbancia observada en la valoración y sobre esta base, calcular el resultado de la valoración. Esas curvas patrón deben comprobarse con frecuencia y en todo caso cuando se emplea un aparato nuevo o nuevos lotes de reactivos.

En caso de incertidumbre o controversia se procederá a la comparación directa con una sustancia de referencia. ¹⁰

1.4. Validación de Métodos Analíticos

1.4.1. Validación

Un método analítico, como lo es el espectrofotométrico ultravioleta es definido como la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra, así el analito es comprendido como el componente específico en la muestra a medir en un análisis; por lo que el método analítico mide un componente específico (analito), en una muestra y como todo proceso de medición, este debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido. La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir, cumple con su propósito.^{12 - 14}

1.4.2. Justificación para realizar la validación de un método analítico

Un método analítico está identificado como un sistema crítico en el aseguramiento de la calidad, ya que impacta de manera directa en la calidad de un producto. La constante intención de las empresas por alcanzar una productividad mayor a menores costos, está determinada, entre otros factores, al dictamen del producto y de sus materias primas en menor tiempo, utilizando métodos de prueba de menor costo, mantenimiento o tiempo de análisis. De esta forma, el profesional farmacéutico es responsable de la calidad de los procesos farmacéuticos, por lo que todo producto debe satisfacer los requisitos mediante la validación de los métodos analíticos.

Además, existe justificación legal para realizar la validación de un método analítico, como lo son:

El reglamento de insumos para la salud referente a los establecimientos que se destinan a la fabricación de insumos, (medicamentos, fármacos, materias primas y aditivos), que establece que: los establecimientos que se destinan a la fabricación de insumos, llevarán el control analítico de estos. Dicho control deberá incluir. La validación de las técnicas empleadas.

La NORMA Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998 Buenas practicas de Fabricación para fármacos que establece: Los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, PNO's o manuales que contengan las especificaciones para garantizar la confiabilidad de sus resultados. Tales controles deben incluir: Validación de métodos analíticos utilizados por la empresa, no farmacopeicos o farmacopeicos que tengan desviaciones frente a la farmacopea de referencia.

La NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos; establece, entre otros, los siguientes puntos para la validación:

Que se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados.

Los métodos analíticos deben ser validados, de acuerdo con lo establecido en el apartado "control del laboratorio analítico".

Se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM.

En la tabla I se enlistan los requisitos a evaluar en la valoración de métodos analíticos de acuerdo a la aplicación del mismo.

1.4.3. Parámetros de Validación

Tabla I. Parámetros de validación

Parámetro de Desempeño	Contenido/ Potencia/ Valoración	Prueba de impureza Contenido/ Valoración	Prueba de impureza Limite	Identificación
Precisión/ Adecuabilidad del sistema	Si	Si	Si	*
Linealidad del sistema	Si	SI	No	No
Especificidad (1)	Si (3)	Si	Si	Si
Exactitud y repetibilidad	Si	Si	No	No
Precisión del método o Precisión intermedia (2)	Si	Si	No	No
Estabilidad analítica de la muestra (2)	*	*	No	No
Limite de detección	No	No	Si	No
Limite de cuantificación	No	Si	No	No
Robustez	*	*	*	No
Tolerancia	*	*	*	No

*PUEDE SER REQUERIDO DEPENDIENDO LA NATURALEZA DEL MÉTODO

(1) La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.

(2) También es definido como un estudio de tolerancia.

(3) Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

1.4.4. Definición de los Parámetros de Validación

1.4.4.1. Precisión del Sistema.

Es el grado de concordancia entre los resultados de cada prueba obtenidos por repetición aplicando el método analítico a múltiples muestras de una muestra homogénea. También se refiere a la distribución de los resultados individuales alrededor de su promedio.¹⁴

1.4.4.2. Linealidad del Sistema.

Es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito en las muestras dentro de un rango dado.¹⁴

1.4.4.3. Especificidad.

La especificidad también puede ser llamada selectividad y se refiere a la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.¹⁴

1.4.4.4. Exactitud.

La exactitud de un método analítico es la cercanía de los resultados del análisis obtenidos con el método con el valor verdadero. La exactitud se expresa con frecuencia como el porcentaje de recobro por medio del ensayo de cantidades adicionadas conocidas del analito. La exactitud debe establecerse a lo largo del rango especificado del procedimiento analítico.^{12 - 13}

1.4.4.5. Repetibilidad.

Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos.^{12 - 14}

1.4.4.6. Linealidad del Método

Se define como la variación en la cantidad de fármaco recobrado por el ensayo como una función de la cantidad de fármaco real en la muestra. Cualquier desviación en la linealidad indica que el método no

trabaja apropiadamente, las muestras con esa cantidad de fármaco, (relación de cantidad agregada y cantidad recuperada).¹⁴

1.4.4.7. Precisión del Método.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados de pruebas individuales cuando el procedimiento se aplica de manera repetida a muestreos múltiples de una muestra homogénea.

La precisión de un método analítico se expresa generalmente como la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación.^{12 - 14}

1.4.4.8. Precisión Intermedia

Expresa la variación dentro del laboratorio en diferentes días con diferentes analistas o equipo dentro del mismo laboratorio.^{12 y 13}

1.4.4.9. Robustez

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

2. Planteamiento del problema:

El método analítico descrito en la Farmacopea de los estados Unidos Mexicanos (FEUM), séptima edición, para la cuantificación de paracetamol requiere de un excesivo gasto de agua, superando los 1000 mL, con un gasto de metanol de 20 mL en la valoración de una sola muestra, involucrando directamente además la generación de desechos.

En la actualidad en el campo de la química analítica es necesario el diseño de métodos analíticos eficaces y precisos que puedan satisfacer los requisitos para la aplicación analítica deseada, proporcionando además, beneficios económicos, de seguridad para los analistas y sobre todo beneficios en materia ecológica, de esta manera el diseño de métodos analíticos a microescala es una alternativa para el desarrollo de análisis cualitativo y cuantitativo en laboratorios de control de calidad, investigación, así como de enseñanza experimental de química.

El microescalamiento para el método analítico de valoración para el paracetamol por debajo del 25 % puede contribuir en gran medida al ahorro de agua, metanol, sustancia de referencia y cantidad de muestra y sobre todo en cuanto a la gran disminución de residuos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General:

Diseñar, desarrollar y validar el método analítico de valoración de paracetamol a microescala, que sea preciso, eficaz y cumpla con los parámetros de desempeño de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).

3.2. Objetivos particulares:

Reducir el consumo de materiales al aplicar la técnica en microescala.

Contribuir en el campo de la ecología disminuyendo la cantidad de materiales y sustancias de desecho.

Facilitar la enseñanza experimental en laboratorios de química analítica y de control de calidad

4. Hipótesis:

Considerando que la capacidad del método a microescala satisface los requisitos para la valoración de paracetamol, mediante la validación del método analítico se podrá asegurar que el método desarrollado es útil, disminuyendo el consumo de materiales, la cantidad de reactivos y sustancias de desecho.

5. Diseño experimental

5.1. Insumos necesarios para realización del proyecto.

Equipo	Marca	Modelo
Balanza analítica	OHAUS	Explorer Pro
Microbalanza	Mettler	Mettler MT5

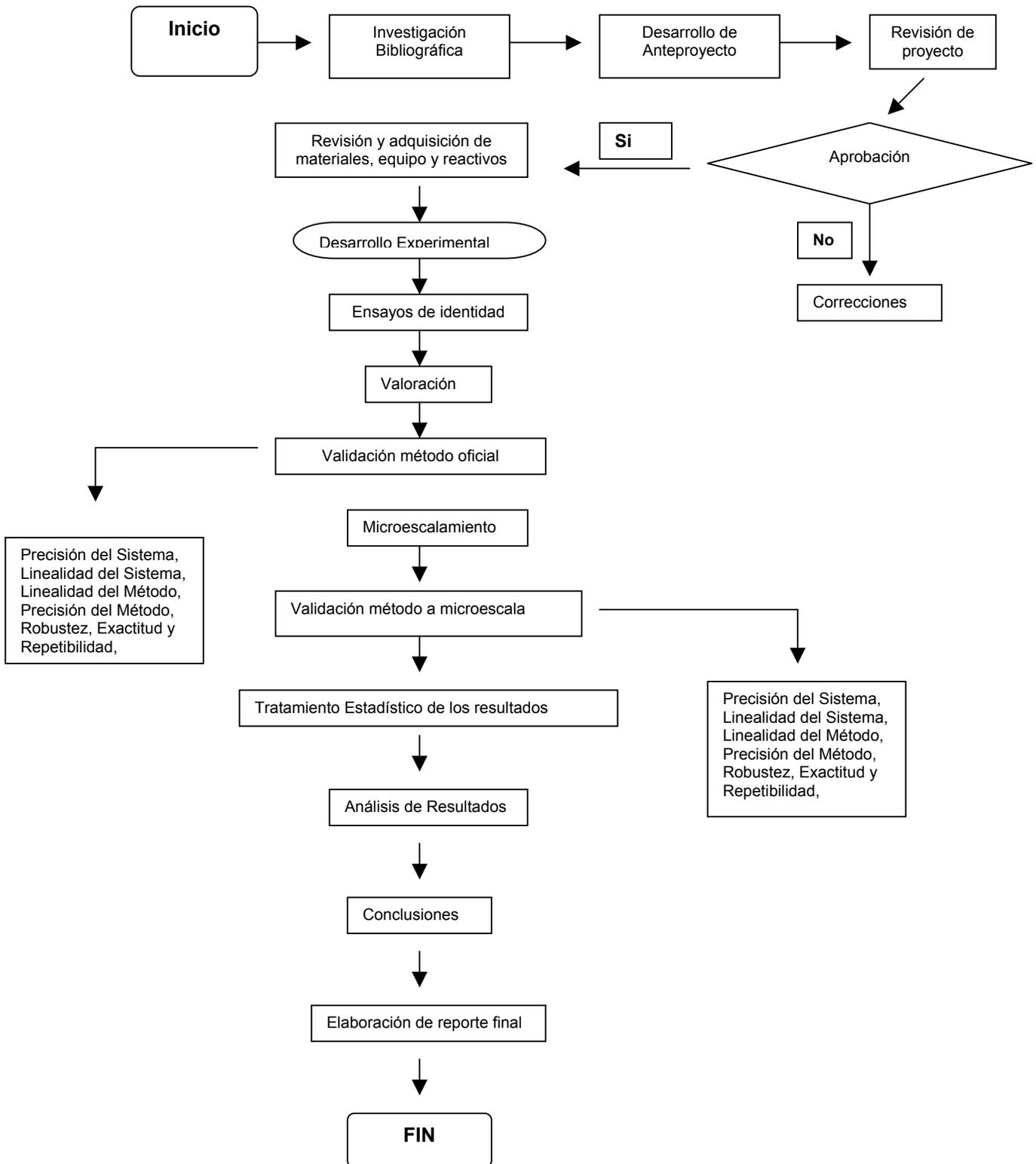
Espectrofotómetro	VARIAN	Cary 50 bio
-------------------	--------	-------------

Reactivo	Marca	No. de lote
Metanol G.R.	EM SCIENCE	39277940
Agua destilada	NON plus ultra	S/N
Paracetamol referencia	PROQUIFA	I
Paracetamol muestra	HELM	088998E104

Material	Característica	Capacidad
Espátula	Acero inoxidable	Chica
Perilla de seguridad	Goma	Mediana
Pizeta	Plástico	Mediana
Soporte universal	Acero inoxidable	Chica
Pinza para bureta	Plástico	Mediano
Matraz Volumétrico	Pirex	500 mL
Matraz Volumétrico	Pirex	250 mL
Matraz Volumétrico	Pirex	100 mL
Matraz Volumétrico	Pirex	50 mL
Matraz Volumétrico	Pirex	25 mL
Matraz Volumétrico	Pirex	10 mL
Matraz Volumétrico	Pirex	5 mL
Pipeta Volumétrica	Pirex	5 mL
Pipeta Volumétrica	Pirex	1 mL
Bureta Graduada	Pirex	10 mL
Vaso de precipitado	Pirex	100 mL
Vaso de precipitado	Pirex	50 mL
Vaso de precipitado	Pirex	30 mL

5.2. Metodología del proyecto.

5.2.1. Diagrama de flujo



5.2.2. Método Analítico Oficial, (FEUM Séptima Edición)

Preparación de la muestra

1. Pesar 120 mg de la muestra.
2. Disolver la cantidad pesada de la muestra con 10 mL de metanol
3. En un matraz Volumétrico de 500 mL llevar al aforo con agua
4. Tomar una alícuota de 5 mL y pasarla a un matraz volumétrico de 100 mL
5. Llevar al aforo con agua el matraz volumétrico de 100 mL con la alícuota.

Preparación de la referencia.

1. Pesar 120 mg de la referencia.
2. Disolver la cantidad pesada de la muestra con 10 mL de metanol
3. En un matraz Volumétrico de 500 mL llevar al aforo con agua
4. Tomar una alícuota de 5 mL y pasarla a un matraz volumétrico de 100mL
5. Llevar al aforo con agua el matraz volumétrico de 100 mL con la alícuota.

Procedimiento

1. Determinar la absorbancia de la preparación de referencia a 244 nm.
2. Determinar la absorbancia de la preparación de la muestra a 244 nm.
3. Utilizar agua como blanco de ajuste,
4. Calcular la cantidad en mg de paracetamol mediante la formula:

$10C (A_m / A_{ref})$, donde C es la concentración en microgramos por mililitro de paracetamol en la referencia; A_m y A_{ref} son las absorbancias obtenidas con la preparación de la muestra y la preparación de referencia respectivamente.

5.3. Métodos en microescala para paracetamol

5.3.1. Microescala al 50%

Preparación de la muestra

1. Pesar 60 mg de la muestra.
2. Disolver la cantidad pesada de la muestra con 5 mL de metanol
3. En un matraz Volumétrico de 250 mL llevar al aforo con agua
4. Tomar una alícuota de 2.5 mL y pasarla a un matraz volumétrico de 50 mL.
5. Llevar al aforo con agua el matraz volumétrico de 50 mL con la alícuota.

Preparación de referencia.

1. Pesar 60 mg de la muestra.
2. Disolver la cantidad pesada de la muestra con 5 mL de metanol
3. En un matraz Volumétrico de 250 mL llevar al aforo con agua
4. Tomar una alícuota de 2.5 mL y pasarla a un matraz volumétrico de 50 mL.
5. Llevar al aforo con agua el matraz volumétrico de 50 mL con la alícuota.

Procedimiento

1. Determinar la absorbancia de la preparación de referencia a 244 nm.
2. Determinar la absorbancia de la preparación de la muestra a 244 nm.
3. Utilizar agua como blanco de ajuste,
4. Calcular la cantidad en mg de paracetamol mediante la formula:

$10C (A_m / A_{ref})$, donde C es la concentración en microgramos por mililitro de paracetamol en la referencia; A_m y A_{ref} son las absorbancias obtenidas con la preparación de la muestra y la preparación de referencia respectivamente.

5.3.2. Microescala al 25%

Preparación de la muestra

1. Pesar 30 mg de la muestra.
2. Disolver la cantidad pesada de la muestra con 2.5 mL de metanol
3. En un matraz Volumétrico de 100 mL llevar al aforo con agua
4. Tomar una alícuota de 1 mL y pasarla a un matraz volumétrico de 25 mL
5. Llevar al aforo con agua el matraz volumétrico de 25 mL con la alícuota.

Preparación de referencia.

1. Pesar 30 mg de la muestra.
2. Disolver la cantidad pesada de la muestra con 2.5 mL de metanol
3. En un matraz Volumétrico de 100 mL llevar al aforo con agua
4. Tomar una alícuota de 1 mL y pasarla a un matraz volumétrico de 25 mL
5. Llevar al aforo con agua el matraz volumétrico de 25 mL con la alícuota.

Procedimiento

1. Determinar la absorbancia de la preparación de referencia a 244 nm.
2. Determinar la absorbancia de la preparación de la muestra a 244 nm.
3. Utilizar agua como blanco de ajuste,
4. Calcular la cantidad en mg de paracetamol mediante la fórmula.
 $10C (A_m / A_{ref})$, donde C es la concentración en microgramos por mililitro de paracetamol en la referencia; A_m y A_{ref} son las absorbancias obtenidas con la preparación de la muestra y la preparación de referencia respectivamente.

5.3.3. Microescala al 10%

Preparación de la muestra

1. Pesar 12 mg de la muestra.
2. Disolver la cantidad pesada de la muestra con 1 mL de metanol
3. En un matraz Volumétrico de 50 mL llevar al aforo con agua
4. Tomar una alícuota de 0.5 mL y pasarla a un matraz volumétrico de 10 mL
5. Llevar al aforo con agua el matraz volumétrico de 10 mL con la alícuota.

Preparación de referencia.

1. Pesar 12 mg de la muestra.
2. Disolver la cantidad pesada de la muestra con 1 mL de metanol
3. En un matraz Volumétrico de 50 mL llevar al aforo con agua
4. Tomar una alícuota de 0.5 mL y pasarla a un matraz volumétrico de 10 mL
5. Llevar al aforo con agua el matraz volumétrico de 10 mL con la alícuota.

Procedimiento

1. Determinar la absorbancia de la preparación de referencia a 244 nm.
2. Determinar la absorbancia de la preparación de la muestra a 244 nm,
3. Utilizar agua como blanco de ajuste
4. Calcular la cantidad en mg de paracetamol mediante la formula.

$10C (A_m / A_{ref})$, donde C es la concentración en microgramos por mililitro de paracetamol en la referencia; A_m y A_{ref} son las absorbancias obtenidas con la preparación de la muestra y la preparación de referencia respectivamente.

CONSERVACIÓN. En envases bien cerrados, protegidos de la luz.

5.4. Selección del método en microescala a validar

En los procesos de experimentación los métodos estadísticos incrementan en gran medida la eficiencia de los resultados y contribuyen a fortalecer las conclusiones así obtenidas, es por ello, que se hace necesario un estudio estadístico para la elección del método analítico de escala menor; que por supuesto no presenten una respuesta analítica significativamente diferente entre las determinaciones de cada escala.

Se obtendrá la respuesta analítica de por lo menos seis muestras para cada escala, (100%, 50%, 25% y 10%), estos datos serán sometidos a un análisis de varianza de un factor para proceder a validar la escala menor, que no presente diferencia significativa al 5%, entre las respuestas analíticas de cada escala del método analítico.

5.5. Metodología de validación

5.5.1. Precisión del Sistema

Preparar por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada; preparadas por dilución. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones. Calcular, desviación estándar y coeficiente de variación de la respuesta analítica.

Criterio de aceptación: coeficiente de variación de la respuesta analítica $\leq 1.5\%$

Precisión del sistema

Media aritmética

$$\hat{y} = \Sigma y/n$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2 / n(n-1)}$$

Coeficiente de variación

$$CV = s/\hat{y}(100)$$

n = numero de mediciones

5.5.2. Linealidad del Sistema

Preparar por lo menos por triplicado 5 niveles de concentración de la solución de referencia, por dilución. La concentración central debe ser igual a la que se prepara de la solución de referencia en el método. A un intervalo de 80%, 90%, 100%, 110%, y 120%. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración vs. Respuesta analítica. Calcular el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación y el intervalo de confianza para la pendiente.

Criterio de aceptación: coeficiente de determinación ≥ 0.98 y el intervalo de confianza para la pendiente, no debe incluir el cero.

Es conveniente trazar la grafica la concentración (x) vs. La respuesta analítica (y), e incluir en ella la ecuación, la línea de ajuste y el coeficiente de determinación.

Linealidad del sistema:
m (pendiente)
b (ordenada al origen)
 r^2 (Coeficiente de determinación)

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

Coeficiente de variación de la regresión
 $C.V.y/x = S_{y/x} / \hat{y} * 100$

5.5.3. Exactitud y Repetibilidad.

Preparar por lo menos un sextuplicado, cada muestra por pesadas independientes, adicionándole la cantidad del analito, correspondiente al 100%. Las muestras deben ser analizadas por el mismo analista bajo las mismas condiciones, utilizando como referencia, la (muestra), la sustancia empleada en la preparación de la muestra. Determinar la cantidad recuperada del analito.

Criterios de aceptación: El intervalo de confianza para la media poblacional IC (μ), debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo, correspondiente a 97 -103 % dado que el método es espectrofotométrico.

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

Se maneja % de recobro como (y)
Media aritmética
 $\hat{y} = \sum y/n$

Desviación estándar
 $S = \sqrt{n(\sum y^2) - (\sum y)^2 / n(n-1)}$

Coeficiente de variación
 $C.V. = s/\hat{y} (100)$

Intervalo De confianza
Para la media poblacional
 $IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1}(S/ n)$
n = numero de recobros

5.5.4. Linealidad del Método

Preparar una muestra correspondiente al 100%. Seleccionar al menos dos niveles superior e inferior por triplicado para cada nivel manteniendo constante la cantidad de placebo analítico en los tres niveles. Las muestras deben ser analizadas por un mismo analista bajo las mismas condiciones utilizando como referencia, la sustancia empleada en la adición para la solución muestra. Determinar la cantidad del analito.

Criterios de aceptación:

Cantidad adicionada contra cantidad recuperada.

Coeficiente de determinación ≥ 0.98

El intervalo de confianza para la pendiente poblacional debe incluir la unidad.

El intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional debe incluir el cero.

El coeficiente de variación de regresión del porcentaje de recobro, no debe ser mayor de 3%

Porcentaje de Recobro: El intervalo de confianza para la media poblacional debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo; 97 a 103 %, dado que el método es espectrofotométrico.

El coeficiente de variación del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 3%, dado que el método es espectrofotométrico.

Es conveniente trazar la grafica de la cantidad adicionada (x) vs. la cantidad recuperada (y), e incluir la ecuación, su línea y el coeficiente de determinación.

Linealidad del método

Cantidad adicionada contra cantidad recuperada

Media aritmética

$$\hat{y} = \Sigma y / n$$

m (pendiente)

b (ordenada al origen)

r^2 (Coeficiente de determinación)

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

Coeficiente de variación de la regresión

$$\mathbf{C.V.y/x = S_{y/x} / \hat{y} * 100}$$

% de recobro como (y)

Media aritmética

$$\hat{y} = \Sigma y/n$$

Desviación estándar

$$\mathbf{S = \sqrt{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2 / n(n-1)}}$$

Coeficiente de variación

$$\mathbf{C.V. = s / \hat{y} (100)}$$

Intervalo de confianza

Para la media poblacional

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

n= numero de recobros

5.5.4. Precisión del método

Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100%, en dos días diferentes por dos analistas diferentes.

Utilizar de preferencia la misma sustancia de reacción y los mismos instrumentos y/o equipo. Reportar la valoración del analito de todas las muestras.

Calcular la media aritmética, desviación estándar coeficiente de variación de la valoración empleando todos los resultados obtenidos.

Criterio de aceptación: el coeficiente de variación $\leq 3\%$ para este método.

Precisión del método

Media aritmética

$$\hat{y} = \Sigma y/n$$

Desviación estándar

$$\mathbf{S = \sqrt{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2 / n(n-1)}}$$

Coeficiente de variación

$$\mathbf{C.V. = s / \hat{y}(100)}$$

n= numero de recobro

5.5.5. Robustez.

Se desarrolla el método en tres condiciones distintas empleando como disolvente en la condición normal de operación: metanol grado reactivo y como condiciones distintas metanol grado analítico y metanol grado técnico, analizar cada condición al menos por triplicado. Reportar la valoración del analito para las muestras en condición normal y para las condiciones de operación, expresadas como %.

Calcular la media aritmética de la condición normal de operación (y_0) y de cada condición de operación diferente a la condición normal (y_1).

Se determina la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal ($|d_i|$).

Criterio de aceptación

$|d_i| \leq 3\%$ para este método, espectrofotométrico.

6. Resultados y análisis de resultados

6.1. Ensayos de identidad

Tabla II. Resultados de ensayos de Identidad

Prueba	1	2	3
A. Reacción con cloruro férrico	Si cumple	Si cumple	Si cumple
B. Reacción con dicromato de potasio	Si cumple	Si cumple	Si cumple

Se llevaron a cabo las reacciones de identidad con cloruro férrico para la prueba A, y con dicromato de potasio para la prueba B; como se puede observar en la tabla 2, cada prueba se realizó por triplicado, siendo positivas desarrollando la coloración violeta, por lo que se considera que los resultados cumplen con las especificaciones de la FEUM, así la materia prima con que se cuenta puede ser utilizada como paracetamol.

6.2. Validación del método analítico de valoración a la escala de 100%

6.2.1. Precisión del sistema

Tabla III. Precisión del sistema:
Respuesta analítica, parámetros estadísticos y criterios de aceptación

Muestras	Respuesta analítica
1	0.7993
2	0.8032
3	0.8039
4	0.8012
5	0.8065
6	0.8028
Parámetros estadísticos	
Suma	4.8169
Promedio	0.8028
Suma de cuadrados	0.6445
Desviación estándar	0.0024
Coefficiente de variación	0.3044

Se preparó un sextuplicado de soluciones a la concentración de la referencia, por dilución, como se puede observar en la tabla III; se determinó la respuesta analítica calculándose los parámetros estadísticos: desviación estándar, promedio y coeficiente de variación el cual es menor al 1.5 %, por lo que el sistema es preciso al cumplir con el criterio de aceptación

6.2.2. Exactitud y repetibilidad

Tabla IV. Exactitud y repetibilidad:
Porcentaje de recobro, parámetros estadísticos y criterios de aceptación.

Muestras	Porcentaje de recobro (%)
1	99
2	99.25
3	99.58
4	100.82
5	100.16
6	101.24
Parámetros estadísticos	
Suma	600.05
Suma de cuadrados	60013.9745
Promedio	100.0083333
Desviación estándar	0.891524911
Coefficiente de variación	0.891450623
Intervalo de confianza para la media poblacional.	94.14 a 101.01

Se prepararon seis muestras por pesadas independientes con una adición correspondiente del analito de 120 mg; las muestras fueron analizadas en igualdad de condiciones utilizando como referencia la muestra y se determinó la cantidad recuperada del analito como se observa en la tabla IV. Se calculó el intervalo de confianza para la media poblacional que incluyó al 100%, el promedio aritmético del porcentaje de recobro el cual se incluye en el intervalo de 97 a 103 % y el coeficiente de variación que es menor a 3% por lo que el método es exacto y repetible.

6.2.3. Precisión del método

Tabla V. Precisión del método: Contenido de analito, parámetros estadísticos y criterios de aceptación.

Día	Analista	Contenido de analito (mg)
1	1	120.87
1	1	121.27
1	1	120.67
1	2	121.1
1	2	122.1
1	2	122.32
2	1	119.57
2	1	119.86
2	1	120.89
2	2	120.96
2	2	121.18
2	2	121.99
Parámetros estadísticos		
Suma		1452.78
Promedio		121.065
Suma de cuadrados		175888.2918
Desviación estándar		0.824681757
Coeficiente de variación		0.681189243

Se analizó por triplicado la muestra con cantidades cercanas a 120 mg en dos días diferentes por dos analistas distintos en igualdad de condiciones. Como se observa en la tabla V. Se reportó la valoración (concentración) de las muestras, calculándose el promedio aritmético desviación estándar y el coeficiente de variación el cual es menor a 3% por lo que el método es preciso.

6.2.4. Linealidad del método

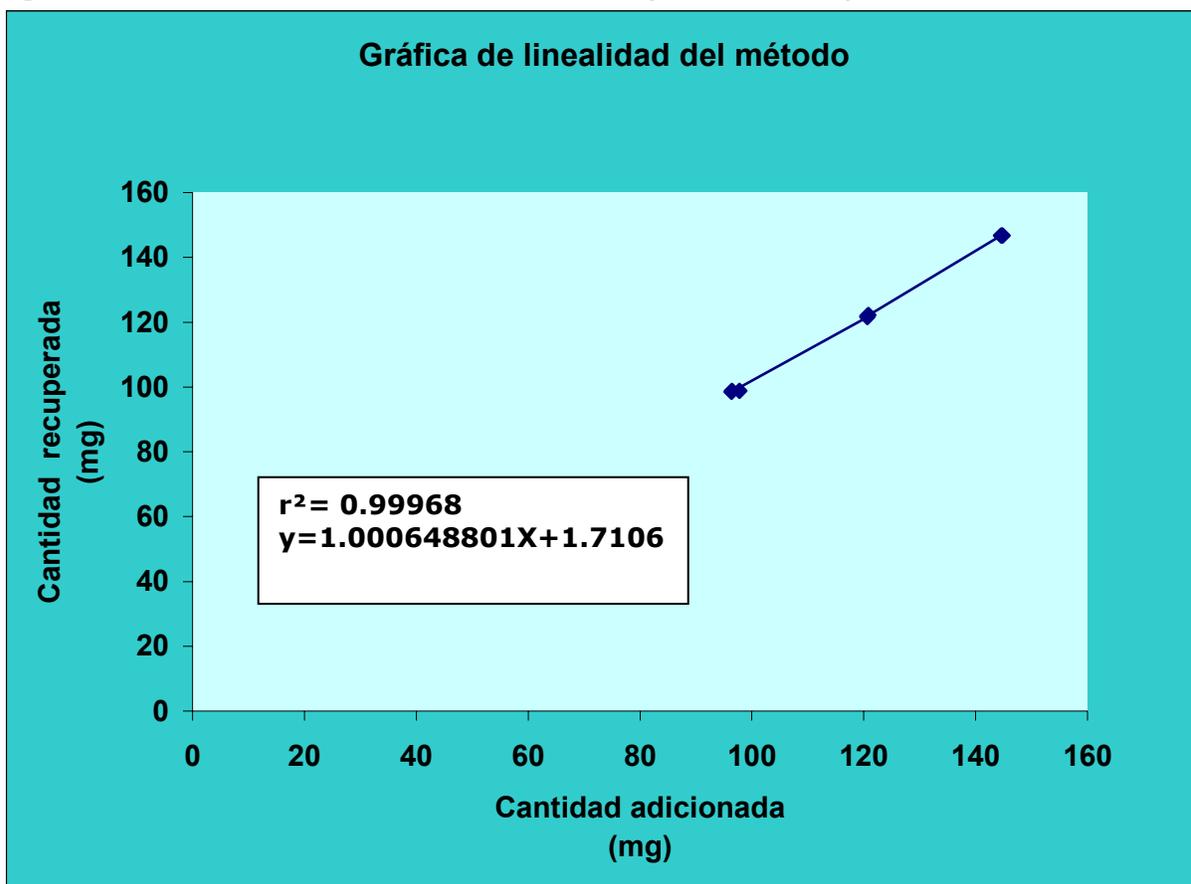
Tabla VI. Linealidad del método: cantidad recuperada, cantidad adicionada, porcentaje de recobro, parámetros estadísticos y criterios de aceptación.

Muestras	Cantidad recuperada (mg)	Cantidad adicionada (mg)	Porcentaje de recobro (%)
1	98.8	97.8	101.0224949
2	98.8	96.8	102.0661157
3	98.5	96.5	102.0725389
4	121.6	120.6	100.8291874
5	122.2	120.2	101.6638935
6	121.8	120.8	100.8278146
7	146.7	144.5	101.5224913
8	146.8	144.7	101.4512785
9	146.8	144.8	101.3812155
Parámetros estadísticos			
Suma	912.8370303		
Suma de cuadrados	92587.48911		
Promedio	101.4263367		
Desviación estándar	0.470788649		
Coefficiente de variación	0.46416805		
Coefficiente de determinación	0.999680407		
Ordenada al origen	1.710607396		
Pendiente	1.006019623		
Intervalo de confianza para la pendiente	0.986 a 1.026		
Intervalo de confianza para la ordenada al origen	-0.9723 a 4.193		

Se preparó por triplicado una muestra correspondiente al 100%, (120mg) se seleccionó un nivel inferior correspondiente a 80 %, y un

nivel superior correspondiente a 120 %, también preparados por triplicado, se analizaron en igualdad de condiciones por un mismo analista utilizando la muestra como referencia. Como se puede observar en la tabla VI se determinó la cantidad del analito recuperada y adicionada, el intervalo de confianza para la pendiente, el cual incluye la unidad, el intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional que incluye el cero, el promedio aritmético del porcentaje de recobro que se incluye en el intervalo de 97 a 103 % y el coeficiente de variación es menor a 3%; se anexa la gráfica de Cantidad adicionada (x) vs. Cantidad recuperada (y); y se incluye la ecuación de su línea y el coeficiente de determinación que es mayor a 0.98 como se observa en la figura 2. Los criterios de aceptación cumplen con las especificaciones y por lo tanto el método es lineal.

Figura 2: Gráfica de Linealidad del método, (escala 100%).



6.2.5. Linealidad del sistema

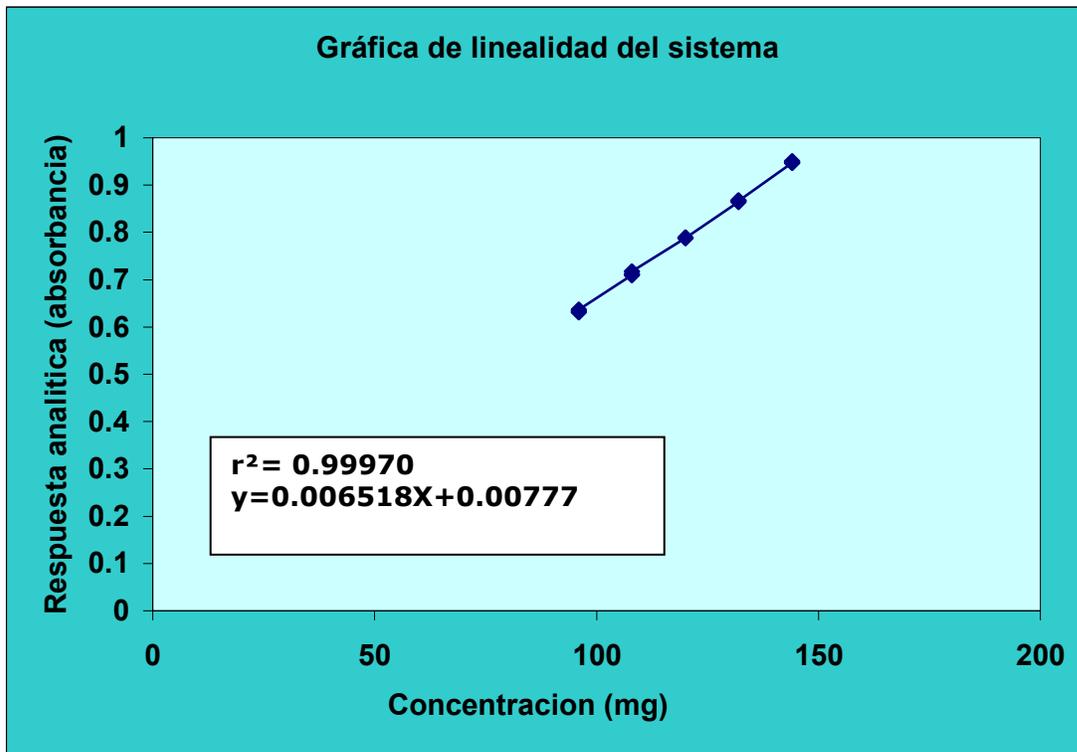
Tabla VII: Linealidad del sistema, concentración teórica, respuesta analítica y criterios de aceptación

Concentración teórica (mg)	Respuesta analítica (absorbancia)
96	0.6331
96	0.6311
96	0.6372
108	0.7093
108	0.7115
108	0.7178
120	0.7886
120	0.7893
120	0.7878
132	0.864
132	0.868
132	0.8669
144	0.947
144	0.9469
144	0.9506
Parámetros estadísticos	
Coefficiente de determinación	0.99970959
Ordenada al origen	0.00777
pendiente	0.006518056
Intervalo de confianza para la pendiente	0.006396 a 0.006639

Se prepararon por triplicado niveles de concentración equivalentes a 80%, 90%, 100%, 110% y 120%. Como se observa en la tabla VII, se determinó la respuesta analítica en igualdad de condiciones, calculándose la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación el cual es mayor a 0.98 y el intervalo de confianza para la pendiente, que no incluye el cero. Se anexa en la figura 3 la gráfica correspondiente de concentración (x) vs. Respuesta analítica (y) que

incluye la ecuación de su línea y el coeficiente de determinación. Así los criterios de aceptación cumplen con las especificaciones y por lo tanto el sistema es lineal.

Figura 3: Gráfica Linealidad del sistema, (escala 100 %).



6.2.6. Robustez

Tabla VIII. Robustez: Concentración en porcentaje, promedio aritmético de la concentración en porcentaje y criterios de aceptación

Muestra	Concentraciones expresadas en porcentaje (%)	promedio aritmético de la concentración en porcentaje
1 Grado técnico	100.25	
2 Grado técnico	98.14	99.08
3 Grado técnico	98.85	
1 Grado reactivo	98.4	
2 Grado reactivo	98.43	98.893
3 Grado reactivo	99.85	
1 Grado analítico	100.85	
2 Grado analítico	99.49	100.046
3 Grado analítico	99.8	
Criterios de aceptación		
di 1	0.18666667	
di 2	1.15333333	

Se desarrollo el método en tres condiciones distintas, en la condición normal de operación se empleó como disolvente para la muestra metanol grado reactivo y como condiciones distintas metanol grado técnico y metanol grado analítico, se analizó cada condición por triplicado. Como se observa en la tabla VIII se reportó la valoración para las tres condiciones expresadas en por ciento, se calculo el promedio aritmético para cada condición y la diferencia absoluta de cada condición diferente respecto a la condición normal. La diferencia absoluta de ambas condiciones diferentes no es mayor a 3% por lo tanto el método mantiene su desempeño con las variaciones propuestas.

6.2.7. Resumen de resultados de la validación al 100 %

Tabla IX. Resumen de resultados de validación de la escala a 100 %

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado obtenido	Cumple
Precisión del sistema	C.V. ≤ 1.5 %	C.V. = 0.3044%	Si
Exactitud y repetibilidad	I.C. (μ) debe incluir el 100% La media aritmética del % de recobro se debe incluir en el intervalo de 97 a 103 % C.V. ≤ 3.0 %	I.C.(μ) =94.14 a 101.01 Media = 100.008 % C.V. = 0.8914 %	Si
Precisión del método	C.V. ≤ 3.0%	C.V. = 0.6811 %	Si
Linealidad del método	C. adicionada vs. C. recuperada r² ≥ 0.98 I.C. (b) debe incluir la unidad I.C. (a) debe incluir el cero C.V. ≤ 3.0 % Porcentaje de recobro La media aritmética del % de recobro se debe incluir en el intervalo de 97 a 103 % C.V. del % de recobro ≤ 3.0 %	C. adicionada vs. C. recuperada r² = 0.9996 I.C. (b) = 0.9861 a 1.026 I.C. (a) = -0.7723 a 4.193 Porcentaje de recobro media = 101.426 C.V. = 0.4641 %	Si
Linealidad del sistema	r² ≥ 0.98 I.C. (b) no debe incluir la unidad	r² = 0.9994 I.C.(b) =0.006396 a 0.006639	Si
Robustez	 di ≤ 3.0 %	Grado técnico di 1 = 0.19 % Grado analítico di 2 = 1.15 %	Si

La validación del método analítico de valoración de paracetamol, a la escala de 100 %, es decir el método oficial, cumple con los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros de desempeño evaluados, como se puede observar en la tabla IX. De esta forma se considera que el método oficial satisface los requisitos para la valoración de paracetamol.

6.3. Resultados de microescalamiento de la valoración de paracetamol

6.3.1 Determinación al 100 % balanza analítica.

Tabla X. Determinación de la respuesta analítica a la escala de 100 % y parámetros estadísticos, (uso de balanza analítica).

Muestras	Respuesta analítica
1	0.7895
2	0.7966
3	0.8018
4	0.8052
5	0.8054
6	0.808
Parámetros estadísticos	
Promedio	0.80108333
Desviación estándar	0.00690229
Coefficiente de variación	0.86162001
(Pesada: 121.2mg)	

En la tabla X se observa la respuesta analítica de seis muestras preparadas por diluciones de una sola muestra homogénea a una concentración igual a la de la referencia, a la escala de 100%, (método oficial), utilizando la balanza analítica para la pesada de la muestra y referencia; calculándose un coeficiente de variación menor a 3%.

6.3.2. Determinación al 100 % en microbalanza

Tabla XI. Determinación de la respuesta analítica a la escala de 100 % y parámetros estadísticos, (uso de microbalanza).

Muestras	Respuesta analítica
1	0.8036
2	0.7923
3	0.8054
4	0.7999
5	0.7966
6	0.8002
Parámetros estadísticos	
Promedio	0.79966667
Desviación estándar	0.00474032
Coefficiente de variación	0.59278743
(Pesada: 121.670mg)	

En la tabla XI se observa la respuesta analítica de seis muestras preparadas por diluciones de una sola muestra homogénea a una concentración igual a la de la referencia, a la escala de 100%, (método oficial), utilizando la microbalanza para la pesada de la muestra y referencia; calculándose un coeficiente de variación menor a 3%.

6.3.3. Determinación al 50% en balanza analítica

Tabla XII. Determinación de la respuesta analítica a la escala de 50 % y parámetros estadísticos, (uso de balanza analítica).

Muestras	Respuesta analítica
1	0.7892
2	0.7953
3	0.7952
4	0.8056
5	0.7963
6	0.7997
Parámetros estadísticos	
Promedio	0.79688333
Desviación estándar	0.00545212
Coefficiente de variación	0.68418108
(Pesada: 62.01mg)	

En la tabla XII se observa la respuesta analítica de seis muestras preparadas por diluciones de una sola muestra homogénea a una concentración igual a la de la referencia, a la escala de 50 %, respecto al método oficial, utilizando la balanza analítica para la pesada de la muestra y referencia; calculándose un coeficiente de variación menor a 3%.

6.3.4. Determinación al 50 % en microbalanza

Tabla XIII. Determinación de la respuesta analítica a la escala de 50 % y parámetros estadísticos, (uso de microbalanza).

Muestras	Respuesta analítica
1	0.7936
2	0.7909
3	0.795
4	0.8082
5	0.7961
6	0.7913
Parámetros estadísticos	
Promedio	0.79585
Desviación estándar	0.00638083
Coefficiente de variación	0.80176298
(Pesada: 60.804mg)	

En la tabla XIII se observa la respuesta analítica de seis muestras preparadas por diluciones de una sola muestra homogénea a una concentración igual a la de la referencia, a la escala de 50 %, respecto al método oficial, utilizando la microbalanza para la pesada de la muestra y referencia; calculándose un coeficiente de variación menor a 3%.

6.3.5. Determinación al 25% en balanza analítica

Tabla XIV. Determinación de la respuesta analítica a la escala de 25% y parámetros estadísticos, (uso de balanza analítica).

Muestras	Respuesta analítica
1	0.7767
2	0.7969
3	0.784
4	0.7906
5	0.8009
6	0.7928
Parámetros estadísticos	
Promedio	0.79031667
Desviación estándar	0.00879668
Coefficiente de variación	1.11305827
(Pesada: 30.07mg)	

En la tabla XIV se observa la respuesta analítica de seis muestras preparadas por diluciones de una sola muestra homogénea a una concentración igual a la de la referencia, a la escala de 25 %, respecto al método oficial, utilizando la balanza analítica para la pesada de la muestra y referencia; calculándose un coeficiente de variación menor a 3%.

6.3.6. Determinación al 25 % en microbalanza

Tabla XV. Determinación de la respuesta analítica a la escala de 25% y parámetros estadísticos, (uso de microbalanza).

Muestras	Respuesta analítica
1	0.796
2	0.8001
3	0.8143
4	0.7967
5	0.7943
6	0.7982
Parámetros estadísticos	
Promedio	0.79993333
Desviación estándar	0.00730881
Coficiente de variación	0.91367707
(Pesada: 30.418mg)	

En la tabla XV se observa la respuesta analítica de seis muestras preparadas por diluciones de una sola muestra homogénea a una concentración igual a la de la referencia, a la escala de 25 %, respecto al método oficial, utilizando la microbalanza para la pesada de la muestra y referencia; calculándose un coeficiente de variación menor a 3%.

6.3.7. Determinación al 10% en balanza analítica

Tabla XVI. Determinación de la respuesta analítica a la escala de 10% y parámetros estadísticos, (uso de balanza analítica).

Muestras	Respuesta analítica
1	0.7895
2	0.7893
3	0.8021
4	0.7966
5	0.7966
6	0.7958
Parámetros estadísticos	
Promedio	0.79498333
Desviación estándar	0.00487665
Coefficiente de variación	0.61342733
(Pesada: 12.2mg)	

En la tabla XVI se observa la respuesta analítica de seis muestras preparadas por diluciones de una sola muestra homogénea a una concentración igual a la de la referencia, a la escala de 10 %, respecto al método oficial, utilizando la balanza analítica para la pesada de la muestra y referencia; calculándose un coeficiente de variación menor a 3%.

6.3.8. Determinación al 10 % en microbalanza

Tabla XVII. Determinación de la respuesta analítica a la escala de 10% y parámetros estadísticos, (uso de microbalanza).

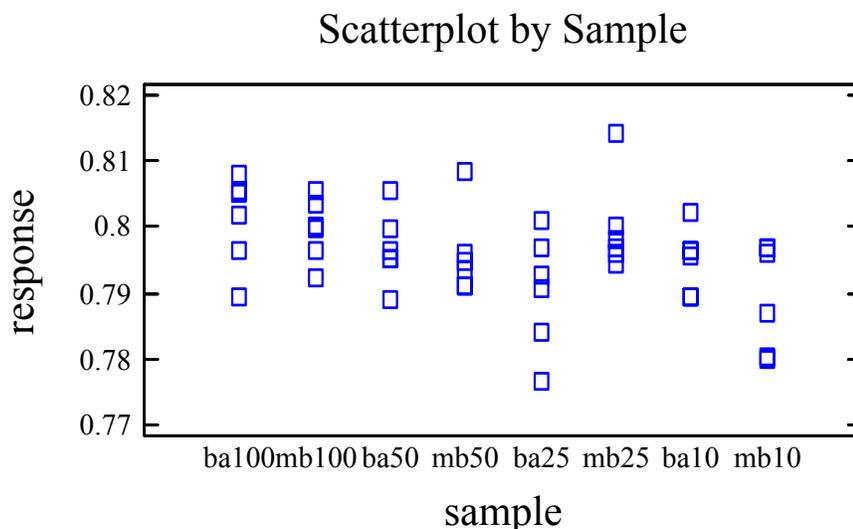
Muestras	Respuesta analítica
1	0.7802
2	0.7962
3	0.7871
4	0.797
5	0.797
6	0.7806
Parámetros estadísticos	
Promedio	0.78968333
Desviación estándar	0.00810738
Coefficiente de variación	1.0266626
(Pesada: 12.121 mg)	

En la tabla XVII se observa la respuesta analítica de seis muestras preparadas por diluciones de una sola muestra homogénea a una concentración igual a la de la referencia, a la escala de 10 %, respecto al método oficial, utilizando la microbalanza para la pesada de la muestra y referencia; calculándose un coeficiente de variación menor a 3%.

Para el microescalamiento se probaron los ocho tratamientos representados en las tablas X a XVII, que contienen las determinaciones de la respuesta analítica de seis muestras para cada tratamiento, es decir, cada escala 100%, 50%, 25% y 10% empleando la balanza analítica y microbalanza calculándose la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación. Las respuestas analíticas fueron sometidas a un análisis de varianza unifactorial para probar los ocho tratamientos, cuatro niveles de escala con balanza analítica y cuatro niveles con microbalanza, donde el factor de interés es la escala y así determinar si hay diferencia significativa entre las respuestas analíticas, (absorbancias) de cada escala. Y someter a validación el método analítico de menor escala respecto al método oficial (de 100 % de escala), que no presente diferencia significativa.

6.3.9. Análisis de Varianza

Figura 4: Gráfica de dispersión de la respuesta analítica vs. Tratamientos.



* Tratamientos

ba 100 = balanza analítica, escala de 100%

mb100 = Microbalanza, escala de 100%

ba 50 = balanza analítica, escala de 50%

mb50 = Microbalanza, escala de 50%

ba 25 = balanza analítica, escala de 25%

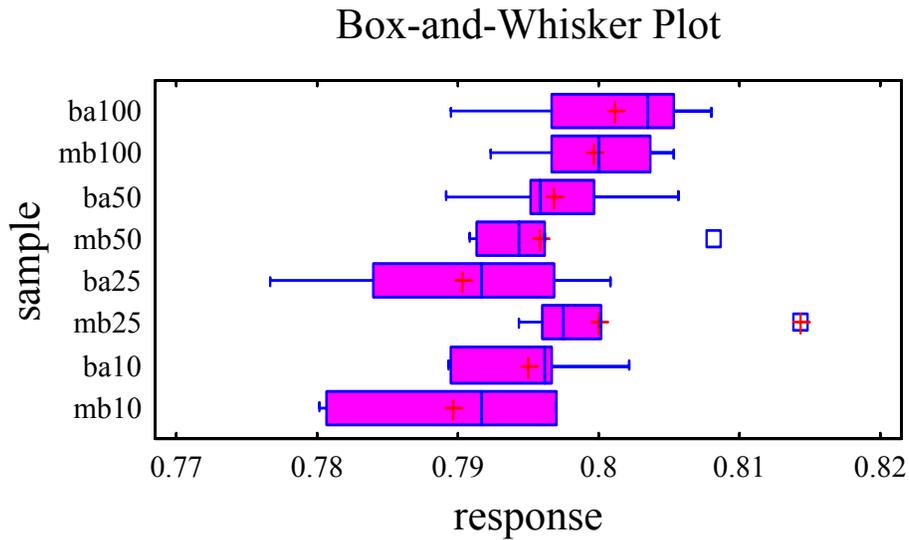
mb25 = Microbalanza, escala de 25%

ba 10 = balanza analítica, escala de 10%

mb10 = Microbalanza, escala de 10%

En la figura 4 se representa gráficamente el diagrama de dispersión para los tratamientos con balanza analítica y microbalanza a cada escala contra la respuesta analítica, en donde se observa que si existe una diferencia significativa entre las absorbancias obtenidas de cada tratamiento, siendo más marcada la diferencia en los tratamientos de las escalas menores de 10 % utilizando balanza analítica y microbalanza, así como en la escala de 25 % empleando la balanza analítica; siendo el tratamiento de la escala de 25 % empleando la microbalanza, la escala menor que no presenta diferencia significativa.

Figura: 5 Gráfica de caja y de bigote de la respuesta analítica.



* Tratamientos

- ba 100 = balanza analítica, escala de 100%
- mb100 = Microbalanza, escala de 100%
- ba 50 = balanza analítica, escala de 50%
- mb50 = Microbalanza, escala de 50%
- ba 25 = balanza analítica, escala de 25%
- mb25 = Microbalanza, escala de 25%
- ba 10 = balanza analítica, escala de 10%
- mb10 = Microbalanza, escala de 10%

En la figura 5 se presenta un diagrama de caja y bigote donde los máximos y mínimos así como la mediana de las respuestas analíticas de cada tratamiento que están representados los tratamientos de las escalas menores de 10 % con balanza analítica y microbalanza son los que presentan mayor diferencia significativa respecto a los tratamientos de la escala de 100 %, lo que coincide con el diagrama de dispersión, que el tratamiento de escala menor que no presenta diferencia significativa es el de 25 % de escala empleando la microbalanza.

Figura 6: Tabla de ANDEVA

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.000772637	7	0.000110377	2.45	0.0347
Within groups	0.00180432	40	0.0000451081		
Total (Corr.)	0.00257696	47			

En la tabla de ANDEVA, representada en la figura 6, puesto que el valor de P es menor a 0.05 se dice que hay diferencia significativa al 5% entre las cantidades medias de las respuestas analíticas, (absorbancias), para los ocho diferentes tratamientos.

Figura 7. Comparación múltiple de los pares de tratamientos.

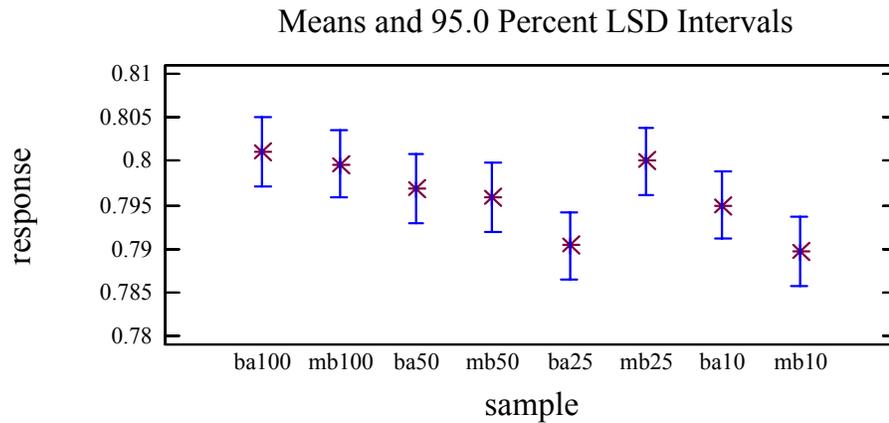
Multiple Range Tests			
Method: 95.0 percent LSD			
	Count	Mean	Homogeneous Groups
mb10	6	0.789683	X
ba25	6	0.790317	X
ba10	6	0.794983	XX
mb50	6	0.79585	XX
ba50	6	0.796883	XX
mb100	6	0.799667	X
mb25	6	0.799933	X
ba100	6	0.801083	X

Contrast	Difference	+/- Limits
ba100 - mb100	0.00141667	0.007837
ba100 - ba50	0.0042	0.007837
ba100 - mb50	0.00523333	0.007837
ba100 - ba25	*0.0107667	0.007837
ba100 - mb25	0.00115	0.007837
ba100 - ba10	0.0061	0.007837
ba100 - mb10	*0.0114	0.007837
mb100 - ba50	0.00278333	0.007837
mb100 - mb50	0.00381667	0.007837
mb100 - ba25	*0.00935	0.007837
mb100 - mb25	-0.000266667	0.007837
mb100 - ba10	0.00468333	0.007837
mb100 - mb10	*0.00998333	0.007837
ba50 - mb50	0.00103333	0.007837
ba50 - ba25	0.00656667	0.007837
ba50 - mb25	-0.00305	0.007837
ba50 - ba10	0.0019	0.007837
ba50 - mb10	0.0072	0.007837
mb50 - ba25	0.00553333	0.007837
mb50 - mb25	-0.00408333	0.007837
mb50 - ba10	0.000866667	0.007837
mb50 - mb10	0.00616667	0.007837
ba25 - mb25	*-0.00961667	0.007837
ba25 - ba10	-0.00466667	0.007837
ba25 - mb10	0.000633333	0.007837
mb25 - ba10	0.00495	0.007837
mb25 - mb10	*0.01025	0.007837
ba10 - mb10	0.0053	0.007837

* denotes a statistically significant difference.

En la figura 7 se aplicó una comparación múltiple a los valores promedio de las respuestas analíticas de los tratamientos, observándose en la primera tabla diferencias significativas unas con otros; en el siguiente tabla de la figura se marca con un asterisco a los pares de tratamientos entre los que hay diferencia estadística significativa.

Figura 8: Gráfica de valores medios con un intervalo de 95%, de la repuesta analítica



* Tratamientos

- ba 100 = balanza analítica, escala de 100%
- mb100 = Microbalanza, escala de 100%
- ba 50 = balanza analítica, escala de 50%
- mb50 = Microbalanza, escala de 50%
- ba 25 = balanza analítica, escala de 25%
- mb25 = Microbalanza, escala de 25%
- ba 10 = balanza analítica, escala de 10%
- mb10 = Microbalanza, escala de 10%

Figura 9: Tabla de valores medios con un intervalo de 95%, de la repuesta analítica

Table of Means
with 95.0 percent LSD intervals

	Count	Mean	Std. error (pooled s)	Lower limit	Upper limit
ba100	6	0.801083	0.0027419	0.797165	0.805002
mb100	6	0.799667	0.0027419	0.795748	0.803585
ba50	6	0.796883	0.0027419	0.792965	0.800802
mb50	6	0.79585	0.0027419	0.791931	0.799769
ba25	6	0.790317	0.0027419	0.786398	0.794235
mb25	6	0.799933	0.0027419	0.796015	0.803852
ba10	6	0.794983	0.0027419	0.791065	0.798902
mb10	6	0.789683	0.0027419	0.785765	0.793602
Total	48	0.79605			

En la figura 9 se presenta la Tabla de valores medios con un intervalo de 95%, de la repuesta analítica y en la figura 8 la gráfica correspondiente donde se observa de igual manera una diferencia significativa con respecto a los tratamientos del 100 %, de los

tratamientos a escala de 10% empleando balanza analítica y microbalanza y mostrando que el tratamiento de menor escala que no presenta diferencia significativa es el método a escala de 25 % empleando la microbalanza.

Por lo tanto, hay diferencia significativa entre el tratamiento a escala de 100 %, (empleando balanza analítica y microbalanza) y los tratamientos a escala de 10 % (empleando balanza analítica y microbalanza). Dado que, la menor escala o tratamiento que no presentó diferencia significativa respecto al 100 % es a 25 % empleando la microbalanza, este tratamiento es el que se procedió a validar

6.4. Validación del método analítico de valoración a la escala de 25%

6.4.1. Precisión del sistema

Tabla XVIII. Precisión del sistema:
Respuesta analítica, parámetros estadísticos y criterios de aceptación

Muestras	Respuesta analítica
1	0.7960
2	0.8001
3	0.8143
4	0.7967
5	0.7943
6	0.7982
Parámetros estadísticos	
Suma	4.7996
Promedio	0.79993333
Suma de cuadrados	0.63989334
Desviación estándar	0.00730881
Coefficiente de variación	0.91367707

Se preparó un sextuplicado de soluciones, con el método escalado al 25 % utilizando la microbalanza, a la concentración de la referencia, por dilución, como se puede observar en la tabla XVIII; se determinó la respuesta analítica calculándose los parámetros estadísticos: desviación estándar, promedio y coeficiente de variación el cual es menor al 1.5 %, por lo que el sistema es preciso al cumplir con el criterio de aceptación

6.4.2. Exactitud y repetibilidad

Tabla XIX. Exactitud y repetibilidad:
Porcentaje de recobro, parámetros estadísticos y criterios de aceptación.

Muestras	Porcentaje de recobro (%)
1	99.85
2	99.85
3	100.29
4	100.24
5	99.68
6	99.6
Parámetros estadísticos	
Suma	599.51
Suma de cuadrados	59902.4491
Promedio	99.9183333
Desviación estándar	0.28603613
Coefficiente de variación	0.28626992
Intervalo de confianza para la media poblacional.	96.61 a 100.21

Se prepararon seis muestras con el método escalado al 25 % utilizando la microbalanza, por pesadas independientes con una adición correspondiente del analito de 120 mg; las muestras fueron analizadas en igualdad de condiciones utilizando como referencia la muestra y se determinó la cantidad recuperada del analito como se observa en la tabla XIX. Se calculó el intervalo de confianza para la media poblacional que incluyó al 100%, el promedio aritmético del porcentaje de recobro el cual se incluye en el intervalo de 97 a 103 % y el coeficiente de variación que es menor a 3% por lo que el método es exacto y repetible.

6.4.3. Precisión del método

Tabla XX. Precisión del método: Contenido de analito, parámetros estadísticos y criterios de aceptación.

Día	Analista	Contenido de analito (mg)
1	1	119.52
1	1	119.7
1	1	120.68
1	2	121.19
1	2	121.11
1	2	120.25
2	1	119.95
2	1	120.28
2	1	121.17
2	2	120.22
2	2	120.89
2	2	121.89
Parámetros estadísticos		
Suma		1446.85
Promedio		120.570833
Suma de cuadrados		174453.356
Desviación estándar		0.70360705
Coeficiente de variación		0.58356323

Se analizó por triplicado la muestra con cantidades cercanas a 120 mg en dos días diferentes por dos analistas distintos en igualdad de condiciones con el método escalado al 25 % utilizando la microbalanza. Como se observa en la tabla XX. Se reportó la valoración (concentración) de las muestras, calculándose el promedio aritmético desviación estándar y el coeficiente de variación el cual es menor a 3% por lo que el método es preciso.

6.4.4. Linealidad del método

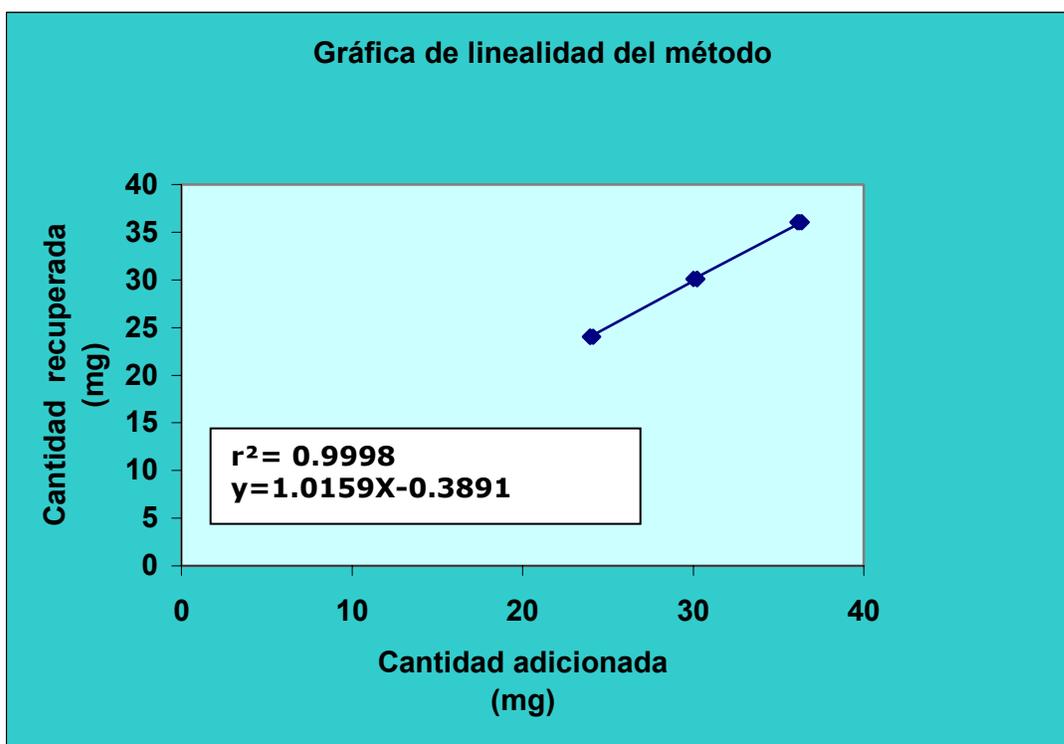
Tabla XXI. Linealidad del método: cantidad recuperada, cantidad adicionada, porcentaje de recobro, parámetros estadísticos y criterios de aceptación.

Muestras	Cantidad recuperada (mg)	Cantidad adicionada (mg)	Porcentaje de recobro (%)
1	23.987	24.01	99.9042066
2	24.127	24.014	100.470559
3	23.941	24.008	99.7209264
4	30.231	30.103	100.425207
5	30.231	30.104	100.421871
6	30.026	30.100	99.7541528
7	36.359	36.040	100.885128
8	36.100	36.031	100.191502
9	36.248	36.038	100.582718
Parámetros estadísticos			
Suma	902.35627		
Suma de cuadrados	90473.1414		
Promedio	100.261808		
Desviación estándar	0.39851214		
Coefficiente de variación	0.39747153		
Coefficiente de Determinación	0.99982145		
Ordenada al origen	-0.3891		
Pendiente	1.01591595		
Intervalo de confianza para la pendiente	0.9986 a 1.033		
Intervalo de confianza para la ordenada al origen	-0.914 a 0.136		

Se preparó por triplicado una muestra correspondiente al 100%, (120mg) se seleccionó un nivel inferior correspondiente a 80 %, y un nivel superior correspondiente a 120 %, también preparados por

triplicado, con el método escalado al 25 % utilizando la microbalanza, se analizaron en igualdad de condiciones por un mismo analista utilizando la muestra como referencia. Como se puede observar en la tabla XXI se determinó la cantidad del analito recuperada y adicionada, el intervalo de confianza para la pendiente, el cual incluye la unidad, el intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional que incluye el cero, el promedio aritmético del porcentaje de recobro que se incluye en el intervalo de 97 a 103 % y el coeficiente de variación es menor a 3%; se anexa la gráfica de Cantidad adicionada (x) vs. Cantidad recuperada (y); y se incluye la ecuación de su línea y el coeficiente de determinación que es mayor a 0.98 como se observa en la figura 10. Los criterios de aceptación cumplen con las especificaciones y por lo tanto el método es lineal.

Figura 10: Gráfica de Linealidad del método (25 % de escala).



6.4.5. Linealidad del sistema

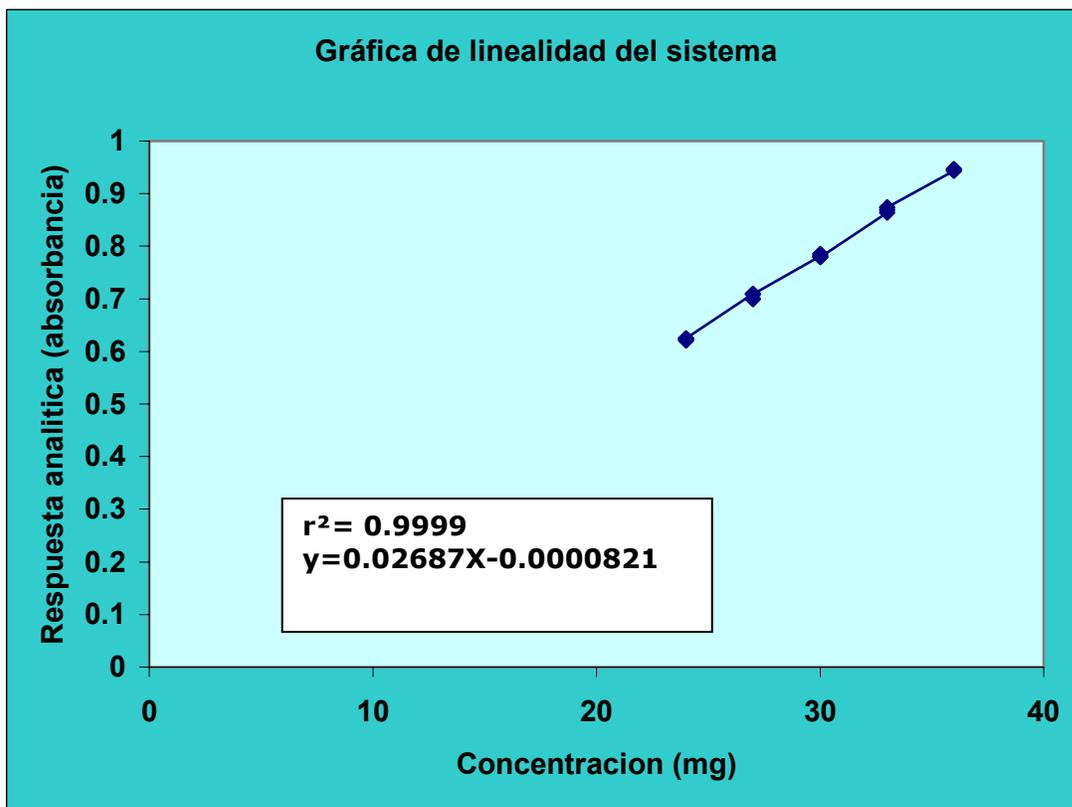
Tabla XXII: Linealidad del sistema, concentración teórica, respuesta analítica y criterios de aceptación

Concentración teórica (mg)	Respuesta analítica (absorbancia)
24	0.621
24	0.6243
24	0.6252
27	0.7098
27	0.6995
27	0.7086
30	0.7814
30	0.7849
30	0.7794
33	0.8644
33	0.8691
33	0.874
36	0.9435
36	0.9462
36	0.9454
Parámetros estadísticos	
Coefficiente de determinación	0.99944371
Ordenada al origen	-0.0000821
pendiente	0.02687556
Intervalo de confianza para la pendiente	0.02611 a 0.02612

Se prepararon por triplicado niveles de concentración equivalentes a 80%, 90%, 100%, 110% y 120%. Con el método escalado al 25% utilizando la microbalanza. Como se observa en la tabla XXII, se determinó la respuesta analítica en igualdad de condiciones, calculándose la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación el cual es mayor a 0.98 y el intervalo de confianza para la pendiente, que no incluye el cero. Se anexa en la figura 11 la grafica correspondiente de concentración (x) vs. Respuesta analítica (y) que incluye la ecuación de su línea y el coeficiente de determinación. Así los

criterios de aceptación cumplen con las especificaciones y por lo tanto el sistema es lineal.

Figura 11: Gráfica Linealidad del sistema, (25 % de escala)



6.4.6. Robustez

Tabla XXIII. Robustez: Concentración en porcentaje, promedio aritmético de la concentración en porcentaje y criterios de aceptación

Muestra	Concentraciones expresadas en porcentaje (%)	promedio aritmético de la concentración en porcentaje
1 Grado técnico	101.43	
2 Grado técnico	101.36	101.64
3 Grado técnico	102.13	
1 Grado reactivo	100.00	
2 Grado reactivo	101.60	100.90
3 Grado reactivo	101.10	
1 Grado analítico	99.20	
2 Grado analítico	100.20	100.00
3 Grado analítico	100.60	
Criterios de aceptación		
di 1	0.74	
di 2	0.90	

Se desarrollo el método en tres condiciones distintas, con el método escalado al 25% en la condición normal de operación se empleó como disolvente para la muestra metanol grado reactivo y como condiciones distintas metanol grado técnico y metanol grado analítico, se analizó cada condición por triplicado. Como se observa en la tabla XXIII se reportó la valoración para las tres condiciones expresadas en porcentaje, se calculo el promedio aritmético para cada condición y la diferencia absoluta de cada condición diferente respecto a la condición normal. La diferencia absoluta de ambas condiciones diferentes no es mayor a 3% por lo tanto el método mantiene su desempeño con las variaciones propuestas.

6.4.7. Resumen de resultados de la validación al 25 %

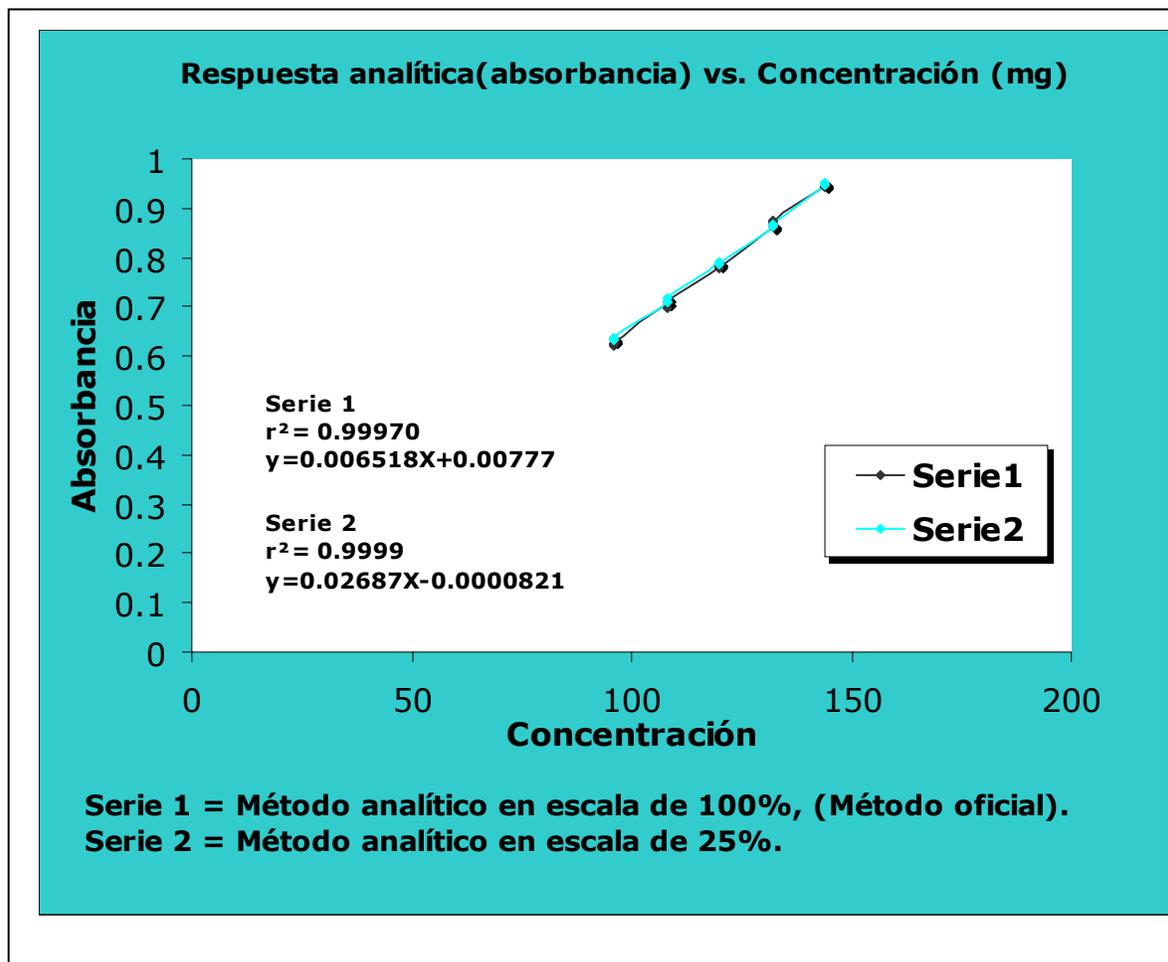
Tabla XXIV. Resumen de resultados de validación de la escala a 25 %

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado obtenido	Cumple
Precisión del sistema	C.V. \leq 1.5 %	C.V. = 0.9136%	Si
Exactitud y repetibilidad	I.C. (μ) debe incluir el 100% La media aritmética del % de recobro se debe incluir en el intervalo de 97 a 103 % C.V. \leq 3.0 %	I.C. (μ) =96.61 a 100.21 Media = 99.918 % C.V. = 0.2862 %	Si
Precisión del método	C.V. \leq 3.0%	C.V. = 0.5835 %	Si
Linealidad del método	C. adicionada vs. C. recuperada $r^2 \geq 0.98$ I.C. (b) debe incluir la unidad I.C. (a) debe incluir el cero Porcentaje de recobro La media aritmética del % de recobro se debe incluir en el intervalo de 97 a 103 % C.V. del % de recobro \leq 3.0 %	C. adicionada vs. C. recuperada $r^2 = 0.9998$ I.C. (b) = 0.9986 a 1.0331 I.C. (a) = -0.914 a 0.136 Porcentaje de recobro media = 101.26 C.V. = 0.3974 %	Si
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$ I.C. (b) no debe incluir la unidad	$r^2 = 0.9994$ I.C. (b) = 0.02611 a 0.02612	Si
Robustez	$ d_i \leq 3.0 \%$	Grado técnico $ d_i 1 = 0.74 \%$ Grado analítico $ d_i 2 = 0.90 \%$	Si

La validación del método analítico de valoración de paracetamol, al tratamiento o escala de 25 %, empleando la microbalanza para la pesada de la muestra; cumple con los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros de desempeño evaluados como se puede observar en la tabla XXIV. De esta forma se considera que el método microescalado satisface los requisitos para la aplicación analítica.

6.4.8. Comparación gráfica de respuesta analítica vs. concentración del método a 100 % de escala, (método oficial) y el método a 25 % de escala, utilizando microbalanza.

Figura 12. Gráfica comparativa de respuesta analítica vs. Concentración del método a 100 % de escala, (método oficial) y el método a 25 % de escala, utilizando microbalanza.



Se presenta en la figura 12. la gráfica respuesta analítica vs. concentración correspondiente a la comparación de linealidad entre el método a 100 % de escala, (método oficial) y el método a 25 % de escala utilizando microbalanza. En ambas series de cinco concentraciones diferentes no existe una diferencia significativa, así ambos métodos pueden ser utilizados para la valoración de paracetamol como materia prima.

6.4.9. Comparación de gasto de recursos y generación de desechos para ambos métodos, a 100 % de escala, (método oficial) y a 25 % de escala, utilizando microbalanza.

Tabla XXV. Comparación de gasto de recursos para ambos métodos, a 100 % de escala, (método oficial) y a 25 % de escala, utilizando microbalanza

	Escala 100% (método oficial)	Escala 100% (método oficial)	Escala a 25% utilizando la microbalanza	Escala a 25% utilizando la microbalanza
Reactivo	Cantidad	Costos (Dólares)	Cantidad	Costos (Dólares)
Paracetamol	360 mg	\$ 0.25	90 mg	\$ 0.06
Agua destilada	1800 mL	\$ 1.20	375 mL	\$ 0.25
Metanol	30 mL	\$ 0.17	7.5 mL	\$ 0.04

*Cantidades y costos considerados para una valoración por triplicado.

Tabla XXVI. Comparación de generación de desechos para ambos métodos, a 100 % de escala, (método oficial) y a 25 % de escala, utilizando microbalanza.

Escala	Cantidad
100 %, (método oficial).	2100 mL
25 % utilizando microbalanza.	382.5 mL

*Generación de desechos considerados para una valoración por triplicado.

En la tabla XXV. La comparación de gasto de recursos para ambos métodos, a 100 % de escala, (método oficial) y a 25 % de escala, utilizando microbalanza muestra un ahorro total tanto de reactivos como económicamente del 75%, por lo que el método analítico a menor escala es más favorable por este beneficio.

En la tabla XXVI. La comparación de generación de desechos para ambos métodos, a 100 % de escala, (método oficial) y a 25 % de escala, utilizando microbalanza. Se demuestra una disminución en un 75 % considerable en la generación de desechos por lo que el método analítico a menor escala es más adecuado.

7. Conclusiones

Se diseñó, desarrolló y validó el método analítico a microescala, 75 % menor respecto al método oficial de la valoración de paracetamol por espectrofotometría ultravioleta, siendo preciso, eficaz y que cumple con los parámetros de desempeño de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, (FEUM).

Ambos métodos, el oficial y a la escala de 25 % empleando la microbalanza para la pesada de la muestra, satisfacen los requisitos para la valoración de paracetamol, ya que son lineales, precisos reproducibles y repetibles en un rango de 80 a 120 %.

De esta forma se contribuye en el campo de la ecología al disminuir la cantidad de materiales de desecho, así como la reducción en el consumo de materiales en un 75% y facilita la enseñanza experimental en laboratorios de química analítica y de control de calidad.

Bibliografía

- 1.** Ibáñez J.G. Centro Mexicano de Química en microescala, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Iberoamericana. "La química a Microescala en México Hacia un Panorama General". Educación Química, Segunda Época Enero, 2000; 11: (1).
- 2.** Rosa Maria Mainero, Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas, Universidad iberoamericana. "Porque Microescala". Educación Química 1997; 8: (3).
- 3.** Esperanza Torres Espinoza y Juan Pedro Castellón Santana. "Minimización del Impacto Ecológico Empleando Microescala en Laboratorios de Enseñanza Química" . Educación Química, Segunda Época Enero, 2000; 11: (2).
- 4.** Ventajas de la química en microescala. Lycos. Mexico D.F. 07 de octubre de 2004
<http://www.uv.es/~tcliment/microes/ventajas.htm>.
- 5.** Universidad Iberoamericana. Ciudad de México. Centro Mexicano de Química en Microescala, departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas. Lycos. Mexico D.F. 07 de octubre de 2004:
<http://www.uia.mx/ibero/oacademica/posgrado/ciencias/microescala/>.
- 6.** Goodman, Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ninth Edition. U.S.A. Mc. Graw Hill, 1996: 677-679.
- 7.** Florey K. Copilador Analytical Profiles of Drug Substances. 5ta. Edition. U.S.A. Academia Press, 1985: vol. 14: 552-578.
- 8.** The Merck Index. An Encyclopedia of Chemical Drugs and Biologicals, 12va. Edition. U.S.A. Published for Merck Research Laboratories, 1989: 9.
- 9.** Hawley, Gessner, Goodrich. Diccionario de Química y de Productos Químicos. Barcelona. Editorial Omega, 1993 : 12
- 10.** Secretaria de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Séptima Edición. México. Secretaria de Salud, 2000: 266 -269, 901-903
- 11.** Day R.D.Jr., Underwood A.L. Quantitative Analysis. 5ta. Edition. U.S.A. Prentice Hall, 1989: 10-45, 466-469.

- 12.** ICH Harmonised Tripartite Guideline. Text on Validation of Analytical Procedures Q2A. October 1994.
- 13.** ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures Methodology Q2B. Noviembre 1996.
- 14.** Comisión de Validación de Métodos analíticos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C. Edición 2003.
- 15.** Guideline for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation. August 2000. FDA.
- 16.** The United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeial, Validation of Compendial Methods. 23 Edition. Printed by Mack Printing Company, 1995: 1982, 1983.
- 17.** NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. Capítulos "Validación" y "Control del Laboratorio Analítico; Incisos 9.11.1. a 9.11.7. y 9.12.3.
- 18.** Marques de Cantú María José. Probabilidad y Estadística. México. Segunda Edición. McGraw Hill. 2004: 361- 395.
- 19.** Douglas C. Montgomery. Design and Analysis of Experiments. New York, U.S.A. LIMUSA WILEY, 2004:13-20, 51-65.
- 20.** Daniel C. Harris ANALISIS Químico Cuantitativo. México. Segunda Edición. Grupo Editorial Iberomexicano, 1992: 495-508.
- 21.** Andrés Menéndez Raymat, Ph.D. EDUC 6390. Estadística Aplicada en la Educación. LABORATORIO DE ESTADÍSTICAS Yahoo. Mexico D.F. 05 de diciembre de 2004:
<http://rrpac.upr.clu.edu:9090/~amenend/excel6intro.htm>
- 22.** Gary P. Christian. Química Analítica. México. Segunda Edición, LIMUSA WILEY, 1998: 33- 37
- 23.** Jay L. Devore. Probabilidad y Estadística Para Ingeniería y Ciencias México. Quinta Edición. THOMSON LEARNING, 2001: 399 -451.

24. Robert O. Kuehl Diseño de Experimentos, Principios Estadísticos de diseño y Análisis de Investigación. México. Segunda Edición. THOMSON LEARNING, 2001: 45- 59.

25. Aldrich, Manual de Químicos Finos y Equipos de Laboratorio, Sigma Química S.A. de C.V. México 2003 – 200