



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA



TESIS DE LICENCIATURA

Estudio de equivalencia de los resultados analíticos para la
cuantificación de Naproxeno Sódico por Cromatografía de
líquidos de alta resolución y Espectroscopia UV-Visible.

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FÁRMACO BIÓLOGO**

Presenta

GARCÍA VILCHIS MARÍA DEL PILAR

Director de Tesis: Dr. Vicente J. Hernández Abad

Asesor de Tesis: M. en C. Elizabeth G. Sánchez González



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



INDICE

INTRODUCCIÓN	3
I. ANTECEDENTES TEÓRICOS	4
A. Métodos espectrométricos	4
1. Espectroscopia UV/Visible	4
2. Componentes del espectrofotómetro UV/Visible	5
a. Fuentes luminosas	5
b. Sistemas dispersivos	5
c. Detectores	6
d. Ley de Lambert- Beer	6
B. Introducción a la cromatografía	8
1. Descripción general de la cromatografía	8
2. Cromatografía de líquidos de alta resolución	9
a. Instrumentación	10
b. Disolventes	10
c. Sistema de bombeo	11
d. Sistemas de inyección	12
e. Columnas	12
f. Detectores	13
C. Disolución	15
1. Método de flujo continuo	15
D. Validación	16
E. Inflamación	19
1. Prostaglandinas	19
2. Antiinflamatorios no esteroideos	21
a. Mecanismo de acción	22
b. Acciones antiinflamatorias	22
c. Acción analgésica	22
e. Acción antipirética	22
F. Naproxeno sódico	23
1. Descripción	23
2. Mecanismo de acción	23



3.Farmacología	24
4. Farmacocinética	24
G. Tabletas	25
1.Fabricación	25
H. Valoración del Naproxeno sódico	26
I. Ventajas y Desventajas de los métodos utilizados	27
II. DESARROLLO EXPERIMENTAL	28
A. Planteamiento del problema	28
B. Objetivo general	28
C. Hipótesis	28
D. Material	29
E. Metodología	31
1. Cromatografía de líquidos de alta resolución	31
2. Espectrofotometría UV/ Visible	33
III. RESULTADOS	35
IV. ANALISIS DE RESULTADOS	41
V. CONCLUSIONES	43
VI. BIBLIOGRAFIA	44



INTRODUCCIÓN

Desde el siglo pasado las separaciones analíticas se llevaban a cabo por métodos clásicos como son la precipitación, destilación y extracción. Los crecientes esfuerzos por conocer más sobre la composición y función de los compuestos han obligado a los científicos a buscar técnicas, cada vez, más precisas.

Para elegir una técnica de separación, además de tomar en cuenta los criterios económicos y de accesibilidad, hay que atender a dos tipos de consideraciones: las que tienen que ver con las propiedades físicas y estructurales de las moléculas que se pretenden separar; y las que derivan de los objetivos del análisis como la sensibilidad, resolución, tiempo de análisis y la necesidad de una detección específica. En función a estos requerimientos, las técnicas analíticas más empleadas en la actualidad pueden englobarse en dos grandes grupos: técnicas de separación y técnicas espectroscópicas.²⁰

Actualmente, las técnicas de separación se realizan fundamentalmente por cromatografía, en particular, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) la cual se ha convertido en la herramienta más versátil y utilizada en la industria farmacéutica, debido a su sensibilidad, fácil adaptación, capacidad para separar especies no volátiles y su aplicación a sustancias de primordial interés en la industria, logrando desplazar a métodos volumétricos y espectrofotométricos, lo que ha generado el cambio continuo en los procesos que aplican los distintos laboratorios, como puede observarse en cada nueva edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Así mismo, haciendo una revisión desde la 6^{ta} hasta la 9^{na} edición de la FEUM para la valoración de naproxeno sódico en tabletas se observó que un método clásico como la volumetría no instrumentada fue desplazada por un método cromatográfico, HPLC.

Con base a lo anterior en el presente trabajo se atiende a la necesidad de evaluar la equivalencia de los resultados obtenidos al cuantificar naproxeno sódico en tabletas, desarrollando un método por Espectroscopia UV/Visible con respecto a el método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, lo cual nos asegure la eficacia y confiabilidad en los resultados, permitiéndonos detectar los puntos débiles entre ambos y nos posibilite la elección de un método eficiente, rentable y competitivo.



I. ANTECEDENTES TEÓRICOS

A. Métodos espectrométricos

Dentro de un amplio grupo de métodos analíticos se encuentran los métodos espectrométricos son un amplio grupo de métodos analíticos que se basan en las espectroscopias atómica y molecular. La espectroscopia es un término general para la ciencia que trata de las distintas interacciones de la radiación con la materia. La espectrometría y los métodos espectrométricos hacen referencia a la medida de la intensidad de la radiación mediante un detector fotoeléctrico o con otro tipo de dispositivo electrónico. ¹

Hay tres grandes tipos de métodos espectrométricos para identificar los elementos presentes en la materia y determinar sus concentraciones: (1) *la espectrometría óptica*, (2) *la espectrometría de masas* y (3) *la espectrometría de rayos X*. ¹

1. Espectroscopia de absorción Ultravioleta / Visible

El principio de la espectroscopia Ultravioleta / Visible (UV/Visible) involucra la absorción de la radiación UV/Visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda(λ) comprende entre 190 y 800 nm.¹

Los espectrómetros UV/Visible permiten obtener el espectro del compuesto a modo de una curva que representa la transmitancia (**T**) o la absorbancia (**A**) en función de las longitudes de onda, expresadas en nanómetros (nm). ²

La transmitancia (**T**) es una medida de la atenuación del haz luminoso basada en la comparación entre la intensidad transmitida (**I**) y la intensidad incidente (**I₀**), dependiendo de que la muestra esté o no situada en el trayecto óptico entre la fuente y el detector (T) y se expresa por un cociente o como porcentaje: ²

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{ó} \quad \%T = \frac{I}{I_0} \times 100$$

La absorbancia está definida por: ²

$$A = -\log T$$

La región espectral está dividida en tres zonas denominadas UV (185 – 400 nm), visible (400 – 700 nm) e infrarrojo cercano (700 – 1,100 nm). ²

2. Componentes del espectrofotómetro UV / Visible.

Generalmente un espectrofotómetro está constituido por tres partes diferenciadas: la fuente, el sistema dispersivo y el detector. La muestra se intercala en el trayecto óptico antes o después del sistema dispersivo, dependiendo del tipo de detector. ² (Ver figura 1)

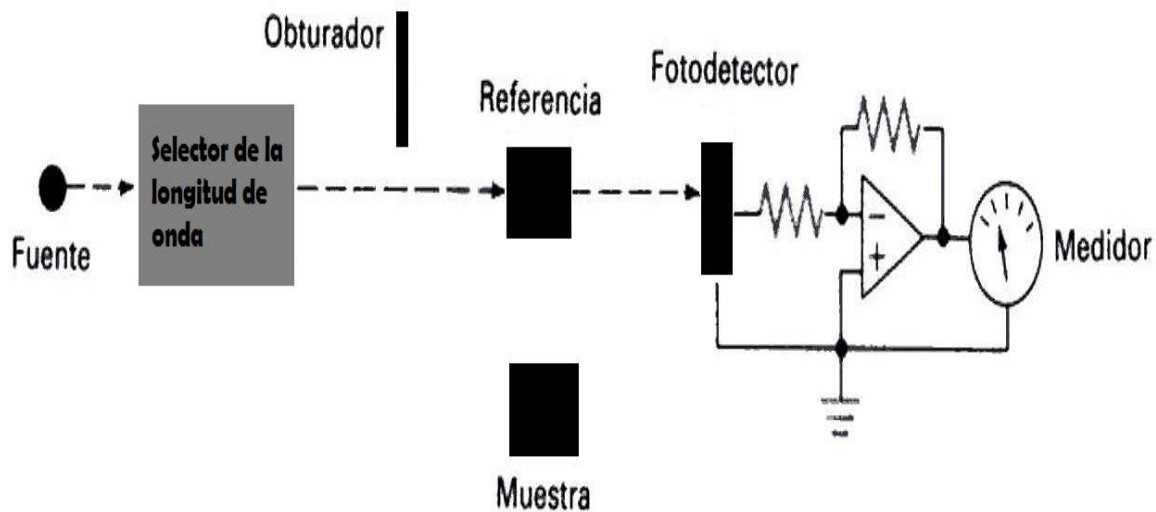


Figura 1. Principales componentes del espectrofotómetro UV/visible.

a. Fuentes luminosas

Los tipos de lámparas utilizadas son:

- Lámpara incandescente con filamento de wolframio y cubierta de vidrio de sílice en la parte visible del espectro. La lámpara de wolframio-halógeno que contiene una pequeña cantidad de yodo tiene una duración doble que la lámpara de wolframio simple. ²
- Lámpara de arco de deuterio de presión media, para la región UV (<350 nm). ²
- Lámpara de arco de xenón, que abarca todo el rango comprendido entre 200 y 1100 nm. ²

b. Sistemas dispersivos.

- Sistemas secuenciales. Las radiaciones emitidas por la fuente se dispersan mediante una red plana o cóncava que forma parte de un montaje denominado monocromador. ²
- Sistemas simultáneos. Estos sistemas están provistos simplemente de una red de difracción situada tras el compartimiento de muestra para difractar las radiaciones transmitidas. ²



c. Detectores

El detector convierte la radiación luminosa incidente en señal eléctrica. Su sensibilidad depende de la longitud de onda. Se utiliza normalmente un tubo fotomultiplicador (PM) o un semiconductor (detector de transferencia de carga o fotodiodo de silicio).²

En los sistemas simultáneos que no poseen monocromador pero sí un sistema dispersivo, se recoge la totalidad de las intensidades luminosas correspondientes a todas las longitudes de onda mediante alineación de un gran número de detectores *quasi* puntuales que forman una fila de diodos. El umbral fotoeléctrico, del orden de 1 le permite prolongar el rango de detección hasta 1.1 μm .²

d. Ley de Lambert-Beer

Las medidas se basan en la ley de Lambert-Beer que relaciona, en determinadas condiciones, la absorción de la radiación con la concentración de un compuesto en disolución. La ley de Lambert-Beer es representada como:²

$$A = \epsilon_{\lambda} l C$$

Donde (A) es la absorbancia, (ϵ_{λ}) es el coeficiente, (l) es la longitud de la celda y (c) la concentración. La ley de Lambert – Beer, considerada originalmente como un postulado, ha sido objeto de numerosas interpretaciones y demostraciones considerando hipótesis estadísticas o cinéticas o simplemente lógicas.²

Esta ley, que se refiere a la fracción de la luz absorbida, se cumple en las siguientes condiciones:²

- La luz utilizada debe ser monocromática.
- Las concentraciones deben ser bajas.
- La disolución no debe ser fluorescente ni heterogénea.
- El soluto no debe sufrir transformaciones fotoquímicas.
- El soluto no debe originar asociaciones variables con el disolvente.



B. Introducción a la cromatografía

En general, los métodos para el análisis químico son, selectivos; pocos si es que los hay, son verdaderamente específicos. La separación del analito de las posibles interferencias es a menudo una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos. Hasta mediados del siglo XX, las separaciones analíticas se llevaban a cabo en su mayor parte por métodos clásicos como precipitación, destilación y extracción. Ahora, sin embargo, las separaciones analíticas se realizan, en la mayoría de los casos, por cromatografía y electroforesis.¹

La cromatografía es un poderoso método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. La cromatografía en columna fue inventada y denominada así, a principios del siglo XX por el botánico ruso Mikhail Tswett. Él empleó la técnica para separar varios pigmentos vegetales, tales como clorofilas y xantofilas, haciendo pasar disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método (del griego **chroma** que significa ≈ color ≈, y **graphein** que significa ≈ escribir ≈).¹

Las aplicaciones de la cromatografía han aumentado en gran manera en los últimos cincuenta años, debido, no sólo al desarrollo de nuevos y diversos tipos de técnicas cromatográficas, sino también a las necesidades crecientes, por parte de los científicos, de mejores métodos para la caracterización de mezclas complejas.¹

1. Descripción general de la cromatografía

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una *fase móvil*, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una *fase estacionaria* con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida.¹



Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente *retenidos* por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distancia de movilidad, los componentes de la muestra se separan en *bandas* o *zonas* discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

La clasificación de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. Ver tabla 1.

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (LC)(fase móvil : líquida)	Líquido-líquido, o reparto	Líquido absorbido sobre un sólido	Distribución entre Líquidos inmiscibles
	Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
Cromatografía de gases (GC)(fase móvil :gas)	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución / exclusión
	Gas-líquido	Líquido absorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (fase móvil: fluido supercrítico)	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

Tabla 1. Clasificación general de cromatografía. ^{1*}

^{1*} Douglas A. Skoog, Donal M. West, F. Joes Holle, Stanley R. Crouch. Fundamentos de Química Analítica. Editorial Thomson 2004



2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La técnica más usada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), por su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles y su aplicación a sustancias de primordial interés en la industria, como son los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, entre otros. ¹

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) utiliza una fase móvil líquida y una fase estacionaria muy finamente dividida, para lograr una velocidad de flujo satisfactoria, el líquido debe someterse a una presión de cientos de libras por pulgada cuadrada (psi). ¹

De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas y con los mecanismos de separación, es posible distinguir diferentes tipos de cromatografía, como se indica en la figura 2.

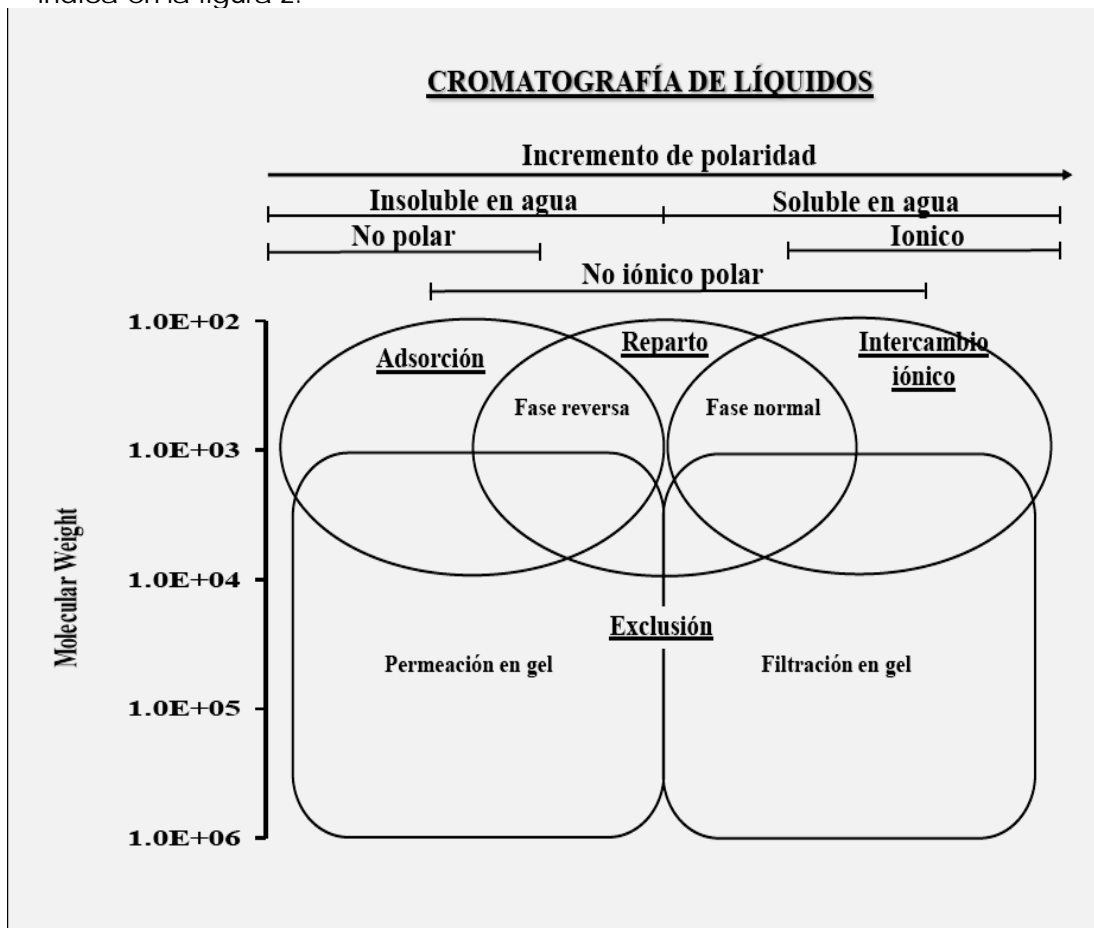


Figura 2. Tipos de cromatografía líquida^{1*}

^{1*} Douglas A. Skoog, Donal M. West, F. Joes Holle, Stanley R. Crouch. Fundamentos de Química Analítica. Editorial Thomson 2009

a. Instrumentación

La figura 3 muestra un diagrama con los componentes de un aparato de HPLC típico.¹

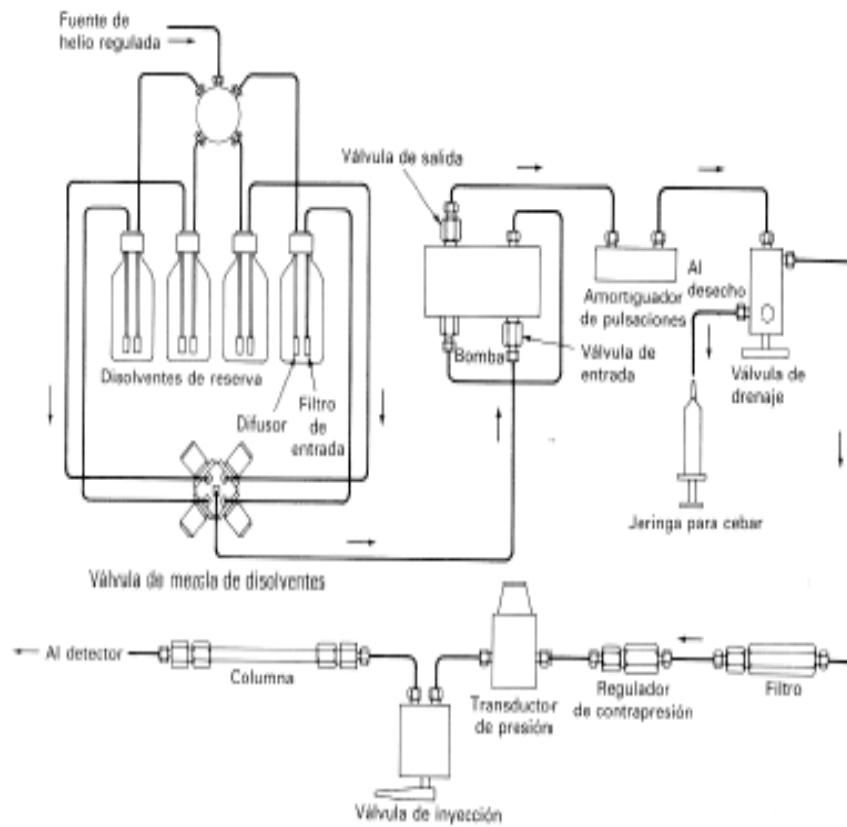


Figura 3. Componentes de un HPLC^{1*}

b. Disolventes

Los aparatos de HPLC modernos están equipados con uno o más recipientes de vidrio, cada uno de los cuales contiene 500 mL o más de un disolvente. Frecuentemente incluyen accesorios para eliminar los gases disueltos y partículas en suspensión de los líquidos.¹

Los desgasificadores consisten en un sistema de bomba de vacío, un dispositivo para calentamiento y agitación o un sistema en el cual los gases disueltos se extraen de un disolvente mediante el burbujeo de un gas inerte e insoluble en la fase móvil.¹

^{1*} Douglas A. Skoog, Donal M. West, F. Joes Holle, Stanley R. Crouch. Fundamentos de Química Analítica. Editorial Thomson 2009



Una elusión isocrática en HPLC es aquella en la que la composición del disolvente permanece constante. En la elusión en gradiente se usan dos o más sistemas de disolventes que difieren significativamente en su polaridad, las proporciones de los dos disolventes se varían de manera prolongada durante la separación, bien de forma continua o de un modo escalonado.¹

Los instrumentos de HPLC modernos suelen estar equipadas con válvulas de dosificación o válvulas eléctricas, las cuales introducen líquidos de dos o más recipientes en proporciones que pueden variarse de manera continua.¹

c. Sistemas de bombeo

Los requisitos de las bombas para cromatografía líquida incluyen: (1) capacidad para generar presiones de hasta 6000 psi (libras por pulgada cuadrada); (2) salida libre de pulsos; (3) velocidades de flujo de (0.1 – 10 mL/min; (4) reproducibilidad relativa de los flujos de 0.5 % o mejor, y (5) resistencia a la corrosión por diversos disolventes.¹

Existen tres tipos de bombas: las de tipo de jeringa impulsada con tornillo, las bombas de vaivén u oscilantes y la bombas neumáticas o de presión constante. En la figura 4 se muestra el tipo de bomba más utilizado, el oscilante.¹

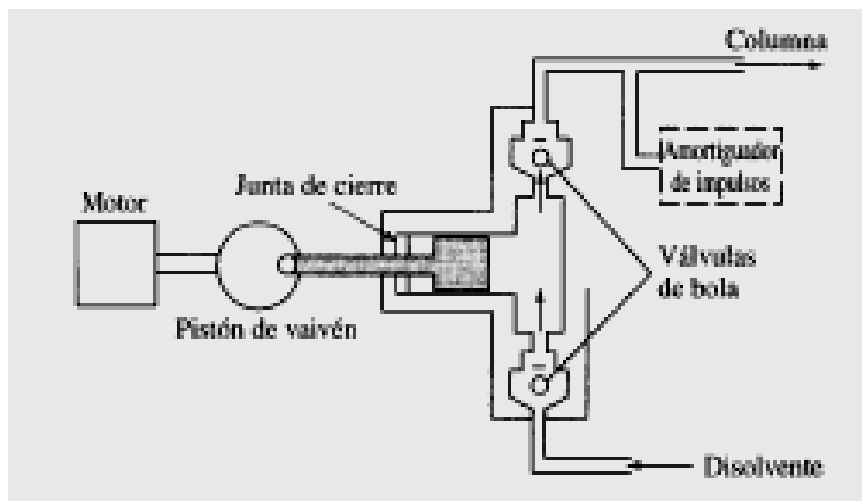


Figura 4. Bomba oscilante^{1*}

^{1*} Douglas A. Skoog, Donal M. West, F. Joes Holle, Stanley R. Crouch. Fundamentos de Química Analítica. Editorial Thomson 2009

Entre las ventajas de las bombas oscilantes cabe mencionar un volumen interno pequeño, una presión de salida alta (hasta de 10 000 psi), su fácil adaptación en gradiente y una velocidad de flujo constante, que es en gran parte independiente de la contrapresión de la columna y la viscosidad del disolvente. ²

d. Sistema de inyección

El sistema de muestras más usado en HPLC se basa en un bucle de muestras como el ilustrado en la figura 5. ¹

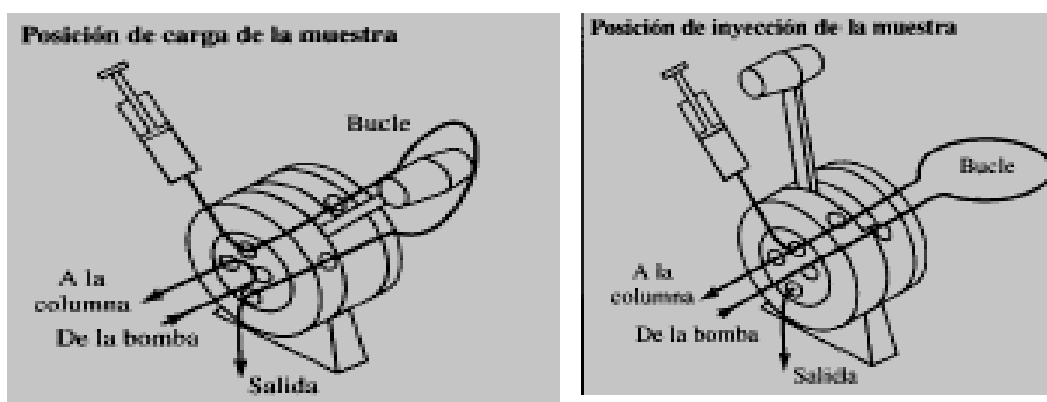


Figura 5. Sistema de inyección^{1*}

Frecuentemente se encuentran disponibles bucles intercambiables de una amplia gama de tamaño que varían de 5 a 500 μ l. La reproducibilidad típica de las inyecciones con bucle de muestras es del orden de décimas de punto porcentual relativa. ¹

e. Columnas

Las columnas de cromatografía líquida usualmente se elaboran con tubos de acero inoxidable, si bien a veces se utilizan los tubos de vidrio o Tygon para aplicaciones de baja presión (<600 psi). La mayoría de las columnas tienen una longitud de 10-30 cm y diámetro interno de 2-5 mm. Los empaquetamientos de las columnas suelen ser de partículas de 3-10 μ m, las columnas de este tipo proporcionan 40 000 - 60 000 platos por metro. ¹

^{1*} Douglas A. Skoog, Donal M. West, F. Joes Holle, Stanley R. Crouch. Fundamentos de Química Analítica. Editorial Thomson 2009



El empaquetamiento más común se prepara con partículas de sílice, que se sintetizan por aglomeraciones de partículas submicrónicas de sílice en condiciones que producen partículas más grandes y de diámetro muy uniforme. Las partículas resultantes suelen cubrirse con películas orgánicas finas que se enlazan química o físicamente con la superficie. Otros materiales de empaquetamiento son las partículas de alúmina, partículas de polímeros porosos o resinas de intercambio iónico. ¹

Precolumna: Con frecuencia se coloca una precolumna pequeña delante de la columna analítica para extraer partículas y contaminantes de los disolventes y prolongar así la vida de la columna analítica. ¹

f. Detectores

Los detectores de HPLC deben tener un volumen muerto bajo para minimizar el ensanchamiento de banda adicional de columna, el detector debe ser pequeño y compatible con el flujo del líquido. ¹

El detector usado, depende de la naturaleza de la muestra. En la tabla se enumeran algunos de los detectores más usados y sus propiedades. ¹

Propiedades de los detectores de HPLC			
Detector de HPLC	Disponible comercialmente	Limite de detección de masa típico	Intervalo lineal (decenas)
Absorbancia	Si	10 pg	3-4
Fluorescencia	Si	10 fg	5
Electroquímico	Si	100 pg	4-5
Índice de refracción	Si	1 ng	3
Conductividad	Si	100 pg – 1 ng	5
Espectrometría de masas	Si	<1 pg	5
FTIR	Si	1 µg	3
Dispersión de luz	Si	1 µg	5
Actividad óptica	No	1 ng	4
Selectivo de elementos	No	1 ng	4-5
Fotoionización	No	<1 pg	4

Tabla 2. Principales detectores ^{1*}

^{1*} Douglas A. Skoog, Donal M. West, F. Joes Holle, Stanley R. Crouch. Fundamentos de Química Analítica. Editorial Thomson 2009

Los detectores espectrofotométricos son mucho más flexibles que los fotométricos. En equipos modernos, se usan detectores de diodos integrados, que permiten mostrar el espectro completo de un analito que sale de la columna. Los detectores más usados en cromatografía líquida se basan en la absorción de radiación ultravioleta o visible. Como se muestra en la siguiente figura. ²

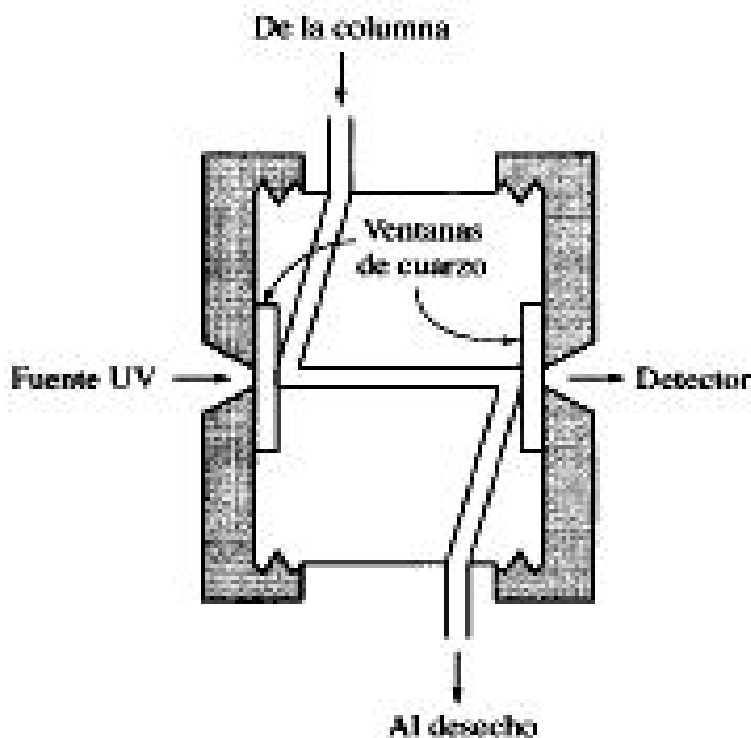


Figura 6. Detector de UV/Visible para HPLC^{1*}

^{1*} Douglas A. Skoog, Donal M. West, F. Joes Holle, Stanley R. Crouch. Fundamentos de Química Analítica. Editorial Thomson 2009



C. Disolución

La prueba de disolución es la forma más importante que se tiene para estudiar *in Vitro* la liberación de un fármaco desde una forma posológica sólida, por lo que representa una herramienta importante para evaluar los factores que afectan a la biodisponibilidad de un fármaco desde el preparado sólido. Durante la prueba de disolución se estudia la cantidad acumulada del fármaco que va entrando en la solución en función del tiempo.³

La disolución se efectúa introduciendo el comprimido en una cámara que contiene un medio de disolución fluido, para que el método sea reproducible, todos los factores que puedan afectar el proceso de disolución deben estar estandarizados. Esta condición incluye factores que afectan a la solubilidad de la sustancia (es decir, la composición y temperatura del medio de disolución) y otros que afectan el proceso de disolución (como la concentración de la sustancia disuelta, y en las condiciones de flujo, el líquido que se encuentra en la cámara de disolución).³

Normalmente, la concentración del principio activo en el medio de disolución en conjunto no excederá al 10 % de la solubilidad del fármaco, es decir, cuando esté sumergido. Cuando la cesta está sumergida se asume que el gradiente de concentración entre la capa de difusión que rodea la fase sólida y la concentración en el medio de disolución es constante.³

Hay varios métodos oficiales y no oficiales para el estudio de la disolución que se pueden aplicar a los principios activos y a los preparados formulados. Con respecto a estos últimos, los principales métodos de estudio se basan en la convección forzada del medio de disolución y se pueden clasificar en dos grupos: métodos en vaso con agitación y métodos de flujo continuo.³

1. Método de flujo continuo

Cuando se utiliza el flujo continuo, el preparado se mantiene en el interior de una celda de flujo a través de la cual se bombea el medio de disolución desde un reservorio grande a una velocidad controlada. El líquido que ha atravesado la celda se recoge para analizar el contenido del fármaco. La composición del medio de disolución podría variar en las distintas situaciones de la prueba.³





D. Validación

Los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos, están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente, así como, otros documentos normativos nacionales e internacionales. La farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) es el documento legal instituido por la Ley General de Salud donde se establecen los métodos de análisis y los requisitos sobre la identidad, pureza, potencia y otras características de calidad que garanticen que los fármacos (principios activos), aditivos, medicamentos (preparados farmacéuticos), radiofármacos y productos biológicos sean eficaces y seguros.⁴

La validación de un método analítico puede definirse como un paso crítico cuyo objetivo es asegurar su calidad o validez. El objetivo de la validación no es comparar un método con otro ya existente, sino conocer mejor sus características. La validación corresponde a un estudio crítico de confiabilidad de esta técnica.⁴

Los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías dependiendo de la naturaleza del método analítico:⁴

Categoría I. Métodos analíticos para cuantificar a un componente específico en muestras de productos terminados o en pruebas de estabilidad.

Categoría II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos.

Categoría III. Métodos analíticos utilizados en determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico.

Categoría IV. Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés.



En la siguiente tabla se muestran los lineamientos generales de acuerdo a los organismos oficiales para la evaluación de desempeño de un método analítico.

Validación de métodos					
PRUEBAS	USP	FEUM	(CDER) Guía de Validación de Métodos Cromatográficos	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos	ICH
Especificidad	X	X	X	X	
Linealidad	X	X	X	X	X
Exactitud	X	X	X	X	
Precisión	X	X	X	X	X
Precisión intermedia	X			X	X
Reproducibilidad		X			
Repetibilidad			X		X
Robustez	*		*	*	
Estabilidad de la muestra	*			*	
Límite de cuantificación			*		
Límite de detección			*		
Tolerancia			*	*	
Rango					X
Adecuabilidad					X

Tabla 3. Guías nacionales e internacionales. *Estas pruebas se realizan dependiendo de la naturaleza del método o de acuerdo a los objetivos del estudio.



Para poder comprender el procedimiento de la validación es necesario conocer conceptos básicos como: ⁴

Linealidad: Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.

Exactitud: Es la concordancia entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra a una cantidad fija.

Precisión: Es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo las mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad), utilizando una muestra homogénea.

Precisión intermedia: Se expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas.

Reproducibilidad: Se refiere a la variación de los resultados de las muestras, al aplicar el método en una corrida analítica. La repetibilidad es una propiedad crítica del método analítico por que mide la variación del método analítico en la rutina del trabajo.

Especificidad: Permite investigar la influencia de otros componentes de la muestra en las determinaciones cualitativas o cuantitativas de un método analítico.



D. Inflamación

La inflamación es una reacción protectora normal a la lesión tisular producida por traumatismos físicos, productos químicos nocivo o agentes microbiológicos. Es el esfuerzo del cuerpo por inactivar o destruir los microorganismos invasores, eliminar las sustancias irritantes e iniciar la etapa para la reparación tisular. ⁶

La inflamación se desencadena con la descarga de mediadores químicos provenientes de los tejidos lesionados y las células que migran. Los mediadores químicos específicos varían según el tipo de proceso inflamatorio y consisten en aminas, como la histamina y la 5-hidroxitriptamina, lípidos, como las prostaglandinas, péptidos pequeños, como la bradicina, y péptidos de mayor tamaño, como la interleucina1. ⁶

1. Prostaglandinas

Muchos de los fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE'S) actúan mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Por este motivo, se requiere conocer las acciones y la biosíntesis de las prostaglandinas, derivados de ácidos grasos no saturados que contienen 20 carbonos y una estructura cíclica en el anillo (estos compuestos se conocen como eicosanoides). La siguiente figura ilustra aspectos estructurales de importancia de las prostaglandinas. ⁶

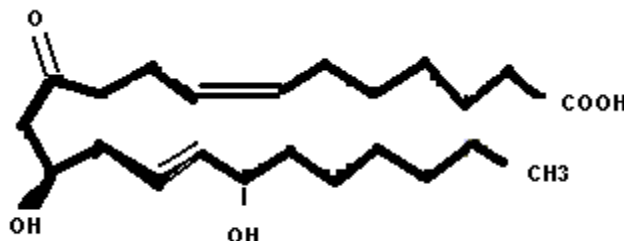


Figura 7. Estructura de las prostaglandinas

El precursor primario de las prostaglandinas y los compuestos relacionados es el ácido araquidónico, un ácido graso de 20 carbonos. Este ácido se encuentra como componente de los fosfolípidos de las membranas celulares, en especial fosfatidilinositol y otros lípidos complejos. El ácido araquidónico libre se descarga desde los fosfolípidos tisulares por acción de la fosfolipasa A₂ y otras acilhidrolasas por un proceso controlado por hormonas y otros estímulos. Existen otras dos vías mayores para la síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico. ⁶

- Vía de la ciclooxigenasa: todos los eicosanoides con estructuras anulares, esto es, prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina, se sintetizan por la vía de la ciclooxigenasa. Se identifican dos ciclooxigenasas: COX-1 y COX-2. la primera se encuentra en todas partes y es consecutiva, en tanto que la segunda es inducida como reacción de los estímulos inflamatorios. ⁶

- Vía de la lipoxigenasa: de manera alternativa pueden actuar diversas lipoxigenasas sobre el ácido araquidónico para formar 5-HPETE, 12-HPETE y 15-HPETE, derivados peroxidados inestables que se convierten en los derivados hidroxilados correspondientes, o en leucotrienos o lipoxinas, lo que depende del tejido. ⁶

Muchas acciones de las prostaglandinas están medidas por su fijación a gran variedad de receptores membranales definidos que operan por medios de proteínas G, las cuales activan o inhiben de manera subsecuente la adenilciclase o estimulan la fosfolipasa C. Esto determina que la formación de diacilglicerol y 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) se incremente. La prostaglandina alfa-2 (PGF_{2α}), los leucotrienos y el tromboxano A₂ (TXA₂) median ciertas acciones al activar el metabolismo del fosfatidilinositol y producir un aumento de Ca⁺⁺ intracelular. ⁶

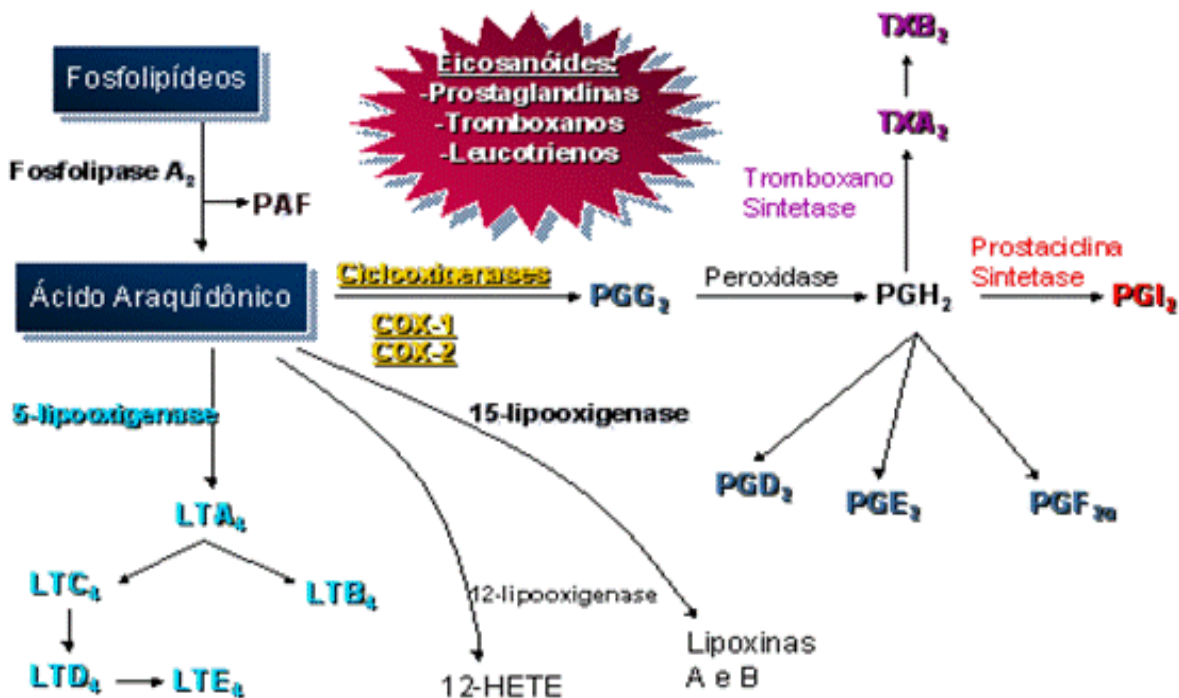


Figura 8. Síntesis de prostaglandinas



2. Antinflamatorios no esteroideos

Los fármacos analgésicos antipiréticos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) forman un grupo de agentes distintos desde el punto de vista químico que difieren en sus actividades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias. Actúan primordialmente al inhibir las enzimas del grupo de la ciclooxigenasa, pero no a las del grupo de la lipoxigenasa. 7

En la siguiente tabla se muestra la clasificación general de los analgésicos antipiréticos antiinflamatorios no esteroideos.⁸

Clasificación general de los AINE'S		
Derivados del ácido Salicílico	+ Ácido acetilsalicílico + Ácido salicílico + paracetamol + Indometacina	Producen inhibición irreversible de la ciclooxigenasa plaquetaria por medio de la acetilación
Derivados del ácido acético	+ Diclofenaco sódico + Ketorolaco	Son inhibidores reversibles y competitivos de la ciclooxigenasa
Derivados del ácido propiónico	+ Ibuprofeno + Naproxeno	Son inhibidores selectivo de COX2
Derivados de la sulfonanilida	+ Nimesulida	Inhibición de COX2

Tabla 4. Clasificación de AINE'S



a. Mecanismo de acción

Los efectos antipiréticos y antiinflamatorios se deben sobre todo al bloqueo de las síntesis de prostaglandinas en los centros termorreguladores del hipotálamo y sus sitios periféricos blancos. Más aún al disminuir la síntesis de prostaglandinas, previenen también la sensibilización de los receptores del dolor a los estímulos tanto mecánicos como químicos. ⁶

b. Acciones antiinflamatorias

Puesto que los AINE'S inhiben la actividad de la cicloxigenasa, disminuyen la formación de prostaglandinas y por lo tanto modula los aspectos de la inflamación en los que éstas actúan como mediadores. ⁶

c. Acción analgésica

Se creó que la prostaglandina E₂ (PGE₂) vuelve sensibles las terminaciones nerviosas a la acción de la bradicina, histamina y otros mediadores químicos que el proceso inflamatorio libera a nivel local. De este modo al disminuir la síntesis de PGE₂, reprimen la sensación de dolor. ⁶

d. Acción antipirética

Ocurre fiebre cuando el punto de ajuste dentro del termorregulador situado en la parte interior del hipotálamo se eleva. Los AINE'S disminuyen la temperatura corporal al impedir la síntesis y la descarga de PGE₂, con ello reajustando la temperatura⁶.



D. Naproxeno Sódico

1. Descripción

El naproxeno sódico es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo que posee propiedades analgésicas y antipiréticas. Pertenece a la familia de los ácidos aril-propiónicos como el ketoprofeno, ibuprofeno y flurbiprofeno. Desde el punto de vista farmacológico, el naproxeno sódico es semejante a la aspirina y a la indometacina pero muestra una menor incidencia de efectos secundarios. El naproxeno sódico se utiliza en el tratamiento de la artritis reumatoide y otros desórdenes inflamatorios y dolorosos. En la siguiente figura se muestra la estructura química.⁹

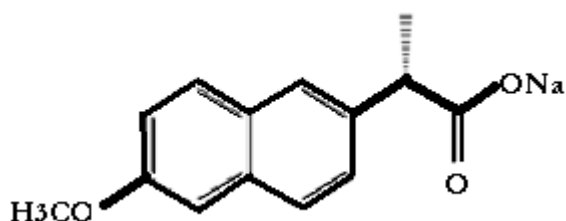


Figura 9. Estructura química de Naproxeno Sódico.

2. Mecanismo de acción

Los efectos antiinflamatorios del naproxeno sódico son el resultado de la inhibición periférica de la síntesis de prostaglandinas subsiguiente a la inhibición de la cicloxigenasa. El naproxeno sódico inhibe la migración leucocitaria a las áreas inflamadas, impidiendo la liberación por los leucocitos de citoquinas y otras moléculas que actúan sobre los receptores nociceptivos. El naproxeno sódico, como otros AINE'S, no altera el umbral del dolor ni modifica los niveles de prostaglandinas cerebrales, concluyéndose que sus efectos son periféricos. La antipiresis es consecuencia de la vasodilatación periférica debido a una acción central sobre el centro regulador de la temperatura del hipotálamo.⁹

Los efectos inhibidores de la síntesis de prostaglandinas tienen, en cambio, su lado negativo en la citoprotección de la mucosa gástrica y la función renal (disminuye el flujo renal), así como sobre la agregación plaquetaria.⁹



3. Farmacología

Como antiirreumático actúa por su mecanismo antiinflamatorio, independiente del eje pituitario-adrenal. Como analgésico bloquea el estímulo doloroso generado periféricamente, por reducción de la síntesis y la actividad de las prostaglandinas y otras sustancias que sensibilizan los receptores dolorosos de tipo mecánico y químico. Como analgésico y antiinflamatorio en el ataque de gota (artritis gotosa). No corrige la hiperuricemia. Como antipirético actúa probablemente por disminución de la actividad de las prostaglandinas en el centro termorregulador del hipotálamo. Como antidismenorréico, actúa disminuyendo la actividad de las prostaglandinas intrauterinas, responsables del dolor y otros síntomas de la dismenorrea primaria (cefalea, náusea y vómitos).⁶

Disminuyen la presión de la contractibilidad uterina, incrementando la perfusión sanguínea aliviando la isquemia y consecuentemente el dolor espasmódico. En las cefaleas vasculares, también por reducción de la actividad de las prostaglandinas, el Naproxeno sódico es un fármaco no narcótico.⁹

4. Farmacocinética

El naproxeno sódico se puede administrar como ácido o en forma de sal sódica. En ambos casos, la absorción gastrointestinal es completa, aunque la sal sódica se absorbe más rápidamente que el ácido. Los alimentos reducen la velocidad de absorción aunque no afectan el % de fármaco absorbido.⁹

Las concentraciones máximas de naproxeno sódico se alcanzan a las 1-2 horas. La situación de equilibrio ("steady-state") se alcanza después de 4 o 5 dosis. El fármaco se une a las proteínas del plasma en un 99%. El naproxeno sódico cruza la barrera placentaria y se excreta en la leche materna, alcanzando unas concentraciones que representan el 1% de las maternas. La semivida plasmática es de 10 a 20 horas.⁹

Aproximadamente el 30% del fármaco administrado es metabolizado a 6-desmetil-naproxeno, que no tiene actividad antiinflamatoria. La eliminación es fundamentalmente urinaria, siendo el 10% fármaco sin alterar, 5-6% el 6-desmetilnaproxeno y el resto conjugados o glucurónidos. Sólo una pequeña cantidad es eliminada en las heces.⁹



G. Tabletas

La vía oral es la más utilizada para administrar estas formas farmacéuticas. La idea de formar una tableta por compresión de polvos nació a través de la primera patente en 1843, para un dispositivo manual usado para formar un comprimido. El uso de tabletas como forma posológica atrajo la atención de la industria farmacéutica floreciente, pero dentro de las farmacias la píldora siguió siendo la forma más popular.³

Una tableta incluye uno o más fármacos (principios activos), además de otras sustancias que se usan en la formulación de un preparado completo. En la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (8ª edición, 2007) se define como preparado farmacéutico obtenido por compresión o moldeado de forma y de tamaño variable. Puede estar recubierto con mezclas de diversas sustancias tales como: polímeros, ceras y plastificantes. Existe una variedad de tabletas, tales como: efervescentes, sublinguales, vaginales, multicapa, masticables y dispersables.¹⁰

Las tabletas se usan principalmente para la liberación sistémica del fármaco, pero también para su acción local. Para que tenga un efecto sistémico, el fármaco debe liberarse del comprimido, es decir, disolverse normalmente en los líquidos de la boca, el estómago o intestino y después absorberse hacia la circulación sistémica, a través de la cual llega a su lugar de acción.

La principal desventaja de los comprimidos como forma posológica se refiere a la indisponibilidad de fármacos poco hidrosolubles o poco absorbibles. Además, algunos fármacos pueden provocar efectos irritantes locales o cualquier otro tipo de daño sobre la mucosa gastrointestinal.³

1. Fabricación

Las tabletas se preparan forzando las partículas a mantenerse estrechamente unidas entre sí por compresión del polvo, que permite que las partículas cohesionen en una muestra porosa sólida de una geometría definida. La compresión se produce en una matriz por la acción de dos punzones o troqueles, el interior y superior, a través de los cuales se aplica la fuerza compresiva. El proceso de tableteado se divide en tres etapas, lo cual se conoce como ciclo de compactación.³



H. Valoración del Naproxeno sódico

Métodos reportados en FEUM para la valoración de Naproxeno sódico		
Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6 ^{ta} (1994) y 7 ^{ma} (2000) edición	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8 ^{va} (2004) y 9 ^{na} (2008) edición	
+Se reporta una titulación no acuosa con ácido acético glacial y ácido perclórico,	+Se reporta una titulación no acuosa, con una solución de Naproxeno sódico en ácido acético glacial.	+Se reporta una valoración por medio de Cromatografía líquida de alta definición usando como fase móvil acetonitrilo: agua: ácido acético glacial. Proporción (50:49:1).
+Utilizando como indicador naftolbenzeina. ¹¹	+ Utilizando p-naftolbenzeina como indicador. La cual se titula con ácido acético glacial. ¹⁰	+Disolvente: acetonitrilo : agua(90:10) +Bajo las siguientes condiciones del equipo_ Columna de 4,6 mm x 15 cm empacada con L1; detector de luz UV; longitud de onda de 254 nm; flujo de 1,2 mL/min. ¹²

Tabla 5. Valoraciones para Naproxeno reportadas en las distintas ediciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).

Como se puede observar en la tabla anterior al consultar la FEUM en sus ediciones 6^{ta}, 7^a, 8^{va} y 9^{na}, para la cuantificación del naproxeno sódico en tabletas se encontró el reporte de una valoración por titulación no acuosa y posteriormente, en la 8^{va} y 9^{na} edición, un método cromatográfico. Si bien, se puede observar como hay un cambio de un método menos selectivo a uno con mayor sensibilidad, no hay que dejar de considerar que éste último lleve implícito que es más costoso en tiempo e insumos.



I. Ventajas y desventajas de los métodos utilizados.

Espectroscopia Ultravioleta UV/Visible

Ventajas	Desventajas
Preparación mínima de muestra	
Mayor posibilidad de análisis, incluyendo materiales muy opacos o poco absorbentes.	Método menos aplicable (hoy en día mejorado con la aparición del empleo de sondas y marcadores fluorescentes)
Alta sensibilidad	El llenado de la celda es poco reproducible sobre todo cuando se requiere trabajar en análisis cuantitativo.
Sensibilidad	
Gran intervalo lineal de concentraciones	
Selectividad	

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Ventajas	Desventajas
Tiempos de separación cortos y bien definidos	Sólo se puede acomodar un número limitado de picos (escala de tiempos corta)
No hay pérdida de muestra (los solutos no interaccionan con la fase estacionaria)	Pequeña capacidad, no pudiéndose hacer purificaciones a gran escala
Su elevada resolución permite la purificación de rutina de mezclas cuya separación no se consigue por otras técnicas.	Gasto elevado de la instrumentación.
Su velocidad permite que la mayor parte de las separaciones se consigan significativamente en tiempos menores a 1 hora.	
Su elevada sensibilidad permite la valoración cuantitativa de cantidades de material menores del picomol.	
Su capacidad de automatización.	
No se desactiva la columna debido a la ausencia de interacción del soluto con el relleno.	



II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

A. Planteamiento del problema

En los últimos años se han observado grandes avances tecnológicos los cuales han remplazado a métodos analíticos como los volumétricos y espectrofotométricos, sustituyéndolos casi en su mayoría por métodos cromatográficos, en particular, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Esto ha resultado ser una variable a considerar por los laboratorios farmacéuticos ya que estos cambios implican la adquisición de equipos, insumos y capacitación del personal que realiza el método analítico, afectando tiempos y costos que se ven reflejados en el precio del producto que sale al mercado. Dichos avances han dado paso a que se presenten cambios en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), ya que en cada renovación se observa cómo se sustituyen métodos menos selectivos por unos más selectivos, como en el caso del Naproxeno sódico, en el cual se reporta un método volumétrico y posteriormente, en la 9^{na} edición, por HPLC. Estos cambios nos llevan a pensar si realmente son necesarios o sólo cumplen con las exigencias que se presentan en la actualidad. Por ello, la pregunta a resolver en este trabajo sería ¿El método por espectroscopia propuesto para cuantificar tabletas de Naproxeno sódico presenta equivalencia en sus resultados con respecto al método por cromatografía de líquidos de alta resolución propuesto en la 9^{na} edición? Si esto fuera así, podría proponerse una nueva modificación a la FEUM o bien que exista la posibilidad de utilizar un método confiable pero que implique un menor costo y cumpla con las necesidades de los laboratorios farmacéuticos.

B. Objetivo General

Evaluar la equivalencia entre los resultados obtenidos para la cuantificación de Naproxeno sódico en tabletas entre dos métodos analíticos: Espectroscopia UV/Visible y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

C. Hipótesis

Dada las características de los métodos, podemos suponer que ambos son eficientes, sin embargo, el método de HPLC se considera en términos de tiempo y eficacia más viable, aunque no así en costos, entonces al evaluar los resultados es posible encontrar una equivalencia entre los dos métodos analíticos.



D. Material

Reactivos	Equipo
Estándar de Naproxeno sódico USP Lote: 2-SN-0030103	Espectrofotómetro UV/VIS Modelo: Varian-Cary 50 BIO. No Inv. 2180835.
Fosfato monobásico de sodio. Lote: A47C24	Potenciómetro Modelo: Corning Pinnacle 54 No. Inv. 2159563
Fosfato dibásico de sodio. Lote: B33C31	Microbalanza Modelo: Metter No. Inv. 1468879.
	Balanza Analítica Modelo: OHAUS-Exploren Pro No. Inv. 2159563
	Cromatografo de alta Resolución Marca: Varian Detector: protar 325 Automuestador: Protar 410 Bomba: Prostar 240

Tabla 6. Reactivos y equipo utilizados en el estudio.

Material	
Matraces volumétricos de 25mL	Micro pipeta de 10-100 μ l
Matraces volumétricos de 10mL	Vasos de precipitado de 100 mL
Probeta graduada de 1000 μ l	Vaso de precipitado de 1000 mL
Agitador	Vaso de precipitado de 250 mL
Celdas	Piseta

Tabla 7. Material utilizado en el estudio



Para el estudio, se tomaron en cuenta tabletas de naproxeno sódico con un rango de 250-270 mg de principio activo presente en la tableta, así como, la fecha de caducidad y el número de lote. Se considerarán tabletas de venta libre adquiriendo las marcas A, B, C, D, E y F.

Marca	# de tabletas	# de lote	Cantidad de activo por tableta
A	10	X76150	270 mg
B	10	M03036	270 mg
C	10	7JE0650	250 mg
D	10	8956645	270 mg
E	10	244257C	250 mg
F	10	070153	250 mg

Tabla 8. Tabletadas analizadas en el estudio

☀ Criterios de inclusión:

1. Mismo lote.

☀ Criterio de exclusión:

1. Fecha de caducidad
2. Defecto del producto
3. Defecto del material de empaque.

☀ Criterio de eliminación.

1. Ruptura de la tableta



E. Metodología

1. Cromatografía líquida de alta resolución

* Se prepararon las siguientes soluciones:

Fase móvil. Acetonitrilo: agua: ácido acético glacial. Proporción (50:49:1). Filtrar y desgasificar.

Blanco. Acetonitrilo: agua: ácido acético glacial. Proporción (50:49:1).

Preparación de referencia. Se pesó una cantidad de SRef-FEUM de Naproxeno sódico equivalente 13,75 mg, se pasó a un matraz volumétrico de 50 mL, se disolvió y se llevó al aforo con fase móvil. Esta solución contiene 27,5 µg /mL de Naproxeno sódico.

Preparación de la muestra. Se pesaron no menos de 20 tabletas, se calculó su peso promedio y se trituraron hasta obtener polvo fino, se pesó una cantidad del polvo equivalente a 275 mg de Naproxeno sódico equivalente (39.38 mg), se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL, se agregó 10 mL de agua y se agitó hasta completar la dispersión, se llevó al aforo con la fase móvil y se filtró.

Solución a 25 µg/mL: Se transfirió con una micro pipeta de 10-100 mL de forma independiente alícuotas de 0.9 mL de la solución estándar y 0.9 mL de la solución de muestra a tres matraces volumétricos de 10 mL, se agitó y se llevó al aforo con fase móvil. Concentraciones 25 µg/mL.

Solución a 26 µg/mL: Se transfirió con una micro pipeta de 10-100 mL de forma independiente alícuotas de 0.95 mL de la solución estándar y 0.95 mL de la solución de muestra a tres matraces volumétricos de 10 mL, se agitó y se llevó al aforo con fase móvil. Concentraciones 26 µg/mL.

Solución a 27 µg/mL: Se transfirió con una micro pipeta de 10-100 mL de forma independiente alícuotas de 1.0 mL de la solución estándar y 1.0 mL de la solución de muestra a seis matraces volumétricos de 10 mL, se agitó y se llevó al aforo con fase móvil. Concentraciones 27 µg/mL.

Solución a 29 µg/mL: Se transfirió con una micro pipeta de 10-100 mL de forma independiente alícuotas de 1.05 mL de la solución estándar y 1.05 mL de la solución de muestra a tres matraces volumétricos de 10 mL, se agitó y se llevó al aforo con fase móvil. Concentraciones 29 µg/mL.

Solución a 30 µg/mL: Se transfirió con una micro pipeta de 10-100 mL de forma independiente alícuotas de 1.1 mL de la solución estándar y 1.1 mL de la solución de muestra a tres matraces volumétricos de 10 mL, se agitó y se llevó al aforo con fase móvil. Concentraciones 30 µg/mL.



Condiciones del equipo. Columna de 4,6 mm x 15 cm empacada con L1; detector de luz UV; longitud de onda de 254 nm; flujo de 1,2 mL/min.

Procedimiento. Se inyecta al cromatografo, repetidas veces, volúmenes iguales (2µL) de la preparación de referencia y registrar los picos respuesta. La eficiencia de la columna calculada para el pico de la sustancia de análisis no es menor de 4000 platos teóricos cuando se calcula por la siguiente fórmula:

$$5,545 (t/W_{h/2})^2$$

Donde:

t= tiempo de retención
W= ancho de la base del pico
h= alto del pico obtenido

Se calcula la cantidad de $C_{14}H_{13}NaO_3$ en la porción de la muestra tomada, por medio de la siguiente fórmula:

$$CD (A_m/A_{ref})$$

C= cantidad por mililitro de Naproxeno sódico en la preparación de referencia.
D= factor de dilución de la muestra
 A_m = área relativa obtenida en el cromatógrama con la preparación de la muestra.
 A_{ref} = área relativa obtenida en el cromatógrama con la preparación de la referencia.

Se evaluaron los siguientes parámetros para este método:

Linealidad. Se considero por lo menos una muestra y de dicha muestra se deben preparar al menos tres niveles de concentración del analito por triplicado, considerando el siguiente intervalo: de 80% a 120% del contenido del marbete.⁴

Exactitud. Con placebos o muestras adicionadas preparados de manera independiente, al menos por sextuplicado. Dichas muestras contienen todos los componentes del producto y además se le adiciono la concentración que represente el 100 %.⁴

Precisión intermedia. Se determino el análisis de por lo menos tres alícuotas, tomadas de una muestra homogénea; para ser analizadas en diferentes días (mínimo dos) y por diferentes analistas (mínimo dos).⁴

Especificidad. Para determinar la especificidad se demostro que la respuesta analítica se debe únicamente al analito.⁴



2. Espectroscopia de absorción UV/Visible.

* Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 (medio de disolución). Se peso 2.62 g de fosfato monobásico de sodio y 11.5 g de fosfato dibásico de sodio anhidro, se paso a un matraz volumétrico de 1000 mL, se disolvió y llevo a aforo con agua, se mezclo y ajusto el pH (si es necesario con solución de hidróxido de sodio o ácido sulfúrico).

Blanco: Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4

Solución de estándar. Se tomo cinco tabletas de los medicamentos A, B, C, D, E, y F. se peso cada una de ellas y determino el peso promedio. Se trituro en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se peso el equivalente a 30 mg (41.91 mg de polvo), se coloco en un matraz volumétrico de 25 mL, se agito y llevo a volumen con el amortiguador de fosfatos. Se paso la solución por un filtro de 0.45 cm. Concentración 300 mg /mL.

* Se prepararon las siguientes soluciones de trabajo:

Solución a 30 µg/mL. Se transfirió con una micro pipeta de 10-100 mL de forma independiente alicuotas de 0.25 mL de la solución estándar a seis matraces volumétricos de 10 mL, se agito y aforo con solución amortiguadora de fosfatos. Concentraciones 30 µg/mL.

Solución a 60 µg/mL. Se transfirió con una micro pipeta de 10-100 mL de forma independiente alicuotas de 0.50 mL de la solución estándar a seis matraces volumétricos de 10 mL, se agito y aforo con solución amortiguadora de fosfatos. Concentraciones 60 µg/mL.

Solución a 90 µg/mL. Se transfirió con una micro pipeta de 10-100 mL de forma independiente alicuotas de 0.75 mL de la solución estándar a seis matraces volumétricos de 10 mL, se agito y aforo con solución amortiguadora de fosfatos. Concentraciones 90 µg/mL.

Solución a 120 µg/mL. Se transfirió con una micro pipeta de 10-100 mL de forma independiente alicuotas de 1 mL de la solución estándar a seis matraces volumétricos de 10 mL, se agito y aforo con solución amortiguadora de fosfatos. Concentraciones 120 µg/mL.



Solución a 140 mg/mL. Se transfirió con una micro pipeta de 10-100 mL de forma independiente alicuotas de 1.2 mL de la solución estándar a seis matraces volumétricos de 10 mL, se agito y aforo con solución amortiguadora de fosfatos. Concentraciones 140 µg/mL.

Se determinó la absorbancia de cada una de las soluciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 332 nm, empleando celdas de cuarzo de un centímetro. Tomando la solución amortiguadora de fosfatos como blanco.

* Se evaluarán los siguientes parámetros para este método:

Linealidad: Se prepararon por triplicado 5 niveles de concentración, las soluciones incluyen la concentración que represente el 100%. Calcular m, b y r^2 .

Exactitud: Se prepararon por lo menos 6 placebos cargados, de manera independiente, con la cantidad necesaria del analito de interés para la concentración al 100 %. El análisis se llevo a cabo en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Especificidad: Para determinar la especificidad se demostro que la respuesta analítica se debe únicamente al analítico.

Precisión intermedia: Se prepararon por lo menos tres soluciones a la concentración que represente el 100%. Para ser analizadas en diferentes días (mínimo dos) y por diferentes analistas (mínimo dos). Calcular \bar{Y} , S y $CV \leq 3 \%$

Repetibilidad: Se determino de una muestra homogénea del producto cercana al 100 % de la concentración teórica, analizada bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, laboratorio, y equipo). Calcular \bar{Y} , S y $CV \leq 3 \%$

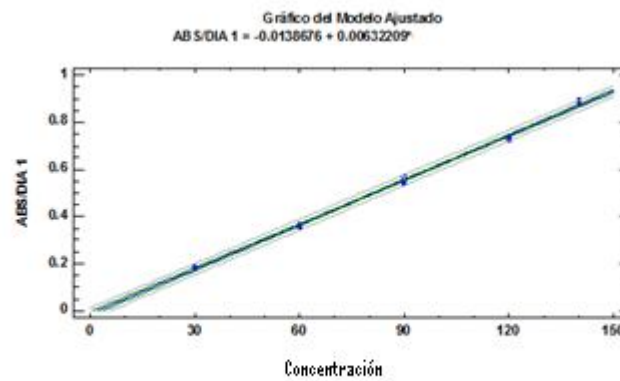


III. RESULTADOS

A. Método por espectroscopia UV/Visible

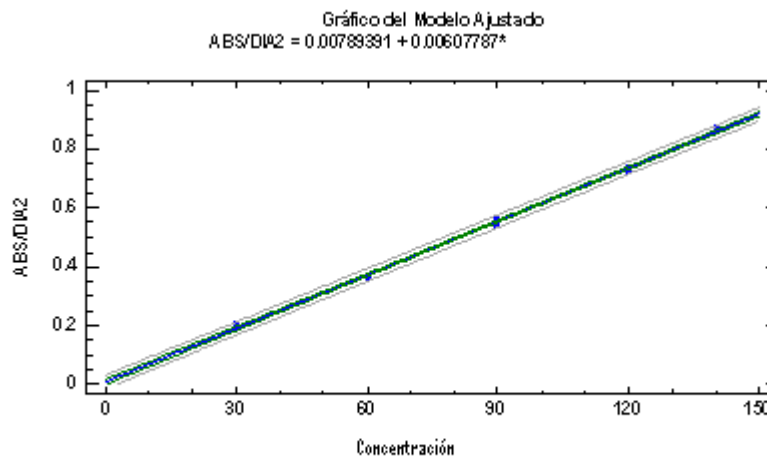
Para determinar la linealidad se obtuvieron los siguientes parámetros:

Parámetros día 1		
m	b	r ²
0.0063204	-0.013867	0.998234



Gráfica 1

Parámetros día 2		
m	b	r ²
0.0060778	0.0078939	0.998260



Gráfica 2



Para determinar la repetibilidad se obtuvieron los siguientes parámetros:

Analista 1/día 1			Analista 2/día 1		
Y	S	% CV	Y	S	% CV
0.5640	0.0115	2.0550	0.5600	0.0104	1.8727

Analista 1/día 2			Analista 2/día 2		
Y	S	% CV	Y	S	% CV
0.5545	0.0115	2.0889	0.5494	0.0081	1.4866

Tabla 9. Resultados de precisión intermedia

Y aplicando el modelo estadístico $Y_{kij} = \mu + A_k + D_i + AD_{ki} + e_{J(ki)}$, con el cual se obtuvieron los siguientes resultados para la precisión intermedia:

Concentración utilizada (90 mg/mL)

Análisis de Varianza para ABS - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:ANALISTA	0.000615094	1	0.000615094	1.52	0.292
B:DIA	0.00012927	1	0.00012927	1.16	0.2944
INTERACCIONES					
AB	0.00000155042	1	0.00000155042	0.01	0.9073
RESIDUOS	0.00222969	20	0.000111485		
TOTAL (CORREGIDO)	0.00297561	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Analista

Ho: No hay interacción en analista
Ha: Hay interacción en el analista

Día

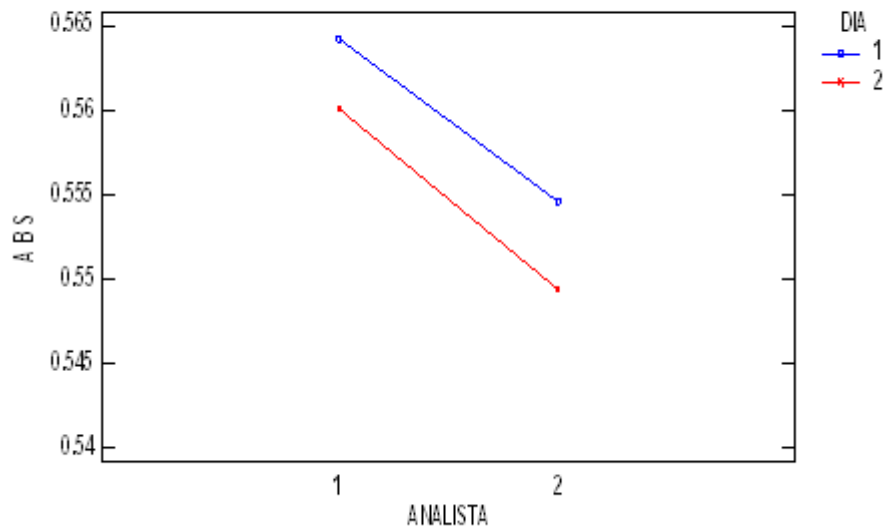
Ho: No hay interacción en el día
Ha: Hay interacción en el día

Interacción analistas /día

Ho: No hay interacción en el día /analista
Ha: Hay interacción en el día /analista



Gráfica 3. Gráfico de interacciones



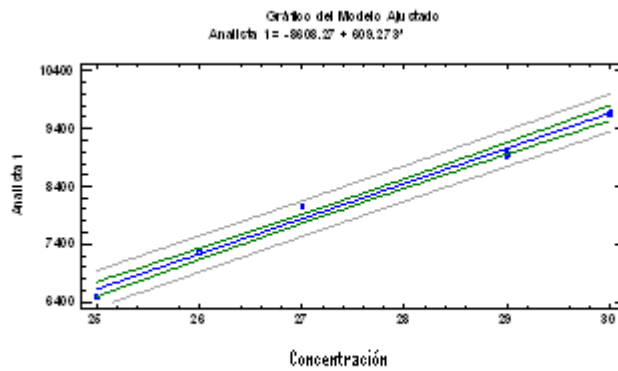
Conclusión: Considerando los parámetros establecidos por las normas para la validación de un método analítico, el CV en ambos caso es menor al 3 %; así como al obtener F_{tab} y F_{cal} en el modelo estadístico utilizado; podemos concluir que no se encontró evidencia necesaria para rechazar la precisión intermedia ya que no hay interacción entre los analistas y ni en los días.



B. Método por cromatografía de líquidos de alta resolución

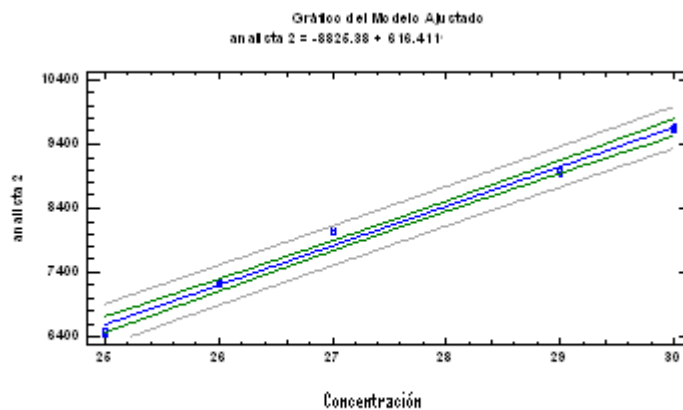
Para determinar la linealidad se obtuvieron los siguientes parámetros:

Parámetros analista 1		
m	b	r ²
609.27	-8608.27	0.987342



Gráfica 4

Parámetros analista 2		
m	b	r ²
616.41	-8825.38	0.987489



Gráfica 5.



Para determinar la precisión intermedia se obtuvieron los siguientes parámetros:

Analista 1		
Y	S	CV
8277.5950	16.7934	0.00203

Analista 2		
Y	S	CV
8053.3883	30.6068	0.00380

Tabla 8. Resultados de precisión intermedia

Y aplicando el modelo estadístico $Y_{kij} = \mu + A_k + D_i + AD_{ki} + e_{J(ki)}$, con el cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Concentración utilizada (27 mg/mL)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:ANALISTA	271050.	1	271050.	558.77	0.0000
B:DIA	65792.4	1	65792.4	135.63	0.0000
INTERACCIONES					
AB	816.083	1	816.083	1.68	0.2094
RESIDUOS	9701.59	20	485.08		
TOTAL (CORREGIDO)	347360.	23			

Analista

Ho: No hay interacción en analista
Ha: Hay interacción en el analista

Día

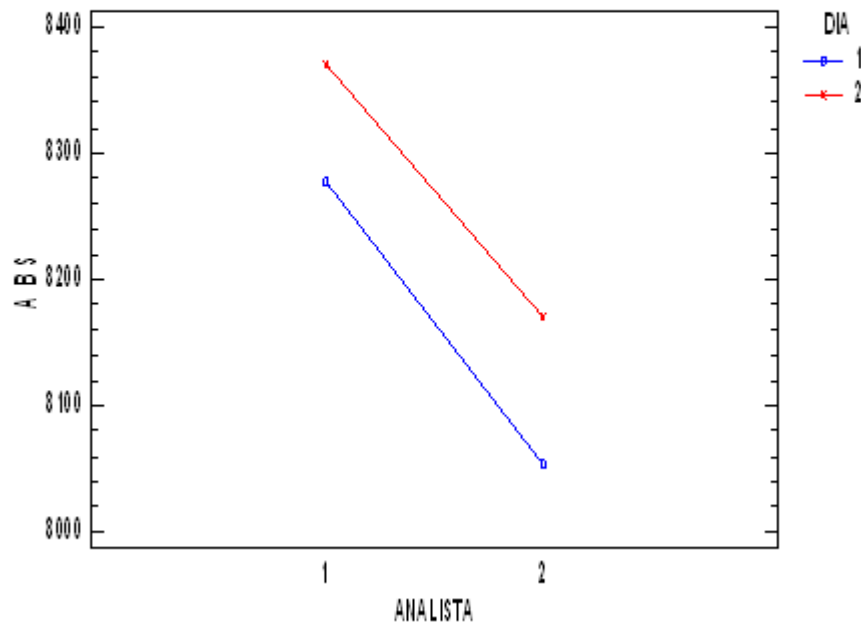
Ho: No hay interacción en el día
Ha: Hay interacción en el día

Interacción analistas /día

Ho: No hay interacción en el día /analista
Ha: Hay interacción en el día /analista



Grafica 6. Grafico de interacciones



Conclusión: Considerando los parámetros establecidos por las normas para la validación de un método analítico, el CV en ambos caso es menor al 3 %; así como al obtener F_{tab} y F_{cal} en el modelo estadístico utilizado; podemos concluir que se encontró evidencia necesaria para rechazar la precisión intermedia ya que no hay interacción entre los analistas y ni en los días.



VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La cuantificación del Naproxeno sódico que se llevó a cabo a partir del método reportado en la FEUM 9ª edición, presentó un comportamiento cromatográfico en los intervalo de concentración de 25 a 30 $\mu\text{g/mL}$, una ecuación $Y = 609.27x - 8608.27$ y un coeficiente de determinación de 0.987342 al analizar las muestras de Naproxeno sódico.

Con respecto al método analítico desarrollado para espectroscopia UV/Visible para los intervalo de concentraciones de 30 a 140 $\mu\text{g/mL}$, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.998234 para el día uno a partir de la ecuación de la recta $Y = 0.0063204X + 0.013867$. Y un coeficiente de determinación de 0.998260 para el día dos a partir de la ecuación de la recta $Y = 0.0060778X - 0.0078939$.

Con base a lo anterior queda demostrada la linealidad de los métodos analizados, en los cuales podemos comprobar que la respuesta es directamente proporcional a la concentración del fármaco presente en cada muestra, teniendo como resultado un coeficiente de variación del 95 %.

Al realizar la comparación de los resultados obtenidas en los métodos por espectroscopia UV/Visible y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución se determinó que el método desarrollado es sensible, ya que es capaz de diferenciar con claridad, entre las pequeñas variaciones de las concentraciones utilizadas en ambos métodos.



En cuanto a la especificidad del método analítico reportado en la FEUM 9^{na} edición, la muestra, el blanco y el estándar, presentan un comportamiento similar al del método desarrollado, ya que al analizar las absorbancias utilizadas, tanto de espectroscopia UV/Visible y HPLC no se detecta la presencia de productos de degradación del Naproxeno sódico, por lo tanto ambos métodos son específicos,

La precisión cumplió con los criterios del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C, ya que en ambos casos el coeficiente de variación se observo menor al 3 % en el nivel de concentración analizado como se observa en la tabla 8 y 9.

Las gráficas 3 y 6, muestran que ambos métodos son repetibles, al no haber intersección entre las rectas, por lo que se deduce que no hay efecto de los analistas y días en que se realice el estudio, en los resultados de los métodos.



V. CONCLUSIONES

El método analítico desarrollado por espectroscopia UV/Visible es confiable y adecuado para la cuantificación del Naproxeno sódico en comparación al método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección UV reportado en la FEUM 9° edición; ya que el método cumplió con las especificaciones y atributos de calidad establecidos por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C.

Por lo tanto, este método es adecuado para uso rutinario en estudios químicos para la cuantificación de Naproxeno sódico, debido a que el método validado presentó linealidad en un intervalo de 30 a 140 $\mu\text{g/mL}$, así como precisión y exactitud en cada nivel de concentración propuesto.

El método desarrollado es sencillo y económico, porque solo se requiere realizar una sola preparación sin necesidad de reactivos para la extracción de la misma, además de que utiliza una solución amortiguadora básica (fosfatos al 0.1 M y pH 7.4).

Además el método desarrollado es eficiente, pudiéndose aplicar a muestras con estándares o principios activos y también permitiendo analizar un número mayor de muestras en menor tiempo; así como menos equipo y material de laboratorio en comparación con la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.



VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Douglas A. Skoog, Donal M. West, F. Joes Holle, Stanley R. Crouch. Fundamentos de Química Analítica. Editorial Thomson 2004.
2. Rouessac Francis, Rouessac Annick. *Análisis Químico. Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. Editorial McGRAW-HILL INTERAMERICANA. ESPAÑA 2003.
3. Aulton M. E. Göran Alderborn. "Comprimidos y Compactación" *Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas*. 2ª edición, editorial: ELSEVIER España S.A. 2004, capítulo 27, pp. 397-410.
4. Secretaría de Salud. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 9ª edición. Volumen I y II. México 2008. pp 1145-1146, 1912 – 1913, 2155.
5. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. Comisión de Validación de Métodos Analíticos. *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. Edición 2002.
6. Mycek J. Mary, Harvey A. Richard. *Farmacología*. 2da edición. Editorial MC Graw-Hill Internacional 2004.
7. Valsecia-Malgor. "Analgésicos Antipiréticos y Antiinflamatorios no esteroideos (AINE´s)". *Drogas tipo aspirina. Farmacología*. Capítulo 7. pp. 112-132. Vol 4: [med.unne.edu.ar/cátedra/farmacologia/temas_farma/volumen4/cap7_aines.pdf -WEPEDIA].
8. Gennaro R. Alfonso. *Remington: the science and practice of pharmacy*. 20 th edition. Editorial Board Members and Editors. USA 200.
9. *Vadecum*. Monografía naproxeno sódico. (www.iqb.es)
10. *Secretaría de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 8ª edición. Volumen I y II. México 2007, pp.1897-1898, 1166-116.
11. *Secretaría de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 5ª edición. Volumen I y II. México 2007, pp. 782, 1340.
12. Prapeau. *Análisis y control de calidad en los medicamentos*. Editorial ciencia y técnica, 2001.
13. Miller J.C. *Estadística para Química Analítica*. 2ª edición, editorial: ADDISON-WESLEY IBEROAMERICANA, Wilmington Delaware, E.U.A. 1993.

}



14. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
15. PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-SSA1-2004, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos (modifica a la NOM-059-SSA1-1993, publicada el 31 de julio de 1998).
16. Swartz Michael, Krull S. Ira. *Analytical Method Development and Validation*. Editorial Marcel Dekker. INC. New York, 1997.
17. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. *Guideline for Industry Text on Validation of Analytical Procedures. ICH-Q2A*. March 1995.
18. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. *Guidance for Industry, ICH-Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology*. November 1996.
19. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. *Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation. Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation*.
20. Noguez Méndez, Quirino Barreda, Del Castillo García, Rojas Oviedo. "Diseño y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta eficacia para la cuantificación de tolbutamida, acetamida y propianamida en dispersiones sólidas". Laboratorio de Farmacia Molecular y de Liberación Controlada. Dpto. de Sistemas Biológicos. Universidad. Universidad Nacional Autónoma de México