



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE UN MÉTODO PARA CUANTIFICAR PARACETAMOL EN TABLETAS POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO- MEDIO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

PERALTA VÁZQUEZ JAVIER IVAN

DIRECTORA DE TESIS: M. en A. TERESA BENÍTEZ
ESCAMILLA

ASESORA DE TESIS: DRA. ALBERTA LOURDES
CASTILLO GRANADA

CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2019





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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo otorgado durante mis estudios de nivel medio superior y superior.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a todos sus académicos por el gran aporte brindado tanto en mi formación académica como profesional.

A la Mtra. Teresa Benítez Escamilla y a los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza por la posibilidad de la realización de este trabajo.

Al laboratorio de espectroscopía de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, y en especial a la Dra. A. Lourdes Castillo Granada por el apoyo en la obtención e interpretación de los espectros IR, cuya realización fue posible a través del Proyecto PAPIME PE206115.

Dedicatorias

A mis padres María Araceli Vázquez Mayorga y Javier Peralta Millán por todo su amor, esfuerzo, dedicación y apoyo que me han brindado a lo largo de este camino, por todas esas palabras de aliento y por motivarme a seguir adelante y superarme como profesional, pero sobre todo como persona. Las palabras sobran para decir lo agradecido que estoy con ustedes, así que, ¿qué más puedo decir? Los amo.

A mi hermana Karen por siempre ser una grata compañía y apoyo, por ser una muy buena hermana, y que, pese a no coincidir en todo momento, siempre saber que podemos contar el uno con el otro.

A todos mis amigos por todos esos buenos momentos a lo largo de estos cinco años, porque gracias a ustedes: Osmar, Oscar, Noé, Ulises, Laura, Tavo y un largo etcétera es que todos y cada uno de los días de nuestra estancia en esta institución fueron los más amenos y divertidos posibles. Siempre atesoraré nuestra amistad, y ojalá sigan perdurando a lo largo de los años.

Y un agradecimiento especial a mi amiga Joselyn Sánchez Róquez quien fue un gran apoyo y compañía a lo largo de prácticamente media carrera y durante la realización de esta tesis. Joselyn, siempre apreciaré todos estos años que hemos compartido juntos, y que pese a la distancia siempre fuiste un gran motivo para superarme a mí mismo y lograr mis objetivos. También te agradezco el siempre hacer mis días más divertidos y llenarme de felicidad.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	8
I. MARCO TEÓRICO	10
1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	10
1.1 Radiación infrarroja	11
1.2 Espectrometría de absorción	13
1.2.1 Momento dipolar	14
1.2.2 Vibraciones moleculares.....	15
1.3 Instrumentos para espectroscopía IR	17
1.3.1 Espectrómetros dispersivos.....	17
1.3.2 Fotómetros de filtro.....	18
1.3.3 Espectrómetro de transformada de Fourier	18
1.4 Fuentes de radiación en el infrarrojo.....	19
1.5 Detectores en infrarrojo.....	20
1.6 Manejo de la muestra	21
2. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	22
2.1 Clasificación de métodos analíticos	24
2.2 Validación de métodos analíticos.....	25
2.3 Características de desempeño	27
3. PARACETAMOL	33
3.1 Propiedades generales	34
3.2 Propiedades químicas	35
3.3 Propiedades físicas y químicas.....	37
3.4 Propiedades biológicas.....	38
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
III. HIPÓTESIS	43
IV. OBJETIVOS	44
V. MATERIAL Y MÉTODO	45
1. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA.....	45
2. MATERIAL	46
2.1 Materiales	46
2.2 Equipos e instrumentos.....	46
3. REACTIVOS	46

3.1	Muestras analíticas	46
3.2	Sustancias de referencia.....	47
3.3	Reactivos sólidos	47
3.4	Reactivos líquidos	47
3.5	Soluciones preparadas	47
4.	METODOLOGÍA	47
4.1	Pruebas de calidad de las tabletas	47
4.2	Desarrollo del método	55
4.3	Evaluación de los parámetros de desempeño	56
4.4	Evaluación como método indicativo de estabilidad	59
4.5	Evaluación costo-beneficio del método	60
VI.	RESULTADOS	61
1.	CONTROLES DE CALIDAD	61
2.	DESARROLLO DEL MÉTODO	62
3.	VALIDACIÓN	65
3.1	Especificidad.....	65
3.2	Linealidad del sistema	66
3.3	Precisión del sistema	68
3.4	Linealidad del método.....	69
3.5	Exactitud del método	72
3.6	Repetibilidad del método.....	73
3.7	Reproducibilidad del método.....	74
3.8	Límite de detección y límite de cuantificación	76
4.	MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDAD	77
5.	EVALUACIÓN COSTO-BENEFICIO	81
VII.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	82
VIII.	CONCLUSIONES.....	86
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	ANEXO 1. DOCE PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro electromagnético	12
Figura 2. Tipos de vibraciones moleculares	16
Figura 3. Interferómetro de Michelson	19
Figura 4. Ciclo de vida de un método analítico	24
Figura 5. Precursores del Paracetamol	33
Figura 6. Estructura química del Paracetamol	34
Figura 7. Mecanismo de reacción del Paracetamol en hidrólisis básica	36
Figura 8. Mecanismo de reacción del Paracetamol en hidrólisis ácida	37
Figura 9. Espectro infrarrojo del Paracetamol	38
Figura 10. Rutas metabólicas del Paracetamol	40
Figura 11. Diagrama de flujo de la metodología empleada	45
Figura 12. Espectro infrarrojo de la acetona	63
Figura 13. Espectro infrarrojo de la SRef de Paracetamol empleando celdas selladas con ventanas de KBr	65
Figura 14. Espectro infrarrojo de la muestra más la adición de estándar empleando celdas selladas con ventanas de KBr	65
Figura 15. Linealidad del sistema	66
Figura 16. Curva de la linealidad del sistema	67
Figura 17. Precisión del sistema	68
Figura 18. Linealidad del método (Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada)	69
Figura 19. Curva calibración de la linealidad del método	71
Figura 20. Exactitud del método	72
Figura 21. Espectro de infrarrojo de la hidrólisis ácida del paracetamol	77
Figura 22. Espectro de infrarrojo de la hidrólisis básica del paracetamol	77
Figura 23. Espectro de infrarrojo del paracetamol, paracetamol tras hidrólisis ácida y paracetamol tras hidrólisis básica	78
Figura 24. Hidrólisis del grupo amida	80
Figura 25. Oxidación del Paracetamol	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Regiones del espectro infrarrojo	12
Cuadro 2. Características de desempeño recomendadas para validar un método de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos	26
Cuadro 3. Resultados del control de calidad de tabletas de Paracetamol	61
Cuadro 4. Linealidad del sistema	66
Cuadro 5. Parámetros estadísticos de la linealidad del sistema	67
Cuadro 6. Resultados de la precisión del sistema	68
Cuadro 7. Parámetros estadísticos de la precisión del sistema	68
Cuadro 8. Resultados de la linealidad del método	69
Cuadro 9. Parámetros estadísticos de la linealidad del método (Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada)	70

Cuadro 10. Parámetros estadísticos de la linealidad del método (recobro)	70
Cuadro 11. Resultados de la exactitud del método	72
Cuadro 12. Parámetros estadísticos de la exactitud del método.....	72
Cuadro 13. Resultados de la repetibilidad del método	73
Cuadro 14. Parámetros estadísticos de la repetibilidad del método.....	73
Cuadro 15. Resultados de la precisión intermedia del método.....	74
Cuadro 16. Tabla de análisis de varianza de la precisión intermedia del método	75
Cuadro 17. Determinación del límite de detección y límite de cuantificación para una muestra de Paracetamol al 1%	76
Cuadro 18. Señales presentadas tras la degradación ácida y básica del Paracetamol	78
Cuadro 19. Evaluación del costo beneficio del método desarrollado	81

INTRODUCCIÓN

El término espectroscopia hace referencia a la observación y al estudio del espectro, y se basa en la interacción de la energía radiante con la materia. La espectroscopía es una técnica de análisis que se basa en la absorción de radiación por parte de las moléculas.

La espectroscopía infrarroja se basa en el hecho de que, los enlaces de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas. Esta vibración tiene un contenido energético de la misma magnitud que la radiación IR del espectro electromagnético. Cuando al enlace se hace incidir la radiación IR, este enlace absorbe sólo la que es de la misma energía, generando así una señal de absorción que se puede observar. Cuando absorbe la energía pasa a un estado vibracional de alta energía y después retorna a su estado basal.

Pese al hecho de ser una técnica analítica desarrollada en el siglo XIX, sigue siendo muy empleada en la actualidad debido a la gran mejora y disponibilidad de los instrumentos modernos, que permiten aplicaciones cualitativas como cuantitativas. En la actualidad, los instrumentos de transformadas de Fourier (FTIR) son los más utilizados debido a que muestran muy buena relación señal-ruido.

Una de las más importantes aplicaciones de la espectroscopía en el infrarrojo medio es el análisis de muestras orgánicas, ya sea únicamente analizando de forma cualitativa la presencia de los grupos funcionales de una molécula, o bien, arrojando datos cuantitativos. Esta aplicación cuantitativa permite a la espectroscopía infrarroja ser una técnica útil para el análisis de control de calidad en la industria farmacéutica.

El Paracetamol es uno de los principios activos de más alto consumo en el mundo, disponible en gran variedad de presentaciones, tales como soluciones orales, suspensiones, tabletas, entre otros. Es por este hecho que resulta necesario contar

con un método analítico que permita cuantificar el principio activo, ya sea para control de calidad, o como un método indicativo de estabilidad.

La cuantificación de Paracetamol se encuentra reportada en una gran variedad de métodos. Sin embargo, el método reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos está descrito por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la cual es una técnica que genera muchos contaminantes, principalmente disolventes, aunado al hecho de que en ocasiones no se cuenta con el equipo, siendo ese el caso en los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza, en los que se opta por realizar el análisis empleando espectroscopía ultravioleta, teniendo esta la desventaja de no poder ser empleada como un método indicativo de estabilidad.

Por tal motivo, se desarrolló y validó un método analítico alternativo al método farmacopeico para cuantificar Paracetamol en tabletas, empleando para ello espectroscopía en el infrarrojo-medio. Esta técnica presenta diversas ventajas de acuerdo con la Química Verde, entre las que se encuentra el menor gasto de insumos, un ahorro en el tiempo de trabajo pues los espectros se generan en tiempos cortos, lo cual representa un ahorro de energía, y una disminución en la generación de residuos.

I. MARCO TEÓRICO

1. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

El término espectroscopia hace referencia a la observación y al estudio del espectro, y se basa en la interacción de la energía radiante con la materia. La espectroscopía es una técnica de análisis que se fundamenta en absorción de radiación por parte de las moléculas. Aunque existen muchos tipos de espectroscopia, las más utilizadas en química orgánica se agrupan en seis categorías:¹

- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)
- Espectroscopía de infrarrojo
- Espectroscopia de ultravioleta
- Espectrometría de rayos X
- Espectrometría de plasma

La espectroscopía infrarroja (IR) se fundamenta en el hecho de que, los enlaces de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas. A partir de la energía emitida por las vibraciones de estos enlaces, se determina el o los elementos contenidos en las muestras.²

En la actualidad la espectroscopía infrarroja es una importante técnica analítica para la identificación de grupos funcionales, y cuyo descubrimiento data del año 1800, tras el descubrimiento de la radiación infrarroja por parte del astrónomo inglés William Herschel. Herschel colocó un termómetro de mercurio en el espectro obtenido por un prisma de cristal con el fin de medir el calor emitido por cada color. Descubrió que el calor era más fuerte al lado del rojo del espectro, observando que allí no había radiación. Esta es la primera experiencia que muestra que el calor puede transmitirse por una forma invisible de luz. Herschel denominó a esta radiación "rayos calóricos", denominación bastante popular a lo largo del siglo XIX que, finalmente, fue dando paso al más moderno de radiación infrarroja.¹

Sin embargo, la espectroscopía infrarroja como una rama científica necesitó de varios aportes científicos como la Ley de Lambert-Beer y el desarrollo de instrumentos capaces de medir y procesar los datos. El primer espectro de vibraciones moleculares fue observado en 1881 por Abney y Festing, quienes prepararon emulsiones fotográficas sensibles al infrarrojo cercano y fotografiaron el espectro de absorción de 48 líquidos orgánicos.

Dicha técnica involucra la interacción existente entre la radiación infrarroja (IR) con la materia, y está basada en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales vibran y rotan. Dichas vibraciones tienen un contenido energético de la misma magnitud que la radiación infrarroja que se le incide, lo que permite que el enlace absorba radiación de la misma energía y genere una señal de absorbancia.

Debido a que, salvo por algunas excepciones, las moléculas absorben radiación infrarroja, esta técnica se ha convertido en una excelente herramienta para identificar compuestos orgánicos e inorgánicos. Esto, a su vez, mediado por el hecho de que cada compuesto presenta un espectro infrarrojo característico.^{3, 4, 5}

1.1 Radiación infrarroja

El infrarrojo (IR) es una forma de radiación electromagnética que obedece las mismas leyes que la luz visible, ultravioleta, ondas de radio y rayos X.

La región infrarroja del espectro electromagnético (Figura 1) comprende la radiación con número de onda de entre $12,500$ y 10 cm^{-1} o longitudes de onda 0.7 a $1000\text{ }\mu\text{m}$.^{4, 6, 7}

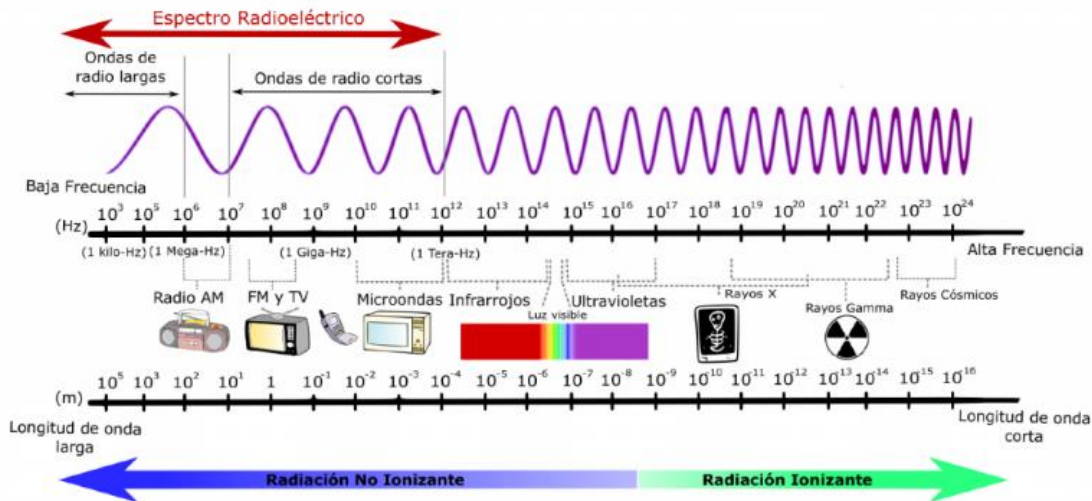


Figura 1. Espectro electromagnético⁵

Desde el punto de vista de las aplicaciones, como de los instrumentos empleados, el espectro infrarrojo se divide en tres regiones: Infrarrojo cercano, infrarrojo medio e infrarrojo lejano (Cuadro 1).

Cuadro 1. Regiones del espectro infrarrojo.⁷

Región	Número de onda (cm ⁻¹)	Longitud de onda (μm)	Frecuencia (Hz)
IR cercano	12500 - 4000	0.78 - 2.5	3.8x10 ¹⁴ – 1.2x10 ¹⁴
IR medio	4000 - 200	2.5 - 50	1.2x10 ¹⁴ – 6.0x10 ¹²
IR lejano	200 – 10	50 - 1000	6.0x10 ¹² – 3.0x10 ¹¹

✓ Infrarrojo cercano

Las determinaciones en el infrarrojo cercano suelen realizarse empleando espectrofotómetros muy similares a los utilizados en espectrofotometría UV. Las aplicaciones más importantes en esta región son principalmente de análisis cuantitativo de materiales industriales y agrícolas. Es ampliamente utilizada en la determinación de proteínas, almidón, lípidos y celulosa.⁴

✓ Infrarrojo medio

En un principio, los instrumentos empleados para la región del infrarrojo medio eran en su mayoría de tipo dispersivo, y se usaban principalmente para el análisis orgánico cualitativo y la determinación estructural con base en el espectro de absorción. Sin embargo, el surgimiento de los espectrofotómetros por transformadas de Fourier abrió la puerta al análisis cuantitativo de muestras complejas por medio de espectrometría de absorción.^{4, 8}

La espectroscopia en el IR-medio es una técnica analítica que proporciona información cualitativa y cuantitativa. Tiene aplicaciones en las ramas ambientales, biológicas, médicas, de industria textil, farmacéutica, etc.⁹

Las aplicaciones de esta técnica en el ámbito farmacéutico pueden ser: Monitoreo de materias primas y medicamentos, obtención de un fármaco o en la formulación, identificación de moléculas orgánicas por comparación con una referencia, homogeneidad de mezclas, polimorfismo, co-cristales, ensayo de contenido, entre otras.^{10, 11}

✓ Infrarrojo lejano

Las aplicaciones están enfocadas en el estudio de compuestos inorgánicos. Existen pocas fuentes que generen este tipo de radiación, y además dichas emisiones son atenuadas por la necesidad de emplear filtros que seleccionen órdenes espectrales, a fin de evitar que radiaciones de mayor energía lleguen al detector.⁴

1.2 Espectrometría de absorción

Los espectros de absorción, transmisión y reflexión pueden ser explicados si se asume que todos son resultado de diversos cambios energéticos producidos por transiciones de las moléculas en unos de sus estados energéticos vibracionales y rotacionales.^{4, 7}

El espectro IR se muestra como una serie de señales características producto de la absorción de la radiación infrarroja. En dicho espectro, el eje “y” viene expresado en unidades de transmitancia para análisis cualitativo, y en unidades de absorbancia para análisis cuantitativo. Suele existir cierta preferencia por la escala lineal empleando número de onda como abscisa; dicha preferencia lineal en espectroscopía infrarroja se debe a la proporcionalidad directa que existe entre esta magnitud y la frecuencia (ν). Sin embargo, rara vez se emplea la frecuencia como abscisa debido al gran tamaño de las unidades. Por lo tanto, es más común ver expresadas las unidades como número de onda, o bien, como longitud de onda. Existe una relación inversa entre la longitud de onda y el número de onda, expresada por la Ecuación 1:

$$\bar{\nu}(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\mu\text{m})} \times 10^4 (\mu\text{m}/\text{cm}) = \frac{\nu(\text{Hz})}{c(\text{cm}/\text{s})}$$

Ecuación 1

Donde:

$\bar{\nu}$ =Número de onda (cm^{-1})

λ =Longitud de onda (μm)

ν =Frecuencia (Hz)

c =(cm/s)

1.2.1 Momento dipolar

La radiación infrarroja, a diferencia de la radiación ultravioleta y visible, no tiene la suficiente energía para producir la misma clase de transiciones electrónicas. Por lo cual, la absorción de la radiación infrarroja se limita a moléculas en las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre sus distintos estados vibracionales y rotacionales.

Para que exista absorción de radiación infrarroja, una molécula debe experimentar un cambio neto en su momento dipolar. El momento dipolar está determinado por

la diferencia en la magnitud de la carga y la distancia existente entre los dos centros de carga.

En el caso, por ejemplo, de moléculas homonucleares como el O₂, N₂ y Cl₂ en donde no existe una diferencia de carga (al tratarse de moléculas no polares), no se genera un cambio en el momento dipolar, y por consiguiente, estas especies no absorben radiación infrarroja.^{4, 5}

1.2.2 Vibraciones moleculares

Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no son fijas, sino que varían constantemente como consecuencia de las vibraciones y rotaciones que ocurren en los enlaces de la molécula.

Para el caso de moléculas diatómicas y triatómicas es posible determinar el número y la naturaleza de las vibraciones y rotaciones presentes. Sin embargo, para moléculas más complejas es virtualmente imposible realizar esto debido al número de centros de vibración.^{4, 7}

El tipo de vibración suele clasificarse en dos tipos: De estiramiento y de flexión. En las vibraciones de estiramiento (stretching) existe un cambio continuo en la distancia entre los átomos, sin alterar el ángulo de enlace; en las vibraciones de flexión (bending) ocurre un cambio en el ángulo de enlace.

✓ Vibraciones de estiramiento

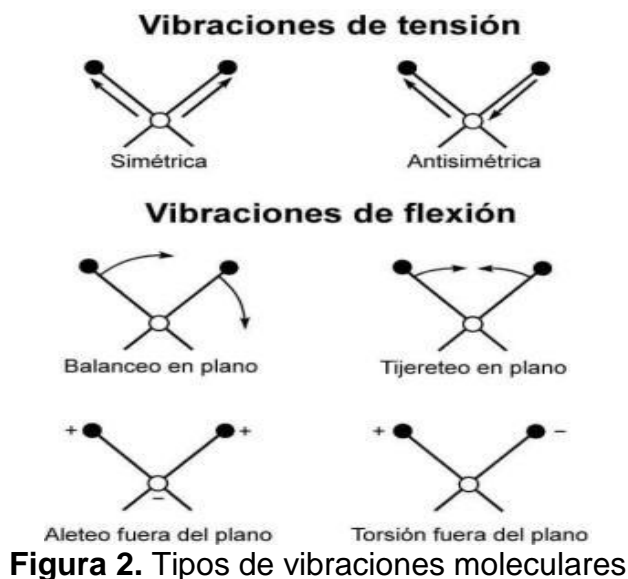
La vibración de estiramiento se puede representar por medio de un modelo mecánico con dos masas unidas por un resorte. La perturbación en una de estas masas genera una vibración a lo largo del eje denominado *movimiento armónico simple*.

Este movimiento sigue la Ley de Hooke, que nos dice que la fuerza restauradora F del resorte, es proporcional al desplazamiento ocurrido en el resorte. Por lo tanto, la fuerza tiende a regresar la masa a su posición original.

Las vibraciones de estiramiento pueden ser de tipo simétrico y asimétrico. Para el caso del estiramiento de tipo simétrico, debe ser considerada la geometría de los enlaces. Por ejemplo, una molécula de tipo lineal como el dióxido de carbono puede presentar estiramiento simétrico y asimétrico, sin embargo, el estiramiento simétrico no produce un cambio en el momento dipolar, por lo que es inactivo en el infrarrojo. Por otra parte, una molécula no lineal que presente vibración de estiramiento simétrico sí será activa al infrarrojo por existir un cambio en su momento dipolar.⁴

✓ Vibraciones de flexión

Las vibraciones de flexión dan lugar a cambios en el ángulo de enlace en las moléculas. Existen cuatro tipos, dos de las cuales ocurren en el mismo plano (balanceo y tijereteo), y otras dos que ocurren fuera del plano (aleteo y torsión). Estas se presentan en la Figura 2:



El número de vibraciones puede ser calculado en moléculas sencillas, diatómicas y triatómicas. Para ello es necesario considerar que son necesarios 3 planos para localizar N puntos o átomos. Cada punto tiene un grado de libertad, por ese motivo, se dice que una molécula tiene 3N grados de libertad.

El movimiento de una molécula está definido por tres tipos diferentes de movimientos: 1) El movimiento de la molécula en el espacio, es decir, el movimiento de traslación; 2) El movimiento de rotación de la molécula sobre su centro de gravedad; 3) El movimiento de cada átomo respecto a los otros átomos. Esto nos deja con tres grados de libertad adicionales necesarios para describir el movimiento. Por lo tanto, el número de vibraciones es calculado por medio de la ecuación $3N - 6$. En el caso de moléculas lineales donde no es necesario considerar el movimiento alrededor del eje de enlace, la ecuación cambia a $3N - 5$. Donde N es el número de átomos de la molécula.⁴

1.3 Instrumentos para espectroscopía IR

Existen tres tipos de instrumentos para la medición de la absorción en el infrarrojo: 1) espectrofotómetros dispersivos; 2) fotómetros de filtro, y 3) espectrómetros de transformada de Fourier (FTIR). Los instrumentos de transformada de Fourier y los fotómetros de filtro son no dispersivos, pues no utilizan una rejilla o prisma para dispersar la radiación.

En los años ochenta, los espectrómetros dispersivos eran los más empleados para las determinaciones en el infrarrojo, pero en la actualidad, estos instrumentos han sido desplazados por los espectrómetros de transformada de Fourier para las mediciones en el infrarrojo medio y lejano.^{4, 5}

1.3.1 Espectrómetros dispersivos

Los espectrómetros dispersivos son muy similares en cuanto a diseño a los espectrofotómetros de doble haz empleados para espectroscopía UV-visible. La diferencia recae en el hecho de que, en los espectrofotómetros de doble haz, el compartimento de la celda se encuentra entre el monocromador y el detector a fin de evitar la descomposición fotoquímica que podría, ocurrir en el caso de someter la muestra a la energía total de una fuente de radiación ultravioleta o visible. En el caso de los espectrómetros dispersivos en IR, la radiación infrarroja no es lo suficientemente energética para provocar fotodegradación, con lo que es posible

colocar el recipiente de la celda entre la fuente de radiación y el monocromador. Esto además conlleva algunas ventajas, pues el monocromador elimina gran parte de la radiación dispersa que se genera en el compartimiento de la celda. Estos instrumentos actualmente no se fabrican.^{4, 5}

1.3.2 Fotómetros de filtro

Los fotómetros de filtro son instrumentos no dispersivos que están equipados con un filtro o un gas absorbente, y suele ser usado para analizar la concentración de contaminantes atmosféricos como el monóxido de carbono, nitrobenzono, cloruro de vinilo y piridina.⁵

1.3.3 Espectrómetro de transformada de Fourier

Los espectrómetros de infrarrojo con transformada de Fourier no contienen elementos dispersivos, además de que ofrecen ventajas en cuanto sensibilidad, resolución y rapidez.

Estos detectan y miden todas las longitudes de onda simultáneamente por medio de un interferómetro de Michelson. La separación se lleva a cabo modulando la señal de la fuente y haciéndola pasar por la muestra a fin de generar un interferograma, que posteriormente es decodificado utilizando la transformada de Fourier que ejecuta el computador.

El interferómetro de Michelson (Figura 3) consta de tres componentes principales: Un espejo móvil, un espejo fijo, y un divisor de haz. El divisor de haz es un dispositivo semi-reflectante, a menudo hecho depositando una película delgada de germanio sobre un sustrato plano de KBr. Al incidir la fuente de IR en el divisor de haz, la mitad de la radiación se dirige al espejo fijo, mientras que la otra mitad se desplaza al espejo móvil. Después de la reflexión por los espejos, ambos haces espacialmente coherentes se recombinan en el divisor del haz y, debido a los cambios en la posición relativa del espejo móvil, se genera un patrón de interferencia. El haz resultante luego interactúa con la muestra dando como resultado la absorción, y finalmente se enfoca en el detector. El interferograma

obtenido es una suma compleja de las ondas sinusoidales superpuestas a las que responde el detector, correspondiendo cada onda a una única frecuencia. Para obtener interferogramas satisfactorios, es necesario que la velocidad del espejo móvil sea constante y su posición se conozca con exactitud. También debe permanecer constante el plano del espejo a lo largo de todo el recorrido.^{4, 5, 7, 12, 13}

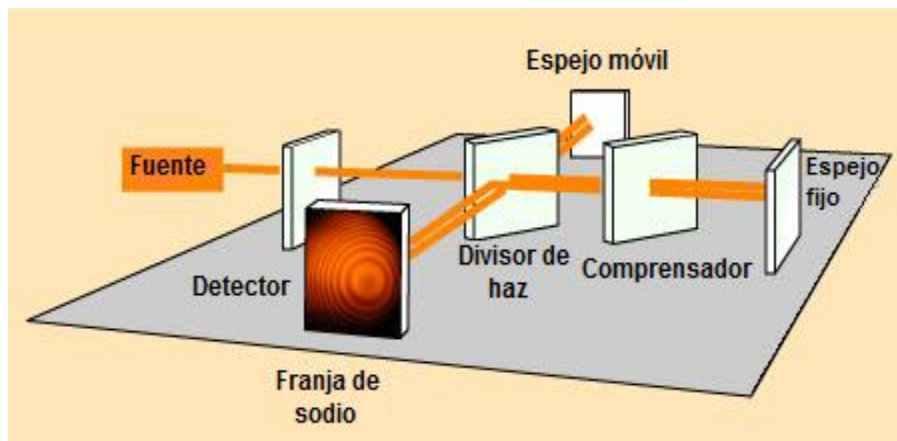


Figura 3. Interferómetro de Michelson⁴

1.4 Fuentes de radiación en el infrarrojo

Las fuentes de radiación infrarroja consisten en un sólido inerte que se calienta eléctricamente a una temperatura de entre 1500 y 2200 K. A esta temperatura, la máxima intensidad radiante se produce entre 5000 y 5900 cm^{-1} .

Entre las principales fuentes de radiación infrarroja se encuentran:

a) Emisor de Nernst

Está constituido por óxidos de zirconio o litio conformadas en un cilindro de 1 a 3 mm. En los extremos del cilindro hay terminales de platino selladas que permiten la conexión eléctrica. Con este dispositivo se alcanzan temperaturas de entre 1200 y 2200 K. Debido a que el coeficiente térmico del emisor de Nernst es muy negativo, debe calentarse externamente hasta un color rojo pálido. También debe ser protegido y diseñado para evitar el sobrecalentamiento, pues de no ser así, la lámpara se destruiría.⁴

b) Fuente global

Una fuente global es una varilla de carburo de silicio generalmente de 5 cm de longitud y 5 mm de diámetro. Esta alcanza una temperatura de entre 1300 a 1500 K al ser calentada eléctricamente. Los electrodos necesitan un enfriamiento auxiliar con agua para evitar la formación de un arco. Las energías espectrales son muy similares a las proporcionadas al emisor de Nernst, excepto en la región inferior a 5 μm , donde la fuente global proporciona una señal mayor.⁴

c) Arco de mercurio

Es una fuente de radiación infrarroja para la región del IR lejano. Consiste en un tubo revestido con cuarzo que contiene vapor de mercurio a alta presión, el cual genera una fuente de plasma interno al someterse al paso de la electricidad.⁴

d) Fuente láser de dióxido de carbono

Se utiliza en el control de la concentración de ciertos contaminantes atmosféricos, y para determinar absorbentes en soluciones acuosas. Dicha fuente produce radiación en el intervalo de 900 a 1100 cm^{-1} (IR mediano).

e) Tira de nicromo o filamento incandescente

Se trata de una fuente de intensidad algo menor, pero de vida más larga que la fuente global o el emisor de Nernst. Consiste en una espiral muy apretada de alambre de nicromo que se calienta por el paso de una corriente eléctrica a casi 1100 K. Las fuentes con filamento de nicromo poseen menor intensidad que muchas fuentes IR, no obstante, la fuente de filamento incandescente no necesita enfriarse y casi no requiere mantenimiento.

1.5 Detectores en infrarrojo

Los transductores en infrarrojo son de tres tipos: 1) transductores piroeléctricos, 2) transductores fotoconductores, y 3) transductores térmicos.

a) Transductores piroeléctricos

Los transductores piroeléctricos se constituyen con lámparas cristalinas de materiales piroeléctricos, que son a su vez aislantes (dieléctricos). El material piroeléctrico más importante es el sulfato de triglicina deuterado (DTGS). Cuando se aplica un campo eléctrico a un material dieléctrico ocurre una polarización, pero dicha polarización desaparece cuando se retira el campo eléctrico. Los materiales piroeléctricos tienen la característica que conservan dicha polarización en función de la temperatura. Así, si se coloca un transductor piroeléctrico, esta polarización se codifica como una corriente eléctrica.^{4, 12}

b) Transductores fotoconductores

Constan de una delgada capa de material semiconductor, como sulfuro de plomo, telururo de cadmio-telururo de mercurio o antimonio de indio, depositada sobre una superficie de vidrio no conductora sellada, y colocada en una cámara de vacío. Los fotoconductores de sulfuro de plomo son empleados en la región del IR cercano, mientras que los de telururo de cadmio-telururo de mercurio se utilizan en IR medio y lejano. Estos detectores deben ser enfriados con nitrógeno líquido a fin de reducir el ruido térmico.^{4, 12}

c) Transductores térmicos

Este tipo de transductores eran empleados en los espectrómetros dispersivos, y su respuesta dependía del efecto calorífico. En estos dispositivos, un pequeño cuerpo negro absorbe la radiación y se mide la temperatura resultante. Tiene la desventaja de que puede existir ruido térmico que complica la medición de la radiación infrarroja.⁴

1.6 Manejo de la muestra

En espectroscopía infrarroja la manipulación de la muestra es considerada uno de los parámetros críticos debido a que no existen disolventes que sean transparentes

en toda la región espectral de infrarrojo. La preparación de la muestra está en función del tipo de muestra del que se trate, ya sea un sólido, un líquido o un gas.

Siempre que sea posible, la muestra debe ser preparada de tal manera que se obtenga una solución de concentración conocida. Sin embargo, no existen buenos disolventes que se adecúen a todo el espectro infrarrojo. Tampoco el agua o los alcoholes son muy usados en espectroscopía IR debido a que generan señales, por lo que la elección del disolvente es muy importante. Para este tipo de muestras se emplean celdas, cuyo espesor es menor al de una celda empleada para ultravioleta-visible, y se necesitan concentraciones altas porque la trayectoria es corta y la absorptividad molar es baja.

Las muestras líquidas suelen ser analizadas directamente colocando una gota del líquido puro entre dos placas de NaCl.

Finalmente, para las muestras sólidas la forma más común de manejar la muestra es por medio de pastillas. Las principales son las de KBr, sin embargo, se han utilizado otros haluros de metales alcalinos. Con este método, se mezcla aproximadamente 25 mg del sólido pulverizado con aproximadamente 100 mg de bromuro de potasio grado espectro.

Los sólidos insolubles en un disolvente transparente al infrarrojo o que no se presentan como pastilla, se dispersan en un aceite mineral, siendo los más comunes el Nujol y el fluorolube.⁴

2. MÉTODOS ANALÍTICOS

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Es una secuencia lógica de operaciones, descrita genéricamente, utilizada en el desarrollo de las mediciones.^{14, 15}

Se desarrolla un procedimiento analítico para probar una característica definida de la sustancia contra los criterios de aceptación establecidos para esa característica. En el desarrollo de un nuevo procedimiento analítico, la elección de la instrumentación analítica y la metodología deben basarse en el propósito previsto y el alcance del método analítico.¹⁶

La medición de una determinada magnitud en una muestra de interés farmacéutico tiene que ver con la necesidad de demostrar que dicha muestra cumple con alguna de las características de calidad del producto. Dicha determinación, ya sea cualitativa o cuantitativa será fundamento para la aceptación o no de la calidad del producto.¹⁷

Los pasos comunes seguidos en el desarrollo del método son los siguientes:

1. Caracterización del analito de referencia
2. Requisitos del método
3. Búsqueda de literatura
4. Seleccionando el método
5. Montaje instrumental y estudios preliminares
6. Optimización de los parámetros
7. Documentación de la figura analítica
8. Evaluación del desarrollo del método con la muestra
9. Determinación del porcentaje de recuperación de la muestra
10. Demostración del análisis cuantitativo de la muestra

La capacidad de proporcionar datos precisos, confiables y consistentes es el motivo del químico analítico. Los procedimientos de desarrollo de métodos son complejos, extendidos y costosos. Un método analítico detalla los pasos y las técnicas necesarias para realizar un análisis. Esto puede incluir: preparación de muestras, estándares y reactivos; uso de aparatos; generación de la curva de calibración, uso de las fórmulas para el cálculo, etc.¹⁶

El ciclo de vida de un método analítico se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Ciclo de vida de un método analítico¹⁶

Tras la validación, del método analítico, se ha demostrado que dicho método sirve para lo que fue diseñado, y dicho método puede ser empleado en cualquier laboratorio. Esto implica la transferencia de conocimiento de cómo operar el método a quienes lo usarán rutinariamente, y la documentación de que ambas partes obtienen resultados similares.^{16, 18}

2.1 Clasificación de métodos analíticos

En la FEUM se establece una clasificación de los métodos analíticos para fines de validación, en la que estos se dividen en cuatro categorías:¹⁹

- 1) Categoría I: Métodos analíticos para cuantificar a un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, u otros analitos de interés.
- 2) Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos.

- 3) Categoría III: Métodos analíticos utilizados en la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico.
- 4) Categoría IV: Prueba de identificación de un analito en muestras de fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos.

Por otro lado, en la Guía Q2 de la ICH, los métodos analíticos son clasificados de la siguiente manera:²⁰

- 1) Ensayo de identidad
- 2) Prueba de impurezas
- 3) Métodos de valoración

Independientemente de la fuente de clasificación de los métodos, es necesario hacer notar que para la validación del método analítico se debe conocer de inicio el objetivo del mismo, pues no se va a requerir demostrar las mismas propiedades de un método que se empleará para determinar la presencia de un analito en la muestra, que para un método donde se cuantificará este analito.^{21, 22}

2.2 Validación de métodos analíticos

En el ámbito farmacéutico existen una gran diversidad de analitos que se pueden encontrar en una muestra, ya sean fármacos o compuestos de interés. Es muy claro que, sin importar la naturaleza del analito, se debe considerar que el método que se está empleando sea capaz de medir lo que se quiere medir, en la cantidad que realmente se encuentra, y que además este método proporcione resultados consistentes cada que se utilice.

Para ello, es indispensable contar con una herramienta que dé la certeza de que estos tres aspectos sean cumplidos. Dicha herramienta es la validación de métodos analíticos.

De acuerdo con el Código de Regulaciones Federales (CFR) de los Estados Unidos, la validación es la confirmación a través de la provisión y examen de la evidencia objetiva de que los requerimientos particulares para un uso específico que se intenta pueden ser cubiertos en su totalidad.²³

Por otro lado, el Centro Nacional de Metrología define a la validación como la confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.¹⁵

Dentro de la validación existen una serie de parámetros que deben ser evaluados, y que dependerá del tipo de método analítico que se esté realizando. En el Cuadro 2 se presentan las características de desempeño evaluadas para cada tipo de método:

Cuadro 2. Características de desempeño recomendadas para validar un método de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos¹⁹

Característica de desempeño	Categoría I	Categoría II (cuantitativa)	Categoría II (Cualitativa)	Categoría III	Categoría IV
Verificación del sistema	*	*	*	*	X
Precisión del sistema	✓	✓	*	*	X
Linealidad del sistema	✓	✓	*	*	X
Especificidad	✓	✓	✓	*	✓
Exactitud del método	✓	✓	*	*	X
Linealidad del método	✓	✓	*	*	X
Precisión del método	✓	✓	X	✓	X
Límite de detección	X	X	✓	*	X
Límite de cuantificación	X	✓	X	*	X
Tolerancia	*	*	*	*	*
Robustez	*	*	*	*	*

*Puede ser necesario evaluar

2.3 Características de desempeño

a) Precisión del sistema

Definición: La precisión del sistema es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida.^{19, 24}

Criterios de aceptación:¹⁴

$CV \leq 1.5\%$	Métodos físico-químicos
$CV \leq 3\%$	Métodos biológicos

b) Linealidad del sistema

Definición: La linealidad del sistema es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito (puede ser una sustancia de referencia) se ajustan al modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica.^{19, 24}

Criterios de aceptación:¹⁴

$$r^2 \geq 0.98$$

IC(β_1), no debe incluir el cero

c) Especificidad

Definición: La especificidad/selectividad, es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes (especificidad) o que se pudieran presentar por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como: impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra.¹⁹

Criterios de aceptación:¹⁴

La respuesta del método solo se deberá al analito.

d) Exactitud del método

Definición: La exactitud de un método analítico, es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra, a una cantidad fija.^{19, 24}

Criterios de aceptación:¹⁴

IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

98-102%	Método cromatográfico
98-102%	Método volumétrico
97-103%	Método químico o espectrofotométrico
95-105%	Método microbiológico

CV del porcentaje de recobro:

No mayor de 2%	Método cromatográfico
No mayor de 2%	Método volumétrico
No mayor de 3%	Método químico o espectrofotométrico
No mayor de 5%	Método biológico

e) Linealidad del método

Definición: Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito (sin sesgo) dentro de un intervalo dado.^{19, 24}

Criterios de aceptación:¹⁴

1) Cantidad adicionada vs cantidad recuperada:

$$r^2 > 0.98$$

El IC(β_1) debe incluir la unidad

El IC(β_0) debe incluir el cero

El CV_{y/x} del porcentaje de recobro:

No mayor del 2%	Método cromatográfico
No mayor del 2%	Método volumétrico
No mayor del 3%	Método químico o espectrofotométrico
No mayor del 5%	Método microbiológico

No mayor a una magnitud preestablecida acorde a la especificación del analito en la muestra.

2) Porcentaje de recobro:

El IC(μ) debe incluir el 100% o el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

98-102%	Método cromatográfico
98-102%	Método volumétrico
97-103%	Método químico o espectrofotométrico
95-105%	Método microbiológico

CV del porcentaje de recobro:

No mayor del 2%	Método cromatográfico
No mayor del 2%	Método volumétrico
No mayor del 3%	Método químico o espectrofotométrico
No mayor del 5%	Método microbiológico

f) Precisión del método (repetibilidad)

Definición: La precisión de un método analítico 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. La precisión de un método analítico generalmente se expresa como la desviación estándar o como el coeficiente de variación (desviación estándar relativa).

Repetibilidad. La repetibilidad 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 porque mide la variación del método analítico en la rutina de trabajo.^{19, 24}

Criterios de aceptación:¹⁴

IC(μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo:

98-102%	Método cromatográfico
98-102%	Método volumétrico
97-103%	Método químico o espectrofotométrico
95-105%	Método microbiológico

CV del porcentaje de recobro:

No mayor del 2%	Método cromatográfico
No mayor del 2%	Método volumétrico
No mayor del 3%	Método químico o espectrofotométrico
No mayor del 5%	Método microbiológico

g) Precisión intermedia

Definición: La precisión intermedia expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas (condiciones de precisión intermedia).¹⁹

Criterios de aceptación:¹⁴

No mayor del 2%	Método cromatográfico
No mayor del 2%	Método volumétrico
No mayor del 3%	Método químico o espectrofotométrico
No mayor del 5%	Método microbiológico

Los resultados pueden ser analizados utilizando otros métodos estadísticos apropiados que permitan sustentar que la precisión del método es aceptable. Puede ser utilizado un modelo estadístico lineal de diseño experimental ya que es de utilidad cuando se quiere determinar el grado de tolerancia del método a fuentes de variación como estimar la variabilidad entre analistas o entre días.

h) Límite de detección

Definición: El límite de detección (LD) es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de aplicación del método. Así las pruebas límite solamente indican que la cantidad del analito es superior o inferior a la concentración establecida. El límite de detección se expresa generalmente como la concentración indicada en el método analítico (por ejemplo, porcentaje, ppm. partes por billón, mg/g, etc.).^{19, 24}

i) Límite de cuantificación

Definición: El límite de cuantificación (LC) es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable, bajo las

condiciones de aplicación del método. Las unidades del límite se expresan como se indica en el método analítico (por ejemplo, porcentaje, ppm, partes por billón, mg/g, etc.).^{19, 24}

j) Tolerancia

Definición: La tolerancia es el grado de reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo una variedad de condiciones tales como: diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, lotes de reactivos, días, etc.^{19, 24}

Criterios de aceptación:¹⁴

$CV \leq 2\%$	Método cromatográfico
$CV \leq 2\%$	Método volumétrico
$CV \leq 3\%$	Método químico o espectrofotométrico
$CV \leq 5\%$	Método microbiológico

k) Robustez

Definición: Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en las características normales de operación del método.^{19, 24}

Criterios de aceptación:¹⁴

$ d_i \leq 2\%$	Método cromatográfico
$ d_i \leq 2\%$	Método volumétrico
$ d_i \leq 3\%$	Método químico o espectrofotométrico
$ d_i \leq 5\%$	Método microbiológico

3. PARACETAMOL

El Acetaminofén o Paracetamol es el metabolito activo de la Fenacetina, un analgésico derivado de la anilina. El Paracetamol es un medicamento eficaz que puede sustituir al ácido acetilsalicílico como analgésico y antipirético, sin embargo, no posee gran actividad antiinflamatoria. Además, no genera muchos de los efectos colaterales propios del ácido acetilsalicílico. Pese a estas ventajas, la sobredosis aguda genera daño hepático mortal.²⁵

Las propiedades analgésicas y antipiréticas del Paracetamol fueron descubiertas en el siglo XIX cuando se buscaban sustancias alternativas para combatir la fiebre. El compuesto original del que se derivaron todas estas sustancias fue la Acetanilida (Figura 5), introducida en 1886. Sin embargo, esta sustancia era demasiado tóxica, por lo que se tuvieron que buscar otras alternativas como el p-aminofenol. Sin embargo, este tampoco disminuyó la toxicidad. No fue sino hasta 1887 cuando se introdujo satisfactoriamente la Fenacetina.²⁵

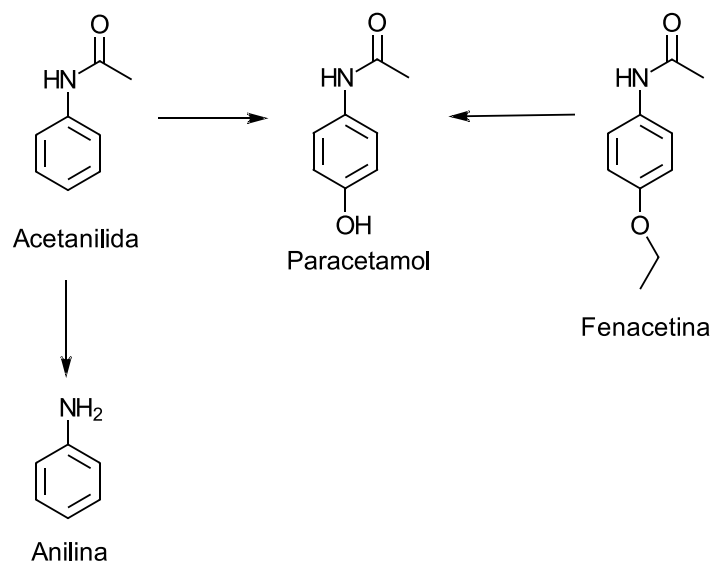


Figura 5. Precursores del Paracetamol

El Paracetamol fue sintetizado en 1878 por Morse y usado en la clínica como analgésico por Von Mering en 1887. Para esta época, el medicamento empleado

era la Fenacetina. Fenacetina y Paracetamol proceden del mismo origen y tienen propiedades clínicas analgésicas semejantes. Sin embargo, la Fenacetina fue abandonada y eliminada por los serios problemas renales que producía.

Posteriormente con los estudios de Brodie y Axelrod permitieron el redescubrimiento del Paracetamol, al comprobarse que se trataba del metabolito activo de la acetanilida y fenacetina, llevándolo finalmente a ser comercializado en 1950 en los Estados Unidos de América, como un analgésico no esteroideo, no opioide, para reemplazar la toxicidad de la fenacetina. El Paracetamol es un medicamento con más de 129 años de uso clínico, ha sido capaz de aliviar cientos de cuadros febriles y síndromes dolorosos en prácticamente todo el mundo.^{25, 26}

Para 1970 el Paracetamol llegó a ser el analgésico más popular en todo el mundo, recetado por la comunidad médica y autoadministrado por el público en general para el alivio del dolor y la fiebre. Actualmente, el Paracetamol es uno de los medicamentos más usados en todo el mundo, con ventas sin receta que superan los 25 mil millones de dosis por año, sólo en los Estados Unidos de América.^{27, 28, 29}

3.1 Propiedades generales^{30, 31, 32}

- Sinónimos: Acetaminofén, N-acetil-p-aminofenol, 4-hidroxiacetanilida, N-(4-hidroxifenil) acetamida, p-acetilaminofenol, Tylenol.
- Fórmula condensada: C₈H₉NO₂
- Fórmula desarrollada

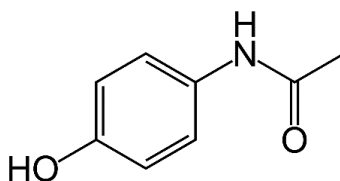


Figura 6. Estructura química del Paracetamol

- Peso molecular: 151.16 g/mol
- Descripción: El Paracetamol se presenta como polvo cristalino o cristales de color blanco.

3.2 Propiedades químicas^{30, 33}

- Grupos funcionales que reaccionan: El Paracetamol presenta en su estructura dos grupos funcionales básicos, el hidroxilo de fenol y la amida. El grupo amida da la característica al Paracetamol de efectuar reacciones de hidrólisis, la cual puede ser catalizada por un ácido o una base.
- Ruta de degradación: Debido al grupo amida presente en la estructura del Paracetamol, esta molécula sufre hidrólisis, generando como principal producto de degradación al p-aminofenol y ácido acético.

Para la mayoría de los productos farmacéuticos, el medicamento entra en contacto con el agua. Incluso en formas de dosificación sólidas, la humedad suele estar presente, aunque en cantidades bajas. En consecuencia, la hidrólisis es una de las reacciones más comunes observadas con productos farmacéuticos. Muchos investigadores han informado ampliamente sobre la hidrólisis de sustancias farmacológicas. De hecho, el término más apropiado es solvólisis, ya que la descomposición puede llevarse a cabo en sistemas solventes no acuosos.

La hidrólisis es a menudo la principal vía de degradación para las sustancias farmacológicas que tienen grupos funcionales éster y amida dentro de su estructura. Sin embargo, un sinnúmero de compuestos es susceptibles de presentar degradación por hidrólisis, entre los que se encuentran los azúcares, lactatos, nitrilos, sales de ácidos débiles, etc.^{34, 35}

Los enlaces amida se encuentran comúnmente en las moléculas de fármacos. Los enlaces amida son menos susceptibles a la hidrólisis que los enlaces éster porque el carbono carbonilo del enlace amida es menos electrofílico, y el grupo saliente,

una amina, es un grupo saliente más pobre. Algunos ejemplos de fármacos que presentan un grupo amida en su estructura son el Paracetamol, el cloranfenicol, la lincomicina, la indometacina y la sulfacetamida, todos los cuales se sabe que producen una amina y un ácido a través de la hidrólisis de su grupo amida.³⁵

El Paracetamol contiene un grupo amida, que por hidrólisis básica en una solución de hidróxido de sodio, produce una sal de carboxilato más p-amino fenol, bajo el siguiente mecanismo (Figura 7):³⁶

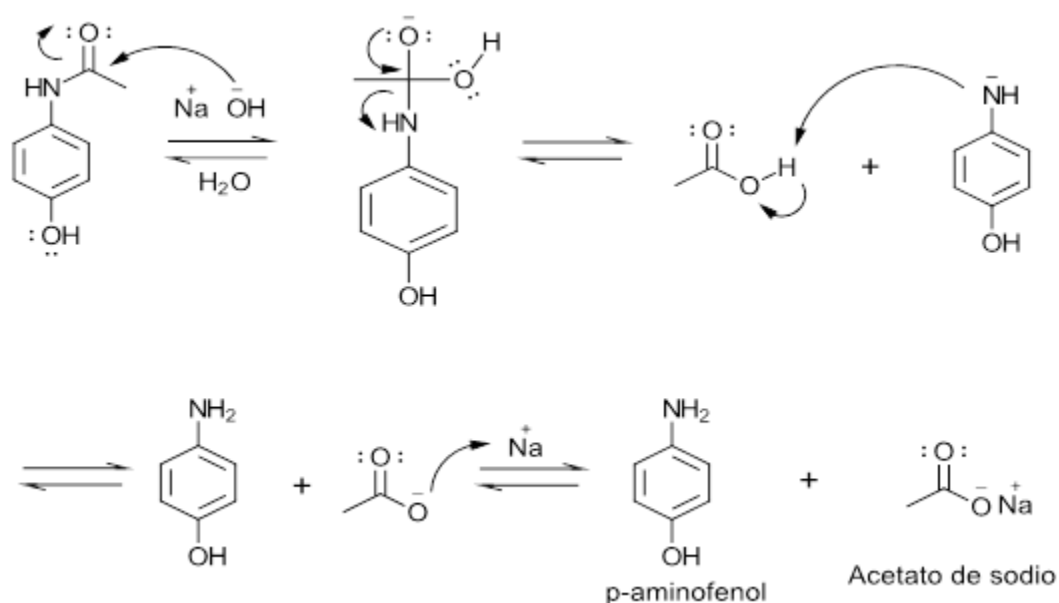


Figura 7. Mecanismo de reacción del Paracetamol en hidrólisis básica³⁶

Así mismo, se tiene que al someter al Paracetamol a hidrólisis ácida se obtiene un ácido carboxílico más p-amino fenol, siguiendo el mecanismo descrito a continuación (Figura 8):³⁶

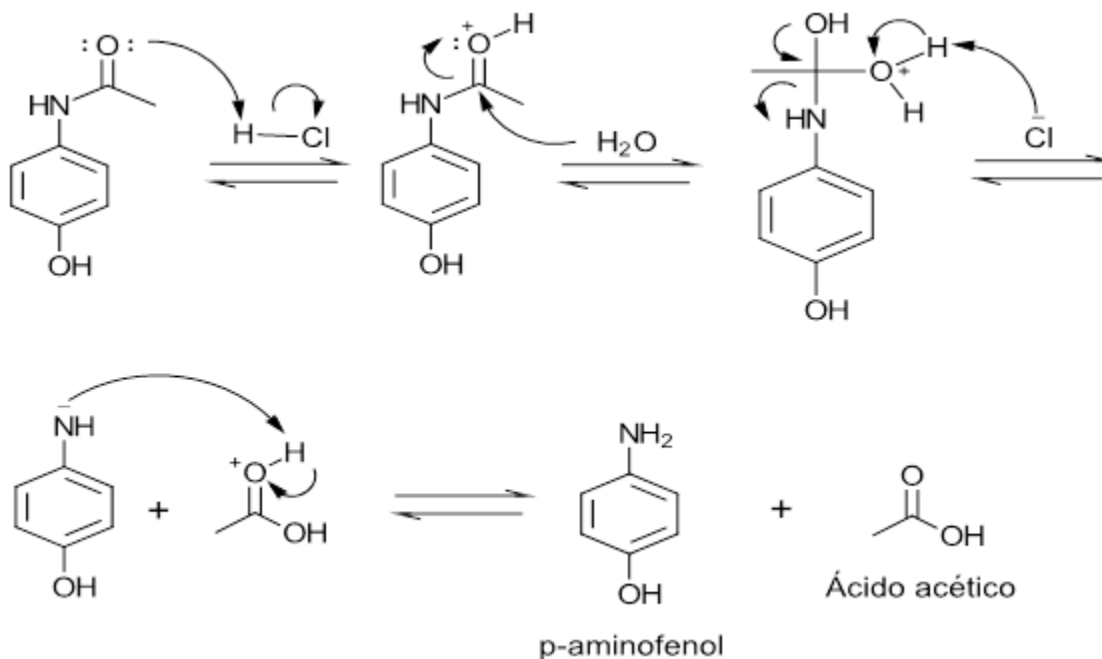
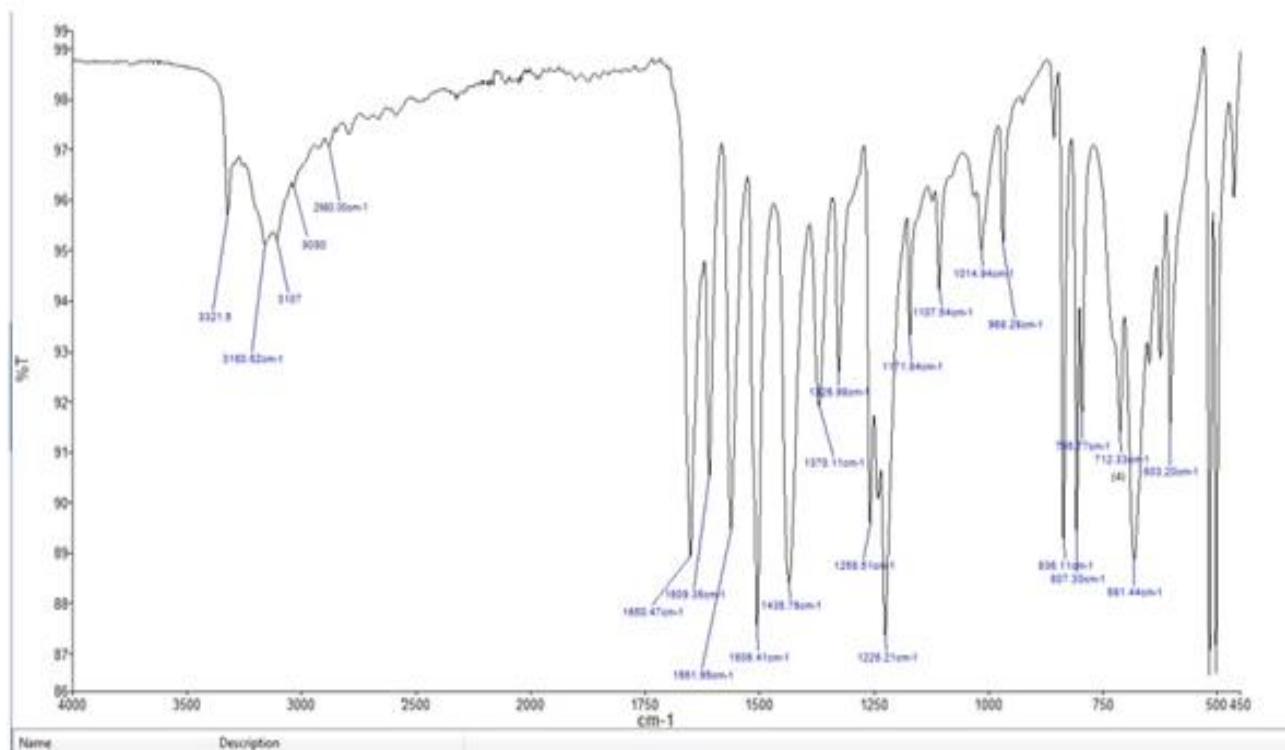


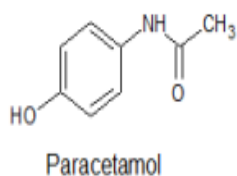
Figura 8. Mecanismo de reacción del Paracetamol en hidrólisis ácida³⁶

3.3 Propiedades físicas y químicas^{19, 30}

- Solubilidad: Fácilmente soluble en alcohol y metanol; soluble en acetona, agua caliente y en solución de hidróxido de sodio 1 N; casi insoluble en cloroformo y éter dietílico.
- Punto de fusión: 169-170.5°C
- pKa: 9.5 (25°C)
- Coeficiente de partición: Log P (octanol/agua) 0.5
- Espectro infrarrojo: Las principales señales por número de onda son 1506, 1657, 1565, 1263, 1227 y 1612 cm^{-1} (Figura 9).



ACETAMINOFEN



Aromatico		Amida		Alcano	
Enlace C-H	3030.00 cm-1	Carbonilo	1650.47 cm-1	Enlace C-H	2980.00 cm-1
Enlace C=C	1609.35 cm-1 1551.95 cm-1 1505.41 cm-1 1435.76 cm-1	Enlace N-H	3321.60 cm-1 3160.62 cm-1	Enlace	1435.76 cm-1 1370.11 cm-1
2 H adyacentes	836.11 cm-1	-----	-----	-----	-----
Fenol	1225.21 cm-1 1370.11 cm-1	-----	-----	-----	-----

Figura 9. Espectro infrarrojo del Paracetamol³⁷

3.4 Propiedades biológicas³⁰

- Acción farmacológica: El Paracetamol es un analgésico y antipirético. Inhibe la síntesis de prostaglandinas en el SNC, y bloquea la generación del impulso doloroso a nivel periférico. Actúa sobre el centro hipotalámico regulador de la temperatura.

- **Toxicidad:** En una sobredosis, las vías metabólicas habituales se ven desbordadas y el Paracetamol se metaboliza por el CYP2E1 a un metabolito reactivo. Este metabolito puede desintoxicarse por conjugación con glutatión, pero cuando las reservas hepáticas de glutatión se agotan, el metabolito se une a las macromoléculas en el hepatocito causando la muerte celular y la necrosis hepática.
- **Metabolismo:** Después de la administración oral, el Paracetamol se absorbe rápida y completamente por el tracto digestivo. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan a los 30-60 minutos. El Paracetamol se une a las proteínas del plasma en un 25%. Aproximadamente una cuarta parte de la dosis experimenta en el hígado un metabolismo de primer paso. También es metabolizada en el hígado la mayor parte de la dosis terapéutica, produciéndose conjugados glucurónicos y sulfatos, que son posteriormente eliminados en la orina. Entre un 10-15% de la dosis experimenta un metabolismo oxidativo mediante las isoenzimas de citocromo P450, siendo posteriormente conjugado con cisteína y ácido mercaptúrico. Después de una sobredosis, en presencia de malnutrición, o de alcoholismo existe una depleción hepática de los glucurónidos y sulfatos por lo que el Paracetamol experimenta el metabolismo oxidativo que es el más tóxico, a través del sistema enzimático CYP2E1 y CYP1A2 (Figura 10). También puede ocurrir este metabolito cuando el Paracetamol se administra con fármacos que son inductores hepáticos. La semi-vida de eliminación del Paracetamol es de 2-4 horas en los pacientes con la función hepática normal, siendo prácticamente indetectable en el plasma 8 horas después de su administración. En los pacientes con disfunción hepática la semi-vida aumenta sustancialmente, lo que puede ocasionar el desarrollo de una necrosis hepática.

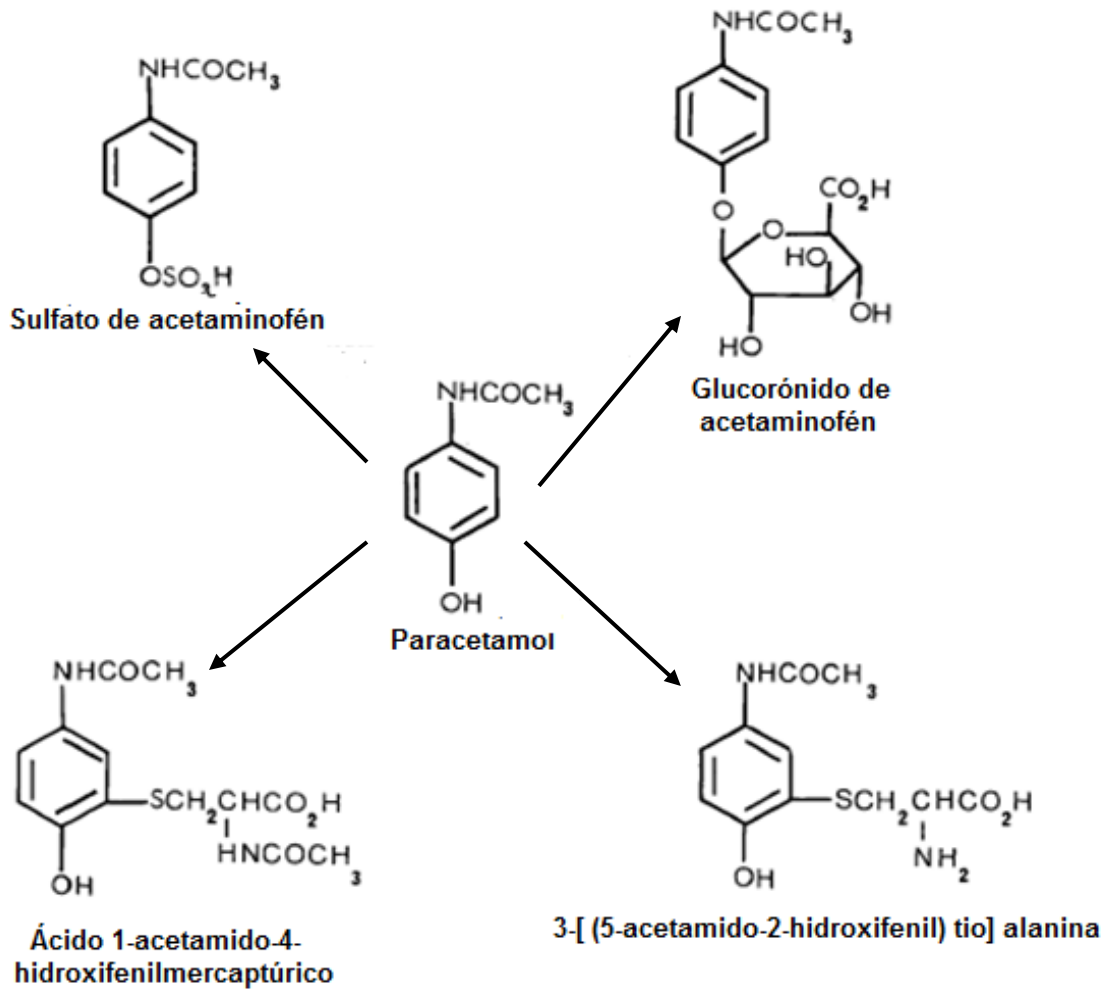


Figura 10. Rutas metabólicas del Paracetamol³⁰

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Paracetamol, también llamado acetaminofén se encuentra en más de 400 medicamentos disponibles en México; ya sea sólo o en combinación con otros principios activos, siendo comercializado en una gran cantidad de presentaciones farmacéuticas, entre las que se encuentran tabletas, supositorios, jarabes, soluciones inyectables, cápsulas, etc. Estos medicamentos pueden ser adquiridos ya sea por medio de receta, o de venta libre en las farmacias. Los medicamentos que contienen Paracetamol son utilizados comúnmente para aliviar dolores de ligeros a moderados, tales como: dolores de cabeza, dolores musculares, resfriados, gargantas irritadas, dolores de muelas, dolores de espalda, o debido a su actividad antipirética, para reducir la fiebre.³⁸

Debido a la gran demanda del Paracetamol es necesario contar con un método analítico que permita cuantificar el principio activo de una forma confiable para garantizar la calidad del producto, o bien, monitorear su estabilidad en el medicamento.

Entre las técnicas reportadas para cuantificar al Paracetamol, se encuentran las de titulación, espectroscopía UV-Vis, colorimetría, espectrofluorometría, quimioluminiscencia, electroforesis capilar, entre otros. La técnica analítica reportada en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos undécima edición es por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Sin embargo, esta técnica analítica emplea una gran cantidad de disolventes, aunado a que se requieren otros consumibles y que muchas veces no se cuenta con el equipo, siendo este el caso el de los Laboratorios Farmacéuticos Zaragoza, en los que los alumnos no disponen de un equipo de HPLC para realizar la determinación, o de laboratorios de control de calidad que pueden ya sea no contar con el equipo, o no contar con una cantidad suficiente para satisfacer la demanda de trabajo.

Así mismo, en ediciones anteriores de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y en farmacopeas extranjeras, la valoración de Paracetamol en tabletas se puede encontrar por espectroscopía UV, siendo este un método sencillo, pero que tiene la desventaja de que no permite cuantificar productos de degradación, y por tanto no poder ser empleado como indicativo de estabilidad.^{19, 27}

Por tal motivo, en el presente trabajo se desarrolló un método analítico alternativo reportado en farmacopea para la cuantificación de Paracetamol en tabletas por medio de espectroscopía de infrarrojo-medio, dadas las ventajas que ofrece la espectroscopía infrarroja, entre las que se encuentra el menor gasto de reactivos y disolventes, el que es una técnica no destructiva, los espectros se generan en tiempos cortos, puede ser considerada una técnica verde, y que en general es más accesible que un método convencional por HPLC. Todo esto conlleva la viabilidad del método de ser empleado para la cuantificación del Paracetamol en tabletas, ya sea a nivel de docencia, o bien por un laboratorio farmacéutico considerando las necesidades y limitaciones del mismo, con la ventaja de poder ser empleado como un método indicativo de estabilidad.

III. HIPÓTESIS

Debido a la presencia de los grupos funcionales fenol y amida en la molécula del Paracetamol, así como del anillo aromático del que está conformado, será posible desarrollar un método analítico por espectroscopía en el infrarrojo-medio para su cuantificación.

IV. OBJETIVOS

❖ General

Desarrollar un método analítico alternativo al presente en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 11va edición para cuantificar Paracetamol en tabletas por medio de espectroscopía infrarrojo-medio.

❖ Específicos

- ✓ Evaluar los parámetros de desempeño del método con el fin de determinar si cumple con los requerimientos por los que fue desarrollado.
- ✓ Valorar la capacidad que tiene el método de ser empleado como un método indicativo de estabilidad.
- ✓ Evaluar el costo-beneficio del método propuesto en comparación con el método descrito en farmacopea.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA

En la Figura 11 se la metodología seguida para el desarrollo del método analítico.

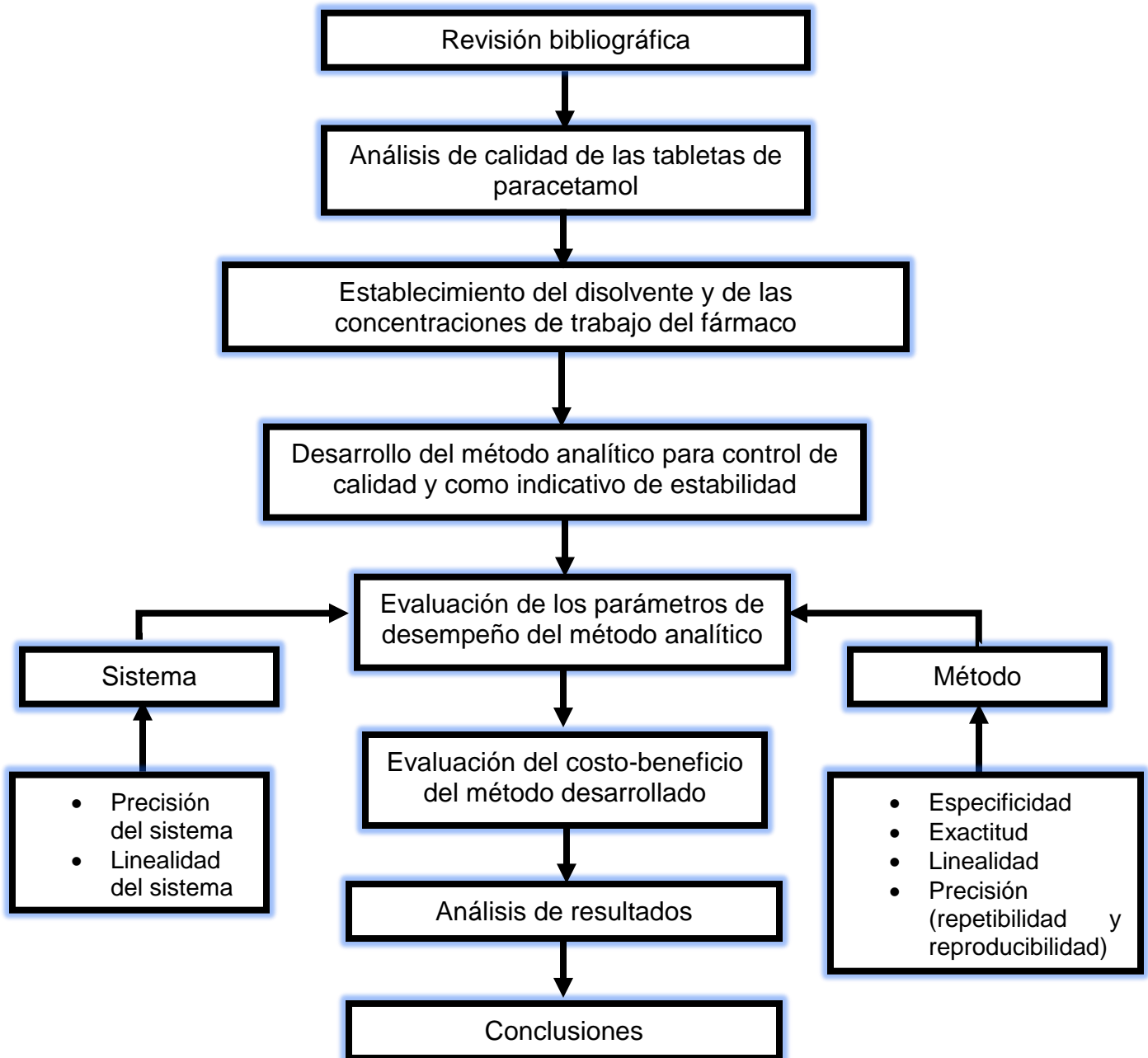


Figura 11. Diagrama de flujo de la metodología empleada

2. MATERIAL

2.1 Materiales

- ✓ Mortero con pistilo
- ✓ Espátula de acero inoxidable
- ✓ Tubos de ensaye 13x100
- ✓ Vasos de precipitado de 20,100, 200, 500 y 1000 mL
- ✓ Pipeta volumétrica de 1 y 5 mL
- ✓ Matraces aforados de 10, 25, 50, 100 y 200 mL
- ✓ Probeta de 50 y 100 mL
- ✓ Soporte universal
- ✓ Embudo de vidrio
- ✓ Anillo de hierro
- ✓ Papel filtro
- ✓ Agitador de vidrio
- ✓ Matraz Kitasato
- ✓ Embudo Buchner
- ✓ Bomba de vacío
- ✓ Mangueras
- ✓ Filtros millipore
- ✓ Piseta
- ✓ Cilindro de acero inoxidable
- ✓ Prensa hidráulica
- ✓ Mortero de ágata
- ✓ Tubos de rosca con tapón de baquelita de 10x100 mm
- ✓ Celdas de vidrio para espectrofotómetro
- ✓ Celda sellada con ventana de bromuro de potasio

2.2 Equipos e instrumentos

- ✓ Balanza analítica Mettler Toledo ME 204
- ✓ Vórtex
- ✓ Durómetro ERWEKA TBH 125D
- ✓ Friabilizador Elecsa FE 30 A
- ✓ Disolutor Agilent 708-DS
- ✓ Desintegrador Tester BJ-2
- ✓ Espectrofotómetro UV marca Hitachi U-2900
- ✓ Espectrofotómetro FT-IR Spectrum Two Perkin Elmer

3. REACTIVOS

3.1 Muestras analíticas

- ✓ Tabletas de Paracetamol marca Vitafast con número de lote 18E011 y caducidad en mayo de 2020.

3.2 Sustancias de referencia

- ✓ Paracetamol 100.20% (Clave SR-44)
- ✓ p-aminofenol (Clave SR-68)

3.3 Reactivos sólidos (Grado reactivo)

- ✓ Fosfato monobásico de potasio
- ✓ Nitroferricianuro de sodio
- ✓ Hidróxido de sodio

3.4 Reactivos líquidos (Grado reactivo)

- ✓ Acetato de etilo
- ✓ Metanol 50% v/v
- ✓ Acetona
- ✓ Ácido clorhídrico

3.5 Soluciones preparadas

- ✓ SA fosfatos pH 5.8
- ✓ Solución alcalina de nitroferricianuro
- ✓ Solución de hidróxido de sodio 0.1 M
- ✓ Solución de hidróxido de sodio 1 N
- ✓ Solución de ácido clorhídrico 1 N

Nota: Preparadas de acuerdo con FEUM 11va edición.

4. METODOLOGÍA

4.1 Pruebas de calidad de las tabletas

Se utilizó la Farmacopea de los Estados Unidos mexicanos undécima edición para el análisis de las tabletas. La valoración fue realizada de acuerdo a la Farmacopea Británica 8va edición.

a) Ensayo de identidad (MGA 0351)

Pesar y triturar 20 tabletas de Paracetamol.

A. Espectro UV. Preparar una disolución que contenga 12 µg/mL de Paracetamol. Pesar polvo de tableta el equivalente a 15 mg de Paracetamol y colocar en un matraz aforado de 50 mL, adicionar 30 mL de hidróxido de sodio 0.1 M. Sonicar

durante 25 minutos, llevar al aforo con hidróxido de sodio 0.1 M. Filtrar y diluir 1 mL de cada filtrado a 25 mL con hidróxido de sodio 0.1 M.

Preparar una solución de referencia de 12 µg/mL de Paracetamol trabajando bajo las mismas condiciones que las muestras.

La prueba se considera conforme si el espectro UV obtenido por la preparación de la muestra corresponde con el espectro obtenido por la preparación de referencia, presentando un pico máximo de absorción a los 257 nm.

B. Espectro IR. Preparación de la muestra: Pesar la cantidad de polvo equivalente a 150 mg de Paracetamol, y colocar en tubos de rosca con tapón de baquelita de 10x100 mm, adicionar 3 mL de acetona y sonicar durante 20 minutos. Filtrar la muestra a través de papel filtro de poro mediano.

Preparación de referencia: Pesar 150 mg de Paracetamol SRef y colocar en tubos de rosca con tapón de baquelita de 10x100 mm, adicionar 3 mL de acetona y sonicar durante 20 minutos. Filtrar a través de papel filtro de poro mediano.

La prueba se considera conforme si el espectro de absorción IR obtenido para la preparación la muestra corresponde con el obtenido para la preparación de referencia.

b) Dureza (MGA 1051)

Utilizar 10 tabletas para la determinación. Colocar cada comprimido de forma diametral entre las platinas del durómetro y aumentar presión hasta que el comprimido se rompa.

La prueba se considera conforme si el promedio de las durezas es mayor a 6 Kg.

c) Friabilidad (MGA 1041)

Colocar en el interior del tambor 10 tabletas libres de polvos previamente pesadas. Una vez cerrada la tapa del tambor, hacer girar este a 25 ± 1 rpm durante 4 minutos.

Observar si no existen unidades agrietadas, laminadas, segmentadas o rotas, y finalmente reportar la pérdida de masa en porcentaje por medio de la Ecuación 2:

$$\left(\frac{P_i - P_f}{P_i}\right) \times 100$$

Ecuación 2

Donde: P_i =Peso total de las unidades antes de colocarlas en el friabilizador.

P_f =Peso total de las unidades después de colocarlas en el friabilizador.

La prueba se considera conforme si la friabilidad no supera el 1%.

d) Humedad (MGA 0671)

Llevar tres pesafiltros a peso constante a 105°C durante dos horas.

Triturar hasta polvo fino un total de 10 tabletas. En cada pesafiltro colocar 1.0 g de polvo de tableta y se colocar en la estufa a 105°C durante 2 horas. Tras este periodo determinar el peso perdido durante el secado por medio de la Ecuación 3:

$$P_s = P_i - P_f$$

Ecuación 3

Donde:

P_s =Peso perdido durante el secado en gramos

P_i =Peso inicial de la muestra en gramos

P_f =Peso final de la muestra en gramos

Y finalmente se calcular la pérdida por secado en porcentaje por medio de la Ecuación 4:

$$\%P_s = \left(\frac{P_s}{P_i}\right) 100$$

Ecuación 4

Donde:

%P_s= Porcentaje de pérdida por secado

P_s= Peso perdido durante el secado en gramos

P_i=Peso inicial de la muestra en gramos

La prueba se considera conforme si la humedad es menor al 3%.

e) Uniformidad de dosis (MGA 0299)

Método de variación de masa

Pesar con exactitud 10 tabletas individualmente. Calcular el contenido del principio activo en cada una de las 10 tabletas expresado como el porcentaje de la cantidad obtenida en la valoración, relacionando la masa de cada tableta con el resultado de la valoración del principio activo mediante la Ecuación 5:

$$X_i = \frac{m_1 A}{\bar{m}}$$

Ecuación 5

Donde:

m₁, m₂, ..., m_n = Masas individuales de las unidades analizadas

A = Contenido del principio activo determinado en la valoración (%)

\bar{m} = Media de las masas individuales

Calcular el valor de aceptación por medio de la Ecuación 6 (Empleada cuando 98.5% < X < 101.4%):

$$VA = kS$$

Ecuación 6

Donde:

VA= Valor de aceptación

k=Constante de aceptabilidad (Si $n=10$, $k=2.4$)

S=Desviación estándar de la muestra

La prueba se considera conforme si la variación porcentual no supera el 15%.

f) Desintegración (MGA 0261)

Colocar una tableta en cada uno de los compartimentos de la canastilla del desintegrador. Poner el aparato en operación utilizando como líquido de inmersión agua a 37°C y registrar el tiempo de desintegración de las tabletas.

La prueba se considera conforme si el tiempo de desintegración no es mayor a 15 minutos.

g) Disolución (MGA 0291)

Medio de disolución. SA de fosfatos pH 5.8 (fosfato monobásico de potasio-hidróxido de sodio).

Preparación de la referencia. Preparar una solución de la SRef de Paracetamol en SA de fosfatos pH 5.8 que contenga 5.0 µg/mL de Paracetamol.

Pesar con exactitud 12.5 mg de Paracetamol SRef, colocar en un matraz aforado de 50 mL, llevar con SA de fosfatos pH 5.8. Tomar una alícuota de 5 mL, transferir a un matraz aforado de 25 mL y llevar al aforo con SA de fosfatos pH 5.8. Finalmente, tomar una alícuota de 1 mL y aforar con SA de fosfatos pH 5.8 en un matraz volumétrico de 10 mL.

Procedimiento. Colocar una tableta en cada uno de los vasos del aparato 2 de disolución con 900 mL de SA de fosfatos pH 5.8, accionar el aparato a 50 rpm durante 30 minutos. Inmediatamente filtrar una porción de esta solución. Tomar una alícuota de 1 mL de esta solución y diluir hasta 100 mL con SA de fosfatos pH 5.8. Esta disolución tiene una concentración aproximada 5 µg/mL de Paracetamol.

Obtener las absorbancias de la preparación de la muestra y de la referencia por medio de espectroscopía UV a una longitud de onda de 243 nm, empleando SA de fosfatos pH 5.8 como blanco de ajuste.

Calcular el porcentaje de Paracetamol disuelto por medio de la Ecuación 7:

$$Q = \frac{100 CD \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right)}{M}$$

Ecuación 7

Donde:

C = Concentración de la preparación de referencia

D = Factor de dilución de la muestra

A_m = Absorbancia de la preparación de la muestra

A_{ref} = Absorbancia de la preparación de referencia

M = Cantidad del principio activo indicada en el marbete

La prueba se considera conforme si Q=80% a los 30 minutos.

h) Valoración

Pesar y triturar 20 tabletas de Paracetamol.

Preparar una disolución que contenga 12 µg/mL de Paracetamol.

Por triplicado, pesar el equivalente a 15 mg de Paracetamol y transferir a un matraz aforado de 50 mL, adicionar 30 mL de hidróxido de sodio 0.1 M. Sonicar durante 25 minutos, y llevar al aforo con hidróxido de sodio 0.1 M. Filtrar y diluir 1 mL de cada filtrado a 25 mL con hidróxido de sodio 0.1 M.

Preparar una solución de referencia de 12 µg/mL de Paracetamol trabajando bajo las mismas condiciones que las muestras.

Obtener las absorbancias de la solución de referencia y de las muestras por espectroscopía ultravioleta, midiendo a una longitud de onda máxima de 257 nm y empleando hidróxido de sodio 0.1 M como blanco de ajuste.³⁹

La prueba se considera conforme si el contenido de la valoración se encuentra entre el 90.0 y 110.0% de la cantidad declarada en el marbete.

i) p-aminofenol libre (MGA 0361)

Preparación de referencia. Preparar una solución de la SRef de p-aminofenol en metanol al 50% (v/v) que contenga 250 µg/mL.

Pesar con exactitud 12.5 mg de p-aminofenol SRef, colocar en un matraz volumétrico de 50 mL, y aforar con metanol 50% (v/v).

Preparación de la muestra. Pesaron 20 tabletas y calcular su peso promedio. Triturar hasta polvo fino y pesar una cantidad de polvo equivalente a 5 g de Paracetamol, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL. En otro matraz volumétrico de 100 mL, colocar una alícuota de 1 mL de la preparación de referencia. Agregar a cada matraz 75 mL de metanol al 50% (v/v), mezclar y agregar 5 mL de solución alcalina de nitroferricianuro, llevar al aforo con metanol al 50% (v/v). Dejar las muestras en reposo durante 30 minutos, filtrar y obtener las absorbancias de las preparaciones de la muestra y de la referencia a una longitud de onda de 710 nm utilizando celdas de vidrio, y empleando una solución (5:100) de la solución alcalina de nitroferricianuro en metanol al 50% (v/v) como blanco de ajuste.

La prueba se considera conforme si la absorbancia obtenida con la preparación de la muestra no excede a la obtenida con la preparación de la referencia, lo que corresponde a no más del 0.005%.

j) Hermeticidad (MGA 0486)

Sumergir completamente las muestras de producto terminado correspondientes a 50 unidades, en solución de azul de metileno al 0.1 % (m/v) contenida en un desecador de vacío. Se coloca la placa de porcelana, tapar el desecador y aplicar vacío a una velocidad de 10 mm mercurio por segundo y hasta un diferencial de presión de 300 mm de mercurio. Tras obtener el vacío indicado, mantener durante 1 min. Una vez transcurrido el tiempo, dejar entrar lentamente el aire a la cámara hasta igualar la presión atmosférica. Retirar las muestras, enjuagar con agua y secar para finalmente revisar individualmente cada una de las unidades.

La prueba se considera conforme si ninguna de las unidades/dosis resulta con penetración de colorante en la burbuja contenedora del producto.

4.2 Desarrollo del método

Para el desarrollo del método se procedió inicialmente a seleccionar el disolvente adecuado que permitiera la completa extracción del Paracetamol de los excipientes de la tableta y que no causara interferencia con la señal empleada para la cuantificación.

Una vez seleccionado el disolvente se realizaron soluciones de concentración conocida para determinar las concentraciones de trabajo que el instrumento pudiera detectar y cuantificar, y que generaran absorbancias menores a 4.0 que es el intervalo en donde el espectrofotómetro IR presenta respuestas que siguen la ley de Lambert y Beer.

Posteriormente se realizaron pruebas de tiempo de agitación sometiendo muestras al 5% m/v de Paracetamol a diferentes tiempos de agitación, siendo estos 20, 25 y 30 minutos.

La técnica que se empleó para el tratamiento de la muestra para obtener el espectro IR por transformada de Fourier es la celda sellada con ventanas de bromuro de potasio. La computadora acoplada al espectrofotómetro IR es lo que permitió obtener datos cuantitativos en la determinación.

Para evitar la interferencia de los componentes de la tableta, el método seleccionado para evaluar los parámetros de desempeño para el Paracetamol es por adición de estándar.

Así mismo, se realizaron degradaciones tanto ácidas como básicas para obtener los productos de degradación del Paracetamol y de esta manera determinar si el método es factible como indicativo de estabilidad. Aunado a esto, se corrieron espectros con una referencia primaria de p-aminofenol, que es el principal producto de degradación del activo de interés.

4.3 Evaluación de los parámetros de desempeño

Una vez desarrollado el método se evaluaron los parámetros de desempeño para comprobar que dicho método cumple con las características para las que fue diseñado. Para esto, se evaluó tanto al sistema como al método, iniciando por establecer las concentraciones con el fármaco únicamente.

❖ Sistema

a) Linealidad del sistema (curva de calibración)

Se realizó una curva de calibración por triplicado, evaluando 5 niveles de concentración por triplicado (40, 60, 80, 100 y 120%). Para ello, se realizaron las disoluciones correspondientes para obtener concentraciones de 2, 3, 4, 5 y 6%. Estas disoluciones fueron preparadas por pesadas independientes, pesando respectivamente 20, 30, 40, 50 y 60 mg de Paracetamol SRef, y disolviendo en 1 mL de acetona en tubos de rosca con tapón de baquelita. Las muestras fueron agitadas con ayuda de un vórtex para tubo y finalmente se leyó cada una de las disoluciones en el espectro infrarrojo.

Se calculó el factor de correlación, factor de determinación, ordenada al origen, pendiente y el intervalo de confianza para la pendiente.

b) Precisión del sistema

Se realizó por sextuplicado una disolución de Paracetamol que correspondía al 100% de la cantidad de la muestra procesada para su medición (determinada en la curva de calibración). Para ello, se pesaron 50 mg de SRef de Paracetamol y se llevaron a 1 mL con acetona en tubos de rosca con tapón de baquelita, se agitaron durante 3 minutos en el vórtex. Cada una de las soluciones fue leída en el espectro infrarrojo.

Se calculó el coeficiente de variación, el cual debe ser menor al 1.5% para ser aceptado.

❖ Método

a) Especificad del método

Se prepararon muestras al 100% de concentración (5% m/v) de la SRef de Paracetamol y se compararon con muestras preparadas a partir de polvo de tableta y muestras con estándar adicionado, a fin de observar si las respuestas obtenidas se debían únicamente al Paracetamol.

Se leyeron las muestras en el espectrofotómetro infrarrojo y se obtuvieron los espectros correspondientes.

b) Exactitud del método

Fueron pesadas y trituradas 20 tabletas de Paracetamol. Por sextuplicado, se pesó la cantidad de polvo equivalente a 150 mg de Paracetamol, y se colocaron en tubos de rosca con tapón de baquelita de 10x100 mm, se adicionaron 3 mL de acetona y se sonicó durante 20 minutos. Dichas muestras fueron filtradas a través de papel filtro de poro mediano y finalmente leídas en el espectro IR.

Se calculó el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro, el cual debe ser menos al 3, además del intervalo de confianza para la media, el cual debe estar comprendido entre 97.0 y 103.0%, o incluir al 100%.

c) Linealidad del método

Un total de 20 tabletas de Paracetamol fueron pesadas y trituradas hasta polvo fino. Para determinar la linealidad del método se utilizó la adición de un estándar. Por triplicado, se pesaron 30 mg de SRef de Paracetamol para cada una de las cinco concentraciones, se colocaron en tubos de rosca con tapón de baquelita de 10x100 mm, se les adicionaron 3 mL de acetona y se agitaron durante 3 minutos. A cada una de las muestras se les adicionó la cantidad de polvo de tableta equivalente a 30, 60, 90, 120 y 150 mg respectivamente para obtener las concentraciones de 2 al 6% de Paracetamol. Las muestras fueron sonicadas durante 20 minutos y filtradas a través de papel filtro de poro mediano. Finalmente, cada una de las muestras fue leída en el espectro IR.

Se graficó la cantidad adicionada vs. cantidad recuperada. A partir de estos datos se obtuvo el coeficiente de determinación (r^2), desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$), coeficiente de variación de la regresión ($CV_{y/x}$), la pendiente, la ordenada al origen, el intervalo de confianza para la pendiente y el intervalo de confianza para la ordenada al origen. El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98 para considerarse validado, así como presentar un coeficiente de variación menor al 3%. El intervalo de confianza para la pendiente debe incluir la unidad, y el intervalo de confianza para la ordenada al origen incluir al 0.

A su vez, mediante los recobros se obtuvo el intervalo de confianza para la media y el coeficiente de variación de estos. El coeficiente de variación debe ser menor a 3%, y el intervalo de confianza para la media estar comprendido entre el 97.0 y el 103.0% para considerarse validado.

d) Precisión del método

Repetibilidad: Se obtuvo el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro de las muestras empleadas para la exactitud del método. El CV debe ser menor al 3%.

Reproducibilidad: Se pesaron y trituraron 20 tabletas de Paracetamol. Por triplicado, se pesó la cantidad de polvo equivalente a 150 mg de Paracetamol, y se colocaron en tubos de rosca con tapón de baquelita de 10x100 mm, fueron adicionados 3 mL de acetona. Las muestras se sonicaron durante 20 minutos y posteriormente se filtraron a través de papel filtro de poro mediano. Se leyeron las tres muestras en el espectro IR.

Esta determinación fue realizada en 2 días diferentes, y por dos analistas diferentes. Se calculó el coeficiente de variación, el cual debe ser menor al 3%.

e) Límite de detección y límite de cuantificación

Se pesaron y trituraron un total de 20 tabletas de Paracetamol. Se pesó el equivalente a 30 mg de Paracetamol y se colocó en un tubo de ensaye con tapón de baquelita. A este se le adicionaron 3 mL de acetona, se filtró a través de papel filtro de poro mediano y finalmente se realizó la lectura en el espectro IR.

Para la determinación del límite de detección y cuantificación, se tomó la lectura de la misma muestra un total de 17 veces, se obtuvo la desviación estándar de la respuesta, y mediante esta se calcularon ambos límites.

4.4 Evaluación como método indicativo de estabilidad

Para la evaluación del método desarrollado como método indicativo de estabilidad se sometió a las tabletas de Paracetamol a degradación forzada. Las condiciones empleadas fueron las de hidrólisis ácida e hidrólisis básica.

- Hidrólisis ácida: Se pesó polvo de tableta equivalente a 150 mg de Paracetamol, previamente pesado y triturado hasta polvo fino. Se colocaron en un tubo de ensaye con tapón de baquelita de 10x100 mm y se le adicionaron 3 mL de ácido clorhídrico 1 N. La muestra fue calentada en baño de agua a 80°C durante 3 horas. Una vez concluido el tiempo, se llevó la muestra a sequedad, se resuspendió con 3 mL de acetona y se filtró a través de papel filtro de poro mediano.
- Hidrólisis básica: Se pesó polvo de tableta equivalente a 150 mg de Paracetamol, previamente pesado y triturado hasta polvo fino. Se colocaron en un tubo de ensaye con tapón de baquelita de 10x100 mm y se le adicionaron 3 mL de hidróxido de sodio 1 N. La muestra fue calentada en baño de agua a 80°C durante 3 horas. Una vez concluido el tiempo, se llevó la muestra a sequedad, se resuspendió con 3 mL de acetona y se filtró a través de papel filtro de poro mediano.

Se obtuvieron los espectros infrarrojos de ambas muestras y se compararon con una muestra al 100% de Paracetamol sin tratamiento. Así mismo, se corrieron los espectros de muestras de referencia de p-aminofenol y p-cloroacetanilida, esto con la finalidad de comprobar que las señales propias de los productos de degradación no interferían con las señales empleadas para la cuantificación del Paracetamol.

4.5 Evaluación costo-beneficio del método

Se realizó una evaluación costo-beneficio del método desarrollado por espectroscopía de infrarrojo comparada con el método por HPLC descrito en farmacopea. En dicha evaluación se investigaron costos de los disolventes empleados, costos aproximados de los instrumentos, y los tiempos de trabajo requeridos para realizar los métodos.

VI. RESULTADOS

1. CONTROLES DE CALIDAD

Los resultados obtenidos para los controles de calidad de las tabletas de Paracetamol de la marca Vitafast con número de lote 18E011 se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Resultados del control de calidad de tabletas de Paracetamol.

Análisis	Especificación	Resultado
Aspecto	Tableta circular de color blanco	Tableta circular de color blanco
Peso promedio	Por especificar	639.33 mg
Ensayo de identidad	A. El espectro UV de la preparación de la muestra corresponde al obtenido con la preparación de referencia, teniendo un pico de absorción máxima a los 257 nm B. El espectro de absorción IR obtenido con la preparación de la muestra corresponde con el obtenido con la preparación de referencia	A. El espectro UV de la preparación de la muestra corresponde al obtenido con la preparación de referencia, teniendo un pico de absorción máxima a los 257 nm B. El espectro de absorción IR obtenido con la preparación de la muestra corresponde con el obtenido con la preparación de referencia
Dureza	Mayor de 6 Kg	19.76 Kg
Friabilidad	No mayor al 1%	0.16%
Humedad	Menor al 3%	1.71%
Uniformidad de dosis	No mayor al 15%	VA= 1.75%
Disolución	Q=80% en 30 minutos	Q=90.10%
Desintegración	No mayor a 15 minutos	30 segundos
Valoración**	90.0 – 110.0%	99.698% CV= 0.67%
p-aminofenol libre	No más del 0.005%	No mayor al 0.005%
Hermeticidad	El blíster no presenta coloración azul	Ningún blíster presenta coloración azul

*Realizados de acuerdo con FEUM 11va edición.

**De acuerdo con Farmacopea Británica 8va edición.

2. DESARROLLO DEL MÉTODO

El disolvente seleccionado que permitió la solubilidad del Paracetamol fue la acetona, esto conforme con las propiedades de solubilidad reportadas para el Paracetamol, que lo clasifican como fácilmente soluble en etanol y metanol, y soluble en acetona. Se optó por la acetona sobre el etanol y el metanol debido a que estos últimos presentan señales características correspondientes al grupo hidroxilo (OH-) que podrían interferir con las señales -OH del fenol y del NH₂. El espectro de absorción de la acetona no presentó señales a la longitud de onda seleccionada para la cuantificación del Paracetamol.

Se realizaron curvas de Paracetamol solo a fin de establecer las concentraciones de trabajo. Dichas muestras fueron colocadas en celdas selladas con ventanas de bromuro de potasio, y se concluyó que las concentraciones óptimas de trabajo son menores al 10% m/v de Paracetamol, por lo que se emplearon muestras del 2 al 6%. Estas muestras generaban absorbancias comprendidas entre 0.5 y 1.5, siendo una absorbancia de 4 la máxima posible en la que el espectrofotómetro IR marca Spectrum Two Perkin-Elmer presenta resultados que obedecen a la Ley de Lambert y Beer. Además, se realizaron pruebas de tiempo de agitación obteniendo que el tiempo óptimo era de 20 minutos de agitación.

Se procedió a seleccionar una de las señales obtenidas que generara respuestas consistentes y en cuya longitud de onda no existiera interferencia de la acetona. Dicha longitud de onda seleccionada fue $836 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$, pues no existía señal proveniente de la acetona a esta longitud de onda (Figura 12).

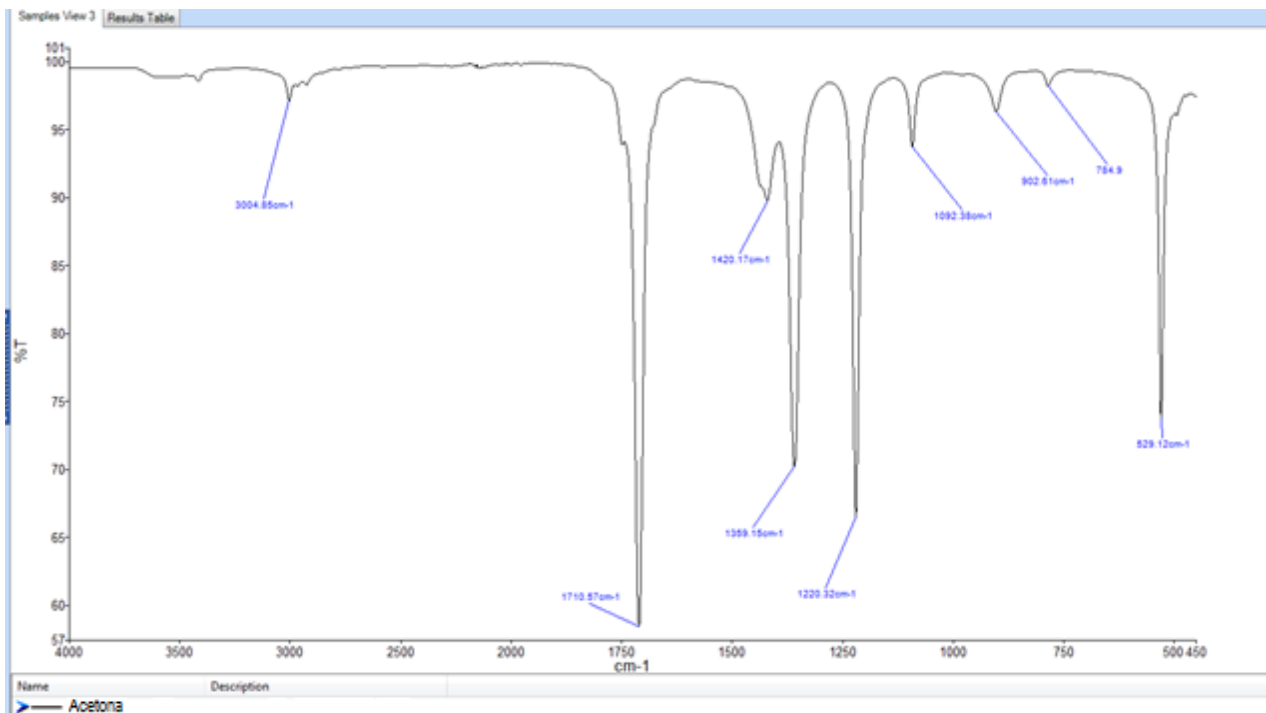


Figura 12. Espectro infrarrojo de la acetona

Los espectros obtenidos fueron comprendidos entre la región de los 4000 a los 450 cm^{-1} correspondiente a la región del infrarrojo medio.

- **Método desarrollado**

Para la cuantificación de Paracetamol en tabletas efectuar el siguiente procedimiento:

Preparación de referencia: Preparar una solución al 5% de Paracetamol.

Pesar 50 mg de SRef de Paracetamol y disolver con 1 mL de acetona previamente destilada.

Preparación de la muestra: Pesar no menos de 10 tabletas de Paracetamol y calcular el peso promedio, triturar hasta polvo fino. Preparar una solución al 5% de Paracetamol.

Pesar el equivalente a 150 mg de Paracetamol y disolver con 3 mL de acetona destilada. Sonicar o agitar en vórtex durante 20 minutos, filtrar a través de papel filtro de poro mediano.

Leer en el espectrofotómetro infrarrojo empleando celdas selladas con ventana de bromuro de potasio, obteniéndose la absorción de fondo de la acetona.

Emplear la absorbancia obtenida en la señal correspondiente a los 836 cm^{-1} . Dicha señal es seleccionada debido a que esta longitud de onda la acetona no presenta respuesta.

El método desarrollado se puede realizar por comparación con un estándar en el caso de ser empleado como control de calidad; en caso de que se quiera utilizar como indicativo de estabilidad realizar una curva estándar de Paracetamol cuyas concentraciones oscilen entre 2.0 y 6.0%.

3. VALIDACIÓN

Los parámetros de desempeño evaluados se muestran a continuación:

3.1 Especificidad

Se obtuvieron los espectros de muestras de Paracetamol estándar y una muestra de Paracetamol con estándar adicionado, los cuales se muestran en las Figuras 13 y 14.

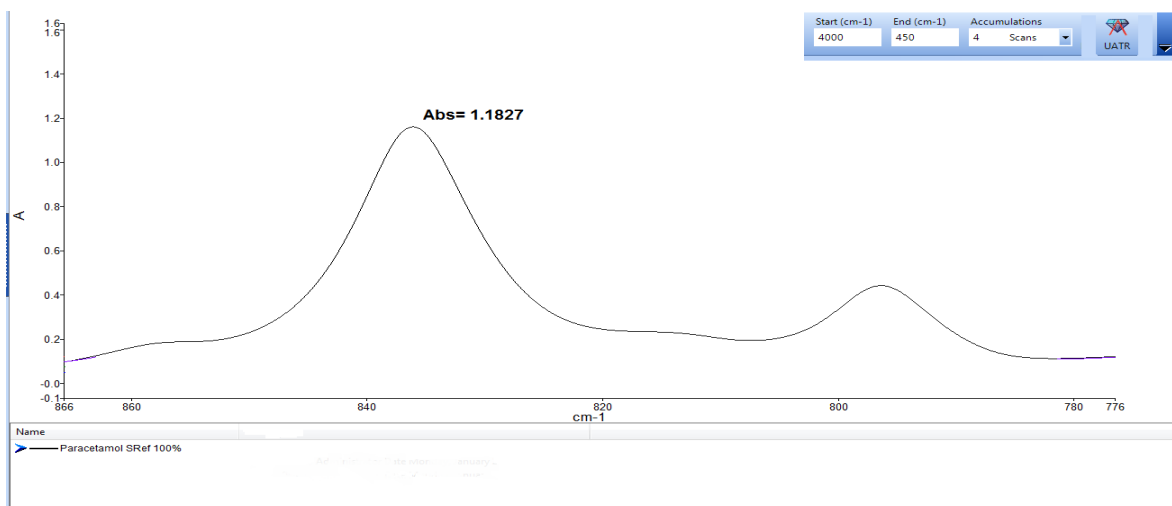


Figura 13. Espectro infrarrojo de la SRef de Paracetamol empleando celdas selladas con ventanas de KBr

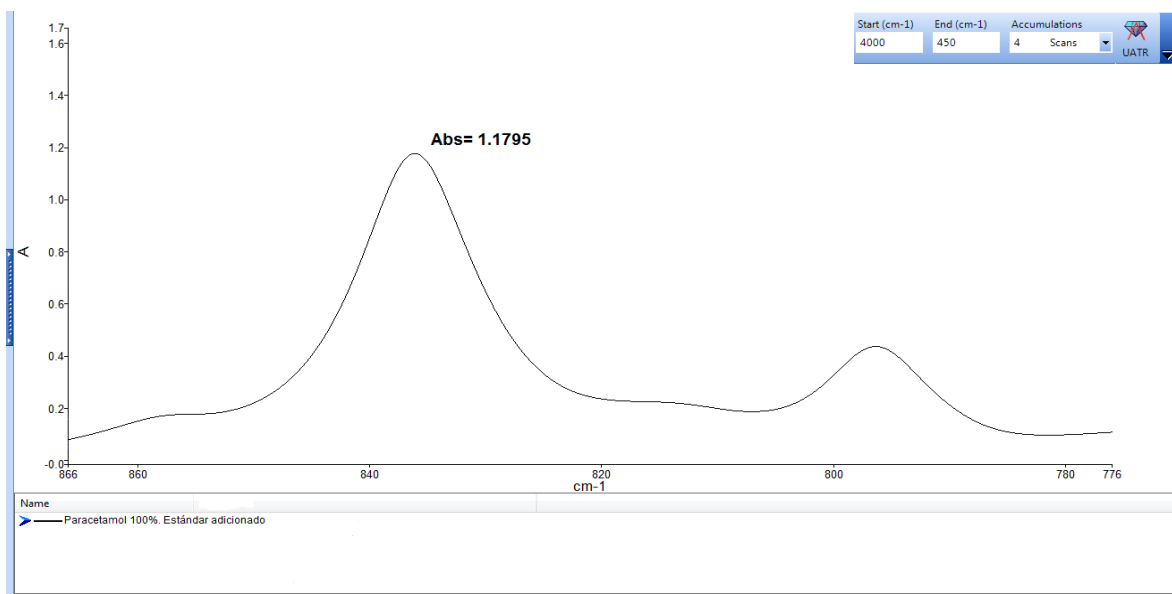


Figura 14. Espectro infrarrojo de la muestra más la adición de estándar empleando celdas selladas con ventanas de KBr

3.2 Linealidad del sistema

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de la linealidad del sistema.

Cuadro 4. Linealidad del sistema

Nivel	Concentración (%)	Respuesta (Abs)
40%	2.00	0.5495
	1.99	0.5452
	2.02	0.5859
60%	3.00	0.7617
	2.99	0.7469
	3.00	0.7617
80%	4.00	0.9427
	4.01	0.9613
	4.02	0.9690
100%	5.02	1.1827
	5.00	1.1688
	4.99	1.1629
120%	6.01	1.4111
	6.02	1.4228
	6.00	1.4053

En la figura 15 se presenta la gráfica de linealidad del sistema.

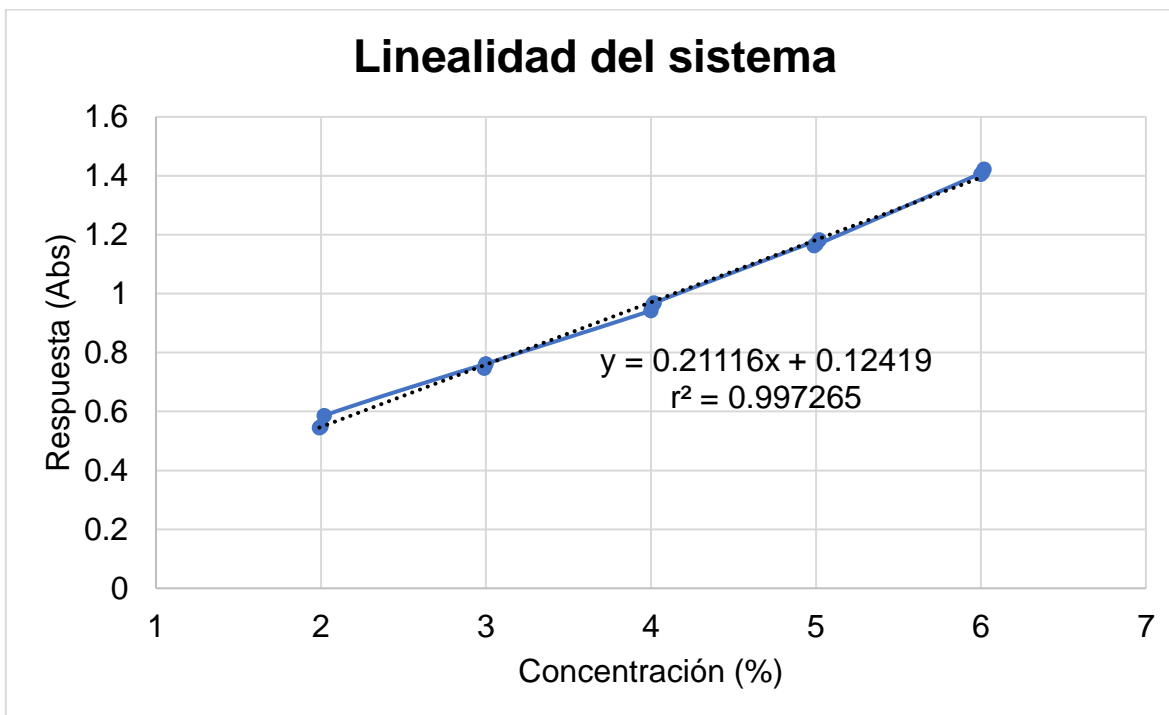


Figura 15. Linealidad del sistema

En el Cuadro 5 se presentan los parámetros estadísticos de la linealidad del sistema.

Cuadro 5. Parámetros estadísticos de la linealidad del sistema

Parámetros estadísticos	Resultado experimental	Criterio de aceptación
Pendiente	0.21116	
Ordenada al origen	0.12419	
Coefficiente de determinación (r^2)	0.997265	$r^2 > 0.98$
Intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$	[0.190857 a 0.232346]	No debe incluir al cero

En la figura 16 se presenta la curva de calibración de la linealidad del sistema.

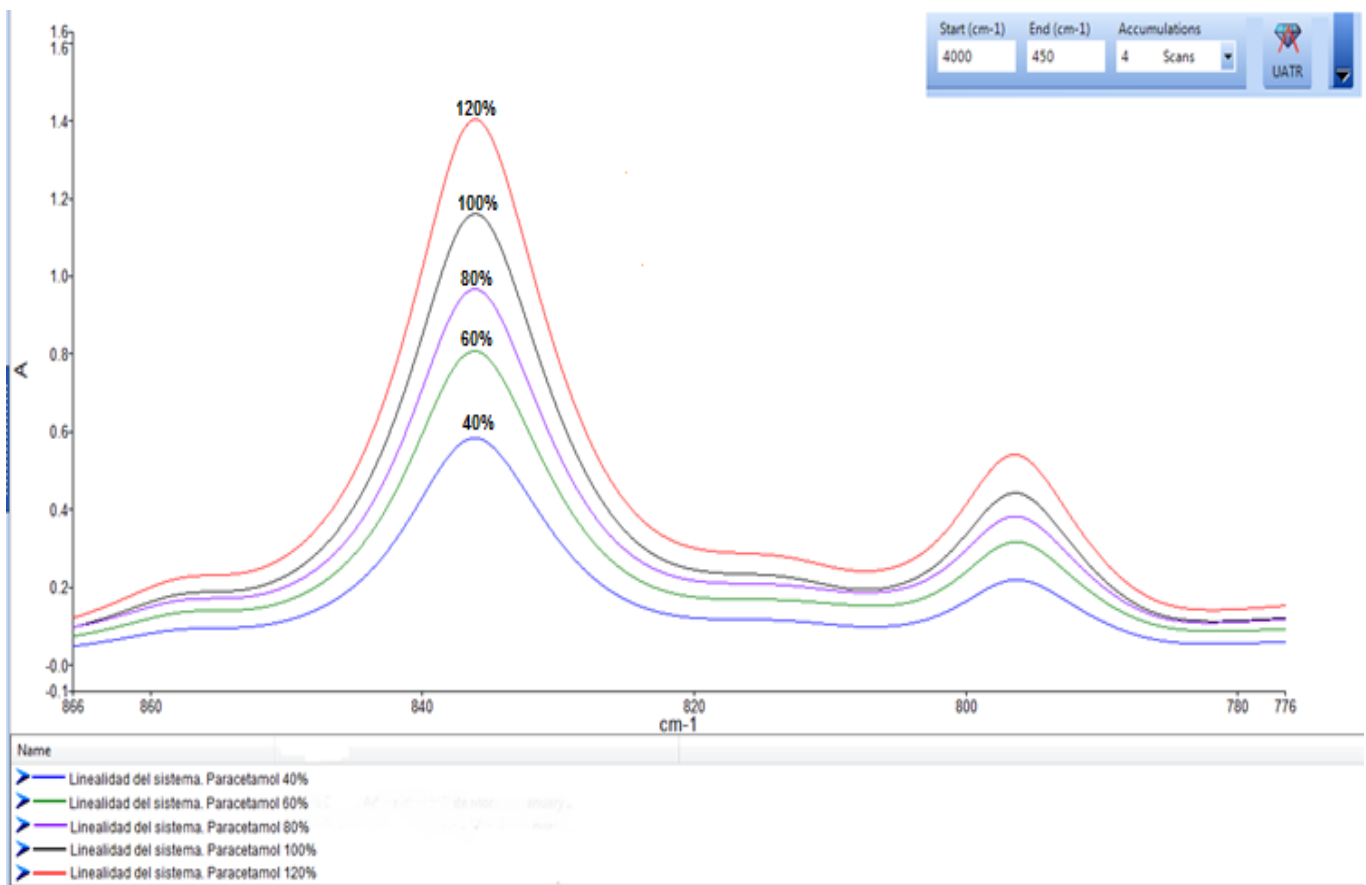


Figura 16. Curva de la linealidad del sistema

3.3 Precisión del sistema

En el Cuadro 6 se muestran los resultados de la precisión del sistema.

Cuadro 6. Resultados de la precisión del sistema

Concentración (%)	Respuesta (Abs)
5.0	1.1508
5.0	1.1462
5.0	1.1482
5.0	1.1827
5.0	1.1688
5.0	1.1629

En la Figura 17 se muestra la gráfica de la precisión del sistema.

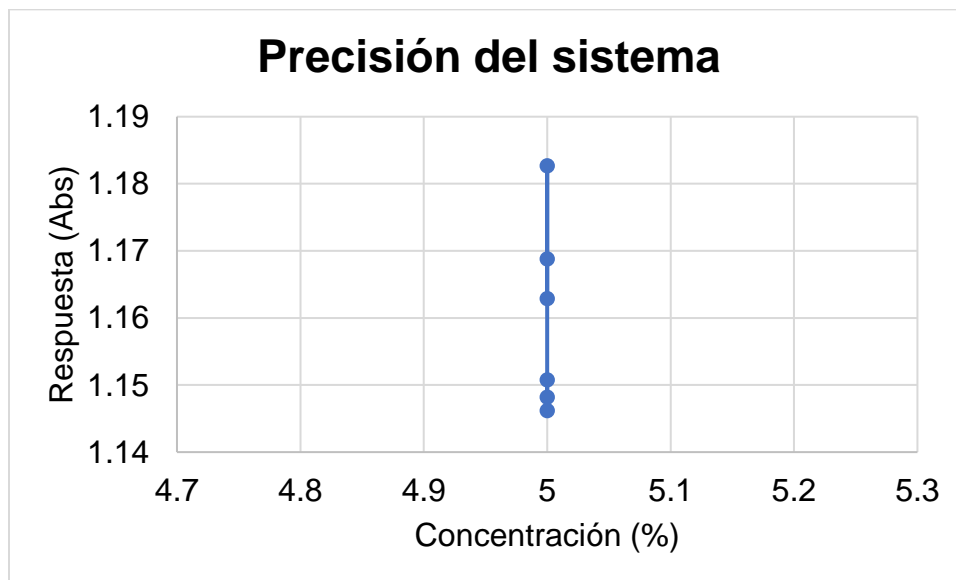


Figura 17. Precisión del sistema

En el Cuadro 7 se muestran los resultados estadísticos de la precisión del sistema.

Cuadro 7. Parámetros estadísticos de la precisión del sistema

Parámetros estadísticos	Resultado experimental	Criterio de aceptación
Media (\bar{x})	1.1599333	
Desviación estándar (S)	0.0142508	
Coefficiente de variación (CV)	1.23%	CV < 1.5%

3.4 Linealidad del método

En el Cuadro 8 se presentan los resultados de la linealidad del método.

Cuadro 8. Resultados de la linealidad del método

Cantidad adicionada (%)	Respuesta	Cantidad recuperada (%)	Recobro (%)
1.98	0.5259	2.02	101.92
1.99	0.5322	2.04	102.76
2.00	0.5517	2.12	106.00
3.00	0.7636	3.03	100.87
3.00	0.7678	3.04	101.46
2.99	0.7523	2.98	99.59
4.03	0.9794	3.94	97.79
3.96	0.9434	3.79	95.65
4.05	0.9960	4.01	99.04
5.00	1.1795	4.79	95.78
5.03	1.2024	4.88	97.13
5.04	1.2114	4.92	97.69
6.00	1.5011	6.15	102.55
5.98	1.4828	6.07	101.58
6.02	1.5259	6.17	102.55

- Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada

En el Figura 18 se presentan los resultados de la linealidad del método.

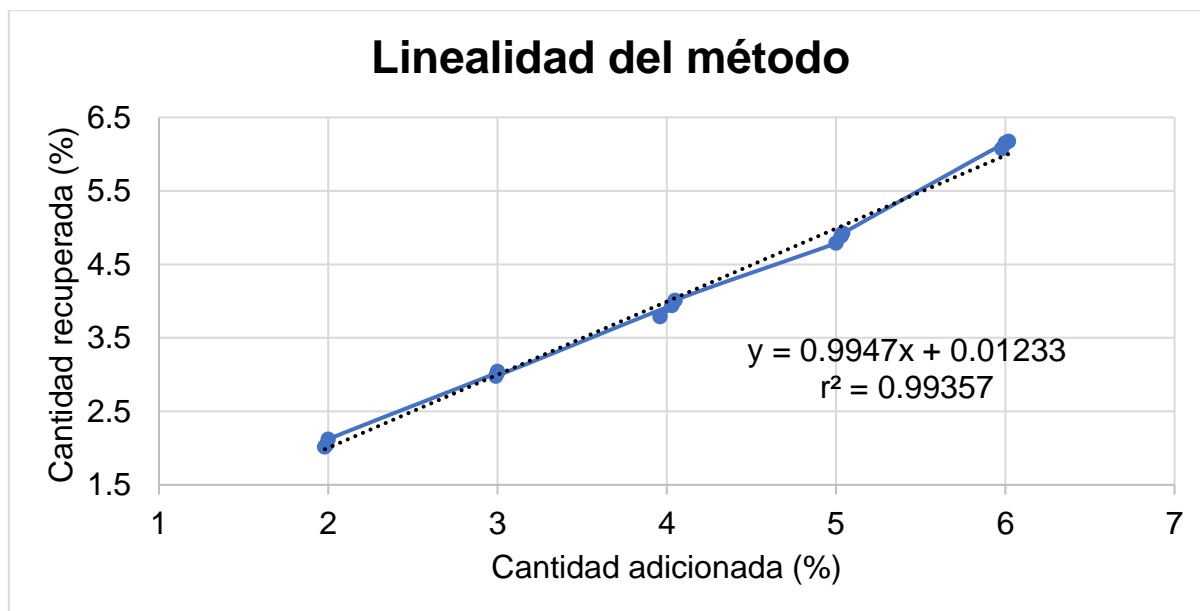


Figura 18. Linealidad del método (Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada)

En el Cuadro 9 se presentan los parámetros estadísticos de la linealidad del método empleando datos de Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada

Cuadro 9. Parámetros estadísticos de la linealidad del método (Cantidad adicionada vs. Cantidad recuperada)

Parámetro estadístico	Resultado experimental	Criterio de aceptación
Pendiente	0.9947	
Ordenada al origen	0.01233	
Coefficiente de determinación (r^2)	0.99357	$r^2 > 0.98$
Intervalo de confianza para la pendiente IC(β_1)	[0.943998 a 1.0454012]	Debe incluir la unidad
Intervalo de confianza para la ordenada al origen IC(β_0)	[-0.201115 a 0.229775]	Debe incluir al cero
$CV_{y/x}$	3.22%	No mayor al 3%

- Porcentaje de recobro

En el Cuadro 10 se presentan los parámetros estadísticos de la linealidad del método empleando el porcentaje de recobro.

Cuadro 10. Parámetros estadísticos de la linealidad del método (recobro)

Parámetro estadístico	Resultado experimental	Criterio de aceptación
Intervalo de confianza para la media IC(μ)	[98.52838 a 101.791617]	El promedio del % de recobro debe incluir al 100%
Coefficiente de variación (CV)	2.94%	Intervalo entre 97-103% No mayor al 3%

En la figura 19 se presenta la curva de calibración de la linealidad del método.

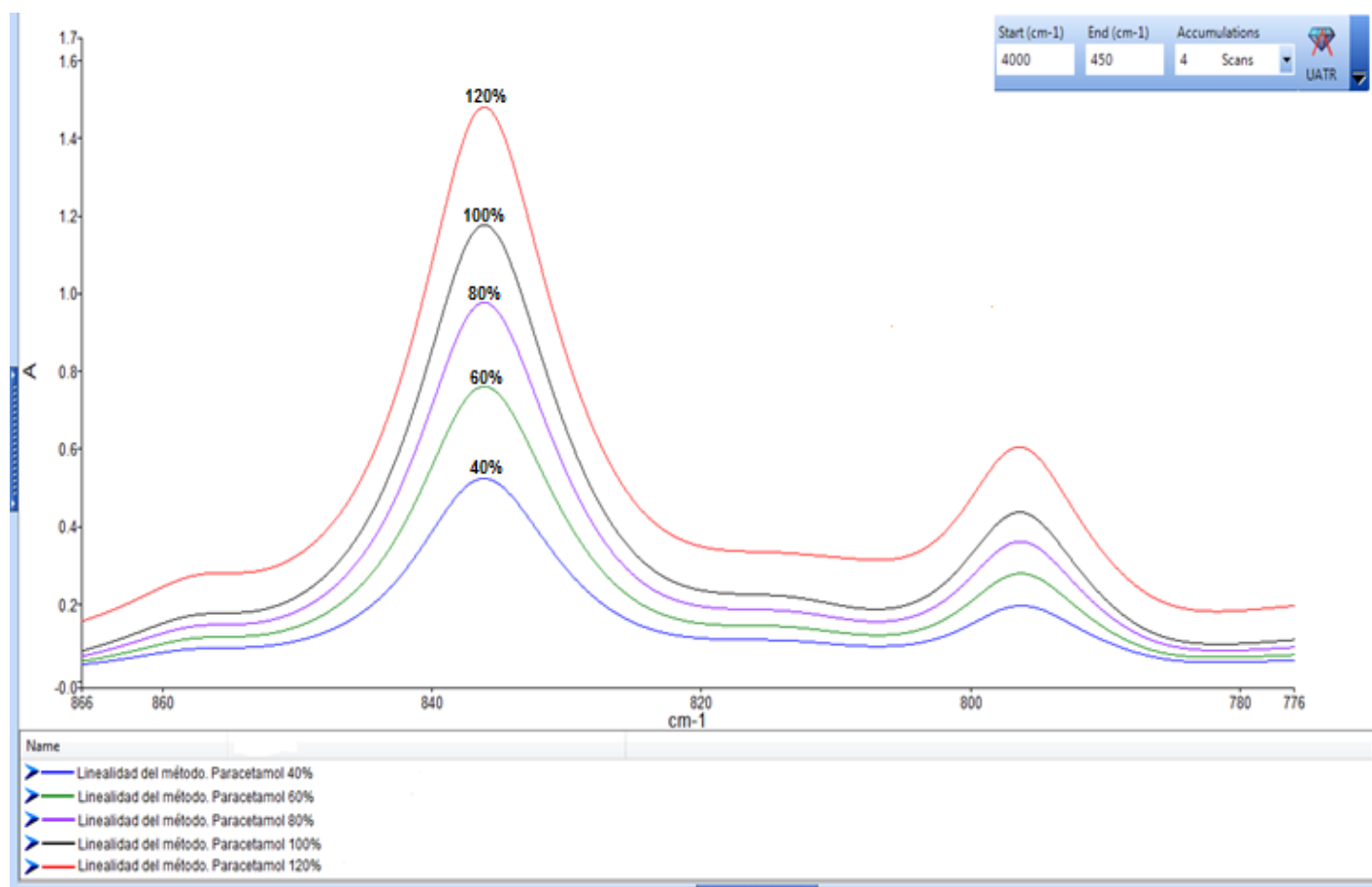


Figura 19. Curva calibración de la linealidad del método

3.5 Exactitud del método

En el Cuadro 11 se presentan los resultados de la exactitud del método.

Cuadro 11. Resultados de la exactitud del método

Cantidad adicionada (%)	Cantidad recuperada (%)	Recobro (%)
5.00	4.95	99.04
5.00	4.99	99.98
5.00	4.97	99.51
5.17	5.27	102.05
5.09	5.26	103.43
5.00	4.99	99.98

En la Figura 20 se presenta la gráfica de la exactitud del método.

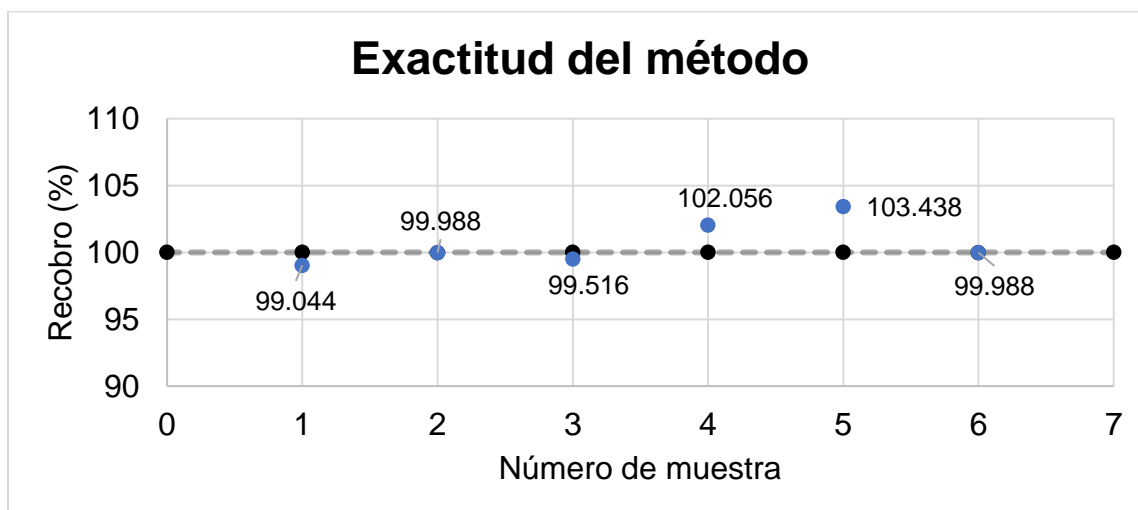


Figura 20. Exactitud del método

En el Cuadro 12 se presentan los parámetros estadísticos de la exactitud del método.

Cuadro 12. Parámetros estadísticos de la exactitud del método

Parámetro estadístico	Resultado experimental	Criterio de aceptación
Media (\bar{x})	100.67	
Desviación estándar (S)	1.70227	
Intervalo de confianza para la media IC(μ)	[98.7553 a 102.5879]	El promedio del % de recobro debe incluir al 100%
Coeficiente de variación (CV)	1.69%	Intervalo entre 97-103% No mayor al 3%

3.6 Repetibilidad del método

En el Cuadro 13 se presentan los resultados de la repetibilidad del método.

Cuadro 13. Resultados de la repetibilidad del método

Cantidad adicionada (%)	Cantidad recuperada (%)	Recobro (%)
5.00	4.95	99.04
5.00	4.99	99.98
5.00	4.97	99.51
5.17	5.27	102.05
5.09	5.26	103.43
5.00	4.99	99.98

En el Cuadro 14 se presentan los parámetros estadísticos de la repetibilidad del método.

Cuadro 14. Parámetros estadísticos de la repetibilidad del método

Parámetro estadístico	Resultado experimental	Criterio de aceptación
Media (\bar{x})	100.67	
Desviación estándar (S)	1.70227	
Intervalo de confianza para la media IC(μ)	[98.7553 a 102.5879]	El promedio del % de recobro debe incluir al 100%
Coeficiente de variación (CV)	1.69%	Intervalo entre 97-103% No mayor al 3%

3.7 Reproducibilidad del método

En el Cuadro 15 se presentan los resultados de la precisión intermedia del método,

Cuadro 15. Resultados de la precisión intermedia del método

Analista	Día	Resultado (Abs)	CV (%)	Criterio de aceptación
1	1	1.1646 1.1679 1.1727	0.348%	CV menor al 3%
1	2	1.1554 1.2177 1.1955	2.624%	
2	1	1.1606 1.2059 1.1758	1.952%	
2	2	1.1738 1.2106 1.1848	1.587%	
			CV _T = 1.751%	

- Análisis de varianza Precisión Intermedia

		Día (j)		
		j=1	J=2	Y _{i..}
Analista (i)	i=1	1.1646	1.1554	7.0738
		1.1679	1.2177	
		1.1727	1.1955	
		3.5052	3.5686	
i=2	1.1606	1.1738	7.1115	
	1.2059	1.2106		
	1.1758	1.1848		
	3.5423	3.5692		
	Y _{.j}	7.0475	7.1378	Y _{...} 14.1853

Modelo

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + e_{k(ij)}$$

$$i = 1, 2, \dots, a \quad a=2$$

$$j = 1, 2, \dots, b \quad b=2$$

$$k = 1, 2, \dots, r \quad r=3$$

En el Cuadro 16 se presenta el análisis de varianza de la precisión intermedia del método.

Cuadro 16. Tabla de análisis de varianza de la precisión intermedia del método

Fuente	Producto simbólico	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F_{calculada}	F_{tablas}
A _i	i-1	0.00011844	1	0.00011844	0.33	(0.13 - 7.57)
D _j	j-1	0.00067951	1	0.00067951	1.90	
AD _{ij}	(i-1) (j-1)	0.00106286	1	0.00106286	2.98	
e _{k(ij)}	l _j (k-1)	0.00285206	8	0.000356507		
Total	ljk - 1	0.00471287	11			

3.8 Límite de detección y límite de cuantificación

En el Cuadro 17 se presentan los resultados de la determinación del límite de cuantificación y límite de detección.

Cuadro 17. Determinación del límite de detección y límite de cuantificación para una muestra de Paracetamol al 1%

Respuesta (Abs)			Límites	
0.2772	0.2774	0.2772	Límite de detección (3S)	0.000304379%
0.2774	0.2773	0.2773		
0.2774	0.2773	0.2772		
0.2775	0.2773	0.2773	Límite de cuantificación (10S)	0.001014599%
0.2775	0.2772	0.2773		
0.2774	0.2772	X=0.27731 S=1.014599 ⁻⁴		

4. MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDAD

Se obtuvieron los espectros en el infrarrojo de las muestras de Paracetamol sometidas a hidrólisis ácida e hidrólisis básica. Dichos espectros se presentan a continuación. (Figuras 21 y 22)

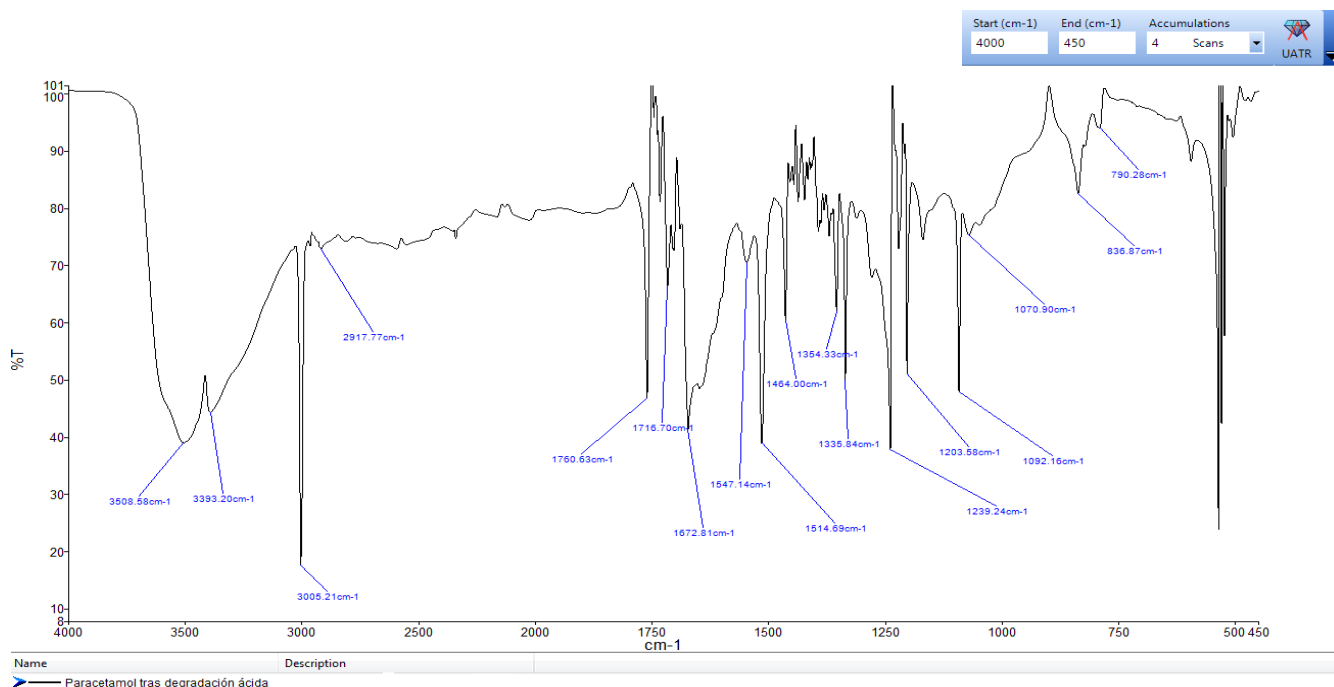


Figura 21. Espectro de infrarrojo de la hidrólisis ácida del paracetamol

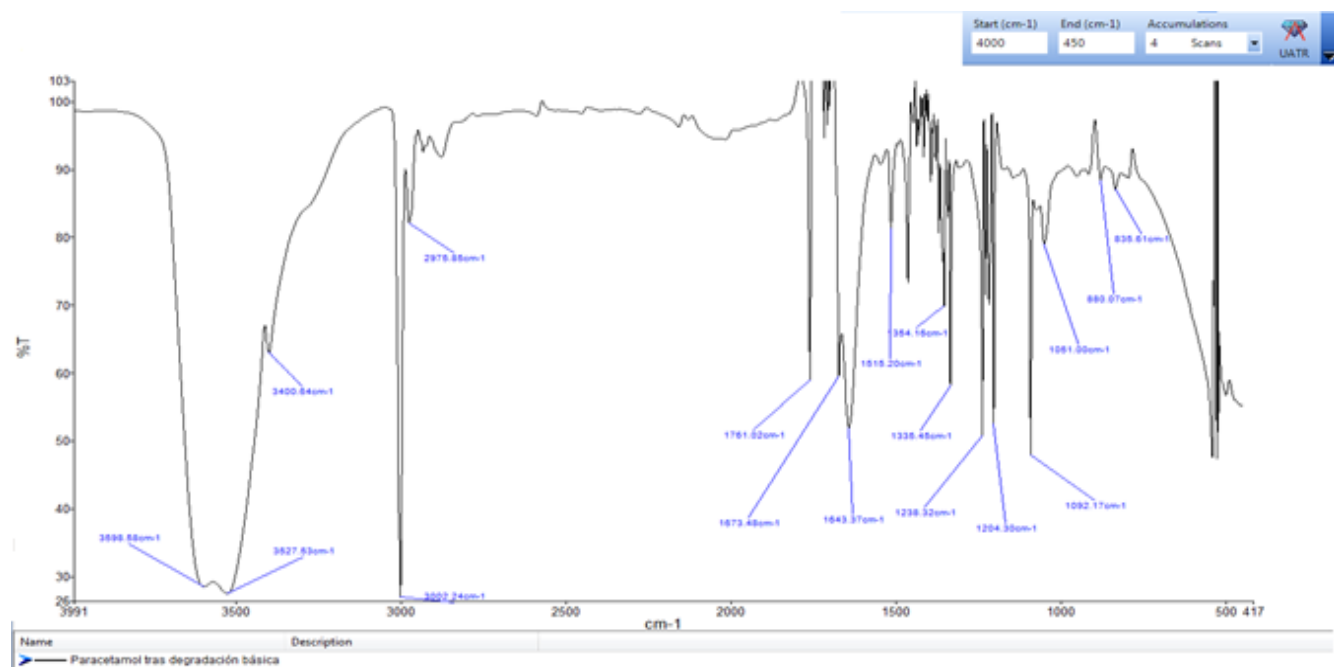


Figura 22. Espectro de infrarrojo de la hidrólisis básica del paracetamol

En la Figura 23 se muestra la comparación entre los espectros en el infrarrojo del Paracetamol, el Paracetamol tras la hidrólisis ácida y tras la hidrólisis básica.

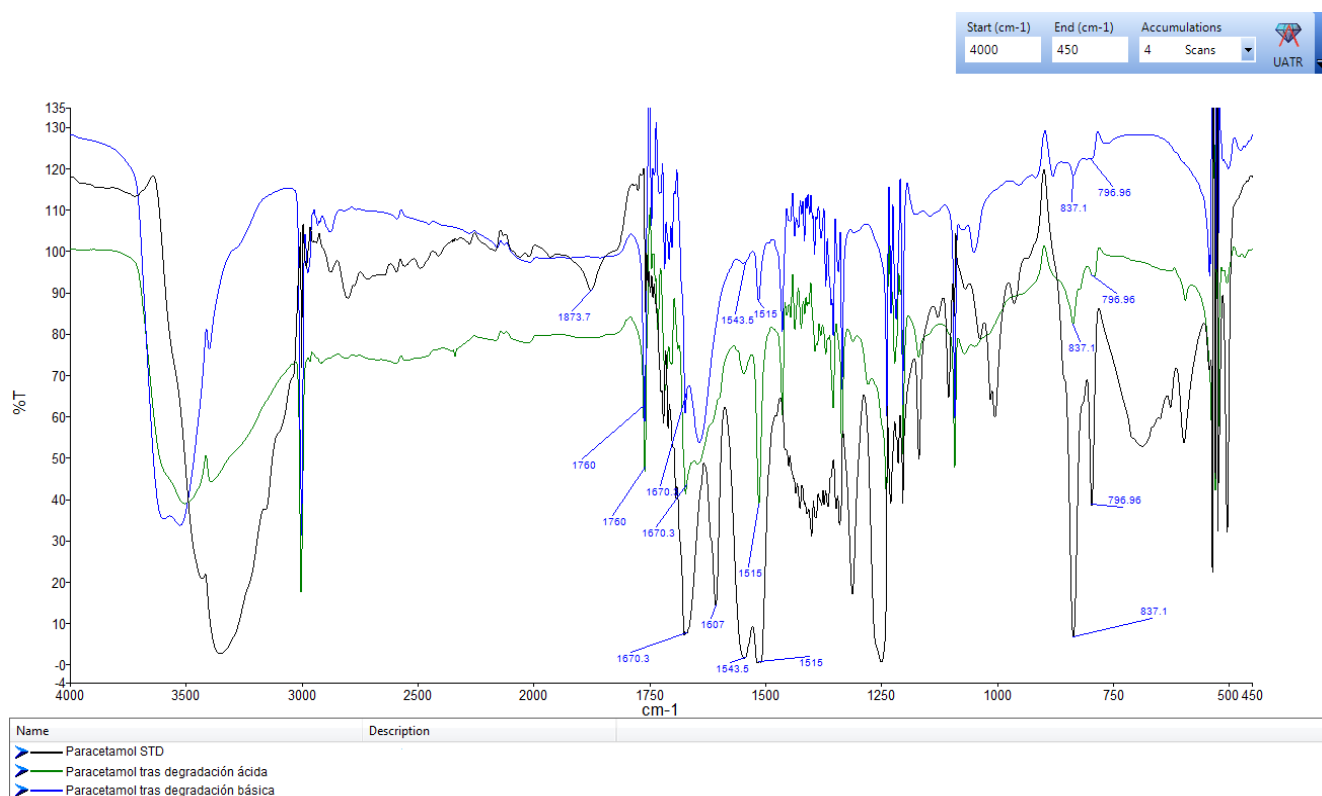


Figura 23. Espectro de infrarrojo del paracetamol, paracetamol tras hidrólisis ácida y paracetamol tras hidrólisis básica

En el Cuadro 18 se resumen las señales obtenidas tanto para el Paracetamol como para los productos resultantes tras su degradación ácida o básica.

Cuadro 18. Señales presentadas tras la degradación ácida y básica del Paracetamol

		Señal (cm ⁻¹)		%T
Paracetamol STD	Aromático	Enlace C-H	3002.89	72.00
		Enlace C=C	1607.47	14.52
			1546.43	1.75
			1518.58	0.62
			1510.06	0.79
		2 H adyacentes	836.22	6.71
	Amida	Fenol	1204.00	39.15
			1340.42	33.89
		Carbonilo	1675.92	7.35
	Enlace N-H	3353.44	2.89	

Paracetamol tras degradación ácida	Aromático	Enlace C-H	3005.21	17.72
		Enlace C=C	1514.69	39.02
			1464.00	60.62
			1436.96	81.13
			1423.18	81.56
		2 H adyacentes	836.87	82.65
	Fenol	1203.58	51.16	
		1335.84	50.09	
Amida	Carbonilo	1672.81	41.36	
	Enlace N-H	3508.58	39.14	
		3393.20	44.44	
Paracetamol tras degradación básica	Aromático	Enlace C-H	3002.24	31.37
		Enlace C=C	1515.24	88.08
			1464.03	80.76
		2 H adyacentes	No presentes	
		Fenol	1204.30	63.15
		1335.45	66.89	
	Amida	Carbonilo	No presente	
		Enlace N-H	3527.38	33.84
Quinona	Carbonilo	1643.51	53.82	

Para la hidrólisis ácida se obtuvo que la degradación generó como producto el p-aminofenol, pues se mantuvo la señal característica de la vibración de deformación o bending del enlace C-H del anillo aromático con 2 hidrógenos adyacentes, la cual se encuentra entre 860 y 800 cm^{-1} , y cuya longitud de onda exacta a 836 cm^{-1} es la empleada para la cuantificación de Paracetamol por el método desarrollado. Sin embargo, la señal era menos intensa que antes de la degradación. Esto mismo ocurre con las señales del fenol y de la amida, en las que siguen presentándose las señales características pero absorbancias menores, lo que indica que ocurrió la hidrólisis de Paracetamol a p-aminofenol, pero que existen aún restos de la amida que no fue hidrolizada a amina. (Figura 24).^{34, 40}

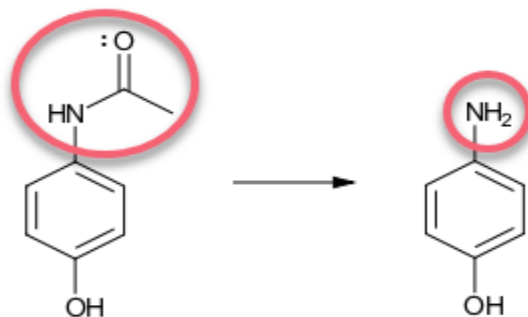


Figura 24. Hidrólisis del grupo amida

Para el caso de la hidrólisis básica, la señal característica de la vibración de deformación o bending del enlace C-H del anillo aromático con 2 hidrógenos adyacentes correspondiente a una longitud de onda de 836 cm^{-1} no se encuentra, así como la señal correspondiente al carbonilo de la amida a 1675 cm^{-1} .

Aún se encuentra presentes las señales de la amina y el hidroxilo de fenol, pero estas señales son incluso menos intensas que las presentadas en la hidrólisis básica.

El espectro obtenido presenta una señal a 1643.51 cm^{-1} que puede corresponder a una señal de 4-benzoquinona, lo que nos indicaría que el Paracetamol sufrió una reacción de oxidación hasta quinona (Figura 25).

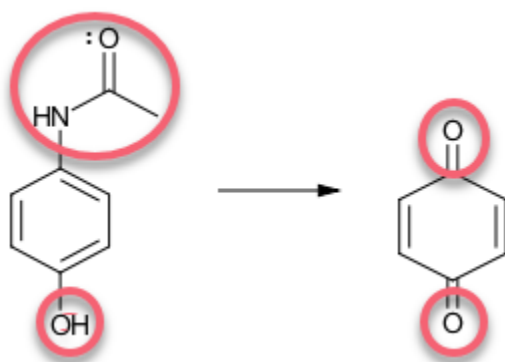


Figura 25. Oxidación del Paracetamol

5. EVALUACIÓN COSTO-BENEFICIO

Se evaluó el costo-beneficio del método desarrollado y se contrastó con el método por HPLC reportado en farmacopea. Los costos y tiempos aproximados se resumen en el Cuadro 19.

Cuadro 19. Evaluación del costo beneficio del método desarrollado^{41, 42, 43}

Método por Infrarrojo			Método por HPLC		
Reactivos					
Acetona	~ \$900/L	3 mL por muestra (12 mL totales)	Metanol	~ \$1700/L	~100 mL totales
			Agua	~ \$615/L	~200 mL
Materiales					
<ul style="list-style-type: none"> • 8 tubos de ensaye con tapa de rosca • 1 pipeta volumétrica 3 mL <ul style="list-style-type: none"> • Sonicador • Soporte universal • 4 embudos de vidrio • Papel filtro poro mediano 			<ul style="list-style-type: none"> • 4 matraces aforados 20 mL • 4 matraces aforados 25 mL <ul style="list-style-type: none"> • Micropipeta • Sonicador • Vórtex • 4 embudos de vidrio • Filtro de porosidad 0.5 µm 		
Tiempos					
Preparación de las disoluciones (pesado y disolución)	~20 min	Preparación de las disoluciones (pesado y disolución)	~25 min		
Agitación	20 min	Desgasificación de la fase móvil	~10 min		
Filtrado	~10 min	Agitación	15 min		
Limpieza de equipo y celda	~2 min	Filtrado	~20 min		
Lectura de muestras (4 muestras)	~2 min por muestra	Limpieza y acondicionamiento del equipo	~30 min		
		Adecuabilidad del sistema	~40 min		
		Lectura de muestras (6 muestras)	~8 min por muestra		
Lavado de celdas	~1 min	Lavado de columna	~15 min		
Total	61 minutos	Total	203 minutos		
Costos del instrumento					
Equipo e instrumento	~ \$100,000 a \$350,000	Equipo e instrumento	~ \$100,000 a \$300,000		
		Columna	~ \$12,000 a \$16,000		

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las tabletas seleccionadas cumplen con las características de calidad requeridas para someterse al estudio de acuerdo con los resultados mostrados en el Cuadro 3.

Para el desarrollo del método fue necesaria la elección de un disolvente adecuado, el cual fue la acetona. La elección del disolvente es muy importante en las determinaciones de IR, ya que algunos analgésicos como el Paracetamol se administran generalmente en dosis altas y el solvente seleccionado debe permitir que el fármaco se disuelva a un nivel de concentración bastante alto y, además, deben ser transparentes. rango medio-IR.⁴⁴

La acetona además de permitir la completa solubilidad del Paracetamol, tiene la característica de no presentar señales de absorción a la longitud de onda empleada para la cuantificación del Paracetamol, correspondiente a 839 cm^{-1} , lo cual lo convierte en un adecuado solvente para el método desarrollado al no interferir con la respuesta analítica.

La señal seleccionada a 836 cm^{-1} corresponde a la señal generada por los dos hidrógenos adyacentes al anillo aromático del Paracetamol, hidrógenos enlazadas al grupo -OH del fenol y al grupo NH-. Fue seleccionada esta señal debido a la nula interferencia del disolvente, y por presentar señales muy definidas.⁴⁰

Las concentraciones del 2.0 al 6.0% m/v generaban absorbancias comprendidas entre 0.5 y 1.4, siendo una absorbancia de 4.0 la máxima en la cual es espectrofotómetro IR genera respuestas que cumplen con la Ley de Lambert y Beer. Concentraciones superiores al 10% presentaban problemas de solubilidad que no permitían la correcta lectura, esto conforme a su clasificación de “soluble” reportada en farmacopea.¹⁹

En cuanto a la evaluación de los parámetros de desempeño se tiene lo siguiente:

Linealidad del sistema

Los resultados obtenidos demuestran la linealidad del sistema analítico. Estos resultados corresponden a una ecuación de la recta $Y = 0.2116X + 0.12419$; un coeficiente de correlación de 0.9972 y un intervalo de confianza para la pendiente comprendida entre 0.1906 y 0.2323. Estos resultados cumplen con los criterios de aceptación, siendo un coeficiente de correlación mayor a 0.98 y un intervalo de confianza que no incluya al cero.

Precisión del sistema

El coeficiente de variación obtenido experimentalmente es de 1.23%, siendo el límite de 1.5%, por lo que se concluye que la respuesta es precisa.

Linealidad del método

La ecuación de la recta obtenida para el método fue $Y = 0.9947X + 0.0123$; el coeficiente de correlación (r^2) de 0.9935; se obtuvo un intervalo de confianza para la pendiente comprendida entre 0.9439 y 1.0454 y un intervalo de confianza para la ordenada al origen de entre -0.2011 y 0.2297. Todos estos resultados corresponden a los criterios de aceptación de $r^2 > 0.98$, $IC(\beta_1)$ que incluye a la unidad e $IC(\beta_0)$ que incluye el cero. Sin embargo, el coeficiente de variación resultó de 3.22%, siendo el máximo 3%, esto puede ser debido a errores analíticos intrínsecos del analista, o durante la preparación de las muestras. Dichos errores pueden solucionarse al optimizar la preparación de las muestras, empleando un método de agitación que permita la completa solubilización del Paracetamol, y cuya solubilización sea la misma en todas las muestras procesadas.

Por otro lado, respecto al porcentaje de recobro, el coeficiente de variación obtenido fue de 2.94%, siendo 3.0% el máximo, y el intervalo de confianza para la media se encuentra entre 98.5283 y 101.7916, que se encuentra entre el 97 y 103% establecido. Por lo que el método es lineal.

Exactitud del método

El intervalo de confianza para la media se encuentra entre 98.7553 y 102.5879, siendo el criterio de aceptación de entre 97 y 103%. A su vez, el coeficiente de variación de las respuestas es de 1.69, menor que el 3% máximo, por lo tanto, el método es exacto.

Repetibilidad del método

El intervalo de confianza para la media se encuentra entre 98.7553 y 102.5879, siendo el criterio de aceptación de entre 97 y 103%. A su vez, el coeficiente de variación de las respuestas es de 1.69, menor que el 3% máximo, por lo tanto, el método es preciso.

Reproducibilidad del método

Los coeficientes de variación de las interacciones entre dos diferentes analistas y dos diferentes días son menores al 3% permitido. Para asegurar la completa interpretación de los resultados, se realizó un análisis de varianza, obteniéndose F calculadas de 0.33 para el analista, 1.90 para el día y 2.98 para la interacción, y siendo F de tablas de 7.57. Al ser cada F calculada menor a F de tablas, el método tiene precisión intermedia.

Fueron obtenidos resultados satisfactorios para demostrar el adecuado funcionamiento del método. Esto nos da la conclusión de que el método es apto para su uso como control de calidad de tabletas de Paracetamol.

Indicativo de estabilidad

En cuanto a la evaluación del método como indicativo de estabilidad se observó que la degradación ácida mantenía la señal de los dos hidrógenos adyacentes del anillo aromático, a su vez que la señal del carbonilo de la amida decrecía en intensidad y se presentaban las señales de la amina, siendo esto prueba de la hidrólisis del Paracetamol a *p*-aminofenol.

En cuanto a la degradación básica no sólo no se presentó la señal del carbonilo de la amida, tampoco estaban presentes la señal de los dos hidrógenos adyacentes y la del hidroxilo de fenol. En este espectro se halló una señal a 1643.51 cm^{-1} que corresponde a un carbonilo de quinona, lo que puede ser prueba de una reacción de oxidación del Paracetamol a benzoquinona.

Al encontrarse todos estos compuestos y poder ser diferenciados a través de las señales del espectro, es posible emplear el método desarrollado como método indicativo de estabilidad.^{34, 35, 40}

Evaluación costo-beneficio

Tras la evaluación costo-beneficio se puede observar que existe un ahorro de tiempo por parte del método desarrollado en comparación del método por HPLC, esto repercute en el hecho de menor gasto de energía, y menor tiempo empleado por el analista. Así mismo, el principal beneficio del método desarrollado por espectroscopía en el infrarrojo es el considerable ahorro de disolvente, siendo el gasto aproximadamente 15 veces menor que el método descrito en farmacopea. Este ahorro de disolvente no implica sólo un ahorro económico, sino además menor generación de desechos, menor empleo de insumos y por tanto la posibilidad de desarrollar el método a pequeña escala, siendo todas estas conformes al enfoque de la química verde.

VIII. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico para la cuantificación de Paracetamol en tabletas por espectroscopía en el infrarrojo medio que cumple con los parámetros de desempeño evaluados, demostrando que se trata de un método lineal, preciso, exacto y específico, y por tanto es un método apto para su uso en el análisis farmacéutico como control de calidad.

Se demostró que el método desarrollado puede ser empleado como un método indicativo de estabilidad, para monitorear la estabilidad del Paracetamol en tabletas.

Se evaluó el costo-beneficio del método desarrollado en comparación con el método farmacopeico, encontrándose una ventaja tanto económica como en ahorro de tiempo y energía por parte del método por espectroscopía en el infrarrojo. A su vez se demostró que existe un ahorro de disolvente, lo cual repercute en una menor generación de desechos, y lo cual está conforme con los principios de la química verde.

Finalmente, se sugiere utilizar el método por espectroscopía en el infrarrojo como un método alternativo al reportado en farmacopea.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González M, Montaña L. La espectroscopia y su tecnología: Un repaso histórico y su importancia para el siglo XXI Ciudad de México: Instituto Politécnico Nacional; 2015.
2. Atkins W. Principios de química: Los caminos del descubrimiento Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006
3. Othmer K. Encyclopedia of Chemical Technology. Quinta ed. Stuart B, editor. New York: John Wiley & Sons; 2005.
4. Skoog D, Holler F, Crouch S. Principios de Análisis Instrumental. 6th ed. México: Cengage Learning; 2008.
5. Skoog D, West D, Holler F, Crouch S. Fundamentos de Química Analítica. 8th ed. México: Cengage Learning; 2005.
6. Vincent J. Fundamentals of Infrared Detector Operation and Testing New York: Wiley; 1990.
7. Watson D, Edrada-Ebel R, Patel B. Pharmaceutical Analysis. A Textbook of Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemist. 4th ed. China: ELSEVIER; 2017.
8. Aaltonen J, Gordon K, Strachan C, Rades T. Perspectives in the use of spectroscopy to characterise pharmaceutical solids. International Journal of Pharmaceutics. 2008; 354(1): p. 159-169.
9. Fuentes-Navarta M, Bosch C, Sánchez R. Aplicación de la Espectroscopia del IR-medio en Química Analítica de Procesos. Bol Soc Quím Méx, Sociedad Química de México. 2008; 2(3): p. 93-113.
10. Latif S, Abbas N, Hussain A, Arshad M, Bukhari N, Afzal H. Development of Paracetamol-caffeine co-crystals to improve compressional, formulation and in vivo performance. Drug development and industrial pharmacy. 2018; p.1-10.
11. Jurček O, Lahtinen M, Wimmer Z, Drašar P, Kolehmainen E. Crystallization, spectral, crystallographical, and thermoanalytical studies of succinobucol polymorphism. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012; 101(5): p. 1794-1802.
12. Van Eerdenbrugh B, Taylor L. Application of mid-IR spectroscopy for the characterization of pharmaceutical. International Journal of Pharmaceutics. 2011; 417(1): p. 3-16.
13. Smith B. Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. 2nd ed. New York: CRC Press; 2011.
14. Comisión de Validación de Métodos Analíticos. Guía de Validación de Métodos Analíticos Ciudad de México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México; 2002.
15. Centro Nacional de Metrología. Métodos Analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para la Validación de métodos y temas relacionados. Publicación técnica CNM-MRD-PT-030. 2nd ed. Querétaro, México: Centro Nacional de Metrología; 2005.

16. Chauhan A, Mittu B, Chauhan P. Analytical method development and validation: a concise review. *J Anal Bioanal Tech.* 2015; 6(1): p. 233-237.
17. Hernández V, Sánchez E. Introducción a la validación de métodos analíticos para el laboratorio farmacéutico de control de calidad Ciudad de México: UNAM. PAPIME PE200815; 2017.
18. Nethercote P, Ermer J. Quality by Design for Analytical Methods: Implications for Method Validation and Transfer. *Pharm Tech.* 2012; 36(10): p. 74-49.
19. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11th ed. Ciudad de México: Secretaría de Salud; 2015.
20. ICH Expert Working Group. Validation of analytical methods. Text and methodology Q2(R1). International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. [Online].; 2005. Acceso 28 de agosto de 2018. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.
21. González A, Herrador M. A practical guide to analytical method validation. Including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem.* 2007; 26(3): p. 227-238.
22. Ermer J, Miller J. Method validation in pharmaceutical analysis, a guide to best practice New York: Wiley; 2005.
23. United States Food and Drug Administration. Current good manufacturing practices for finished pharmaceuticals. Code of Federal Regulations. Title 21. Chapter I. [Online]; 2016. Acceso 22 de Agosto de 2018. Disponible en: <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/21/820.3>.
24. Convention TUSP. The United States Pharmacopeia. 39th ed. Rockville, Maryland: The United States Pharmacopeial Convention; 2015.
25. Brunton L, Chabner A. Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. EE.UU: McGraw-Hill; 2011.
26. Bertolini A, Ferrari A, Ottani AGS, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: New vistas of and old drug. *CNC Drugs Review.* 2006;(12): p. 250-275.
27. Ali Mallah M, Sherazi S, Bhangar M, Bajeer M. A rapid Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopic method for. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and.* 2015; 141(1): p. 64-70.
28. Chiam E, Weinberg L, Bellomo R. Paracetamol: a review with specific. *Heart, Lung and Vessels.* 2015; 7(2): p. 121-132.
29. Fujiwara M, Chow S, Ma D, Braatz R. Paracetamol Crystallization Using Laser Backscattering and ATR-FTIR Spectroscopy: Metastability, Agglomeration, and Control. *Crystal Growth & Design.* 2001; 2(5): p. 363-370.
30. Moffat A, Osselton D, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3rd ed. Londres, Inglaterra: Pharmaceutical Press; 2004.
31. Lunn G, Schmuff N. HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis New York: John Wiley & Sons; 1997.

32. O'Neil M. The Index Merck. 6th ed. New York: Whitehouse Station; 2006.
33. Florey K. Analytical Profiles of Drug Substances USA: Board; 1985.
34. Racz I. Drug Formulation. 1st ed. Hungría: John Wileyand Sons; 1989.
35. Yoshioka S, Stella V. Stability of Drugs and Dosage Forms New York: Kluwer Academic Publisher; 2002.
36. Mc Murry J. Química Orgánica. 7th ed. México: GENGAGE Learning; 2008.
37. Castillo I. Fortalecimiento de la formación profesional en el análisis instrumental (IR). PAPIME PE206115. [Online]; 2018. Acceso 3 de Agosto de 2018. Disponible en: <https://papimepe206115feszunam.wordpress.com/2017/04/12/Paracetamol/>.
38. Secretaría de Salud. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Comunitado: "Uso Seguro para Consumidores de Paracetamol". [Online]; 2015. Acceso 16 de Agosto de 2018. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/154636/Comunicado_Uso_Seguro_para_Consumidores_de_Paracetamol.pdf.
39. The Department of Healt, Social Services and Public Safety. British Pharmacopoeia. 8th ed. London: Crown; 2008.
40. Bellamy L. The Infrared Spractra of Complex Molecules New York; 1975.
41. Baker, J. T. Fisher Scientific. [Online] Acceso 6 de mayo de 2019. Disponible en: <https://www.fishersci.es/es/es/brands/IPF8MGDA/jt-baker.html>.
42. Waters. Waters. The Science of What's Possible. [Online] Acceso 6 de mayo de 2019. Disponible en: <https://www.waters.com/waters/home.htm?locale=103>.
43. Merck. Is now Merck. [Online] Acceso 6 de mayo de 2019. Disponible en: http://www.merckmillipore.com/MX/es/products/vMqb.qB.GdEAAAE_Mhd3.Lxj.nav.
44. Bouhsain Z, Garrigues S, De la Guardia M. Simultaneous Stopped-flow Determination of Paracetamol, Acetilsalicylic Acid and Caffeine in Pharmaceutical Formulations by Fourier Transform Infrared Spectrometry With Partial Least-squares Data Treatment. The Analyst. 1996; 121(12): p. 1935-1938.
45. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namies´nik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic. Trends in Analytical chemistry. 2013; 50: p. 78-84.

ANEXO 1. DOCE PRINCIPIOS DE LA QUÍMICA VERDE

La idea de la química verde tiene sus raíces en el desarrollo sustentable. Las primeras actividades emprendidas por químicos para la sustentabilidad se centraron en procesos y productos a escala industrial. Los inicios de la química verde estuvieron dominados por el tema de la síntesis orgánica verde en diferentes ramas de la industria química, especialmente la industria farmacéutica.⁴⁵

La química analítica verde se refiere al papel de los químicos analíticos en hacer que las prácticas de laboratorio sean más amigables con el medio ambiente. Además del desarrollo en instrumentación y metodologías, que son necesarias para mejorar la calidad de los análisis químicos, se están realizando esfuerzos para reducir el impacto negativo de los análisis químicos en el medio ambiente y para permitir la implementación de principios de desarrollo sustentable en laboratorios analíticos.

En 1998, Anastas y Warner formularon los 12 principios de la química verde. diseñados para satisfacer las necesidades de la química sintética, y entre los cuales algunos pueden ser empleados para la química analítica.

Los 12 principios se enumeran a continuación:

1. Se deben aplicar técnicas analíticas directas para evitar el tratamiento de la muestra.
2. El tamaño mínimo de la muestra y el número mínimo de muestras son objetivos.
3. Se deben realizar mediciones in situ.
4. La integración de los procesos y operaciones analíticas ahorra energía y reduce el uso de reactivos.

5. Se deben seleccionar métodos automatizados y miniaturizados.
6. Se debe evitar la derivación.
7. Debe evitarse la generación de un gran volumen de residuos analíticos y debe proporcionarse una gestión adecuada de los residuos analíticos.
8. Se prefieren los métodos multi-analito o multi-parámetro versus métodos que usan un analito a la vez.
9. El uso de energía debe ser minimizado.
10. Los reactivos obtenidos de fuentes renovables deben ser preferidos.
11. Los reactivos tóxicos deben ser eliminados o reemplazados.
12. La seguridad del operador debe ser aumentada.