



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
CUAUTITLÁN**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAR CONTENIDO QUÍMICO Y EVALUAR PERFILES DE
DISOLUCIÓN DE TABLETAS DE ACETAMINOFÉN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

ROSA ISELA ARANDA GONZÁLEZ

ASESOR:

DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO

COASESOR:

QFB. JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**
Desarrollo y validación de un método analítico para determinar contenido químico y evaluar perfiles de disolución de tabletas de acetaminofen.

Que presenta la pasante: **Rosa Isela Aranda González**
Con número de cuenta: **40509071-2** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de abril de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez	
VOCAL	Dra. Raquel López Arellano	
SECRETARIO	Dr. José Juan Escobar Chávez	
1er SUPLENTE	QFB. Adriana Gil García	
2do SUPLENTE	QFB. Patricia Jeane Domínguez Quiñones	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo representa la culminación de muchos sueños, anhelos, esfuerzos, desveladas, trabajo y sobre todo de muchos años intentando conseguir lo que alguna vez creí imposible. Y esta dedicado a los grandes amores de mi vida, mis hijos Uriel y David que han sido mis principales motores para continuar a pesar de los obstáculos y las adversidades; este trabajo es para ustedes que son mi fuerza, mi luz y mi corazón.

Agradezco a mi madre Guillermina González quien a sido mi mas grande impulso, inspiración y soporte a lo largo de toda mi vida y mi carrera, ya que sin su apoyo este trabajo habría sido imposible de realizar. Gracias por ser mi madre y por todo tu inmenso amor.

Así mismo a mis hermanos Oswaldo Aranda González y Julio Cesar Aranda González que me han apoyado y me han ayudado a lo largo de toda mi vida, así como en la realización de todo este proyecto. Gracias por su cariño, apoyo, comprensión y por todas las veces que los he necesitado y no me han abandonado.

Agradezco a mi prima Adriana Hernández González que estuvo conmigo y me apoyo en momentos difíciles, te quiero mucho, sin ti este trabajo no se hubiera podido realizar y lo que has hecho por mi siempre te lo recordare y lo llevare conmigo en mi corazón.

Agradezco a la Señora Cristina Trejo Álvarez por ser mi apoyo en todo momento, por abrirme las puertas de su casa y su corazón, por ayudarme siempre que la he necesitado; de verdad que usted a sido un pilar muy importante en la culminación de todo este largo recorrido. Igualmente un merecido reconocimiento con todo mi cariño al Señor Fidencio Anaya Hernández, a Gisela Anaya Trejo, Arturo Anaya Trejo, Araceli Anaya Trejo y Víctor Anaya Trejo gracias por todo su cariño y apoyo.

Agradezco de todo corazón a la Dra. Raquel López Arellano y al DAR Juan José Díaz Esquivel por el apoyo, por darme las herramientas necesarias para la realización de este trabajo, por la confianza que han depositado en mi y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y del LEDEFAR.

Un enorme agradecimiento a mi asesor el QFB. José Antonio Garduño Rosas por todo su apoyo, su ayuda, sus consejos, por compartir sus conocimientos y su experiencia, que sin duda alguna fueron

la base de todo este proyecto. Igualmente a la M. en C. Elvia Adriana Morales Hipólito por brindarme su amistad, su apoyo y sus consejos que fueron de gran ayuda.

A todos mis compañeros tesis de LEDEFAR Mariana Dolores, Fernanda Medina, Salvador Martínez, Felipe Sánchez y Julio Zempoaltecatl que compartieron y me brindaron su amistad, me acompañaron durante todo el trayecto de este trabajo, gracias por todos esos momentos de alegrías, risas, pláticas, apoyo y enojos.

A todos mis amigos de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán que tuve la dicha de conocer; Luis Rodríguez, Araceli Zavala, Gabriela Monroy, Julio Jiménez, Betsa Segura, Juan Carlos Manuel, Mariana Fortanelly, Daniel Castro, Iván Alcántara, Alberto Vega, Susana Cid y David Antonio Hernández; gracias por compartir horas de clases, laboratorios, desveladas, trabajos, tardes de estudio, desayunos, comidas, cenas, alegrías, tristezas y muchos recuerdos inolvidables.

También a mis maravillosos profesores que me apoyaron e inundaron mi mente con sus conocimientos M. en C. Enrique Ramos López, Dr. José Juan Escobar Chávez, Dra. Luisa Martínez Aguilar, Miriam Aidé Castillo Rodríguez, DESS Rodolfo Cruz Rodríguez, Arcadia Hernández Beltrán, QFB María Esther Revuelta Miranda, QFB Jonathan Pablo Paredes Juárez, Dra. Elizabeth Piñón Segundo y el Dr. David Quintanar Guerrero que me brindaron ayuda cuando lo necesite, gracia por las arduas jornadas de trabajo en clases y los laboratorios, y por todos los buenos momentos.

Finalmente agradezco a la persona más maravillosa que he conocido; Oscar Anaya Trejo eres mi fuerza, gracias por darme ánimos en los peores momentos, por apoyarme siempre de manera incondicional, por estar a mi lado no solo para ayudarme si no para llenarme de energía y felicidad. Gracias por todo tu amor, tu comprensión, tu paciencia, tu ayuda, tus palabras, tus regaños y hasta por hacerme enojar. Gracias por ser mi pareja porque todo lo que he logrado y todo lo que soy ha sido gracias a ti y ha sido por ti.

Todos y cada uno de ustedes han sido una pieza clave para llegar hasta este punto, la culminación de toda una vida de estudios, de lucha y de esfuerzo... Gracias a todos por estar conmigo al final de este trayecto que hoy termina y espero continúen a mi lado para darle la bienvenida a una nueva etapa de mi vida que hoy comienza.

PENSAMIENTOS

“No estudio por saber mas, sino para ignorar menos”.

Sor Juana Inés de la Cruz

*“Nada esplendido ha sido creado jamás con sangre fría.
Hace falta calor para forjar,
y cada gran logro es el resultado de un corazón en llamas”.*

Arnold H. Glasgow

*“Cuando yo tenía 5 años, mi madre siempre me decía
Que la felicidad era la clave para la vida.
Cuando fui a la escuela me preguntaron que quería ser
cuando fuera grande y escribí... FELIZ.
Me dijeron que yo no entendía la pregunta...
Yo les dije que ellos no entendían la vida...”*

John Lennon

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	IV
Introducción.....	V
Objetivos.....	VII
	Página
1 Marco Teórico.....	1
1.1 Acetaminofén	2
1.1.1 Características Generales.....	2
1.1.2 Propiedades Químicas.....	2
1.1.3 Naturaleza Química y Constante de Disociación.....	3
1.1.4 Espectro Ultravioleta.....	3
1.1.5 Solubilidad y Polimorfismo.....	3
1.1.6 Farmacocinética y Farmacodinamia.....	4
1.1.7 Efectos adversos.....	4
1.2 Sistema Clasificación Biofarmacéutica.....	5
1.3 Análisis Multivariado.....	7
1.3.1 Métodos de Calibración Multivariante.....	8
1.3.2 Ventajas de la Calibración Multivariante.....	8
1.3.3 Fundamento de los Métodos de Análisis Multivariante.....	9
1.4 Mínimos Cuadrados Parciales.....	13
1.4.1 Algoritmo para Mínimos Cuadrados Parciales.....	14
1.4.1.1 Etapa de Calibración.....	15
1.4.1.2 Etapa de Predicción.....	17
1.5 Validación.....	19
1.5.1 Tipos de Validación.....	20
1.5.2 Validación de Métodos Analíticos.....	21
1.5.3 Tipos de Métodos Analíticos a ser Validados.....	22
1.6 Parámetros de Validación de Métodos Analíticos para la Determinación de Contenido Químico en Tabletas de Acetaminofén.....	23
1.6.1 Linealidad.....	24
1.6.2 Precisión.....	24
1.6.3 Validación del Sistema.....	25

1.6.3.1	Linealidad del sistema.....	25
1.6.3.2	Precisión del sistema.....	25
1.6.3.3	Especificidad.....	25
1.6.4	Validación del Método.....	26
1.6.4.1	Linealidad del Método.....	26
1.6.4.2	Precisión del método.....	26
1.6.4.3	Exactitud del método.....	27
1.6.4.4	Repetibilidad.....	27
1.6.4.5	Reproducibilidad.....	27
1.6.4.6	Robustez.....	27
1.7	Criterios de validación del método analítico para cuantificar Acetaminofén en perfiles de disolución.....	28
1.7.1	Adiciones estándar.....	28
1.7.2	Estabilidad de la muestra.....	29
1.7.3	Influencia del filtro.....	30
2	Desarrollo Metodológico.....	31
2.1	Diagrama de Actividades a realizar.....	32
2.2	Materiales y equipos.....	33
2.2.1	Sustancia de Referencia.....	33
2.2.2	Reactivos.....	33
2.2.3	Soluciones.....	33
2.2.4	Excipientes.....	33
2.2.5	Equipos.....	33
2.2.6	Softwares y Programas de computadora.....	34
2.2.7	Material de laboratorio.....	34
2.3	Preparación de soluciones.....	35
2.3.1	Procedimiento para realizar una solución de Ácido Clorhídrico (HCl) 0.1N.....	35
2.3.2	Procedimiento para realizar una solución de Búfer de Acetatos 0.05M, pH 4.5.....	35
2.3.3	Procedimiento para realizar una solución de Búfer de Fosfatos 0.05M, pH 6.8.	36

2.3.4	Procedimiento para realizar una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1N.....	36
2.4	Condiciones espectrofotométricas.....	37
2.4.1	Obtención de espectros de absorción.....	37
2.4.2	Determinación de longitudes de onda.....	42
3	Validación del Método Analítico.....	47
3.1	Validación del Método Analítico para la determinación de Contenido Químico en Tabletas de Acetaminofén.....	48
3.1.1	Linealidad del sistema.....	48
3.1.2	Precisión y exactitud del sistema.....	55
3.1.3	Linealidad del Método.....	57
3.1.4	Precisión y Exactitud del Método.....	61
3.1.5	Repetibilidad y Reproducibilidad del Método.....	64
3.1.6	Tolerancia.....	67
3.2	Validación del Método Analítico para cuantificar Acetaminofén en Perfiles de Disolución.....	68
3.2.1	Adiciones estándar.....	68
3.2.1.1	Linealidad del Método.....	69
3.2.1.2	Precisión y Exactitud.....	71
3.2.2	Influencia del Filtro.....	73
3.2.3	Estabilidad de la muestra.....	74
4	Conclusiones.....	76
5	Referencias.....	78
6	Anexos.....	83
	Anexo I. Validación del Método (Diluciones).....	84
	Anexo II. Pureza de la Materia Prima.....	90
	Anexo III. Monografía de Excipientes y Principio Activo.....	92
	Anexo IV. Aparato II de la USP (paletas).....	97
	Anexo V. Definiciones.....	99
	Anexo VI. Abreviaturas.....	100
	Anexo VII. Índice de Tablas.....	102
	Anexo VIII. Índice de Gráficos.....	105
	Anexo IX. Índice de Figuras.....	106

RESUMEN

En este trabajo experimental se desarrolló y validó un método analítico con la finalidad de lograr dos objetivos:

1. Determinar la cantidad de contenido químico en tabletas de Acetaminofén.
2. Cuantificar Acetaminofén en Perfiles de Disolución.

Se determinó que el método cumple con las características de validación establecidas por norma de linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y robustez.

Además, para el análisis de los datos obtenidos durante la validación, se utilizó una herramienta estadística de análisis multivariante de datos; en este caso se trabajó utilizando el Programa de Mínimos Cuadrados Parciales, tomando en consideración 13 longitudes de onda de lectura, seleccionadas a partir del espectro de absorción del Acetaminofén.

En la primera parte, se presentan las generalidades del trabajo como los conceptos básicos y toda la información previa necesaria que se debe tomar en consideración para el desarrollo de este trabajo.

La segunda parte contiene la información referente al desarrollo experimental como son: material, equipos, reactivos, soluciones y condiciones de análisis necesarias en la elaboración de este trabajo.

La tercera parte contiene los resultados y el análisis de los resultados, obtenidos en la validación del método, los cuales se presentan para cada criterio de validación evaluado. Estos resultados muestran los datos recabados a lo largo de la experimentación, los cuales son presentados por medio de gráficos, figuras y tablas.

INTRODUCCIÓN

La validación es uno de los objetivos de las Buenas Prácticas de Manufactura y que trata de conseguir un total dominio de la calidad. No aumenta la calidad pero si garantiza la fiabilidad y uniformidad de la misma. La validación está principalmente enfocada a ganar la confianza del cliente, dando resultados correctos y que se pueda demostrar que realmente son correctos.

La validación es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y atributos de calidad establecidos.

La validación de métodos analíticos nos permite saber el contenido químico de fármaco presente en una determinada forma farmacéutica, para asegurar la homogeneidad de dosificación, evitando así que se tengan problemas terapéuticos, como en el caso de una deficiencia en la dosis terapéutica o una posible dosis tóxica teniendo así un control terapéutico de las formas farmacéuticas.

Para la validación de métodos analíticos, se debe revisar que cumplan con ciertas características: exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, robustez e intervalo. Se realizó una serie de metodologías que cumplieran con los lineamientos establecidos en las normas; los datos obtenidos para cada prueba realizada se analizaron utilizando como herramienta de análisis de datos un método multivariante.

El análisis multivariante es una rama de la estadística y del análisis de datos que examina, interpreta y elabora los datos estadísticos sobre la base de un conjunto de variables que pueden ser cuantitativas o una mezcla de ambas.

Aunque el análisis multivariante es más comúnmente utilizado en muestras donde existe la presencia de varios analitos de interés. Se utilizó en el desarrollo y validación de este método analítico ya que presenta diversas ventajas como son:

- Mejorar la precisión y la exactitud del método analítico en comparación con la calibración univariante.
- Se puede cuantificar solo uno o varios componentes de una mezcla aún cuando no se conozcan todos los componentes presentes en dicha mezcla. Entre otras cosas.

Dentro de los métodos de análisis multivariante tenemos al Método de Mínimos Cuadrados Parciales, que es una poderosa herramienta estadística multivariante, es comúnmente denominado como la mejor técnica de regresión para datos multivariantes y puede ser utilizado en diversas áreas de la Química como la Química analítica, control de procesos industriales y en la elaboración de formulaciones para productos farmacéuticos, entre otras.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar y validar un método analítico para determinar la cantidad de contenido químico y cuantificar en perfiles de disolución Acetaminofén, en tabletas de 500 mg como único principio activo, utilizando espectrofotometría UV-vis y la herramienta estadística de Mínimos Cuadrados Parciales para el tratamiento de los datos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una investigación de antecedentes teóricos y normativos sobre la validación de métodos analíticos que se han reportado para estudiar perfiles de disolución y determinar contenido químico en tabletas de Acetaminofén.
- Proponer condiciones de operación que sean factibles de aplicar para el estudio de perfiles de disolución y contenido químico de Acetaminofén en tabletas de 500 mg por espectrofotometría UV.
- Desarrollar el un método analítico para determinar contenido químico en tabletas de Acetaminofén de 500 mg/tab.
- Validar el método analítico desarrollado para la determinación de contenido químico en tabletas de Acetaminofén, en base a las guías de validación CNQFB, ICH y FDA.
- Desarrollar un método analítico para perfiles de disolución de tabletas de Acetaminofén de 500 mg/tab
- Validar el método analítico desarrollado para perfiles de disolución para tabletas de Acetaminofén en base a los criterios especificados en la NOM-177-SSA1-2008 en el numeral 8.3.

MARCO TEÓRICO

1.1 ACETAMINOFÉN

1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

El Acetaminofén, mejor conocido como Paracetamol, es principalmente usado por sus propiedades analgésicas. Es una amida aromática acilada (*Ver figura 1*), que se introdujo en primer lugar en la medicina como antipirético/analgésico por Von Mering en 1893 y ha estado en uso como analgésico para medicamentos de uso doméstico por más de 30 años y es aceptado como un tratamiento muy efectivo para el alivio del dolor y la fiebre en adultos y los niños. Es el medicamento más utilizado después del ácido acetilsalicílico en muchos países como una alternativa a la aspirina y fenacetina ^[1, 2].

Usualmente, es un ingrediente importante en numerosos medicamentos para la gripe y muchos analgésicos recetados, es utilizado en formulaciones que lo contienen de 250 a 500 mg como principio activo. Se consigue en varias presentaciones que se encuentran en venta libre y bajo prescripción. Además, forma parte de muchos productos en combinación con fármacos opioides.

El Acetaminofén, a diferencia de otros analgésicos comunes tales como la aspirina y el ibuprofeno, no tiene propiedades anti-inflamatorias, por lo que no es miembro de la clase de fármacos conocidos como los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE).

Sin embargo, el paracetamol (PCT) o Acetaminofén es un claro ejemplo de un fármaco que posee pobres propiedades de flujo así como también una pobre capacidad de compresión ^[1].

1.1.2 PROPIEDADES QUÍMICAS ^[3]

Nombre Químico: N-(4-Hidroxifenil) acetamida; 4-hidroxiacetanilida. *Sinónimos:* p-hidroxiacetanilida; p-acetamidofenol; p-acetaminofenol; N-acetil-p-amionofenol; acetaminofeno; paracetamol; Acetaminofén.

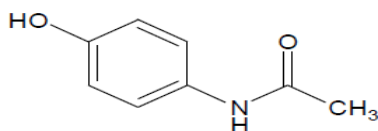


Figura 1. Estructura Química del Acetaminofén ^[3]

En la tabla 1 se muestran las principales características químicas del Acetaminofén.

Característica	Descripción
Fórmula condensada	C ₈ H ₉ NO ₂
Peso molecular (g/mol)	151.16
Estructura química	N-(4-hidroxifenil) acetamida. <i>Véase figura 1.</i>
Descripción física	Cristales blancos o polvo cristalino
Rango de fusión (°C)	169-170.5
Valor de pKa (25°C)	9.5

Tabla 1. Propiedades Químicas del Acetaminofén

1.1.3 NATURALEZA QUÍMICA Y CONSTANTE DE DISOCIACIÓN

El Acetaminofén presenta una naturaleza química ácida, con un valor de pka de 9.5 (25°C); también se reporta un pka 9.38. No se ioniza a valores de pH inferiores a 9, por lo que su solubilidad no varía con el pH.

1.1.4 ESPECTRO ULTRAVIOLETA

En solución acuosa ácida el Acetaminofén presenta un pico a 245 nm (A=668); en solución acuosa alcalina presenta un pico a 257 nm (A=715) ^[3].

1.1.5 SOLUBILIDAD Y POLIMORFISMO

Es soluble en agua, metanol, dimetilformamida, etanol, acetona y etil acetato. Muy poco soluble en cloroformo. Prácticamente insoluble en éter y benceno.

Se conocen 2 formas meta-estables:

- La forma ortorrómbica es la más adecuada para compresión directa, sin embargo solo se ha cristalizado en pequeñas cantidades^[3].
- La forma monocíclica es la más comercial y la que termodinámicamente es más estable^[3].

1.1.6 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA [4,5]

El Acetaminofén inhibe la síntesis de prostaglandina en el Sistema Nervioso Central (SNC), esto explica sus propiedades antipiréticas y analgésicas. Tiene menor efecto sobre la ciclooxigenasa en los tejidos periféricos, lo que da cuenta de su actividad antiinflamatoria débil.

✓ Absorción: el Acetaminofén se absorbe con rapidez y casi por completo en el tubo gastrointestinal. Su concentración plasmática llega a su máximo dentro de un lapso de 30 a 60 minutos, teniendo una vida media plasmática de alrededor de dos horas después de la dosis terapéutica.

✓ Distribución: la distribución del Acetaminofén es bastante uniforme en la mayoría de los líquidos orgánicos, la unión del Acetaminofén con las proteínas plasmáticas es variable presentándose de un 20 a 50%.

✓ Eliminación: bajo circunstancias normales el Acetaminofén se conjuga en el hígado para formar metabolitos glucoronados (cerca del 60%), metabolitos sulfatados (alrededor del 35%) o cantidades de metabolitos hidroxilados y desacetilados. El Acetaminofén es excretado en la orina.

1.1.7 EFECTOS ADVERSOS [5]

Es muy seguro en dosis estándar, pero, debido a su amplia disponibilidad, no es rara una sobredosis intencional o accidental. En condiciones normales de dosis, el Acetaminofén no irrita el revestimiento del estómago o afecta la coagulación de la sangre, los riñones, o el conducto del feto arterioso.

Al igual que los AINE y al contrario que los analgésicos opiáceos, No se ha encontrado que el paracetamol cause euforia o altere el estado de ánimo de alguna manera. El Acetaminofén y los AINE tienen la ventaja de soportar sin riesgo la adicción, dependencia, tolerancia y abstinencia.

1.2 SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA [6]

En 1995 se publican los fundamentos para la clasificación Biofarmacéutica de fármacos, hecha por el doctor Gordon Amidon y cols. sentando las bases de lo que hoy se conoce como el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), difundido actualmente en todo el mundo, y que aparece en el anexo 7 del informe 40 de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

El SCB se basa en un sólido fundamento científico para clasificar un fármaco considerando los parámetros de solubilidad (en este caso relativa a la dosis), la permeabilidad intestinal y en combinación con la disolución del medicamento, considera los tres factores más importantes que modulan la velocidad y cantidad absorbida de un principio activo, a partir de formas farmacéuticas sólidas de administración oral. Esto es ya que la biodisponibilidad sistémica de un fármaco depende de la fracción absorbida y del metabolismo intestinal o hepático que pueda darse. Esta fracción absorbida corresponde a la cantidad de fármaco que pasa del lumen intestinal al torrente sanguíneo.

El SCB plantea la posibilidad de establecer correlaciones *in vitro* - *in vivo* que permitan sustituir los ensayos realizados en humanos por ensayos de disolución *in vitro*, de acuerdo con la clasificación obtenida para el fármaco.

De acuerdo con el SCB, los fármacos se pueden clasificar en 4 categorías, basados en su solubilidad y permeabilidad, como se presenta a continuación en la tabla 2:

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Tabla 2. Clasificación de los fármacos de acuerdo con el SCB

Según sea la solubilidad o la permeabilidad el factor limitante del fármaco, se define cuál de ellas determina el proceso de absorción, lo cual permite relacionar la

clasificación del fármaco con la posibilidad de establecer correlaciones *in vitro* – *in vivo* (CIVIV).

Al momento de realizar la clasificación se deben conocer los límites a los que hace referencia en cada uno de los casos, tanto para la solubilidad como para la permeabilidad:

- Solubilidad:

Se considera de alta solubilidad, cuando el fármaco en su mayor dosis (recomendada por la OMS o disponible en el mercado como forma sólida oral) es soluble en 250 ml o menos de medio acuoso en un rango de pH de 1.2 – 7.5, según la FDA, y de 1.2 – 6.8, según la OMS.

- Permeabilidad:

Se clasifica como altamente permeable, si la cantidad absorbida en humanos es mayor al 85%, según la OMS, y 90%, según la FDA.

De acuerdo con estas propiedades, se evalúa la posibilidad de emplear los estudios de disolución *in vitro* como predictores del comportamiento *in vivo* del medicamento, siempre y cuando se pueda establecer la CIVIV. Hay que tener en cuenta que solamente cuando el proceso de absorción está limitado por la velocidad de disolución se puede obtener CIVIV. El objetivo final del SCB es tener la posibilidad de utilizar estas correlaciones para predecir el comportamiento de medicamentos de liberación inmediata de administración oral.

El Acetaminofén es un fármaco clasificado dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico como Clase II, de baja solubilidad y alta permeabilidad. Con esto se determina que el único factor del cual depende la absorción del Acetaminofén en el organismo se ve afectado directamente por la solubilidad.

1.3 ANÁLISIS MULTIVARIADO ^[7]

El análisis multivariante es una rama de la estadística y del análisis de datos que examina, interpreta y elabora los datos estadísticos sobre la base de un conjunto de variables.

El análisis multivariante implica una estructura más compleja, con una disposición matricial de los datos, cumple también con los objetivos descriptivo e inductivo, pero trabajando simultáneamente con varias variables, de modo que la información que se maneja es de carácter multidimensional. Seguramente la propiedad más determinante del análisis multivariado es que las variables son de naturaleza similar y ninguna de ellas tiene importancia superior a las restantes, es mucho más potente, utilizando extensamente los métodos del álgebra lineal, cálculo numérico, geometría lineal y otras geometrías.

Muchas veces los espectros de los componentes se superponen a una misma longitud de onda, por lo cual no se puede utilizar un método directo. Así que cuando se presentan estos casos, frecuentemente los analitos son separados y cuantificados de manera individual. Para evitar esto, se utilizan los métodos multivariados. Su importancia y utilidad aumentan al incrementarse el número de variables complejas que constan de una gran variedad, medidas en número de unidades experimentales que se están evaluando. Debido a estas razones son extraordinariamente útiles para ayudar a los investigadores a hacer que tengan sentido grandes conjuntos de datos.

Cuando en una disolución hay más de una especie absorbente, el espectrofotómetro suma las absorbancias de todas las diferentes especies. Sin embargo, si las distintas especies tienen absorptividades a diferentes longitudes de onda y al conocer el espectro de los componentes puros, podemos descomponer matemáticamente el espectro de la mezcla en los espectros de sus componentes.

A menudo, el objetivo primario de los métodos es resumir grandes cantidades de datos por medio de relativamente pocos parámetros. Muchos de estos métodos tienen a ser de naturaleza exploratoria en lugar de confirmatoria. Es decir, tienen

a mostrar hipótesis en lugar de probarlas. Los métodos estadísticos tradicionales suelen exigir que un investigador establezca algunas hipótesis, reúna algunos datos y use estos datos para comprobar o rechazar estas hipótesis.

Una situación alternativa que se presenta frecuentemente, es un caso en el cual el investigador dispone de una gran cantidad de datos y se pregunta si pudiera haber información valiosa en ellas. Los métodos multivariados suelen ser útiles para examinar los datos en un intento por saber, si hay información que valga la pena y sea valiosa.

1.3.1 MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE

La regresión es una valiosa técnica cuando se analiza la relación existente entre una variable dependiente (respuesta, variable Y) y varias variables independientes (predictivas, variable X). El análisis multivariante ayuda a determinar la dependencia de estas variables “Y” con respecto a una o varias variables “X” [8,9].

La calibración multivariante es una herramienta de reconocida selectividad y confiabilidad en el análisis cuantitativo, que se aplica en la determinación de macro y micro componentes con diversas características y bajo distintos métodos de análisis como son: resonancia magnética nuclear, cromatografía, espectroscopía de masas, espectrometría acústica, espectroscopia UV-visible, espectroscopia de absorción en infrarrojo, electroforesis, etc.

1.3.2 VENTAJAS DE LA CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE [7,9]

Entre las principales ventajas que ofrece esta herramienta matemática tenemos:

- Mejora la precisión y la exactitud para cualquiera de los métodos analíticos mencionados en comparación con la calibración univariante.
- Se puede realizar un Análisis de Multicomponentes, es decir es posible cuantificar, de forma confiable y de manera simultanea, varios componentes presentes en una muestra analítica en donde se conocen los espectros puros de los componentes de interés.

- Se puede cuantificar solo uno o varios componentes de una mezcla aún cuando no se conozcan todos los componentes presentes en dicha mezcla. Esto se puede aplicar a muestras naturales como: sangre, agua contaminada, extractos de plantas, etc.; en estas muestras pueden existir muchos componentes desconocidos, pero la calibración multivariante puede determinar solo uno o varios componentes que sean de interés elaborando una correcta matriz de calibración.

- La calibración multivariante permite analizar sistemas con interferencias químicas, aunque no sean definidas, sin necesidad de manipular la muestra de manera excesiva, esto en los casos en los que hay presentes interferencias en las mezclas con él o los componentes de interés y no existe otro punto en el que puedan ser determinados selectivamente.

- La calibración multivariante facilita la detección de muestras desechables (muestras mal preparadas) presentes en la matriz de calibración. Debe considerarse que en el momento de efectuar la calibración existen anomalías en la preparación de muestras o variaciones instrumentales (sin importar que tan cuidadoso sea el analista), que la calibración multivariante identifica como datos anormales, siendo posible eliminarlos y evitar en un futuro errores mayores en el modelo de calibración estimado. Así la calibración multivariante establece un modelo matemático multivariante del sistema en estudio, donde los parámetros de calibración se derivan de cálculos estadísticos.

Con la calibración multivariante entonces se puede impulsar el desarrollo de nuevos métodos analíticos, además de mejorar la capacidad predictiva y la confiabilidad de los métodos ya existentes.

1.3.3 FUNDAMENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE MULTICOMPONENTES ^[7,8]

En el análisis cuantitativo se busca una relación lineal entre la medición y la concentración de un componente en particular. En espectroscopía, la Ley de Beer

define la relación entre la absorbancia y la concentración a una longitud de onda (λ_1) de la siguiente manera:

$$A_1 = k_1 c_1$$

Donde A_1 es la absorbancia a una λ_1 , c_1 la concentración del componente y k_1 la absorptividad del componente. Esto implica que es posible conocer la concentración de cualquier muestra tras medir simplemente la absorbancia en una muestra de concentración conocida y deducir la absorptividad, utilizando esta misma en cualquier cálculo posterior. Como se muestra, la ecuación puede resolverse estudiando una sola muestra; sin embargo, ante las limitaciones por ruido, error instrumental, error en la manipulación de las soluciones, etc., se recomienda analizar varias muestras de distinta concentración, realizar un gráfico que mejor comprenda los puntos mediante lo que se conoce matemáticamente como ajuste por mínimos cuadrados, en donde el error total entre las absorbancias sea el mínimo.

Si la mezcla contiene dos componentes, es posible establecer dos ecuaciones:

$$A_1 = k_1 c_1 + e_1$$

$$A_2 = k_2 c_2 + e_2$$

Donde A_1 y A_2 son las absorbancias a dos longitudes de onda diferentes, k_1 y k_2 las absorptividades de los componentes a las respectivas longitudes de onda, e_1 y e_2 los errores residuales obtenidos a partir de la línea ajustada por mínimos cuadrados y las absorptividades reales.

Nuevamente es factible dar solución a cada ecuación de manera independiente mientras la absorbancia de un componente no interfiera con la absorbancia del otro (bandas bien resueltas). Partiendo de que la Ley de Beer es aditiva, también es permisible resolver las ecuaciones simultáneamente y así manejar el caso donde existe interferencia entre las dos absorbancias dentro de un espectro banda solapada:

$$A_1 = k_{11} c_1 + k_{21} c_2 + e_1$$

$$A_2 = k_{12} c_1 + k_{22} c_2 + e_2$$

Sin embargo, solucionar ecuaciones simultáneas manualmente se convierte en algo tedioso cuando se trata de más de dos componentes. Además, conceptualmente es factible medir la absorbancia a más de una longitud de onda para cada componente y resolver las ecuaciones respectivas, lo que suele ser conveniente en caso de datos reales con ruido, ya que estos promedian y obtienen resultados más exactos.

Un camino particularmente eficiente para resolver ecuaciones simultáneas es utilizar métodos matriciales, pues si bien implica numerosos cálculos, estos pueden efectuarse por computadora. En términos matriciales las ecuaciones anteriores se expresan así:

$$A_{(n,j)} = K_{(m,j)} C_{(n,m)} + E_{(n,j)}$$

Siendo n el número de disoluciones patrón o número de muestras, j el número de valores de longitudes de onda y m el número de componentes. Por ejemplo para dos muestras, dos componentes y dos longitudes de onda, las ecuaciones son:

- Para el espectro 1:

$$A_{11} = k_{11} c_{11} + k_{21} c_{12} + e_{11}$$

$$A_{12} = k_{12} c_{11} + k_{22} c_{12} + e_{12}$$

- Para el espectro 2:

$$A_{11} = k_{11} c_{11} + k_{21} c_{12} + e_{11}$$

$$A_{12} = k_{12} c_{11} + k_{22} c_{12} + e_{12}$$

- O en notación matricial:

$$A = KC + E$$

Utilizando álgebra matricial es fácil encontrar la solución de estas expresiones por computadora y planear la matriz de calibración (o matriz de coeficientes de Absortividad) que proporcionan la línea (o líneas) que se ajustan mejor a los datos por mínimos cuadrados.

Para resolver de manera práctica y confiable ecuaciones simultáneas utilizando álgebra matricial, se encuentran reportados en la literatura algunos métodos tales como los que se muestran en la tabla 3:

Método de Análisis	Siglas	Características generales
Regresión Lineal Múltiple (Multiple Linear Regression)	RLM	Es una técnica que intenta modelar probabilísticamente el valor esperado de una variable Y, a partir de los valores de dos o más predictores. Determina la posibilidad de predecir a través de una expresión muy simple el valor de la respuesta de interés, a partir de los valores observados de una serie de factores.
Mínimos Cuadrados Clásicos (Classical Least Squares)	MCC	Este método aplicado a espectrofotometría, proporciona una buena sensibilidad al promediar varios resultados; pero requiere conocer la concentración de todos los componentes de la mezcla, algo que comúnmente no ocurre en la realidad ya que la mayoría de las veces desconocemos en casi un 100%.
Mínimos Cuadrados Inversos (Inverse Least Squares)	MCI	La ventaja que presenta este método de calibración es que no es necesario conocer la contribución total de todas las especies absorbentes de la muestra si no solo la de los analitos en los que estamos interesados. El éxito de MCI está basado en el uso del modelo inverso de calibración.
Análisis del Componente Principal (Principal Component Analysis)	ACP	El ACP se ha utilizado de manera creciente en las últimas décadas, prácticamente en todas las áreas. El análisis de componentes principales realiza dos acciones fundamentales: cuantifica las variables originales y reduce la dimensionalidad de los datos. Cada variable debe estar muy bien representada (con una correlación elevada) en una dimensión y pobremente representada (con correlaciones bajas) en las demás.
Regresión del Componente Principal (Principal Component Regression)	RCP	RCP es un método de calibración multivariante muy utilizado en el área de la química analítica. Es un método indirecto de análisis de espectro completo. La concentración del analito puede ser conocida y los niveles de cualquier interferencia no necesitan ser conocidos.
Mínimos Cuadrados Parciales (Partial Least Squares)	MCP	MCP se basa en la relación lineal que pueda existir entre las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente de interés, de acuerdo al modelo lineal utilizado en la calibración inversa. Al igual que RCP es un método indirecto y de análisis de espectro completo que no necesita conocer todos los componentes de la muestra.

Tabla 3. Características de los Métodos de Análisis de Multicomponentes.

1.4 MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (MPC)

Mínimos cuadrados parciales es una poderosa herramienta estadística multivariante, es comúnmente denominado como la mejor técnica de regresión para datos multivariantes y puede ser utilizado en diversas áreas de la Química como la Química analítica, control de procesos industriales y en la elaboración de formulaciones para productos farmacéuticos, entre otras ^[9,13,14].

Mínimos Cuadrados Parciales es una herramienta la cual comprende una serie de técnicas matemáticas que dan una reconocida selectividad y confiabilidad en el análisis cuantitativo de multicomponentes. Aprovecha la correlación que existe entre los datos espectrales y las concentraciones constitutivas. Puesto que los datos espectrales se pueden descomponer en sus variaciones más comunes.

En una mezcla de dos componentes, hay dos variables independientes (idealmente) en el sistema, es decir, el espectro de la mezcla puede recrearse aunando los espectros puros de A y B. en la realidad generalmente hay variaciones instrumentales o de la muestra; pueden existir además interacciones entre los componentes que pueden dar origen a compuestos intermedios o cambiar la forma de los espectros de los componentes puros, esto aunando al hecho de que puede haber un número finito de espectros independientes factibles de sumarse o restarse para reconstituir los datos. Si estos espectros se calculasen de alguna manera, podrían sumarse las cantidades apropiadas de cada uno, integrarse o ajustarse para obtener el espectro desconocido y finalmente relacionarlas con la concentración de los componentes ^[7,12,13].

Aunque el MCP fue aplicado originalmente en el campo de la econometría por H. Wold, posteriormente se uso para aplicaciones químicas y fue establecido por S. Wold y H. Martens, como un algoritmo para encontrar una solución para el coeficiente de regresión B_f en el modelo lineal $Y = X B_f + E$, en donde se conocen los datos de las matrices X y Y.

En el método de MCP, se desea conocer la relación lineal que pueda existir entre las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente de interés, de acuerdo al modelo lineal utilizado en la calibración inversa ^[13]:

$$C = A k + E$$

En donde, los espectros de la calibración pueden a su vez ser representados por el modelo:

$$A = TB + E_A$$

Y la concentración del componente de interés puede ser representada por el modelo:

$$C = Tv + e_c$$

1.4.1 ALGORITMO PARA MPC

El algoritmo para MCP utilizado en el presente trabajo es una modificación del algoritmo NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Squares) utilizado para ACP, pero en donde ahora el principal objetivo es utilizar la información que pueda proporcionar la concentración del componente de interés para la descomposición de los datos de la matriz A.

Así, en el algoritmo de MCP establecido por Haaland, se realiza el análisis de la calibración y la predicción para un solo componente a la vez. Esto significa que solo la concentración de un solo componente de interés es usada en los datos de la calibración, mientras que las concentraciones de los demás componentes no son incluidas en el análisis. Sin embargo, si se desea conocer la concentración de algún otro componente presente en la mezcla, lo único que se debe hacer es realizar el análisis en donde ahora se incluya este componente en los datos de calibración.

El algoritmo consta de dos etapas:

- ✓ Etapa de Calibración
- ✓ Etapa de Predicción

1.4.1.1 -Etapa de la Calibración

En esta etapa, la relación entre las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente de interés se estima a partir de un conjunto de soluciones de referencia que presentan las posibles combinaciones de los componentes de la mezcla. Así, se obtiene dos expresiones matriciales compuestas por valores de absorbancias a diferentes longitudes de onda Matriz A, y concentraciones de soluciones, Vector C.

Posteriormente, la elaboración del modelo establecido para MCP se logra resolviendo los datos de la matriz conforme se muestra en la figura 2:

Paso 1. Pretratamiento de datos. Centrar A y c		
Paso 2. Formación del vector cargador de peso, \hat{w}_h		
Modelo		$A = c \hat{w}_h' + E_A$
Solución		$\hat{w}_h = A'c/c'c$
		Normalizar \hat{w}_h
Paso 3. Formación del vector cargador, t_h (variable latente espectral)		
Modelo		$A = (t_h) \hat{w}_h' + E_A$
Solución		$t_h = (A) \hat{w}_h' / \hat{w}_h'(\hat{w}_h) = (A) \hat{w}_h$
Paso 4. Relacionando el vector cargador, t_h , a las concentraciones		
Modelo		$c = (v_h)(t_h) + e_c$
Solución		$v_h = (t_h)'c / t_h'(t_h)$
Paso 5. Formación de b_h vector cargador MCP para A,		
Modelo		$A = (t_h) b_h' + E_A$
Solución		$b_h = A'(t_h) / t_h'(t_h)$
Paso 6. Cálculo de los residuales en A y c.		
Residuales espectrales		$E_A = A - (t_h)b_h'$
Residuales de concentración		$e_c = c - t_h v_h$
Paso 7. Incrementar h, sustituir E_A para A y e_c para c en el paso 2 y continuar hasta el número deseado de vectores cargadores.		

Figura 2. Pasos del algoritmo de MCP de la Etapa de Calibración ^[7].

PASO 1. La media del espectro de la calibración es sustraída a cada valor de la matriz (A) y la media de calibración de las concentraciones es restada de cada concentración.

PASO 2. Este paso del algoritmo de MCP es en realidad una calibración de Mínimos Cuadrados Clásicos (MCC) en el cual los análisis se ejecutan sabiendo que se conoce la concentración de uno de los componentes de las muestras de calibración. Una vez obtenido el valor de w_h , estos deben ser normalizados. Este paso se realiza para que la información de la concentración sea posteriormente introducida directamente en el cálculo de los vectores de carga.

PASO 3. Este paso del algoritmo de MCP es similar al paso de predicción del modelo de MCC, en el cual se supone que solo está presente el componente de interés en las muestras de calibración; el primer vector cargador de peso estimado, w_1 , se usa como un componente en el paso de predicción del modelo de MCC para estimar la cantidad o concentración del componente espectral w_h en cada espectro de calibración.

El vector t_1 representa la intensidad o cantidad del primer vector de carga (loading) en las muestras de calibración para el sistema coordinado de MCP. En MCP, cada vector t_h está relacionado tanto por "A" como por "c". También, w_1 y t_1 son los datos normalizados del espectro puro y la concentración centrada del componente de interés en el nuevo sistema de coordenadas, respectivamente.

PASO 4. El vector indicador, t_h , representa las intensidades en el nuevo sistema de coordenadas que están relacionados a la concentración usando una regresión de mínimos cuadrados lineal, así como las intensidades son relacionadas a la concentración en el análisis por MCI o como los "scores" son relacionados a la concentración en RCP.

PASO 5. Como se desea que los vectores t_h deban ser ortogonales para remover los problemas de colinealidad que son presentados en el método de MCI; los vectores ortogonales t_h pueden ser obtenidos para formar un nuevo modelo para "A" basado en la Variable latente t_h . El nuevo modelo se obtiene en la ecuación del modelo, en donde b_h es el vector de carga $n \times 1$ para MCP.

PASO 6. El producto del vector indicador, t_h y el vector de carga, b_h es una aproximación de MCP para el espectro de calibración. El producto de v_h por t_h es una estimación de la concentración del componente de interés por el método de MCP basado en el espectro.

PASO 7. Se incrementa h y se continúa para obtener tanto factores como sea necesario para optimizar el modelo.

1.4.1.2 Etapa de predicción

En esta etapa, se puede estimar la concentración del componente de interés a partir del espectro obtenido para una muestra problema, aplicando cualquiera de los dos métodos de predicción establecido para MCP que se muestran en la figura 3:

Método 1

Paso 1. Centrar a usando los datos de la calibración. Escalar a si los espectros de calibración fueron escalados.

Paso 2. $t_h = (a) \hat{w}_h$

Paso 3. $ch = c_{h-1} + t_h v_h$

Paso 4. $eh = e_{h-1} - t_h b_h$

Paso 5. Incrementar h , sustituyendo e_h por a y repitiendo el paso 2 hasta $h=r$

NOTA: \hat{w}_h , v_h , b_h , son de la calibración MCP1, c_o , es la concentración media del analito en las muestras de calibración y $e_o = a$.

Método 2

Paso 1. Después de la calibración PLS1, calcular los coeficientes de regresión final

$$K = \hat{W}(B^T \hat{W})^{-1} v$$

Paso 2. Centrar a usando los datos de la calibración (escalar a si el espectro de calibración fue escalado).

Paso 3. $c = a^T K + c_o$

NOTA: \hat{W} y B tiene r filas compuestas de vectores \hat{w}_h y b_h , y v esta formado de términos individuales v_h del modelo óptimo MCP1 ($h = r$); c_o es el mismo dado en el método 1.

Figura 3. Pasos del algoritmo de MCP de la Etapa de Predicción [7].

MÉTODO 1. Involucra el cálculo de las intensidades espectrales (t_h) del espectro de la muestra problema en el nuevo sistema de coordenadas obtenido durante la etapa de calibración por MCP. Después, estas intensidades son relacionadas a la concentración del componente de interés utilizando una ecuación parecida a la utilizada en el método de MCI.

Así, el principio básico del Método 1 es la generación de “residuales espectrales”, que no es más que minimizar la suma de cuadrados de las diferencias entre los valores espectrales estimados por el modelo y los valores espectrales medidos experimentalmente.

MÉTODO 2. Para poder predecir la concentración del componente de interés a partir del espectro obtenido para una muestra problema, involucra el cálculo y uso del vector del coeficiente de regresión final, “**K**”, el cual tiene las mismas dimensiones que un espectro normal y puede ser calculado de diversas formas.

En el algoritmo de predicción por el método 2, los valores de “**a**” son centrados, mientras que **W** y **B** son las matrices obtenidas en la etapa de calibración que contienen todos los vectores w_h y b_h obtenidos hasta el número de factores óptimo para el modelo; “**v**” es el vector obtenido utilizando todos los v_h óptimos calculados por el modelo y a_0 es el vector de la media del espectro obtenida en la etapa de calibración.

1.5 VALIDACIÓN

El concepto de validación no es nuevo, actualmente en la industria farmacéutica no se puede esperar un estatuto para un proceso de manufactura nuevo sin asegurarse que esté optimizado para producir de acuerdo a los requerimientos de calidad establecidos ^[15].

Antes que nada es necesario entender el término de validación así como su aplicación, ya que para la industria farmacéutica es fundamental para la elaboración de productos que cumplan con todos los requisitos de calidad a bajo costo.

En 1980, Theodore Byers definió la validación como: “el logro y la documentación de la evidencia suficiente para asegurar razonablemente, en función de un método científico, que el proceso en consideración hace y/o hará lo que se supone que debe de hacer”

Por otra parte en Estados Unidos la FDA (Food and Drug Administration) es el organismo encargado de dictaminar los lineamientos y las regulaciones para el área Farmacéutica y define la Validación como “el Proceso de demostrar que el procedimiento analítico es adecuado para lo que se intenta usar” ^[16].

En el país las Normas Oficiales Mexicanas son las encargadas regular y de aportar los lineamientos que rigen a la industria químico farmacéutica. Dentro de estas Normas se encuentra la NOM- 059-SSA1-1993, la cual define la validación como “la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y atributos de calidad establecidos” ^[17].

Otra definición es la del CNQFB la cual dice que “la validación es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad de un método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada”^[18]; la validación es una actividad justificada por los siguientes aspectos:

- Moral y ética

- Aseguramiento de la calidad
- Economía
- Regulatoria.

La validación trata de conseguir un total dominio de la calidad. No aumenta la calidad pero si garantiza la fiabilidad y uniformidad de la misma. La validación esta principalmente enfocada a ganar la confianza del cliente, dando resultados correctos y que se pueda demostrar que realmente son correctos ^[17].

El desarrollo de la industria farmacéutica fue paralelo a la comercialización de otras actividades humanas, debido a la responsabilidad moral y civil de sus productos, ha sido una industria severamente legislada en lo que a seguridad, eficacia, control, métodos, procesos y calidad se refiere.

La validación asegura que:

- ✓ El resultado es reproducible, cumple con el uso propuesto y está normalizado.
- ✓ El resultado es comparable al de otro equipo o proceso similar validado.
- ✓ El mantenimiento de las propiedades de un proceso, producto o equipo.

1.5.1 TIPOS DE VALIDACIÓN

Existen diferentes tipos de validación los cuales se describen en la tabla 4:

Momento de la Validación	Tipo de Validación	Definición
Durante el Desarrollo del Método	Validación Prospectiva	Se realiza sobre un proceso antes de que este sea implementado. Asegurando el éxito del proceso antes de su implementación además de controlar y elegir las variables a ensayar en el proceso.
	Validación Concurrente	Se realiza durante la producción normal. Es efectiva solo si el desarrollo del proceso permite asegurar su comprensión total para la ejecución. Se debe monitorear tan profundamente como sea necesario los tres primeros lotes de producción.
En base aun análisis de datos históricos	Validación Retrospectiva	Se basa en la revisión histórica de los registros como evidencia documental de la validación. Esta validación es aceptable únicamente para procesos ya establecidos.

Tabla 4. Características Generales de los diferentes Tipos de Validación.

1.5.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

En la actualidad la validación es un proceso sin el cual una planta farmacéutica no puede subsistir, ya que aporta soporte para la elaboración de los medicamentos. Para esto es necesario desarrollar diferentes métodos analíticos los cuales deben ser validados.

La Guía de Validación de métodos analíticos del CNQFB define un método analítico como “la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis del o los componentes específicos (analito) de una muestra” [18].

Para el desarrollo químico farmacéutico de un nuevo medicamento es imprescindible el uso de un método analítico que permita cuantificar el analito en una forma de materia prima, como ingrediente activo de una formulación o para evaluar algunas características de desempeño. Los métodos analíticos son sometidos a validación para asegurar su efectividad y confiabilidad [10].

Realizar la validación de un método analítico es sumamente importante en la industria farmacéutica, ya que desempeña un papel indispensable en la aceptación o rechazo de un lote de medicamentos y con esto la liberación para su venta en el mercado, asegurando que un producto farmacéutico contenga los principios activos correctamente dosificados y los excipientes adecuados que faciliten su administración.

La validación de métodos analíticos puede definirse como el proceso por medio del cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad expresa, en todos los casos, en términos de parámetros o propiedades analíticas, que proporcionan una medida del comportamiento del método analítico [9,19,20].

Mediante un proceso de validación, ya sea de carácter prospectivo, retrospectivo o introspectivo de validación, se comprueba si el método analítico es lo suficientemente confiable y si los resultados previos se obtienen dentro de las condiciones prefijadas para poder resolver un problema analítico en particular. Así mismo la validación proporciona una idea de las capacidades y limitaciones que posee un método analítico cuando se utiliza para el análisis rutinario ^[9].

1.5.3 TIPOS DE MÉTODOS ANALÍTICOS A SER VALIDADOS ^[10,20]

A partir del criterio de que no existe un modelo único para validar y de que existen una gran variedad de métodos analíticos, la validación de los métodos analíticos se fundamenta en la evaluación de diversas propiedades de acuerdo con alguna de las siguientes características a la que pertenezca.

- Categoría I: Métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios o principales fármacos a granel o principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

- Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en el producto farmacéutico terminado. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos o pruebas límite.

- Categoría III: Métodos analíticos para la determinación de características de desempeño (disolución, medicamentos de liberación, etc.)

- Categoría IV: Pruebas de identificación

De esta forma las características que deben evaluarse durante la validación de los métodos analíticos dependen tanto del tipo de métodos analíticos, como del uso que se pretende dar a éstos, a continuación en la tabla 5 se muestran las características mínimas para la validación de un método analítico:

Características a Evaluar	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantificación	Límite		
Precisión	+	+	*	*	-
Exactitud	+	+	-	+	-
Especificidad	+	+	+	*	+
Límite de Detección	-	-	+	*	-
Límite de Cuantificación	-	+	-	*	-
Linealidad	+	+	-	*	-
(+) <i> Debe ser evaluado</i>		(-) <i> No debe ser evaluado</i>			
(*) <i>Puede ser evaluado, dependiendo de los requerimientos del método.</i>					

Tabla 5. Características mínimas consideradas para validar un método analítico según la categoría a la cual pertenezca.

1.6 CRITERIOS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTENIDO QUÍMICO EN TABLETAS DE ACETAMINOFÉN

La validación de métodos analíticos ha sido un requisito fundamental al momento de liberar un medicamento al mercado, por lo que es necesario tener toda la documentación que demuestre que existe un método analítico que asegure el contenido químico del fármaco o los fármacos presentes en la forma farmacéutica. De esta manera se permite asegurar la homogeneidad de la dosificación, evitando así que se tenga problemas terapéuticos, como en el caso de una falta de dosis efectiva o que se tenga una dosis tóxica en aquellos medicamentos que tienen un margen de seguridad muy estrecho y que se requiere tener mucho cuidado al momento de dosificar ^[21,22].

Las propiedades necesarios para realizar la validación de un método analítico enfocado a la determinación de contenido químico en una formulación son semejantes entre los distintos autores y tienen un grado de concordancia con los documentos regulatorios internacionales como la Farmacopea de los Estados Unidos, la Guía de la FDA, la Guía de la ICH y la Guía del CNQFB como se puede observar a continuación en la Tabla 6:

Características de desempeño	Referencia empleada				
	Guía CNQFB ^[18]	Guía FDA	USP ^[22]	ICH ^[23]	Ermer & Miller ^[24]
Precisión del sistema	+	+	+	+	+
Linealidad del sistema	+	+	+	+	+
Especificidad	+	+	+	+	+
Exactitud	+	+	+	+	+
Repetibilidad	+	+	Nd	+	+
Linealidad del Método	+	+	+	+	+
Precisión del Método	+	+	+	+	+
Estabilidad analítica de la muestra	*	Nd	Nd	Nd	Nd
Límite de detección	-	-	-	-	-
Límite de cuantificación	-	-	-	-	-
Robustez	+	+	Nd	Nd	Nd
Tolerancia	+	+	Nd	Nd	Nd
Rango	Nd	Nd	Nd	+	+
(Nd) No definido (+) Debe ser evaluado (-) No debe ser evaluado					
(*) Dependiendo de la naturaleza del método					

Tabla 6. Características de validación para contenido químico de acuerdo a distintas referencias

1.6.1 LINEALIDAD

La linealidad del sistema tiene como finalidad de demostrar que los datos obtenidos deben ser proporcionales, ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida. Los datos deben ser directamente proporcionales a la concentración del analito de interés dentro de un rango determinado.

1.6.2 PRECISIÓN^[18,19,25]

La precisión está relacionada con la dispersión de los datos alrededor de su valor promedio y se define como el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales que se han obtenido dentro de una serie de mediciones efectuadas en una muestra homogénea bajo las mismas condiciones de análisis. La precisión mide el error aleatorio de un análisis y generalmente expresa en términos de desviación estándar, variancia y coeficiente de variación.

1.6.3 VALIDACIÓN DEL SISTEMA

1.6.3.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se debe evaluar por medio de una curva de calibración; la guía de la FDA indica que la linealidad debe corresponder a un rango que obedezca la ley de Beer y la Guía ICH recomienda que se establezca un intervalo de mínimo 5 concentraciones (solución estándar equivalente al 100% y dos niveles superiores y dos niveles inferiores (intervalo de 80%-120%) ^[21,23], preparadas mínimo por duplicado a partir de una misma solución patrón.

La linealidad del sistema debe ser evaluada en un gráfico de la respuesta analítica como una función de la concentración del analito, en donde se debe apreciar la relación lineal. Así mismo se deben considerar el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación, la ordenada al origen y el coeficiente de variación global.

1.6.3.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

De acuerdo con la Guía CNQFB se evalúa por medio de estándares realizando la determinación de tres diferentes concentraciones por sextuplicado, a la concentración del analito que represente la concentración de la solución de referencia utilizada o en ciertos casos, la concentración que represente el 100% de la muestra procesada para su medición y una concentración que represente un nivel por debajo y uno por arriba; las cuales deben estar incluidas en el intervalo establecido; preparadas por dilución o por pesadas independientes. Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones.

1.6.3.3 ESPECIFICIDAD

Se puede definir como la capacidad que tiene el método para producir un cambio en la señal analítica únicamente provocada por el analito y no por alguna de

las sustancias interferentes (tales como impurezas de síntesis, productos de degradación o bien la interferencia de alguno de los excipientes) ^[9]. Esta prueba consiste en establecer las posibles sustancias interferentes y adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra y evaluar su respuesta bajo las mismas condiciones de análisis.

Para métodos de contenido se analizan placebos del producto y cuando procedan sustancias relacionadas, precursores, homólogos y una mezcla de ellos con el producto ^[18].

1.6.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

1.6.4.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad del método es la capacidad que tiene el método para cuantificar confiablemente al analito sin importar de la proporción en la que se encuentre dentro de una formulación, con respecto al resto de los componentes de la muestra, con esto se establece que el método es capaz de detectar y cuantificar un determinado analito ^[9,21].

Se establece que se preparará el placebo analítico a la cantidad de placebo analito equivalente a una muestra analítica por triplicado, se adicionará la cantidad de analito correspondiente al 100% de éste en la muestra. Seleccionar dos niveles superior e inferior de la cantidad del analito (intervalo) y preparar el placebo adicionado por triplicado a cada nivel manteniendo constante la cantidad de placebo analítico en los tres niveles. El mismo analista analizará los placebos adicionados utilizando de referencia la sustancia empleada en la adición al placebo analítico en las mismas condiciones. Se determinará la cantidad recuperada del analito ^[18].

1.6.4.2 PRECISIÓN DEL MÉTODO ^[9,18]

Realizar seis ensayos de una muestra homogénea del producto que tenga un nivel del 100%, un nivel arriba y un nivel abajo (placebo cargado); estos niveles

deben estar incluidos en el intervalo lineal de concentración de linealidad de método.

Reportar el contenido del analito de todas las muestras.

1.6.4.3 EXACTITUD DEL MÉTODO

Este parámetro también es conocido como error sistemático o tendencia y es una medida de qué tan cercano esta el valor experimental a el valor verdadero. Se realiza preparando el placebo analítico a la cantidad de placebo analito equivalente a una muestra analítica por sextuplicado, se adicionará la cantidad de analito correspondiente a tres niveles de concentración (niveles recomendados 80, 100 y 120%) de este en la muestra. El mismo analista analizará los placebos adicionados utilizando de referencia la sustancia empleada en la adición al placebo analítico en las mismas condiciones. Determinar la cantidad recuperada del analito ^[18].

1.6.4.4 REPETIBILIDAD

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos (mismas condiciones de análisis) pero en diferentes días.

1.6.4.5 REPRODUCIBILIDAD

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones de análisis (diferentes analistas instrumentos, laboratorios. etc.)

1.6.4.6 ROBUSTEZ

Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método. Este parámetro es de suma importancia ya que algunas variaciones producen cambios drásticos en la respuesta obtenida, la finalidad de este parámetro

no es que el método sea robusto frente a todas las condiciones impuestas, pero si es necesario reportar un rango en el que se puede variar cada una de las condiciones sin producir alteraciones en los resultados. Se deben establecer los factores instrumentales (temperatura) y/o no instrumentales (pH del medio) relacionados al método y sean críticos. En condiciones normales y distintas de operación, analizar la muestra por triplicado. Reportar el contenido del analito en las muestras de condiciones normales y distintas, expresadas como %.

1.7 CRITERIOS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR ACETAMINOFÉN EN PERFILES DE DISOLUCIÓN [26, 27]

El perfil de disolución es una prueba que permite cuantificar la cantidad disuelta de un fármaco a diferentes tiempos utilizando una metodología validada, de acuerdo a lo estipulado en la NOM-177-SSA1-1998, bajo condiciones controladas.

Los criterios y requisitos de validación solo son aplicables para los medicamentos con tipo de intercambiabilidad “B” y ya que el Acetaminofén cae dentro de este tipo de intercambiabilidad, es necesario aplicar la prueba de perfiles de disolución como un requisito de intercambiabilidad para las tabletas de Acetaminofén.

Por esta razón es sumamente importante que el método analítico para evaluar los perfiles de disolución esté validado y así pueda una nueva formulación incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos.

1.7.1 ADICIONES ESTÁNDAR

Dentro de las metodologías existentes para la determinación de errores sistemáticos, el método de las adiciones estándar, es uno de los más importantes. Esta técnica se conoce también como método del estándar adicionado, método de adiciones incrementada, método de auto estandarización y método de adiciones patrón.

El método de adiciones estándar consiste en añadir diferentes volúmenes de una disolución estándar conocida del analito a varias alícuotas de la muestra. Empleándose los estándares externos se supone que, cuando en la muestra y en el estándar esté presente la misma concentración de analito se obtendrá la misma respuesta.

Éste método resulta adecuado para las muestras complejas donde los efectos de la matriz son importantes, porque no es necesario intentar adaptar las matrices de los patrones a las matrices de la muestra. Simplemente se añade a varias alícuotas de la muestra una cantidad conocida de analito.

Para realizar el método de adición estándar se añaden cantidades conocidas crecientes de la disolución estándar pura del analito a varias alícuotas de la muestra real. De manera que todas tengan una concentración de analito que es la suma de la original y la añadida. Se obtiene una señal para cada alícuota y se representan en función de las concentraciones del estándar añadido.

Un requisito importante del método de las adiciones patrón es que todas las soluciones (estándar y muestra), deben ser aforadas al mismo volumen, cualquier posible interferencia estará siempre presente a las mismas concentraciones y representara un efecto igual sobre la respuesta que se obtenga en la adición estándar.

1.7.2 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

La estabilidad de una muestra se define como la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su detección.

Esta prueba consiste en determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable en el medio, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta del compuesto por analizar en el medio, considerando al menos lo siguiente:

- ❖ Se deberá demostrar la estabilidad del compuesto de interés durante el máximo tiempo que se extienda su análisis.

1.7.3 INFLUENCIA DEL FILTRO

El filtro usado para la toma de muestra para los perfiles de disolución es de suma importancia ya que el filtro no debe de afectar o interferir de ninguna manera con el analito de interés y/o con la muestra recolectada. Se debe determinar que no exista adherencia del fármaco al filtro.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 DIAGRAMA DE ACTIVIDADES A REALIZAR

En la figura 4 se muestra el seguimiento de las actividades realizadas durante el desarrollo y validación de un método analítico para determinar contenido químico y evaluar perfiles de disolución de tabletas de Acetaminofén.

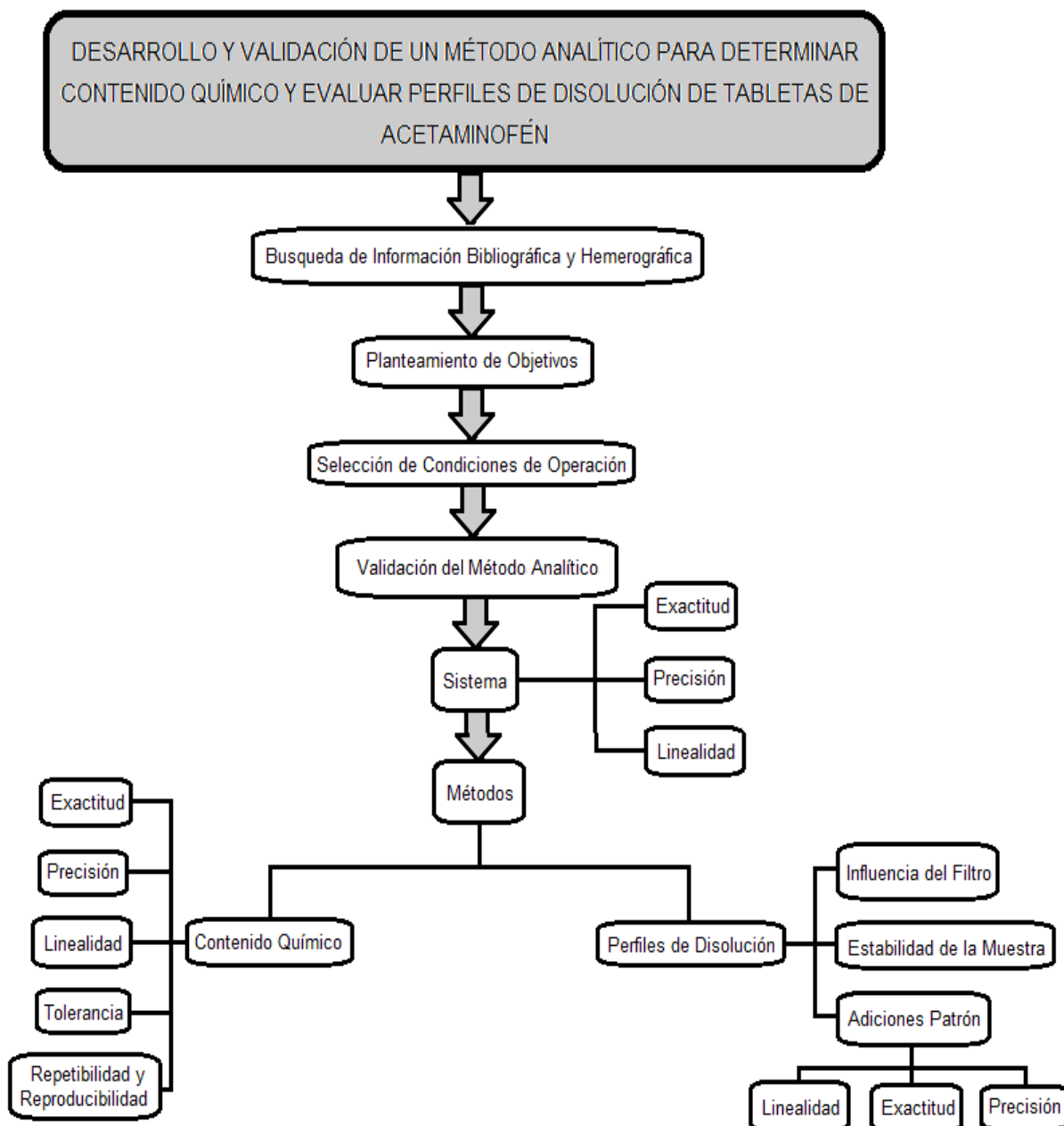


Figura 4. Diagrama de Flujo de las Actividades a Realizar

2.2 MATERIALES Y EQUIPOS

2.2.1 Sustancia de Referencia

- Estándar Acetaminofén Bruluart
- Estándar Acetaminofén Pureza 97.27%

2.2.2 Reactivos

- Ácido Clorhídrico Concentrado (HCl) J.T. Baker
- Ácido Acético Glacial
- Agua Destilada

2.2.3 Soluciones

- Ácido Clorhídrico (HCl) 0.1N (Fluido Gástrico Simulado Sin Enzima)
- Búfer de Acetatos 0.05M pH 4.5
- Búfer de Fosfatos 0.05M pH 6.8
- Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1N

2.2.4 Excipientes

- Celulosa Microcristalina pH 102
- Crospovidona (Polyplasdone XL-10)
- Lactosa (Supertab 14 SD)
- Estearil Fumarato Sódico
- Materia Prima Acetaminofén DC

2.2.5 Equipos

- Balanza Analítica Mettler Toledo, modelo AB104-S.
- Balanza Analítica OHAUS, modelo AP250D.
- Purificados de Agua Millipore (Milli Q) MQ Reference.
- Purificador de Agua Millipore (Milli Q Plus/ Rios S).
- Espectrofotómetro UV-vis Varian, modelo Cary 100 Conc, con celdas

de cuarzo de 1 cm.

- Espectrofotómetro UV-vis Vankel, modelo Cary 1E, con celdas de cuarzo de 1 cm.

- Disolutor Marca Vankel con paletas, modelo VK 7000.
- Disolutor Marca Sotax de celdas de flujo continuo, modelo CH-40008

BASEL

- Prensa Carver C s/n 41000-310
- pHmetro

2.2.6 SOFWARES Y PROGRAMAS DE COMPUTADORA

- Programa ISHEJA INC. Versión 1.0. soportado en ambiente Windows.
- Excel de la paquetería de Microsoft Office
- Programa “Cary Simple Reads”
- Programa “Cary Scan”
- Statgraphics Centurión XVI Versión 16.1.15

2.2.7 MATERIAL DE LABORATORIO

- Matraces Aforados de 10 ml, 25, 50, 100, 250, 1000 y 2000 ml.
- Pipetas Volumétricas de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10 ml.
- Agitadores Magnéticos y barras magnéticas
- Vasos de Precipitados de 50, 100, 250, 1000 ml.
- Tubos de ensayo
- Matraces Érlen Meyer de 250 y 500 ml.

2.3 PREPARACION DE SOLUCIONES

2.3.1 PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR UNA SOLUCIÓN DE ÁCIDO CLORHÍDRICO HCl 0.1N

- En un matraz volumétrico de 250 ml, depositar 50 ml de agua destilada.
- Con cuidado depositar en un vaso de precipitados de 50 ml aproximadamente 15 ml de HCl
- Tomar 2.2 ml de ácido clorhídrico del vaso de precipitados con una pipeta graduada de 3 ml y con cuidado agregar lentamente el ácido clorhídrico en el matraz volumétrico de 250 ml.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua destilada.

2.3.2 PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZAR UNA SOLUCIÓN BÚFER DE ACETATOS 0.05 M CON UN pH 4.5

- Pesar aproximadamente 748 mg de acetato de sodio trihidratado en un vaso de precipitados de 150 ml, utilizando la balanza analítica METTLER TOLEDO AB204-5
- Agregar 100 ml de agua destilada al vaso de precipitados y agitar con una varilla de vidrio hasta disolver el acetato de sodio trihidratado.
- Verter la solución anterior en un matraz aforado de 250 ml, realizando tres lavados al vaso de precipitados con 20 ml de agua destilada.
- Añadir poco a poco 0.4 ml de ácido acético glacial, agregar 50 ml de agua destilada y homogenizar el medio.
- Con ayuda del potenciómetro METTLER TOLEDO Modelo SEVEN MULTI medir el pH y ajustarlo agregando gota a gota ácido acético glacial hasta llegar al pH de 4.5 ± 0.5 .
- Llevar a volumen con agua.

2.3.3 PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZAR UNA SOLUCIÓN BÚFER DE FOSFATOS 0.05M A pH 6.8

- Medir 63 ml de una solución de Fosfato monobásico de Potasio 0.2M (leer anexo 1) en una probeta de 100 ml y verterlos en un matraz volumétrico de 250 ml.
- Medir 30 ml de una solución de NaOH 0.2N (leer anexo 2) en una probeta de 50 ml y agregarlos al matraz volumétrico de 250 ml que contiene el Fosfato Monobásico de Potasio.
- Homogenizar, agregar 100 ml de agua destilada y medir el pH con el Potenciómetro METTLER TOLEDO Modelo SEVEN MULTI.
- De ser necesario ajustar el pH y llevar a volumen con agua destilada.

2.3.4 PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR UNA SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO (NaOH) 0.1N

- Pesar aproximadamente 8.081 g de lentejas u hojuelas de NaOH, en un vaso de precipitados de 150 ml.
- Colocar 700 ml de Agua destilada en un vaso de Precipitados de 1 Lt y verter con cuidado y poco a poco las lentejas, agitando lentamente. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Verter la solución anterior en un matraz aforado de 2 Lt y realizar 3 lavados al vaso de precipitados con 25 ml de agua destilada. Llevar a volumen.

Las soluciones se preparaban un día antes de su uso y de ser necesario el día del trabajo experimental.

2.4 CONDICIONES ESPECTROFOMÉTRICAS

2.4.1 OBTENCIÓN DE ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Para poder establecer las condiciones espectrofotométricas para el método de contenido químico y perfiles de disolución, se realizó un barrido en cada uno de los medios de disolución marcados por la NOM-177-SSA1-2008:

- Solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.1N o fluido gástrico simulado sin enzima.
- Solución Búfer de Acetatos 0.05M a pH 4,5.
- Solución Búfer de Fosfatos 0.05M a pH 6,8 o fluido intestinal simulado sin enzima.

Además se incluyó un medio alcalino debido a que, como ya se mencionó anteriormente, el pKa del Acetaminofen es de 9.38 - 9.5, por lo cual al tener valores de pH inferiores al valor de pKa del Acetaminofén su señal analítica no se verá afectada de manera notable.

- Solución 0.1N de NaOH (solución alcalina)

Con el propósito de determinar las condiciones espectrofotométricas adecuadas, se pesan 12.5 mg de estándar de Acetaminofén y se disuelven con 30 ml del medio de disolución (HCl 0.1N, Búfer de Acetatos, Búfer de Fosfatos o NaOH 0.1N), se vierte la solución anterior en un matraz aforado de 100 ml y se lleva a la marca de aforo con el medio de disolución (*Sol A*).

Se toma una alícuota de 10 ml con una pipeta volumétrica y se coloca en un matraz aforado de 50 ml. Se lleva a la marca de aforo con el medio de disolución y se lee en el Espectrofotómetro UV- vis de 200 a 350 nm. Obteniéndose los espectros de absorción correspondientes de una solución de Acetaminofén con una concentración de 30 µg/ml en cada uno de los medios, los cuales se pueden apreciar a continuación en los gráficos 1, 2, 3 y 4:

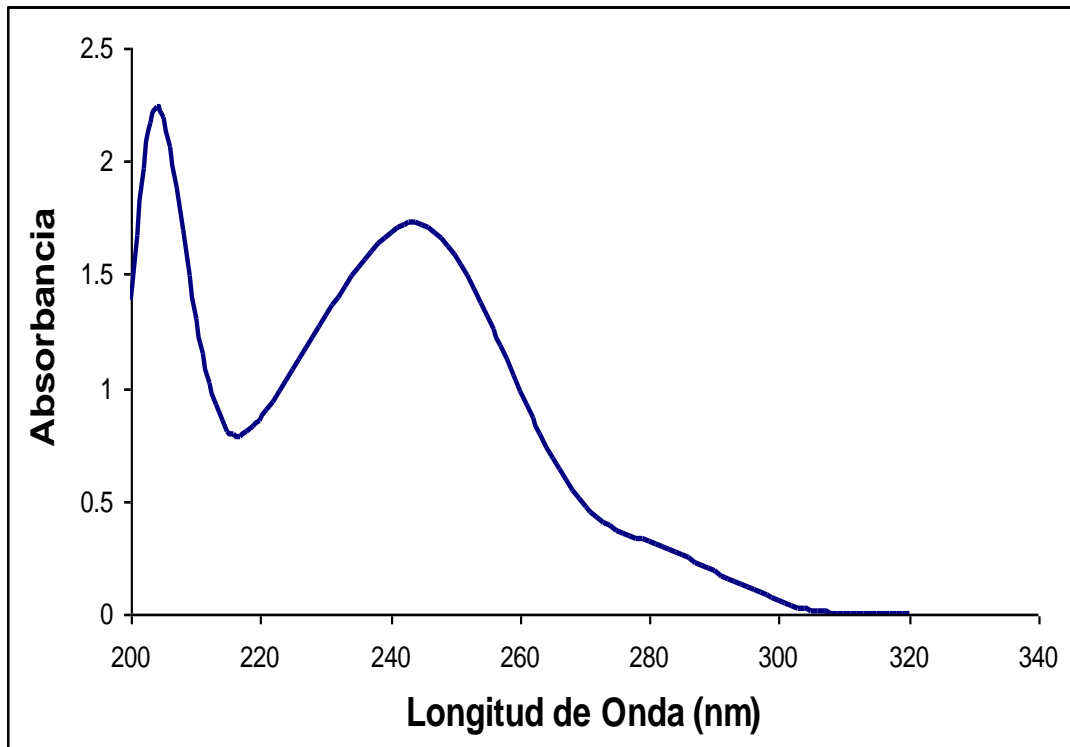


Gráfico 1. Espectro de Absorción de Acetaminofén en HCl 0.1N a un pH 1.01

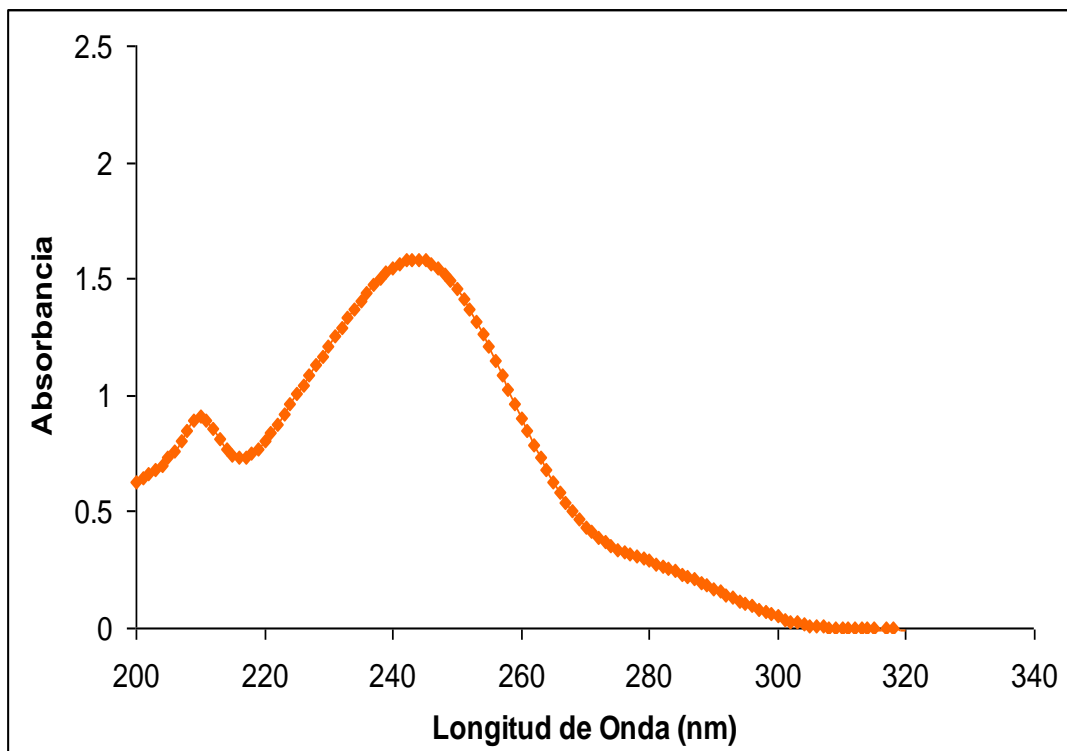


Gráfico 2. Espectro de Absorción de Acetaminofén en Búfer de Acetatos 0.05M pH 4.52

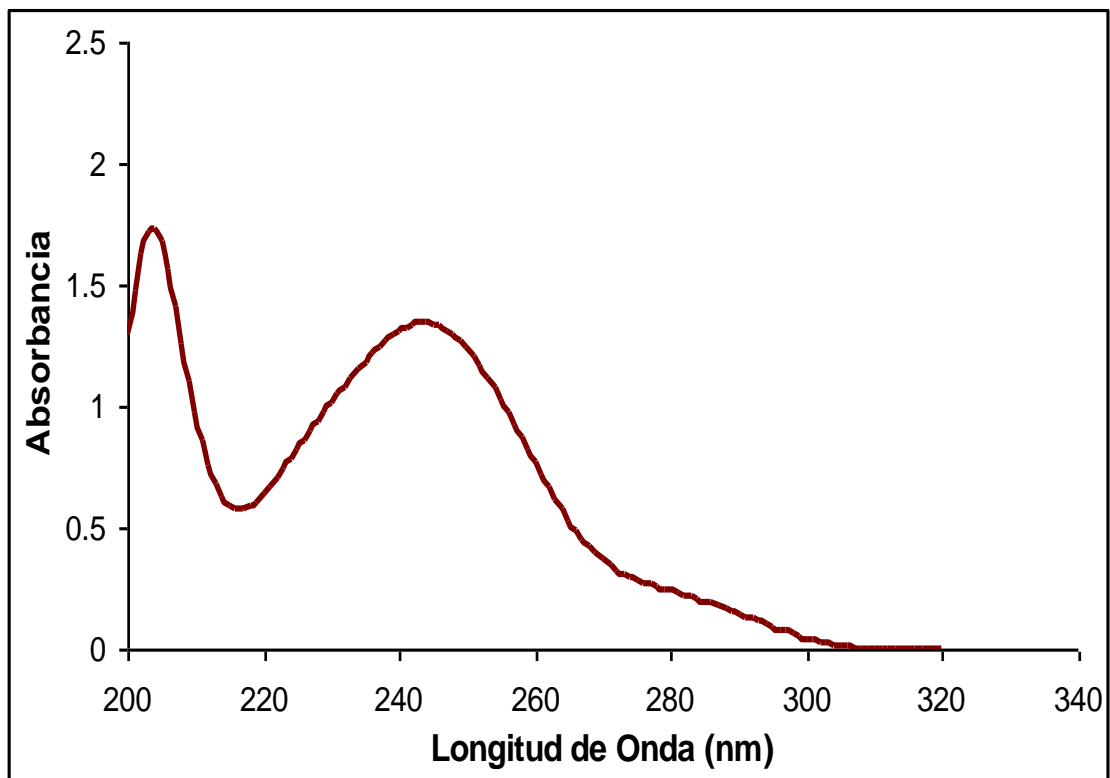


Gráfico 3. Espectro de Absorción de Acetaminofén en Búfer de Fosfatos 0.05M pH 6.8

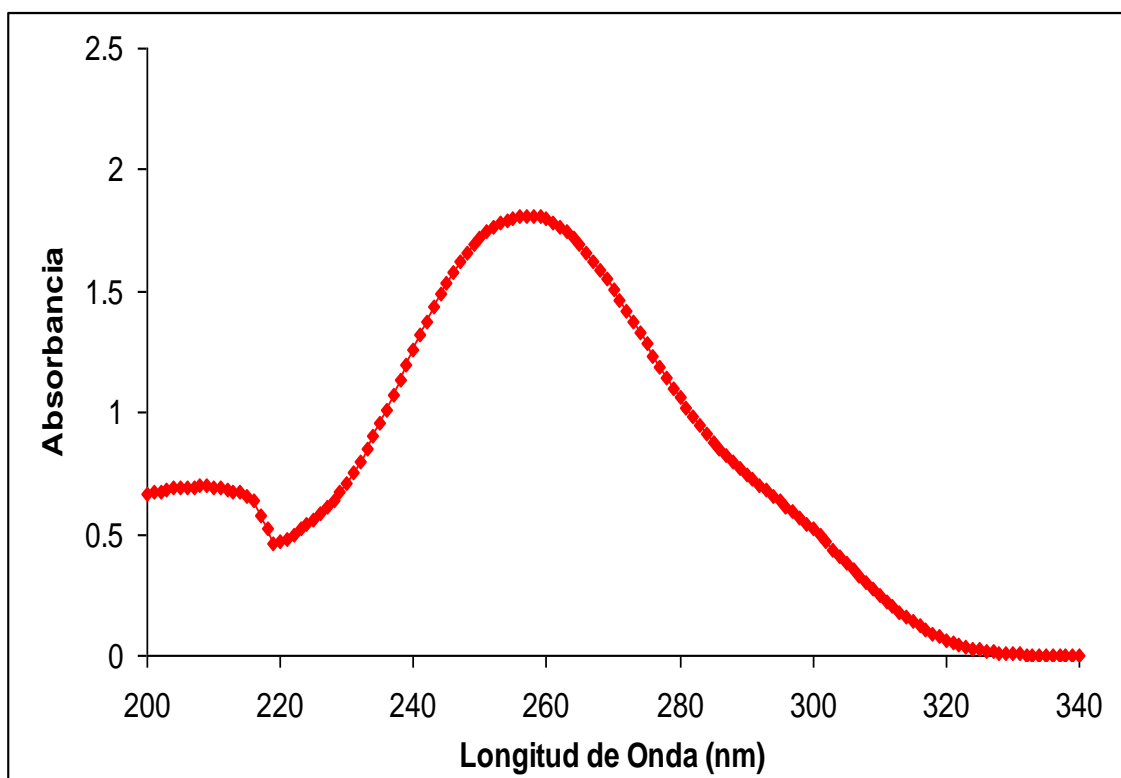


Gráfico 4. Espectro de Absorción de Acetaminofén en NaOH 0.1N a pH 12.

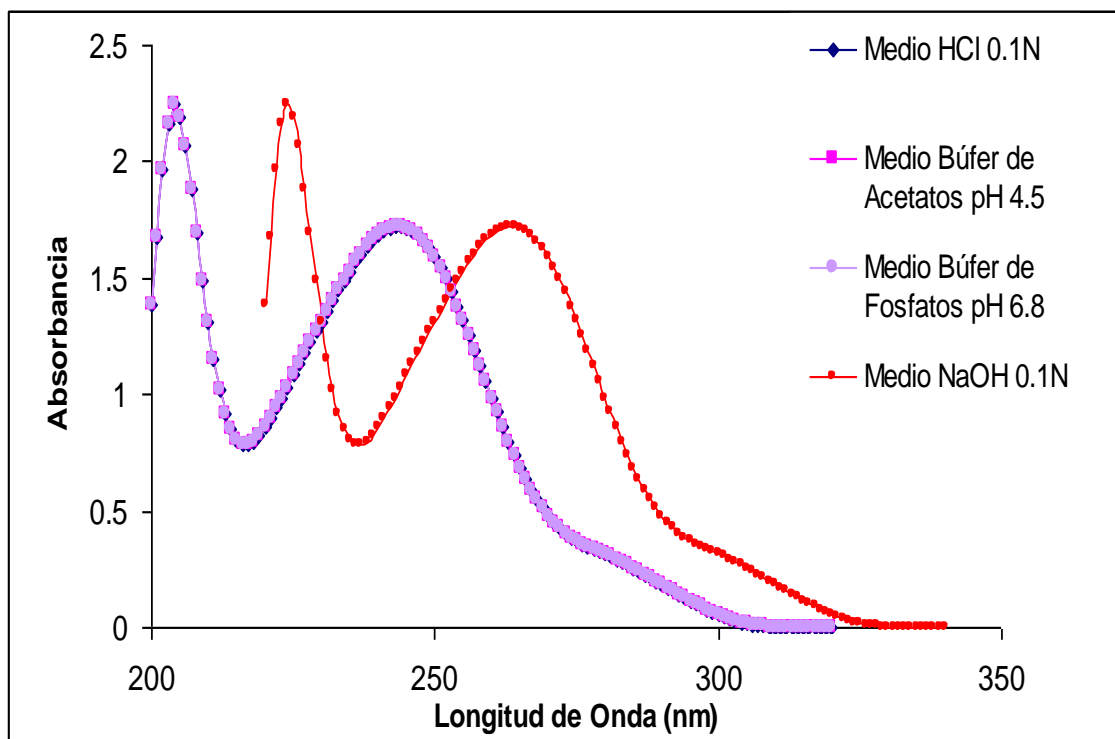


Gráfico 5. Comparación entre los Espectros de Absorción de Acetaminofén en los diferentes medios utilizados a diferentes valores de pH.

Como se puede observar en el gráfico 5, la respuesta del Acetaminofén no se ve afectada en el medio de HCl 0.1N, Búfer de Acetatos pH 4.5 y Búfer de Fosfatos pH 6.8, solo en la solución de NaOH 0.1N es donde se puede observar un cambio en el espectro de absorción, esto debido a que el valor de pH es de 12.4 el cual es superior al valor de pKa del Acetaminofén (véase numeral 1.3).

Por tanto, para la validación del método analítico de Contenido Químico se utilizó NaOH 0.1 N como medio de trabajo. Mientras que para los perfiles de disolución se utilizará NaOH 0.1 N como medio de aforo final ya que se tienen contemplado hacer diluciones del volumen de la muestra debido a que la cantidad de Acetaminofén a evaluar en las tabletas es de 500 mg.

Una vez seleccionado el medio de disolución es necesario realizar una prueba para determinar si los medios de disolución utilizados para los perfiles no afectan la solubilidad del Acetaminofén en el Medio de Aforo final de NaOH 0.1N y por tanto los resultados al realizar la validación del método analítico.

Para esto se pesan 14.5 mg de estándar de Acetaminofén se disuelven en 30 ml de medio de disolución (HCl 0.1N ó Búfer de Acetatos ó Búfer de Fosfatos) y se transfiere la solución a un matraz aforado de 100 ml, llevando a volumen con el mismo medio de disolución utilizado para disolver el Acetaminofén. Se toma una alícuota de 4 ml y se coloca en un matraz aforado de 25 ml, llevando a volumen con NaOH 0.1 N (Sol A). Se realiza un barrido en el espectrofotómetro UV-vis desde 200 hasta 350 nm de la solución A para obtener el espectro de absorción del Acetaminofén. Este procedimiento se realiza para cada uno de los medios de disolución que se utilizarán para la realización de los perfiles. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 7.

Barridos	pH inicial del medio	pH final de la Sol A
HCl 0.1N	1.06	12.48
Buffer Acetatos	4.51	12.53
Buffer Fosfatos	6.83	12.49
NaOH 0.1N	12.65	12.61

Tabla 7. Variabilidad de los valores de pH iniciales y finales de cada uno de los medios de disolución

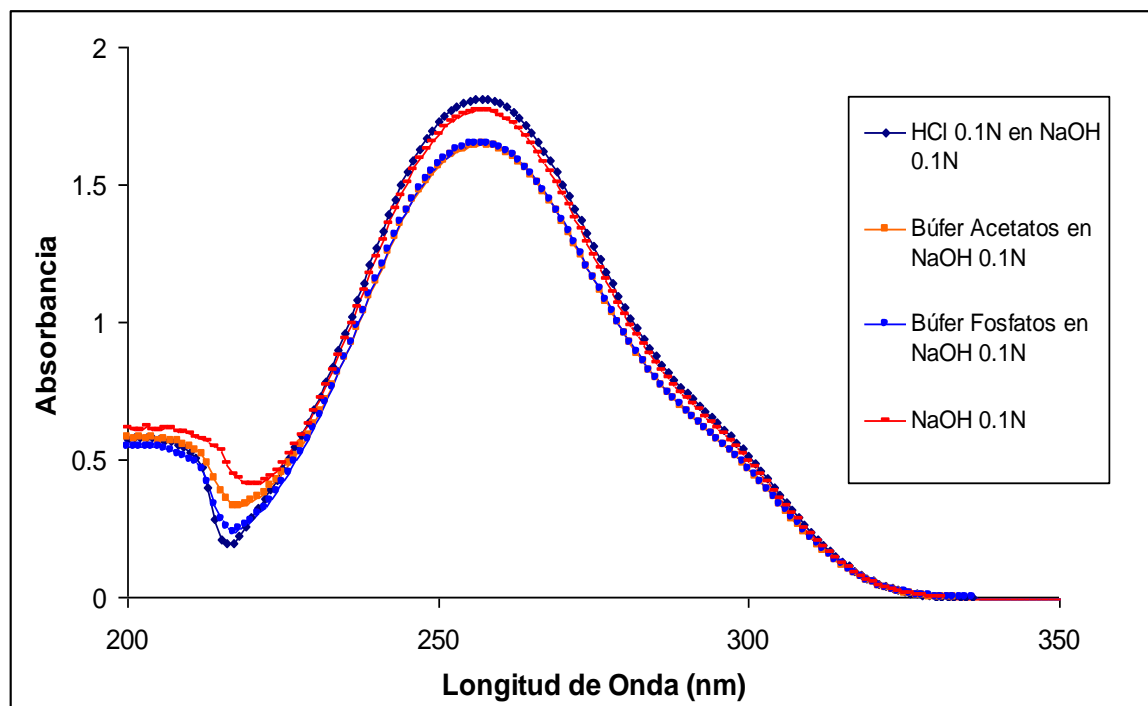


Gráfico 6. Comparación de los espectros de Absorción del Acetaminofén obtenidos de cada uno de los medios de disolución en NaOH 0.1N como medio final de aforo.

Como se puede observar en la Tabla 7, el pH inicial de cada medio de disolución no influye de manera drástica el resultado del pH final en la solución A, teniendo predominantemente un pH alcalino que se encuentra por arriba de 12, con lo cual aseguramos que sin importar el medio de disolución que utilizemos para la validación del Método de Perfiles de Disolución el resultado de la calibración realizada con NaOH 0.1N no se verá afectada. Esto se reafirma con el grafico 6 el cual muestra una comparación de todos los espectros de absorción obtenidos; en este grafico se observa como el comportamiento final del Acetaminofén no se ve influido por el medio de disolución inicial utilizado en cada barrido.

Con esto se establece que la calibración realizada en NaOH 0.1N para validar el Método de Contenido Químico se puede utilizar también para la validación del Método de Perfiles de Disolución.

2.4.2 DETERMINACIÓN DE LONGITUDES DE ONDA

Una de las ventajas de utilizar el método de MCP es que se puede utilizar el espectro completo para la construcción del modelo con solo el conocimiento del espectro del o los componentes puros de interés. En estos casos, el número de longitudes de onda puede ser muy grande o más pequeño, esto dependerá de las longitudes de onda seleccionadas, ya que ciertas longitudes de onda pueden contener ruido espectral o simplemente no contienen información relevante que pueda ayudar a construir el modelo robusto.

Por tal razón, se pueden escoger inteligentemente sólo un pequeño número de variables (longitudes de onda) que aseguren una buena capacidad predictiva, además de que puede construirse un modelo más fácil de interpretar.

A partir del espectro de Absorción del Acetaminofén en NaOH 0.1N se determinan las posibles longitudes de onda óptimas para el análisis de Mínimos Cuadrados Parciales, como se puede observar en el grafico 7:

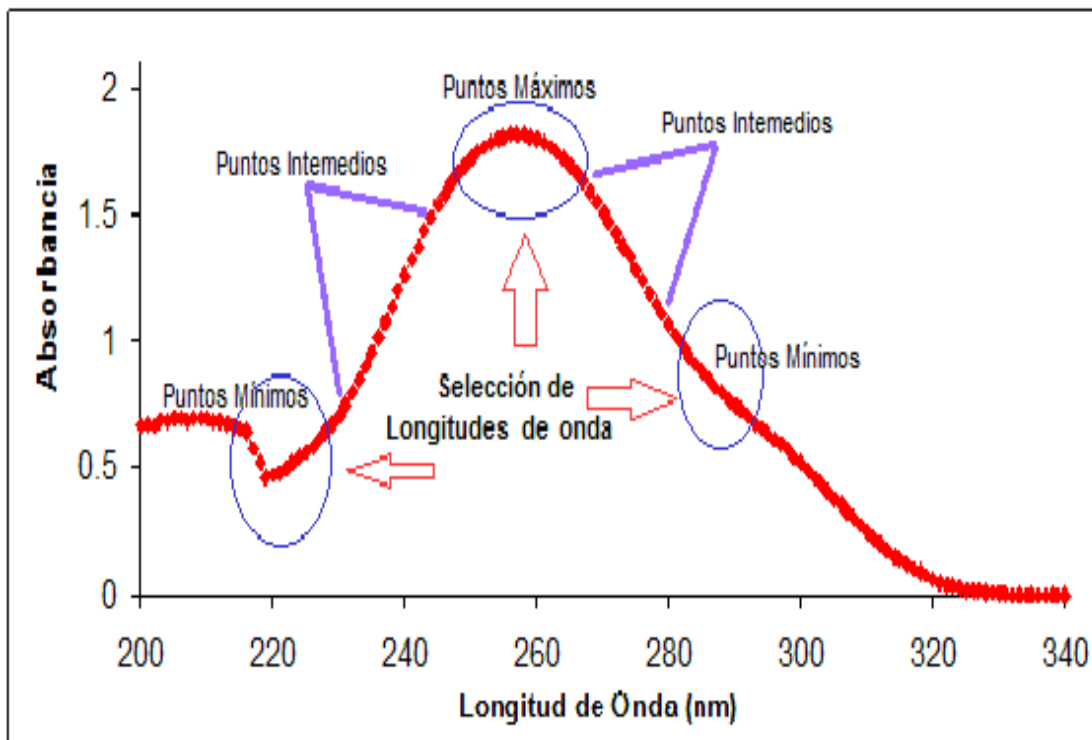


Gráfico 7. Puntos de Referencia para seleccionar las Longitudes de onda utilizando el Espectro de Absorción de Acetaminofén en NaOH 0.1N

Para la selección de las longitudes de onda a utilizar para el desarrollo de los métodos analíticos se parte de puntos clave del espectro considerando inicialmente los puntos de mínima absorbancia (puntos mínimos) y los puntos de máxima absorbancia (puntos máximos) del espectro de absorción, los cuales se muestran en la tabla 8:

	Longitud de Onda (nm)	Absorbancia
Punto Máximo	257	1.8122
Punto Mínimo	219	0.4628
	302	0.4659

Tabla 8. Longitudes de onda donde se encuentran los puntos mínimos y el punto máximo de absorbancia del Acetaminofén

Se seleccionaron inicialmente 17 longitudes de onda para realizar la calibración, posteriormente se eliminaron algunas longitudes de onda donde se presentaban valores de absorbancias muy bajos o donde se observaba una mayor variación entre las absorbancias. Finalmente se trabajó con 13

longitudes de onda, con lo cual se logró obtener una mejor calibración. Se realizó una curva de calibración de 5 concentraciones, cada concentración por triplicado. Se pesaron 23 mg de estándar de Acetaminofen y se disolvieron en 50 ml de NaOH 0.1N. Se vierte la solución en un Matraz aforado de 250 ml y de lleva a volumen con NaOH 0.1N (Sol. Stock). A partir de la solución Stock se toman alícuotas de 2, 4, 6, 8, 10 ml y cada alícuota se deposita en un matraz aforado de 25 ml. Se lleva a volumen con NaOH 0.1N y se llevan a leer en el espectrofotómetro UV-vis a las longitudes de onda seleccionadas, las longitudes de onda y las lecturas obtenidas se muestran a continuación en la tabla 9:

Conc Teórica (mcg/ml)	Absorbancias													Conc Real (mcg/ml)
	Abs 289	Abs 280	Abs 276	Abs 271	Abs 266	Abs 263	Abs 257	Abs 253	Abs 250	Abs 247	Abs 244	Abs 240	Abs 237	
7.8165	0.2295	0.316	0.3685	0.4362	0.4938	0.5189	0.5385	0.5293	0.5112	0.4821	0.4409	0.3689	0.3055	7.8428
	0.2277	0.3139	0.366	0.4338	0.4918	0.5166	0.5364	0.5272	0.5092	0.4805	0.4389	0.3669	0.3031	7.7661
	0.2301	0.3168	0.3686	0.4376	0.4952	0.52	0.5397	0.5308	0.5127	0.484	0.4428	0.3709	0.3076	7.8039
15.6329	0.4558	0.6293	0.7325	0.8687	0.9859	1.035	1.0739	1.0552	1.019	0.9608	0.8794	0.7397	0.6209	15.6842
	0.4566	0.6292	0.7331	0.8691	0.9858	1.0356	1.0747	1.0561	1.0205	0.9626	0.8816	0.7422	0.6243	15.5605
	0.4575	0.6306	0.735	0.871	0.9878	1.0372	1.077	1.0587	1.0222	0.9641	0.8824	0.7427	0.6239	15.6795
23.4494	0.6971	0.9563	1.1123	1.3169	1.4927	1.567	1.6263	1.5997	1.5462	1.4603	1.34	1.1341	0.9621	23.4715
	0.6967	0.9558	1.112	1.3163	1.4908	1.5651	1.6256	1.5991	1.545	1.459	1.3389	1.1324	0.9602	23.5255
	0.6946	0.9511	1.1068	1.3103	1.4845	1.5587	1.6182	1.5918	1.5382	1.4519	1.3322	1.1266	0.9549	23.3971
31.2659	0.9111	1.2538	1.46	1.7297	1.9599	2.0581	2.1355	2.1009	2.0301	1.9165	1.7572	1.4846	1.2583	31.2144
	0.9099	1.2538	1.46	1.7296	1.9607	2.058	2.1365	2.1009	2.0283	1.915	1.7546	1.4819	1.2554	31.3084
	0.912	1.2555	1.4624	1.7323	1.9635	2.0616	2.1407	2.1036	2.0314	1.9176	1.7573	1.4843	1.2584	31.2751
35.1741	1.0191	1.4034	1.6346	1.9358	2.1921	2.3001	2.3885	2.3491	2.2701	2.1428	1.9655	1.6615	1.4094	35.1155
	1.0199	1.4048	1.635	1.9363	2.193	2.301	2.3876	2.3493	2.269	2.1434	1.965	1.6624	1.4107	35.1612
	1.0209	1.4046	1.6369	1.9375	2.1936	2.3017	2.3886	2.3495	2.2699	2.1436	1.9658	1.6633	1.4119	35.2109

Tabla 9. Resultados de las absorbancias obtenidas a las 13 longitudes de onda seleccionadas.

PRESS	Acetaminofén	PRESS	Acetaminofén
h 1	8.38E-01	h 11	2.04E-02
h 2	1.02E-01	h 12	2.03E-02
h 3	5.17E-02	h 13	2.03E-02
h 4	3.67E-02	h 14	2.03E-02
h 5	3.02E-02	h 15	2.03E-02
h 6	2.49E-02	h 16	1.94E-02
h 7	2.28E-02	h 17	1.85E-02
h 8	2.17E-02	h 18	1.71E-02
h 9	2.13E-02	h 19	1.43E-02
h 10	2.07E-02	h 20	1.25E-02

Tabla 10. Resultados del análisis de PRESS a partir del tratamiento de los datos por el algoritmo de MCP para las absorbancias de la tabla 9.

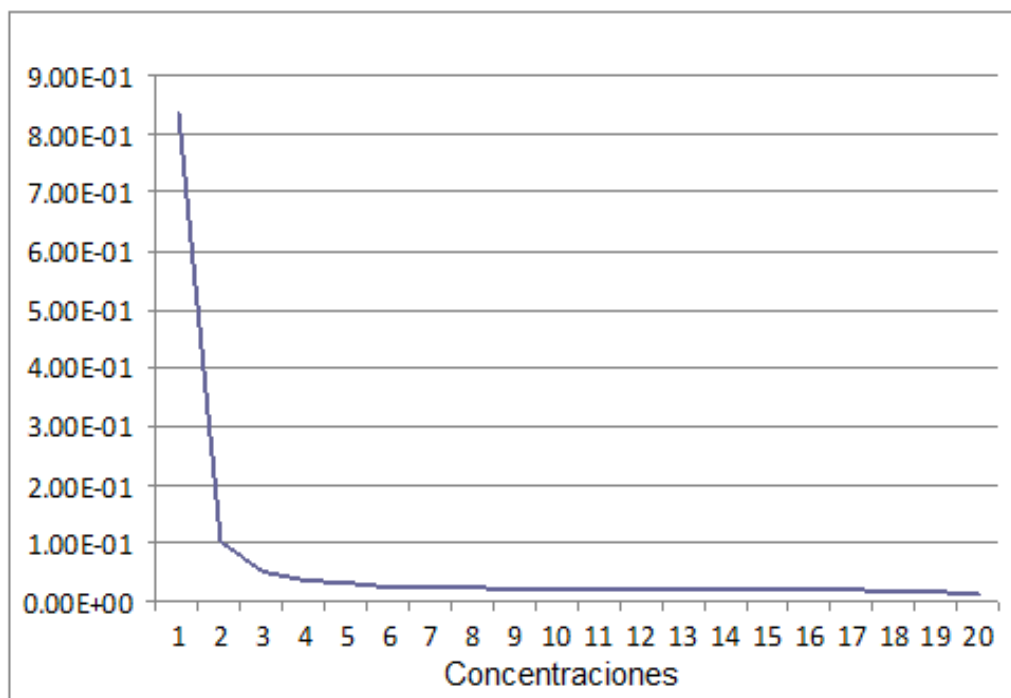


Gráfico 8. Valores obtenidos en el análisis de PRESS a partir del tratamiento de los datos con el algoritmo de MCP del programa ISHEJA.

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de PRESS del programa ISHEJA para MCP, mientras que en el gráfico 8 se ven representados los valores de la tabla 10. Estos valores sirven para encontrar el número de factor óptimo para realizar el análisis de Regresión utilizando el programa ISHEJA, esto es buscando un cambio brusco en el descenso de la tendencia de los datos. Se realizan las estimaciones en el programa con el número de factor elegido y se obtienen los resultados que se muestran a continuación en la tabla 11:

RESULTADOS DE LA REGRESIÓN		RESIDUALES	
PROMEDIO	1	CONC. 1	0.41%
DESVEST	0.0051	CONC. 2	1.83%
C.V.	0.51008	CONC. 3	-1.37%
INTERCEPTO	0.00034	CONC. 4	0.17%
PENDIENTE	0.99998	CONC. 5	-1.06%
COEF. CORR.	0.99998	CONC. 6	-0.48%
COEF. DETER.	0.9999	CONC. 7	0.55%
		CONC. 8	-0.52%
		CONC. 9	0.27%
		CONC. 10	0.22%
		CONC. 11	0.41%
		CONC. 12	-0.11%
		CONC. 13	-0.21%
		CONC. 14	0.23%
		CONC. 15	0.20%
		CONC. 16	-0.29%
		CONC. 17	-0.08%
		CONC. 18	0.07%
		CONC. 19	0.09%
		CONC. 20	0.12%
		CONC. 21	-0.24%

Tabla 11. Resultados obtenidos de la Regresión del Programa ISHEJA del algoritmo de MCP

Como se observa en la tabla 11 los valores obtenidos en la regresión, por el programa están dentro de los criterios de linealidad los cuales se muestran a continuación en la tabla 12, en base a esto se determina que la calibración es buena.

Características a Evaluar	Criterio de Aceptación
CV	$\leq 2\%$
Coefficiente de Determinación (r^2)	≥ 0.98
Pendiente (m)	El valor debe ser = 1
Intercepto (b)	El valor debe ser = 0
Residuales	$\leq 2\%$

Tabla 12. Criterios de linealidad

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

3.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTENIDO QUÍMICO EN TABLETAS DE ACETAMINOFÉN

3.1.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para evaluar la linealidad del sistema se prepararan tres curvas de calibración, cada una con 5 concentraciones diferentes por triplicado, (*ver tabla 13*).

Para esto se pesa, para cada curva de calibración, aproximadamente 23 mg de estándar de Acetaminofén, se disuelve el polvo en 50 ml de NaOH 0.1N. Se vierte la solución en un Matraz aforado de 250 ml realizando 3 lavados y se lleva a volumen con NaOH 0.1 N (Sol. Stock).

A partir de la solución Stock se toman alícuotas de 2, 4, 6, 8, 10 ml (por triplicado), depositando cada alícuota respectivamente en un matraz aforado de 25 ml. Se lleva a volumen con NaOH 0.1N y se llevan a leer en el espectrofotómetro UV-vis. Se analizan los resultados de cada curva de calibración por medio del algoritmo del método de MCP.

A continuación, en la tabla 13 se muestran las concentraciones teóricas de cada una de las curvas de calibración, para cada sistema así como sus respectivas concentraciones reales, que fueron estimadas por medio del método de MCP.

Sistema	Curva de Calibración No. 1		Curva de Calibración No. 2		Curva de Calibración No. 3	
	Conc Teórica (mcg/ml)	Conc Real (mcg/ml)	Conc Teórica (mcg/ml)	Conc Real (mcg/ml)	Conc Teórica (mcg/ml)	Conc Real (mcg/ml)
1	7.3553	7.328	7.3677	7.3713	7.3429	7.3769
		7.3974		7.3519		7.367
		7.432		7.3721		7.3864
2	14.7106	14.6623	14.7355	14.855	14.6857	14.5409
		14.7125		14.7292		14.7082
		14.6898		14.7542		14.69
3	22.0659	21.9712	22.1032	21.9373	22.0286	21.9749
		21.9531		21.9818		21.9789
		22.0859		22.1006		21.9961
4	29.4212	29.5128	29.4710	29.4373	29.3715	29.37
		29.4245		29.6612		29.4536
		29.5448		29.5449		29.5217
5	36.7765	36.7877	36.8387	36.7713	36.7143	36.5984
		36.7261		36.8363		36.8115
		36.7603		36.8443		36.6544

Tabla 13. Concentración real y respuesta analítica obtenida por el método de MCP para cada curva de calibración

Los datos obtenidos de la tabla 13 son sometidos a un análisis estadístico para demostrar la linealidad del sistema, los resultados obtenidos para la curva de Calibración 1 se muestran a continuación en la tabla 14, el gráfico 9 y la tabla 15.

RESULTADOS DE LA REGRESIÓN	
C.V.	0.41488
Coef correlación múltiple	0.9999
Coef determinación R^2	0.9999
Pendiente (m) = 1	
<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
0.9963	1.0036
Intercepto (b) = -6.86E-06	
<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
-0.0888	0.0888

Tabla 14. Resultados de las características evaluadas para la linealidad de la curva de calibración No. 1

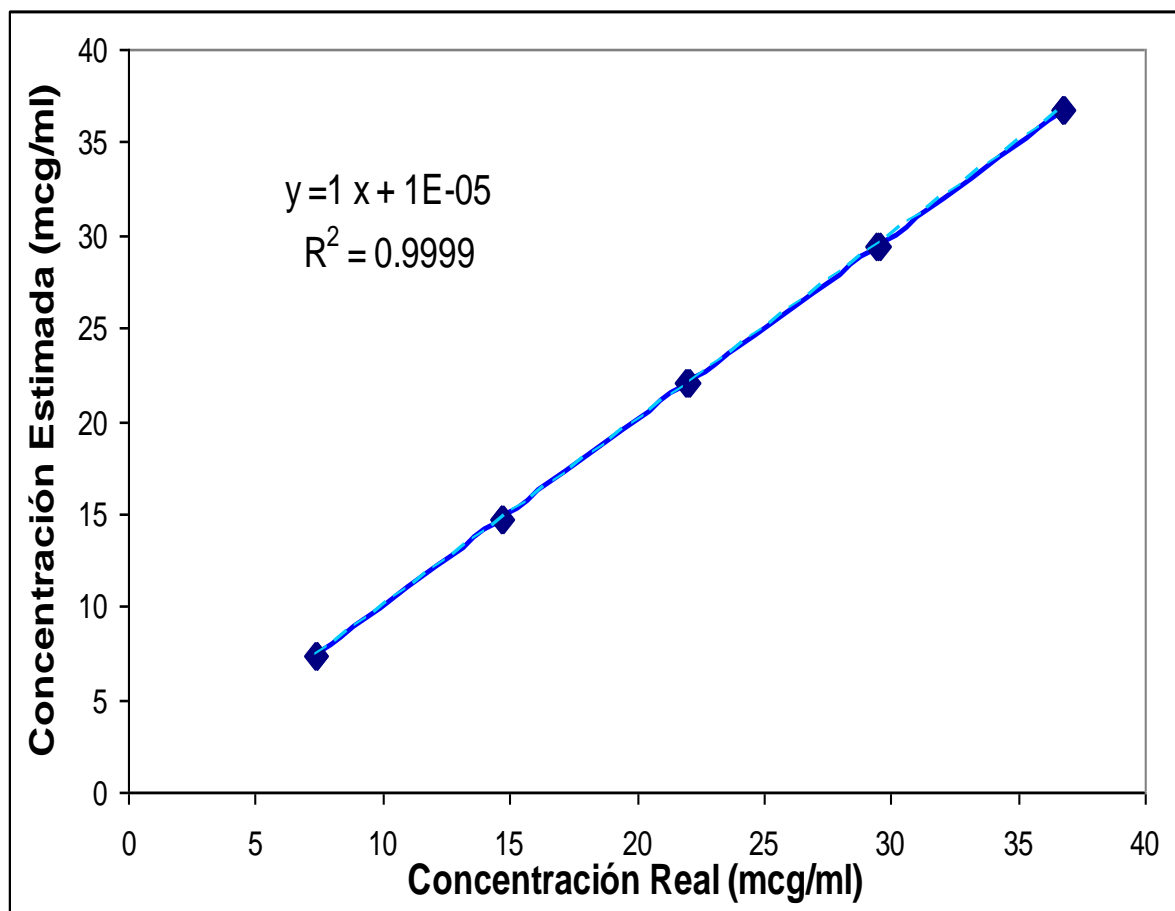


Gráfico 9. Concentración estimada contra la concentración real del Acetaminofén de la curva de calibración No. 1

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F calculada</i>	<i>F crítica (α=0.05)</i>
Regresión	1	1622.957	1622.957	352414.546	3.3213E-30
Residuos	13	0.0599	0.0046		
Total	14	1623.017			

Tabla 15. Resultados del análisis de variancia para la curva de calibración No. 1 con un nivel de significancia del 95%

Los resultados obtenidos para la curva de calibración 2 se muestran en la tabla 16, el gráfico 10 y la tabla 17.

RESULTADOS DE LA REGRESIÓN	
C.V.	0.3889
Coef correlación múltiple	0.9999
Coef determinación R ²	0.9999
Pendiente (m) = 1	
<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
0.9952	1.0048
Intercepto (b) = -6.86E-06	
<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
-0.1174	0.1173

Tabla 16. Resultados de las características evaluadas para la linealidad de la curva de calibración No. 2

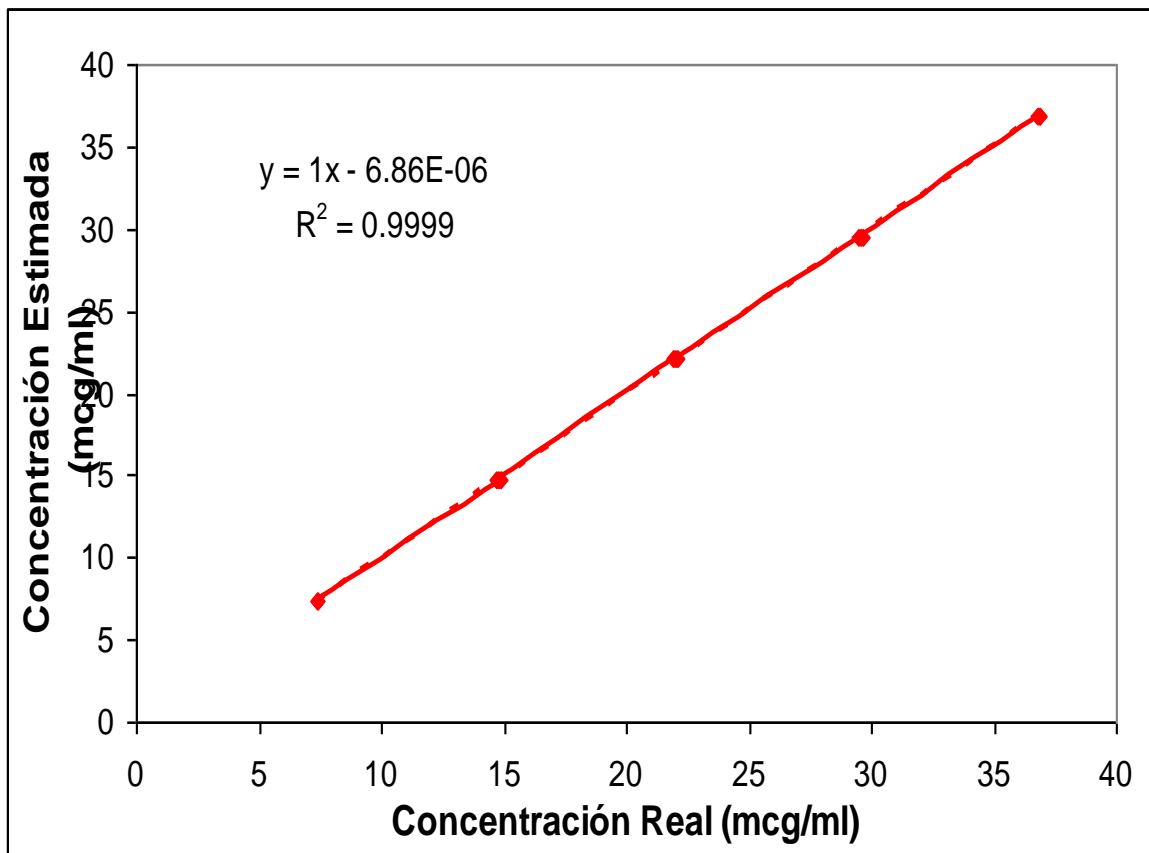


Gráfico 10. Concentración estimada contra la concentración real del Acetaminofén de la curva de calibración No. 2

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica ($\alpha=0.05$)
Regresión	1	1628.407	1628.407	202367.581	1.2223E-28
Residuos	13	0.1046	0.0081		
Total	14	1628.512			

Tabla 17. Resultados del análisis de variancia para la curva de calibración No. 2 con un nivel se significancia del 95%

Por último se muestran los resultados obtenidos para la curva de calibración 3 en la tabla 18, el gráfico 11 y la tabla 19.

RESULTADOS DE LA REGRESIÓN	
C.V.	0.40691
Coef correlación múltiple	0.999
Coef determinación R^2	0.999
Pendiente (m) = 0.999	
<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
0.9956	1.004
Intercepto (b) = 1.61E-05	
<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
-0.1072	0.1072

Tabla 18. Resultados de las características evaluadas para la linealidad de la curva de calibración No. 3

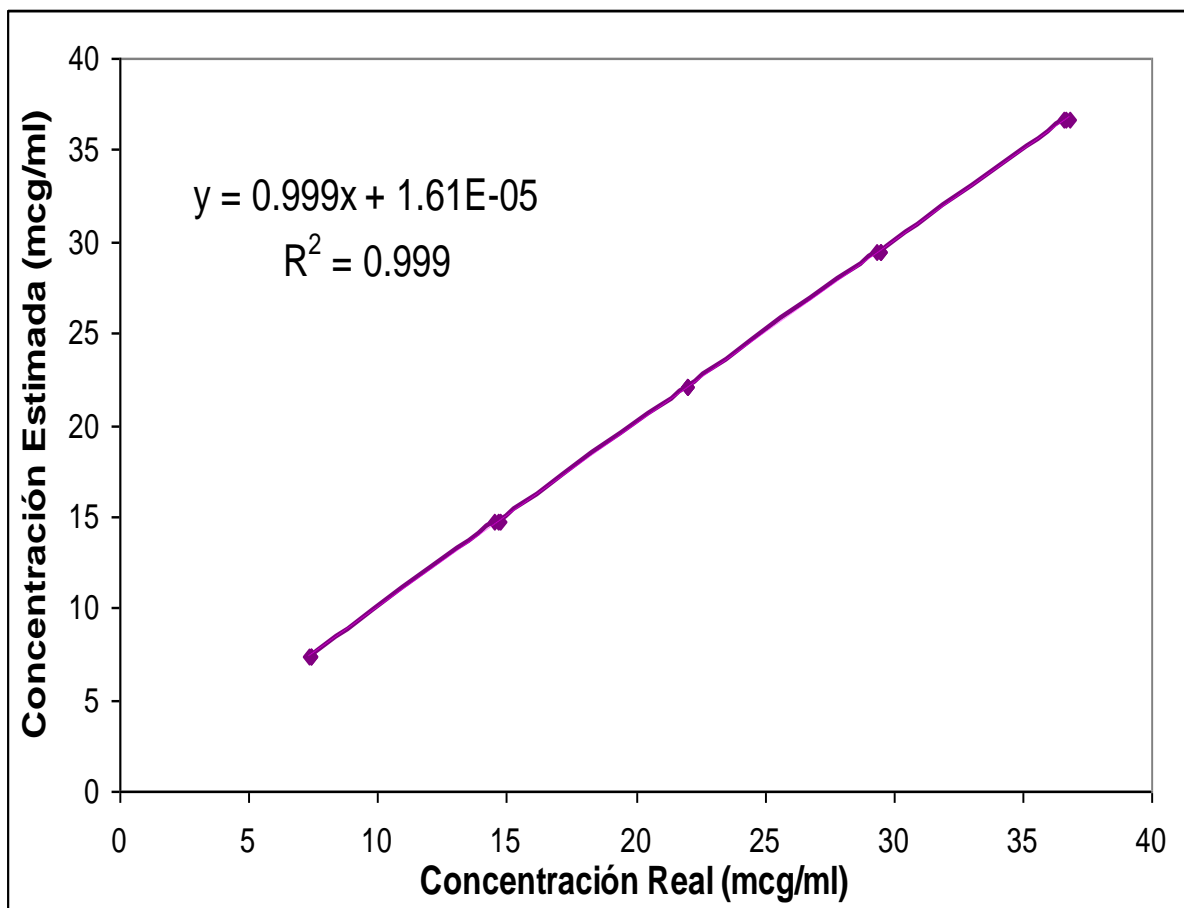


Gráfico 11. Concentración estimada contra la concentración real del Acetaminofén de la curva de calibración No. 3

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	F crítica ($\alpha=0.05$)
Regresión	1	1617.44	1617.44	240752.963	3.9527E-29
Residuos	13	0.0873	0.00672		
Total	14	1617.532			

Tabla 19. Resultados del análisis de variancia para la curva de calibración No.3 con un nivel de significancia del 95%

En base a los gráficos 9, 10 y 11 de concentración real contra la respuesta analítica obtenida se observa la tendencia lineal de los datos obtenidos de las concentraciones del Acetaminofén para cada una de las curvas de calibración realizadas para evaluar la linealidad del sistema.

Esto se reafirma en base a los valores obtenidos a partir de la regresión de cada curva de calibración ya que los valores obtenidos para el coeficiente de Correlación, Coeficiente de Determinación y el CV que se muestran en las tablas 14, 16 y 18 para cada curva, se encuentran dentro de los criterios de aceptación establecidos para determinar la linealidad del sistema, como se puede observar a continuación en la tabla 20:

CARACTERÍSTICAS A EVALUAR	FACTOR DE EVALUACIÓN	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Linealidad del sistema	CV	$\leq 2\%$
	Coeficiente de Correlación (r)	≥ 0.999
	Coeficiente de Determinación (r^2)	≥ 0.98
	Pendiente (m)	El intervalo no debe incluir cero y el valor debe ser = 1
	Intercepto (b)	El intervalo debe incluir cero y el valor debe ser = 0

Tabla 20. Criterios de Aceptación Establecidos para la Validación de linealidad del sistema.

Por otra parte, en las tablas 14, 16 y 18 se observa que en todos los casos el intervalo del intercepto incluye cero, mientras que el intervalo de la pendiente no incluye el cero, cumpliendo así, todos los parámetros establecido en las normas de validación para linealidad del sistema.

Por otro lado, se realizó un análisis de variancia para cada curva, los resultados se muestran en las tablas 15, 17 y 19, y se obtuvo que la $F_{calculada}$ es mayor con respecto a su $F_{crítica}$ para las tres curvas de calibración. Con esto se cumple otro parámetro para determinar la linealidad del sistema.

Finalmente en base a toda la información obtenida a partir de los datos se determina que existe una relación lineal entre la concentración Real y la Respuesta analítica aplicando el método de MCP con un nivel de significancia de 95%, es decir, el sistema es lineal.

3.1.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL SISTEMA

Para evaluar la precisión y exactitud del sistema se evalúan tres niveles de concentración.

Se pesa la cantidad correspondiente al nivel de concentración de estándar de Acetaminofén, se disuelven en 30 ml de NaOH 0.1N y se vierte la solución en un matraz aforado de 100 ml, se lleva a volumen. Se toma una alícuota de 2 ml de la solución anterior y se depositan en un matraz aforado de 25 ml, llevando a volumen con NaOH 0.1N. Se llevan las soluciones al espectrofotómetro UV-vis y se determina el porcentaje de recobro para cada nivel de concentración los resultados se muestran a continuación en la tabla 21:

Concentración	Porcentaje Recuperado	Promedio	S	Coef. Variación	T calculada	T Crítica
29.5 mcg/ml 120%	99.9722	99.9170	0.0761	0.07618	-2.3720	2.5706
	99.8858					
	99.8765					
	100.0167					
	99.8050					
	99.9456					
21.5 mcg/ml 100%	99.9700	100.1016	0.4347	0.43429	0.5723	2.5706
	100.2519					
	99.7837					
	100.4232					
	99.4986					
	100.6820					
13.5 mcg/ml 80%	100.3690	100.3920	0.5972	0.59490	1.6076	2.5706
	99.5972					
	100.7221					
	99.8902					
	100.4987					
	101.2746					

Tabla 21. Porcentajes de recobro determinados a partir de las concentraciones obtenidas por el método de MCP.

En la tabla 21 podemos observar los porcentajes de recuperación a partir del método de MCP los cuales son muy cercanos al 100% para todas los niveles de

concentración, además de que los valores calculados para el CV en las tres concentraciones, son menores al 2% por lo cual se establece que el sistema es Preciso, tomando como referencia los criterios de aceptación para la precisión y exactitud establecidos por las normas de validación que se muestran a continuación en la tabla 22.

CARACTERÍSTICA A EVALUAR	FACTOR DE EVALUACIÓN	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Precisión del sistema	Coeficiente de Variación (CV)	$\leq 2\%$
Exactitud del sistema	Prueba t de Student	$t_{cal} < t_{critica} (\alpha=0.05, gl)$

Tabla 22. Criterios de Aceptación Establecidos para la Precisión y Exactitud del sistema

Por otra parte para ver si el sistema es exacto se realizó un análisis para determinar los valores de t calculada y el valor de la t crítica los cuales se encuentran incluidos la tabla 21.

De acuerdo a los valores de la t calculada, al ser menores al valor de la t crítica, se establece que para los tres niveles de concentración utilizados en la validación el sistema es exacto.

3.1.3 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se evaluó mediante la preparación de placebos cargados y realizando una calibración mismo día de trabajo. Los placebos cargados se prepararon de acuerdo a la formulación que se muestra a continuación en la tabla 23.

Formulación Experimental	%	Función en la formulación	Peso de la tableta (mg)	mg de Acetaminofén por tableta
Acetaminofén DC	82.92	Principio Activo	680	500 mg
Avicel pH 102	10	Aglutinante		
Supertab 14 Ds	2.78	Diluente		
Poliplasdone XL	4	Desintegrante		
Estearil Fumarato de Sodio	0.3	Lubricante		
TOTAL	100			

Tabla 23. Formulación utilizada para la preparación de placebos cargados ^[30].

A partir de la formulación que se muestra en la tabla 23 se realizan los cálculos para preparar placebos cargados con 5 niveles de concentración de Acetaminofén al 80, 90, 100, 110 y 120 % de principio activo.

Los placebos cargados se preparan siguiendo la metodología del diagrama que se muestra a continuación en la figura 5.

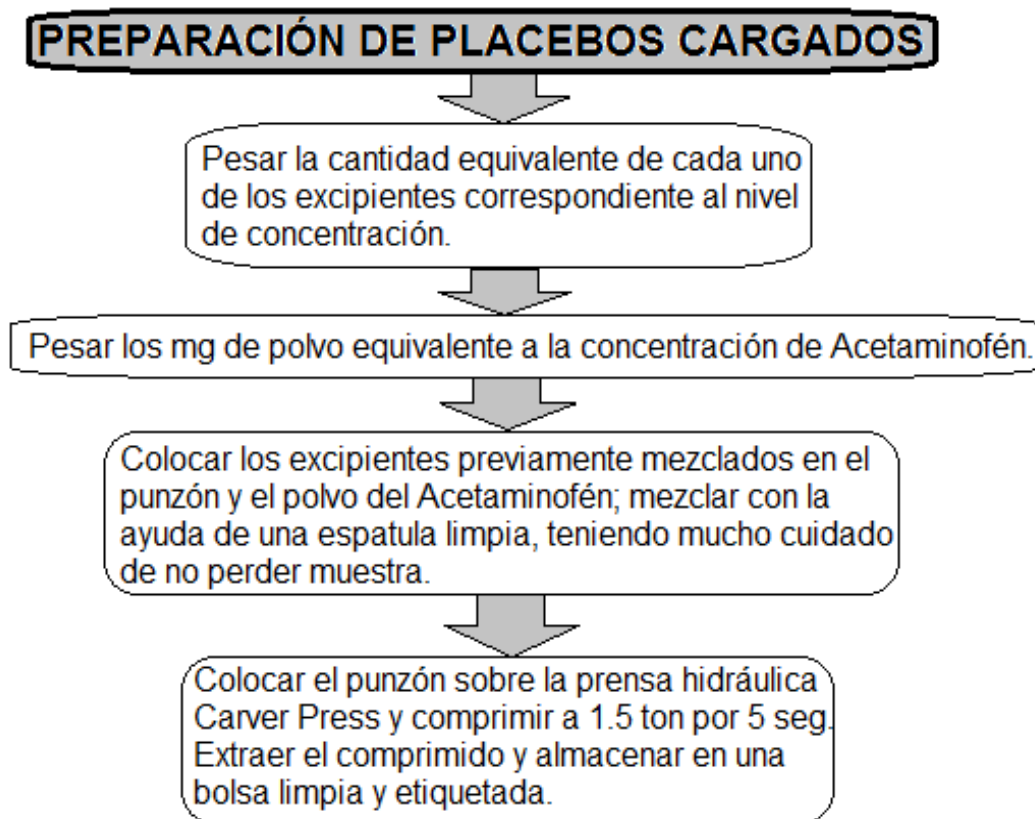


Figura 5. Procedimiento para la preparación de placebos cargados.

Se pesan aproximadamente 15 mg de placebo y se agregan 60 ml de NaOH 0.1N, se agita durante 25 min. Se filtra la solución dejando caer el filtrado en un matraz aforado de 100ml llevando a volumen.

Se toma una alícuota de 2 ml y se colocan en un matraz aforado de 10 ml llevando a volumen y se lee en el espectrofotómetro UV-vis a las longitudes de onda de análisis. Se determina el porcentaje de Acetaminofén recuperado.

Los porcentajes recuperados experimentalmente se muestran a continuación en la tabla 24:

Porcentaje	mg de Acetaminofen Adicionado	mg de Acetaminofen Recuperado	% Recuperado
80%	8.8536	9.0085	101.7496
	8.8418	8.8715	100.3355
	8.8183	8.85545	100.4212
90%	9.8797	9.88545	100.0578
	9.8731	9.85635	99.8301
	9.9459	10.07565	101.3044
100%	11.0291	11.1845	101.4084
	11.0512	11.2597	101.8869
	11.0512	11.1778	101.1458
110%	12.1484	12.2946	101.2032
	12.1727	12.3653	101.5818
	12.1080	12.0174	99.2518
120%	13.2005	13.1059	99.2830
	13.2181	13.2536	100.2682
	13.2270	13.2527	100.1942

Tabla 24. Estimaciones de los porcentajes recuperados a partir de placebos cargados para determinar la Linealidad del Método

En el gráfico 12, que se muestra a continuación, se esquematizan los datos obtenidos descritos en la tabla 24.

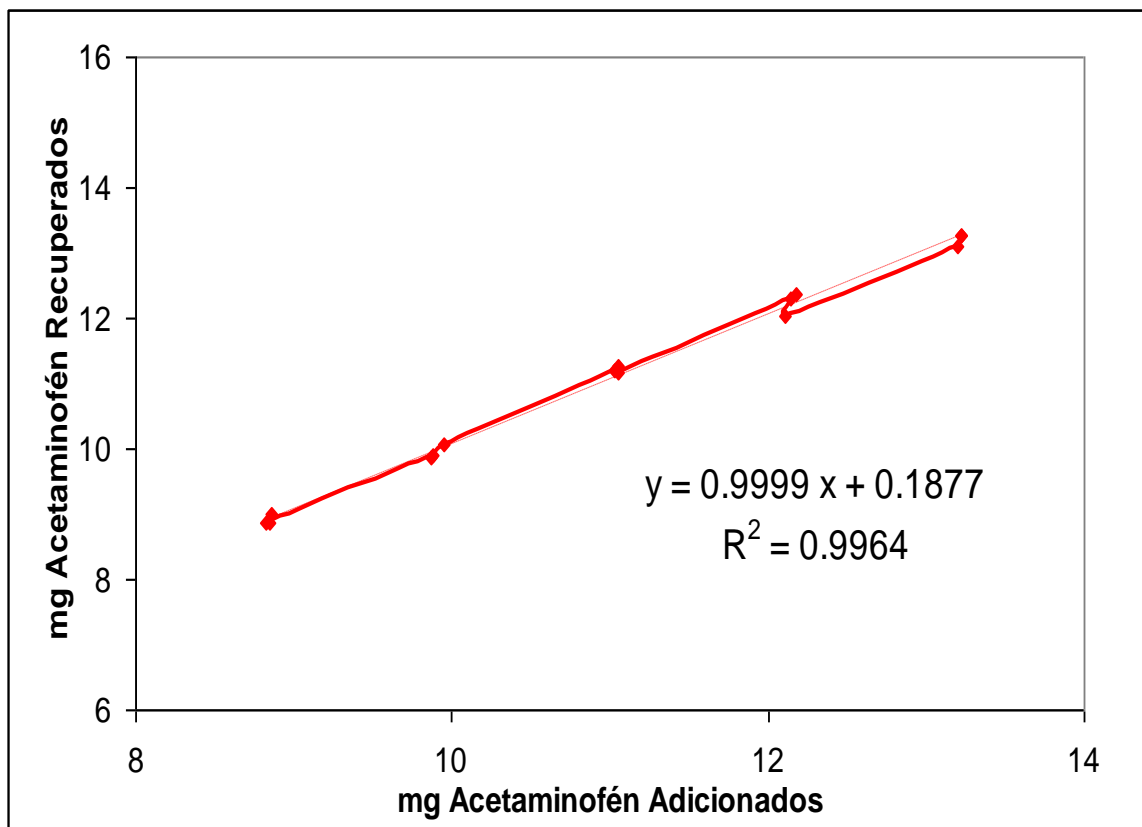


Gráfico 12. Miligramos Recuperados de Acetaminofén en Función de los miligramos Adicionados aplicando el método de MCP

En el gráfico 12 se observa la tendencia lineal correspondiente a los datos, así como la ecuación de la recta.

CRITERIO DE EVALUACIÓN	Resultados de la Regresión	Criterios de Aceptación
CV	0.861	< 2%
r	0.99	> 0.99
r²	0.996	> 0.98
Pendiente (m)	0.99	El intervalo no debe incluir cero y el valor debe ser = a 1
Intervalo de la pendiente	Inferior 95%	Superior 95%
	0.9538	1.0248
Intercepto	0.1877	El intervalo debe incluir cero y el valor debe ser = a 0
Intervalo del intercepto	Inferior 95%	Superior 95%
	-0.2078	0.5833

Tabla 25. Comparación de los resultados de la regresión con los Criterios de Aceptación Establecidos para la Validación de la Linealidad del Método

Como se muestra en la tabla 25, los resultados obtenidos a partir del análisis de regresión, cumplen con los parámetros establecidos de linealidad. Además de que los intervalos de confianza estimados para el intercepto incluye cero, mientras que para los intervalos de la pendiente no incluye cero.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F Calculada	F Crítica ($\alpha=0.05$)
Regresión	1	35.5256	35.5256	3621.1215	2.7248E-17
Residuos	13	0.1275	0.0098		
Total	14	35.6532			

Tabla 26. Resultados del análisis de variancia para los datos de linealidad del método.

Por otro lado se realizó un análisis de variancia y como muestra la tabla 26 el valor de F_{cal} es mayor al valor de $F_{critica}$, por lo cual se puede decir que existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada de los placebos de Acetaminofén con un nivel de significancia del 95%. En base a todos los datos arrojados por el análisis se determina que el método es lineal.

3.1.4 PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO

Para la precisión y la exactitud del método se utilizó placebos cargados, siguiendo por norma que deben ser una concentración representante del 100%, un nivel arriba (110%) y uno por debajo (90%); realizando seis ensayos de cada nivel.

La metodología usada para determinar la precisión y exactitud del método consistió en pesar aproximadamente 15 mg de placebo y se agregan 60 ml de NaOH 0.1N, se agita durante 25 min. Se filtra la solución dejando caer el filtrado en un matraz aforado de 100 ml llevando a volumen. Se toma una alícuota de 2 ml y se colocan en un matraz aforado de 10 ml llevando a volumen. Se determina el porcentaje de Acetaminofén recuperado para los tres niveles de concentración utilizados. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla 27.

Porcentaje	mg Acetaminofén Adicionados	mg Acetaminofén Recuperados	% Recuperado	Promedio	S	CV
90%	9.9393	10.1589	102.2089	101.1709	1.2503	1.2358
	9.9128	9.8855	99.7238			
	9.8996	9.8564	99.5632			
	9.9591	10.0757	101.1698			
	9.9393	10.1449	102.0686			
	9.9261	10.1535	102.2908			
100%	11.0291	11.1845	101.4084	101.2590	1.3013	1.2851
	11.0512	11.2597	101.8869			
	11.0585	11.3030	102.2107			
	11.0512	11.1778	101.1458			
	11.0659	11.4153	102.1577			
	11.0218	10.8834	98.7442			
110%	12.1484	12.2946	101.2032	100.1414	1.6729	1.6706
	12.1727	12.3653	101.5818			
	12.0918	11.8525	98.3498			
	12.0756	11.8574	98.3904			
	12.1080	12.0174	99.2518			
	12.1565	12.5716	102.0712			

Tabla 27. Estimaciones de los porcentajes recuperados de los placebos cargados para determinar la Precisión y Exactitud del Método Analítico.

La tabla 27 muestra los porcentajes de recuperación de Acetaminofén para cada uno de los niveles de concentración de los placebos cargados, así como sus correspondientes valores calculados para el CV.

En todos los casos el CV es menor al 2% con lo cual se establece que el método es preciso, de acuerdo al criterio de validación establecido por norma de acuerdo como se especifica en la tabla 28.

Característica a evaluar	Factor de Evaluación	Criterios de Aceptación
Precisión del Método	Coef de Variación	$\leq 2\%$
Exactitud del Método	t Student Porcentaje de recobro Intervalos de confianza	$t_{cal} < t_{critica} (\alpha=0.05, gl)$ Debe ser 98-102% Debe incluir el 100%

Tabla 28. Criterios de Aceptación Establecidos para la Validación de la Precisión y Exactitud del Método

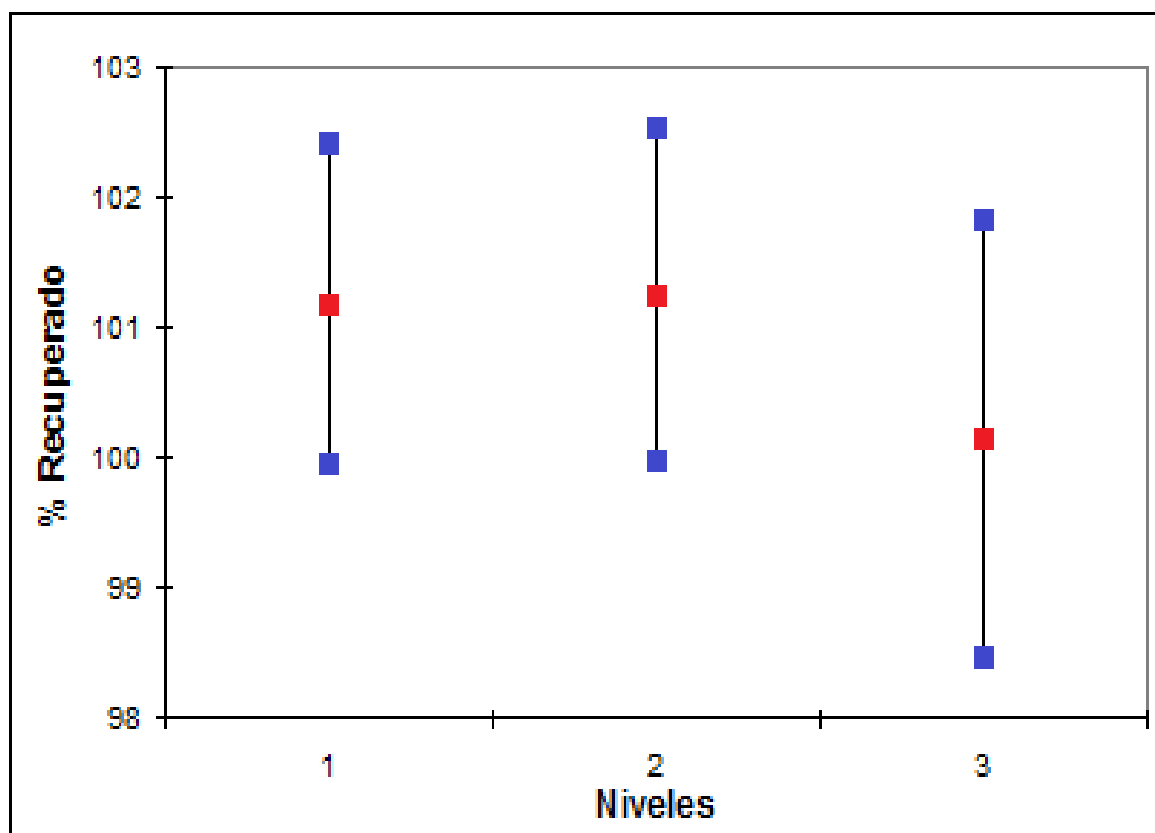
Aunque el método sea preciso no quiere decir que también sea exacto por lo cual requiere que se determine la t calculada para cada nivel de concentración, al igual que los intervalos de confianza, los valores obtenidos para cada nivel se muestran a continuación en la tabla 29.

Porcentaje	IC	LSC	LIC	t calculada	t crítica (0.05, gl)
90	1.3121	102.4830	99.8587	2.294	2.571
100	1.3656	102.6246	99.8933	2.37	
110	1.7556	101.8970	98.3857	0.2070	

Tabla 29. Valores para evaluar la exactitud del método con un nivel de significancia del 95%

De acuerdo a lo establecido en la tabla 27 los valores de $t_{calculada}$ son menores al valor de $t_{critica}$, como se observa en la tabla 25 esta condición de validación se cumple al igual que, como se observa en la tabla 26, los valores del porcentaje de recobro se encuentran dentro del intervalo de 98-102% aceptable de recuperación.

Además que los valores de LSC y LIC incluyen el valor del 100% como se puede observar en la tabla 29 y en el grafico 13 siguiente:



Nivel 1 = 90%

Nivel 2 = 100%

Nivel 3 = 110%

Gráfico 13. Representación Gráfica de los Intervalos de confianza para cada uno de los niveles de concentración

En base a todos los resultados obtenidos se determina que el método es preciso y exacto.

3.1.5 REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

La Repetibilidad y Reproducibilidad se evalúa a partir de la preparación de 6 ensayos con pesos independientes a partir de placebos cargados representantes a la concentración del 100%. Estos ensayos se deben efectuar por dos analistas en dos días diferentes, bajo las mismas condiciones ya establecidas para el análisis.

Analito Acetaminofén		% Fármaco	Promedio	S	CV
Analista 1	Día 1	99.95 100.62 99.70 99.82 100.82 99.01	99.99	0.656	0.656
	Día 2	100.10 100.07 101.00 100.54 99.80 99.08	100.10	0.652	0.651
Analista 2	Día 1	99.56 99.58 99.85 100.59 99.61 101.02	100.04	0.621	0.621
	Día 2	99.41 99.51 100.69 99.90 100.91 99.44	99.98	0.666	0.666

Tabla 30. Porcentajes de Recobro para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método.

De acuerdo a los datos obtenidos en la tabla 30 se determina que el CV es menor al 2%, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido y que se encuentra reportado en la tabla 31, además de que todos los porcentajes caen dentro del intervalo de 98-102% de recobro.

CARACTERÍSTICA A EVALUAR	FACTOR DE EVALUACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Repetibilidad	CV	< 2%
Reproducibilidad	Análisis de Varianza (modelo anidado)	F cal < F crítica($\alpha=0.05, gl$)

Tabla 31. Criterios de aceptación establecidos para Repetibilidad y Reproducibilidad

Al graficar los datos obtenidos en base a los porcentajes de recobro se observa en el gráfico 14, que los intervalos establecidos son muy semejantes entre los días y los analistas, ya que todos los intervalos incluyen el 100%, lo cual indica que entre los datos de los diferentes días así como los datos de los dos analistas no existe una diferencia significativa.

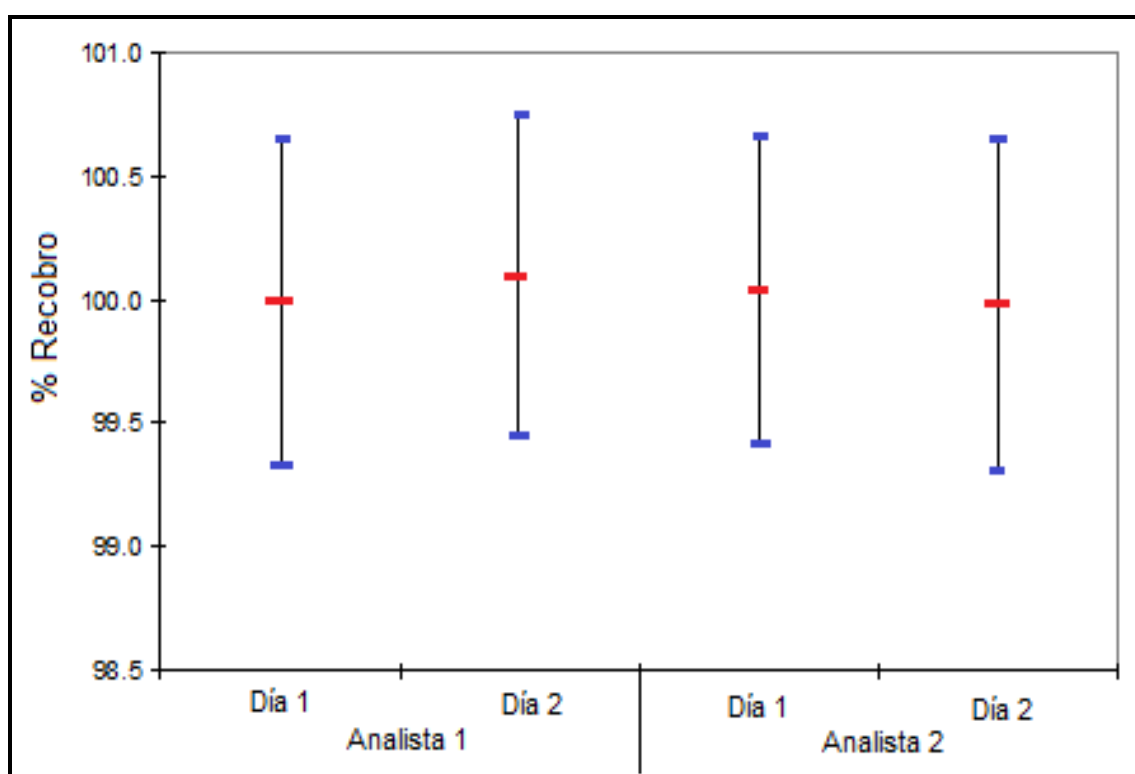


Gráfico 14. Porcentaje de recobro de dos analistas en dos días diferentes

Por último para determinar si en verdad existe o no una diferencia entre los datos obtenidos del porcentaje de recobro de los analistas y los días, se utiliza un análisis de variancia tomando en consideración lo siguiente:

Hipótesis:

- Ho: Analista 1 = Analista 2. No hay diferencias significativas en los resultados obtenidos por los dos analistas.
- Ha: Analista 1 \neq Analista 2. Si hay diferencias significativas en los resultados obtenidos por los dos analistas (Los resultados obtenidos por el analista 1 son diferentes a los obtenidos por el analista 2).

Criterios de aceptación:

- Si $F_{calculada} \leq F_{crítica}$ no se rechaza Ho y por lo tanto el no hay diferencias significativas entre los resultados de los analistas.
- Si $F_{calculada} \geq F_{crítica}$ se rechaza Ho y por lo tanto hay diferencias significativas entre los resultados de los analistas.

El análisis de variancia se realiza con el Modelo de diseño anidado, para esto se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI. Obteniéndose los siguientes resultados:

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F_{cal}	$F_{crítica}$
Analista	0.0080667	1	0.00807	0.34	18.51
Día(Analista)	0.0476	2	0.02381	0.06	3.49
Residuo	8.4341	20	0.4217		
Total (corregido)	8.490	23			

Tabla 32. Análisis de Variancia del diseño anidado para evaluar la reproducibilidad.

A partir de los datos obtenidos en la tabla 32, se determina que los valores de $f_{calculada}$ tanto para los analistas como para los días son menores que el valor de la $f_{crítica}$, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido anteriormente (véase *tabla 31*) para ambos casos.

En base al análisis realizado a los datos obtenidos por los analistas en diferentes días de trabajo se establece que el método es reproducible entre analistas y repetible entre días.

3.1.6 TOLERANCIA

La tolerancia se evaluó realizando la estimación de la concentración de 6 ensayos de muestras de placebos cargados al 100%, a partir de los cuales se obtuvieron sus absorbancias en dos espectrofotómetros diferentes, el mismo día de análisis. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 33.

Espectro	mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperación
1	9.889	9.824	99.341
	9.940	9.850	99.091
	9.926	9.886	99.596
	9.918	9.868	99.493
	9.918	9.842	99.227
	9.933	9.846	99.122
2	9.889	10.285	104.007
	9.940	10.480	105.428
	9.926	10.542	106.214
	9.918	10.453	105.391
	9.918	10.330	104.150
	9.933	10.373	104.429

Tabla 33. Resultados de los porcentajes recuperados a partir de las lecturas obtenidas de cada uno de los espectrofotómetros.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F calculada	F crítica
Modelo	94.9106	1	94.9106	235.73	4.965
Residuo	4.0263	10	0.40263		
Total (Corr.)	98.9369	11			

Tabla 34. Análisis de Variancia para los datos obtenidos para la prueba de Tolerancia

Como se observa en la tabla 34 se muestra el análisis de variancia realizado para la prueba de tolerancia y observamos que el valor de f calculada es mayor que su valor de f crítica, en base a estos resultados se determina que si existe diferencia significativa entre los datos obtenidos de las concentraciones estimadas a partir de las absorbancias obtenidas de dos espectrofotómetros diferentes.

3.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR ACETAMINOFÉN EN PERFILES DE DISOLUCIÓN

3.2.1 ADICIONES ESTÁNDAR

El método de adiciones estándar tiene como objetivo evaluar el sesgo de cuantificación, expresado como error, en un método de análisis. La metodología es útil en la validación de métodos analíticos cuando se desconocen los excipientes contenidos en la matriz.

Para la metodología de Adiciones estándar se utilizó el medicamento establecido por la COFEPRIS como de referencia (Tylenol® Caplets) ^[27]. Se somete a una prueba de dilución en el aparato 2 de la USP (paletas), *ver anexo IV*, al medicamento de referencia tomando 5 puntos antes del tiempo de saturación, en este caso se manejaron 2, 4, 6, 8 y 10 min.

Para la realización de la prueba se prepara una curva de calibración pesando 64 mg de estándar de Acetaminofén el cual se disuelve en 15 ml de NaOH 0.1N, se vierte la solución anterior en un matraz aforado de 50 ml. Se toman alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 ml y se colocan en un matraz aforado de 50 ml respectivamente. Se lleva a la marca de aforo con NaOH 0.1N. Se toman alícuotas de 1 ml de cada concentración de la curva y se colocan en un matraz aforado de 25 ml realizando esto por sextuplicado para cada concentración de la curva.

Se coloca una tableta del medicamento de referencia Tylenol® Caplets en un vaso del aparato 2 de la USP de paletas previamente llenado con 900 ml de HCl 0.1 N y se deja en agitación durante el tiempo designado. Se filtra aproximadamente 200 ml del medio y se toma 1 ml del filtrado y se colocan en los 6 matraces aforados de 25 ml de cada una de las concentraciones de la curva, se lleva a la marca de aforo con NaOH 0.1N. Este procedimiento se realiza para cada uno de los tiempos seleccionados.

3.2.1.1 LINEALIDAD

Se determina a partir de los datos obtenidos de la experimentación propuesta para Adiciones Estándar y a continuación en la tabla 35 se muestran los datos obtenidos para evaluar la linealidad del método.

Sistema	Conc. Adicionada (mcg/ml)	Conc. Recuperada (mcg/ml)	Porcentaje Recuperado
1	1.955	1.959	100.22
	1.955	1.946	99.54
	1.955	1.924	98.42
2	3.911	3.947	100.92
	3.911	3.925	100.36
	3.911	3.890	99.48
3	5.866	5.867	100.02
	5.866	5.849	99.72
	5.866	5.816	99.15
4	7.822	7.814	99.89
	7.822	7.814	99.89
	7.822	7.824	100.03
5	9.77	9.792	100.23
	9.77	9.726	99.55
	9.77	9.757	99.87

Tabla 35. Resultados de linealidad obtenidos a partir de Adiciones Estándar para la validación del método de Perfiles de Disolución.

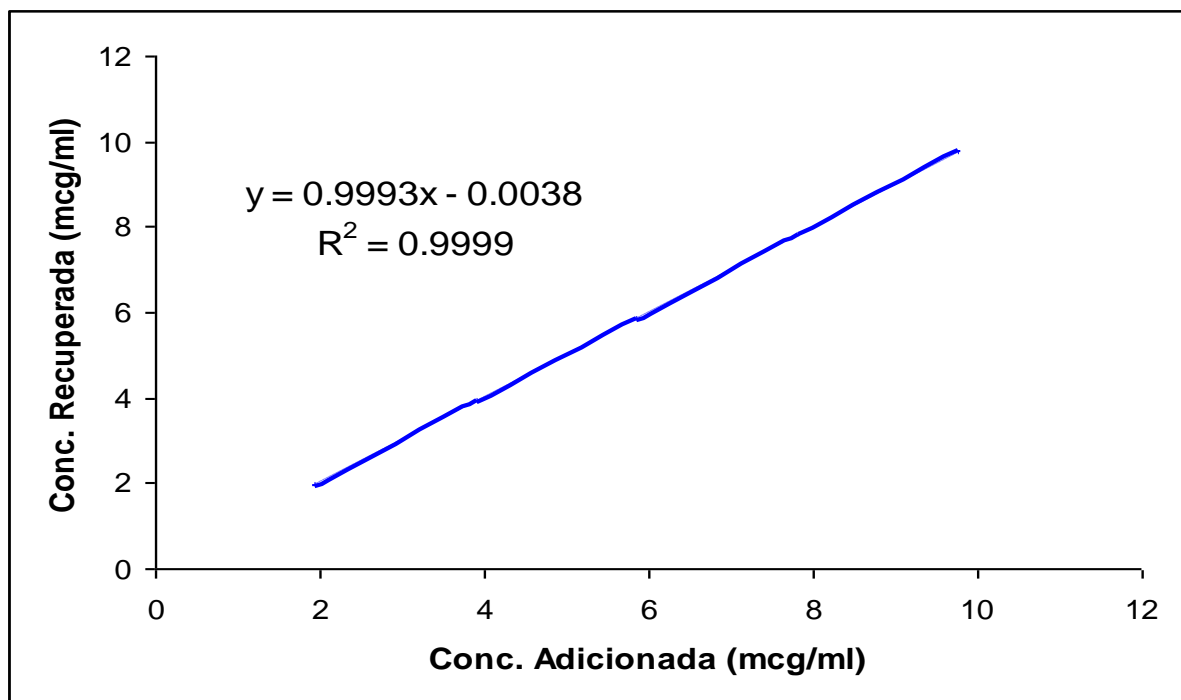


Gráfico 15. Representación gráfica de los datos obtenidos para linealidad del método.

Como se puede observar en el gráfico 15 se muestra la relación lineal que existe entre la concentración adicionada y la concentración recuperada.

RESULTADOS DE LA REGRESIÓN	
C.V.	0.4794
Coef correlación múltiple	0.99993
Coef determinación R ²	0.99993
Pendiente (m) = 0.9993	
<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
0.9945	1.0041
Intercepto (b) = - 0.0038	
<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
-0.0352	0.0275

Tabla 36. Resultados del análisis de regresión obtenidos a partir de los datos de linealidad del método.

Con los resultados obtenidos en el análisis de variancia y en los intervalos de confianza que se muestran en la tabla 36, se evidenció estadísticamente que existe una relación lineal entre la concentración recuperada y la concentración adicionada de Acetaminofén.

3.2.1.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD

Como se puede observar en la tabla 37 se muestran las concentraciones adicionadas para cada uno de los tiempos de disolución seleccionados, así como las respectivas concentraciones recuperadas; además se incluye el porcentaje de recobro y se presentan los parámetros estadísticos para determinar la precisión y exactitud del método.

Tiempo (min)	Conc. Adicionada (mcg/ml)	Conc. Recuperada (mcg/ml)	Porcentaje Recuperado	CV
2	1.955	1.959	100.223	0.223
4		1.946	99.536	-0.464
6		1.924	98.423	-1.577
8		1.981	101.352	1.352
10		1.885	96.403	-3.597
2	3.911	3.947	100.924	0.924
4		3.925	100.359	0.359
6		3.890	99.475	-0.525
8		3.880	99.209	-0.791
10		3.886	99.358	-0.642
2	5.866	5.8670	100.017	0.017
4		5.8109	99.061	-0.939
6		5.8112	99.066	-0.934
8		5.8494	99.717	-0.283
10		5.8161	99.148	-0.852
2	7.822	7.814	99.893	-0.107
4		7.768	99.311	-0.689
6		7.814	99.892	-0.108
8		7.751	99.086	-0.914
10		7.824	100.031	0.031
2	9.777	9.792	100.157	0.157
4		9.813	100.371	0.371
6		9.808	100.322	0.322
8		9.726	99.482	-0.518
10		9.757	99.794	-0.206

Tabla 37. Resultados de Precisión y Exactitud obtenidos a partir de Adiciones Estándar para la validación del método de Perfiles de Disolución.

De igual manera en la tabla 37 puede observar que el coeficiente de variación de cada uno de los tiempos a las concentraciones establecidas está dentro del criterio de aceptación (C.V. $\leq 2\%$), excepto en el caso del tiempo de 10 min para la

concentración adicionada de 1.955 mcg/ml lo cual puede deberse a las variaciones de la muestra obtenido a partir del filtrado de la prueba de disolución para ese tiempo.

Por normatividad, el método es exacto ya que el intervalo de recuperación oscila entre 98 y 102%, además de que el coeficiente de variación para todos los tiempos y concentraciones utilizadas es menor al 2%, en base a esto se determina que el método es preciso y exacto para todas las concentraciones y para todos los tiempos de disolución utilizados.

3.2.2 INFLUENCIA DEL FILTRO

Para la evaluación se realizaron 6 ensayos a partir de placebos cargados al 100%, de una muestra sin filtrar, y 6 ensayos de una muestra filtrada utilizando cada uno de los filtros descritos a continuación:

Para el desarrollo de la validación de contenido Químico se utilizaron filtros:

- ❖ Papel Filtro 24 Ashless. Círculos de 90 mm de diámetro, cant No. 1442090

Para el desarrollo de la validación de perfiles de disolución se utilizaron los siguientes filtros:

- ❖ Filtros para el aparato 2 de la USP (paletas): Full Flow Filliers 10um
- ❖ Filtros para el aparato 4 de la USP (celda de flujo continuo): Glass Microfibre Filters GF/C Círculos de 24 mm de diámetro. Cant No. 1822024.

Determinar que no exista adherencia del fármaco a alguno de los diferentes filtros utilizados, los resultados se muestran a continuación en la tabla 38.

Filtro	mg Recuperados	mg Adicionados	Porcentaje Recuperado	Porcentaje retenido
Solución sin Filtrar	50.6999	50.7047	99.9905	---
Full Flow Filliers 10um	50.8725	50.8826	99.9801	0.0104
Glass Microfibre Filters GF/C	50.8049	50.8292	99.9521	0.0384
Papel Filtro 24 Ashless	50.7824	50.8114	99.9429	0.0476
<i>Criterio de aceptación</i>		<i>El % retenido no debe ser mayor al 2%</i>		

Tabla 38. Resultados del porcentaje retenido para cada uno de los filtros utilizados en la validación de los métodos analíticos.

En base a los resultados obtenidos en la tabla 38 se puede determinar que los filtros utilizados cumplen con el criterio de aceptación, al ser los porcentajes

retenidos inferiores al 2%. Con esto se determina que el filtro no afecta de ninguna manera la cuantificación del analito de interés.

3.2.3 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Para evaluar la estabilidad de la muestra se realizan 6 ensayos con pesos independientes a partir de placebos cargados al 100%. Se comparan los porcentajes recuperados a las 0, 2 y 5 hrs de las mismas muestras. Se determina el porcentaje de analito estable.

Los resultados obtenidos a los tiempos de monitoreo se muestran a continuación en la tabla 39.

Tiempo (hrs)	% Recuperado	% Analito Estable	CV
0	100.65	100	1.837
2	100.25	99.61	1.644
5	100.13	99.5	1.858

Tabla 39. Resultados de la Prueba de Estabilidad del Acetaminofén en NaOH 0.1N

Se evaluó la estabilidad únicamente durante 5 hrs ya que es el tiempo máximo en el cual se manipulaba y trabajaba con la muestra. Durante el tiempo de análisis de las muestras se observa, en base a la tabla 39, que no existe diferencia significativa entre los porcentajes de recuperación entre los tiempos de monitoreo, tomando como referencia los valores del CV. Esto con base a la tabla 40 la cual plantea como parámetro que el CV debe ser menor al 2%.

Factor de Evaluación	Criterio de aceptación
CV	< 2%
Prueba t de Student	$t_{cal} < t_{critica} (\alpha=0.05, gl)$

Tabla 40. Criterios de validación para la prueba de Estabilidad de la muestra.

Para comprobar lo anterior se determina la $t_{calculada}$ que de acuerdo a los parámetros de validación establecidos debe ser menor que la $t_{critica}$ los valores obtenidos se presentan en la tabla 41 y se comparan los resultados obtenidos.

Tiempo (hrs)	t_{calc}	$t_{\text{crítica}}$
0	0.8492	2.571
2	0.3677	
5	0.1697	

Tabla 41. Comparación de los valores t_{calc} y $t_{\text{crítica}}$ para cada uno de los tiempos de análisis.

Como se observa en la tabla 41 los valores de $t_{\text{calculada}}$ para cada uno de los tiempo de monitoreo es menor al valor de $t_{\text{crítica}}$ demostrando así que el analito conserva su integridad fisicoquímica y la concentración después de almacenarse por 5 hrs a una temperatura de trabajo de 26°C.

CONCLUSIONES

4 CONCLUSIONES

Se estableció un método analítico, así como las condiciones de análisis que permitieran la cuantificación de Acetaminofén en tabletas utilizando espectrofotométrica UV-vis.

Se demostró que el método cumple con los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad y reproducibilidad estipulados por las diferentes Guías de Validación tanto para Contenido Químico como para Perfiles de Disolución.

Se determinó la aplicabilidad del método de análisis multivariado de MCP el cual permitió cuantificar al analito de manera precisa y exacta a las condiciones de análisis ya establecidas en placebos cargados y muestras provenientes de diferentes formulaciones (formulación experimental y Medicamento de Referencia Tylenol Caplets).

REFERENCIAS

5 REFERENCIAS

1. Secretaria de Salud. (2008). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 9^a Edición
2. KALANTZI L, Reppas C, Dressman JB, Amidon GL, et al. (2006). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Acetaminophen (paracetamol). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 95(1): pp. 4-14.
3. OSORIO Bautista, J. E. (2010). Estudio Comparativo de Perfiles de Disolución de productos que contienen paracetamol como único principio activo de Acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico. Tesis Licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
4. The United States Pharmacopeia. The National Formulary (USP 31) Ed United States Pharmacopeia Convention.
5. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Biblioteca Médica Digital: http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=6 [Consulta 23 de Mayo de 2011]
6. BAENA, Y. PONCE DE LEÓN, L. F. (2008), 37 (1). Importancia y fundamentación del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo. *Rev. Colombiana Ciencias Quím. Farma*, pp. 18-32.
7. PINO Coate, M. A. (2008). Cuantificación Espectrofotométrica UV de Aspirina y Cafeína Contenida en tabletas, aplicando el Método de Mínimos Cuadrados Parciales. Tesis Licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán.
8. LINDBERG, N. O. (1995), 21 (9). Application of Multivariate Analysis in Pharmaceutical Development Work. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, pp. 987-1007.
9. HUERTA Sánchez, O. (2009). Aplicación de un Método de Mínimos Cuadrados Parciales en la determinación de Uniformidad de Contenido Químico por Espectrofotométrica UV, de Acetaminofén y Naproxeno presentes en tabletas. Tesis Licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán.

10. GÓMEZ Mirón, Margot. (1998). Desarrollo de un método Espectrofotométrico para cuantificar la cantidad de Sulfametazina Sódica liberada en el proceso de disolución de bolos de liberación controlada. Tesis Licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán.
11. KENNETH, B.; Pell T. and Seasholtz M. (1998). Chemometrics: A practical Guide Wiley. New York, pp. 81-101, 339, 2078.
12. LÓPEZ DE ALBA, P., López M., Amador H. J. (1996). 41 (1). Métodos de Calibración Multivariante. Sociedad de Química de México A. C.
13. BRERETON, R. G. (2000), 125. Introduction to Multivariante Calibration in Analytical Chemistry Analyst, pp. 2125-2154.
14. GABRIELSOON J., Lindberg N. (2002), 16. Multivariate Methods in Pharmaceutical Applications Journal of Chemometrics. Pp 141-160.
15. ESCOBAR, F. (1995). Calificación de Equipos e Instalaciones para la óptima realización de la Operación Unitaria de Compresión. Tesis Licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza
16. FDA, Guidance for industry (2000). Analytical procederes and methods validation, CDE. R, Editor.
17. Secretaria de Salud (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993. Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos de la Industria Química Farmacéutica dedicados a la Fabricación de Medicamentos.
18. CNQFB, Comisión de Validación de Métodos Analíticos. Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C. Comisión de Validación de Métodos Analíticos.
19. Requisitos Mínimos para la Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, México (1993).
20. Harmonised Tripartite Guideline (1995). Guideline for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures ICH – Q2A.
21. VILLATORO, Álvarez N. (2009). Validación de un Método Analítico para Determinar Contenido Químico de Clonixinato de Lisina y Ketorolaco Trometamina en una solución inyectable por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Tesis Licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán.

22. Unites States Pharmacopeical Convention, USP 30. (2007), 1. farmacopea de los Estados Unidos. Editorial C. Press. Estados Unidos de America.
23. ICH, Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q2(R1), in International Conference of Harmonization (2005). ICH Harmonized Tripartite Guideline.
24. JOACHIM Ermer, J. (2005). Method Validation in Pharmaceutical Analysis. Wiley-VCH, Editor. Weinheim Republico f Germany.
25. ISLAS Hernández J. A. (2004). Desarrollo de un Método Espectrofotométrico UV para la obtención del Perfil de Disolución de una forma farmacéutica que contenga Trimetroprim y Sulfametoxazol. Tesis Licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán.
26. Secretaria de Salud. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2008. Que establece las Pruebas y Procedimientos para demostrar que un Medicamento es Intercambiable. Requisitos a los que deben sujetarse los terceros Autorizados que realicen las Pruebas.
27. Cofepris Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Catalogo de Pruebas de intercambiabilidad y Medicamentos de referencia www.cofepris.gob.mx/work/sites/cfp/resources/LocalContent Registro con fecha de Diciembre 2010. Información revisada el 25 de enero de 2011.
28. FDA Guidance for Industry Dissolution Testing of immediate release solid dosage forms. (1997).
29. BOLHIUS, G; Chowman, Z. (1996), 71. Material for direct compactation. Goran Alderborn y Christer Nyström. Pharmaceutical Powder Compaction Technology. Marcel Dekker. USA.
30. ANAYA Trejo, O. (2012). Diseño y Desarrollo de una Formulación para Tabletas de Paracetamol de Liberación Inmediata por Compresión Directa como Medicamento Intercambiable. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán.
31. Universidad Nacional Metropolitana, Ingeniería en Alimentos http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/manchi/alim/CURSO0607/trabajos/trabajo%201.pdf Registrado con fecha de 2006. información revisada el 27 de Octubre de 2011.
32. Avicel HFE Microcrystalline Cellulose, NF, Ph. Eur., JP and mannitol, USP, Ph. Eur., JP.

33. Handbook of Pharmaceutical Excipients, (2004). Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association.
34. Tobyn M.J., Mc Carthy G.P., Staniforth, J.N. and Stephen E. Physicochemical Comparison between Microcrystalline Cellulose and Silicified Microcrystalline Cellulose. International Journal of Pharmaceutics. 169:183-194(1998).

6 ANEXOS

ANEXO I. VALIDACIÓN DEL MÉTODO (DILUCIONES)

El método analítico desarrollado y validado fue realizado para tabletas de Acetaminofén de 500 mg/tab, utilizando para contenido químico placebos cargados de Acetaminofén y para perfiles de disolución se utilizaron tabletas de Acetaminofén de 500 mg de dos formulaciones diferentes:

- Formulación experimental (véase página 41, *Linealidad del Método*)
- Medicamento de referencia (Tylenol Caplets).

Se realizaron tres diluciones debido a que la cantidad de Acetaminofén era excesiva, a continuación se presenta la validación de las diferentes diluciones realizadas.

Validación de la Dilución 0.5 ml en 10 ml realizada en los Perfiles de Disolución

Se pesaron 109.72 mg de estándar de Acetaminofén los cuales se disuelven en 40 ml de NaOH 0.1N. Una vez disuelto el estándar se colocan en un matraz aforado de 50 ml, llevando a la marca de aforo.

Se toman alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 ml, colocando cada alícuota en un matraz aforado de 25 ml.

A partir de las 5 concentraciones anteriores se realizan las diluciones de 2 ml en 25 ml por triplicado para cada una de las concentraciones.

A continuación se muestran en la tabla 42 las concentraciones obtenidas, las cuales se encuentran representadas en el gráfico 16.

Sistema	Conc. Adicionada (mcg/ml)	Conc. Recuperada (mcg/ml)
1	4.28	4.38
		4.37
		4.36
2	8.55	8.53
		8.57
		8.60
3	12.83	12.81
		12.82
		12.82
4	17.11	16.95
		16.92
		16.98
5	21.38	21.34
		21.35
		21.34

Tabla 42. Resultados de la Concentración Adicionada y la concentración Recuperada para la Dilución 0.5 ml en 10 ml.

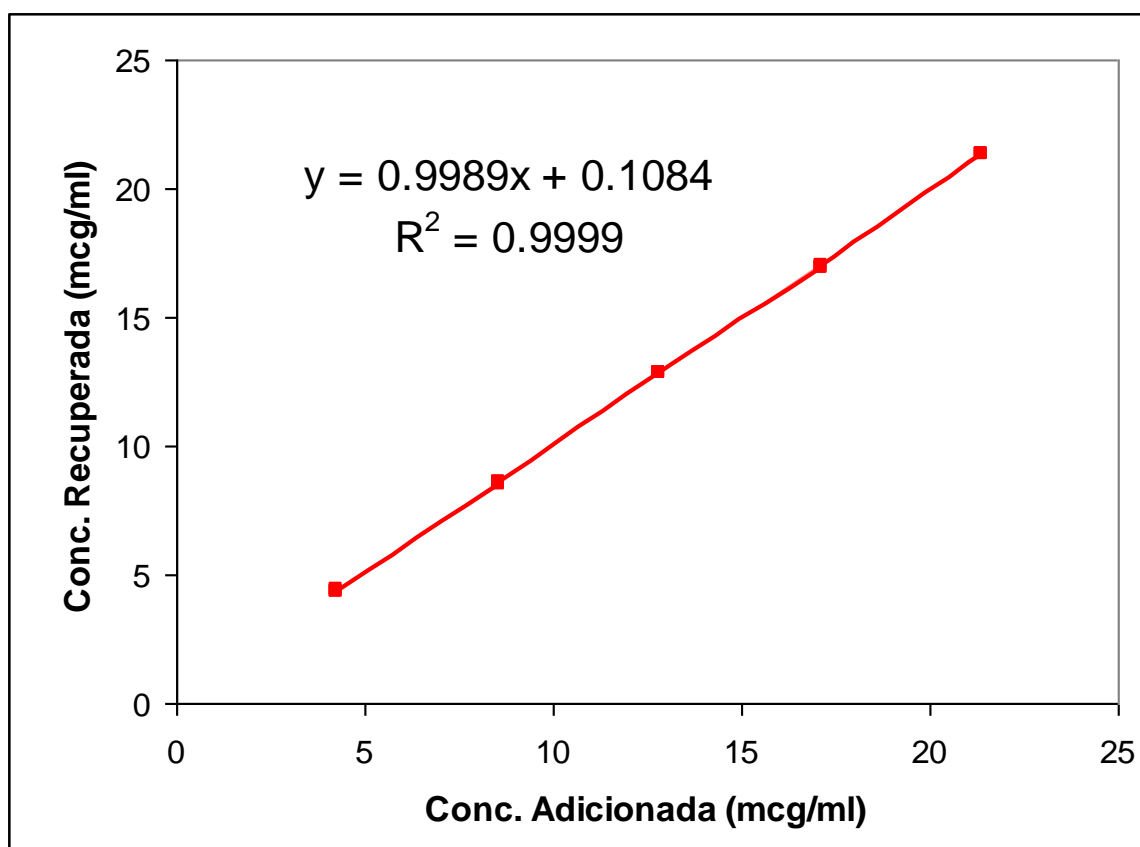


Gráfico 16. Representación gráfica de la Concentración Recuperada contra la Concentración Adicionada.

<i>Fuente de Variación</i>	<i>gl</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F calculada</i>	<i>F crítica</i>
Regresión	1	524.169	524.169	172179.27	3.4929E-28
Residuos	13	0.0396	0.00304		
Total	14	524.208			

Tabla 43. Resultados del análisis de Variancia realizado a partir de los datos obtenidos de la dilución 0.5ml en 10 ml, con un nivel de significancia del 95%.

Validación de la Dilución 0.5 ml en 50 ml realizada en los Perfiles de Disolución

Se pesaron 436.91 mg de estándar de Acetaminofén los cuales se disuelven en 25 ml de NaOH 0.1N. Una vez disuelto el estándar se colocan en un matraz aforado de 50 ml, llevando a la marca de aforo. Se toman alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 ml, colocando cada alícuota en un matraz aforado de 25 ml.

A partir de las 5 concentraciones anteriores se realizan las diluciones de 0.5 ml en 50 ml. A continuación en la tabla 44 se muestran las concentraciones obtenidas, las cuales se encuentran representadas en el gráfico 17.

Sistema	Conc. Adicionada (mcg/ml)	Conc. Recuperada (mcg/ml)
1	6.811	6.858 6.850 6.849
2	13.623	13.510 13.514 13.513
3	20.434	20.322 20.360 20.360
4	27.246	27.171 27.176 27.175
5	34.057	33.980 33.963 33.980

Tabla 44. Resultados de la concentración Adicionada y la Concentración Recuperada para la Dilución 0.5 ml en 50ml.

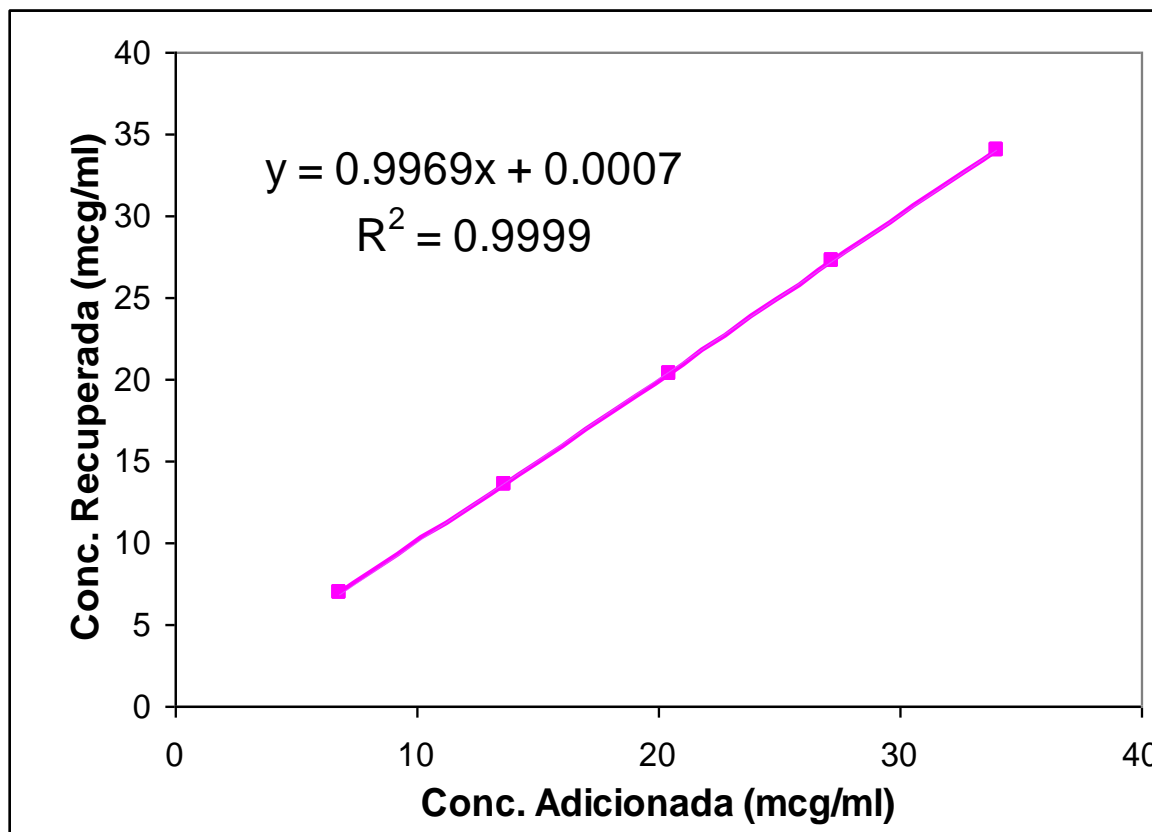


Gráfico 17. Representación gráfica de la Concentración Recuperada contra la Concentración Adicionada

<i>Fuente de Variación</i>	<i>gl</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F calculada</i>	<i>F crítico</i>
Regresión	1	1383.343	1383.343	585397.77	1.227E-31
Residuos	13	0.0307	0.00236		
Total	14	1383.37			

Tabla 45. Resultados del análisis de Variancia realizado a partir de los datos obtenidos de la dilución 0.5ml en 50 ml, con un nivel de significancia del 95%.

Validación de la Dilución 2 ml en 25 ml realizada para Contenido Químico

Se pesaron 109.72 mg de estándar de Acetaminofén los cuales se disuelven en 40 ml de NaOH 0.1N. Una vez disuelto el estándar se colocan en un matraz aforado de 100 ml, llevando a la marca de aforo. Se toman alícuotas de 2, 4, 6, 8 y 10 ml, colocando cada alícuota en un matraz aforado de 25 ml.

A partir de las 5 concentraciones anteriores se realizan las diluciones de 2 ml en 25 ml. A continuación en la tabla 46 se muestran las concentraciones obtenidas, las cuales se encuentran representadas en el gráfico 18.

Sistema	Conc. Adicionada (mcg/ml)	Conc. Recuperada (mcg/ml)
1	6.83	6.996
		6.973
		6.999
2	13.66	13.772
		13.770
		13.789
3	20.49	20.518
		20.549
		20.472
4	27.32	27.112
		27.127
		27.167
5	34.15	34.161
		34.188
		34.187

Tabla 46. Resultados de la concentración Adicionada y la Concentración Recuperada para la Dilución 2 ml en 25 ml.

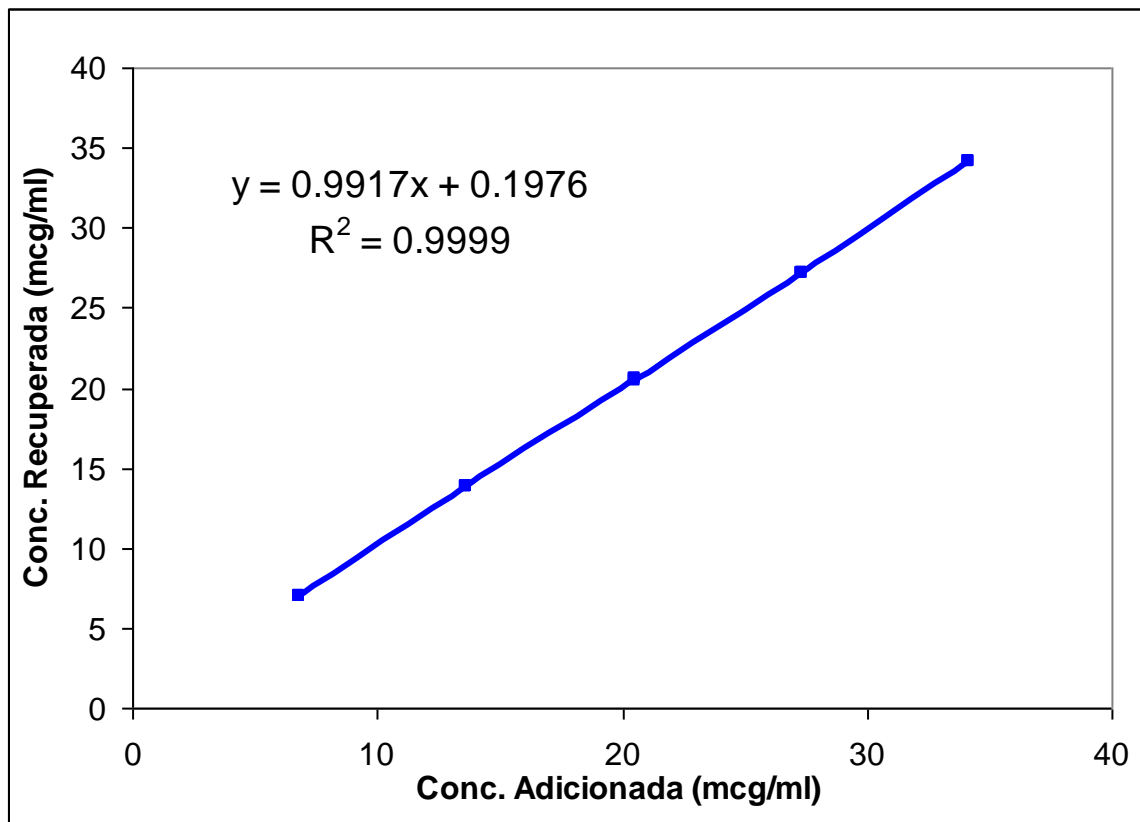


Gráfico 18. Representación gráfica de la Concentración Recuperada contra la Concentración Adicionada

<i>Fuente de Variación</i>	<i>gl</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F cal</i>	<i>F crítica</i>
Regresión	1	1376.4904	1376.4904	146821.26	9.838E-28
Residuos	13	0.1219	0.00938		
Total	14	1376.612			

Tabla 47. Resultados del análisis de Variancia realizado a partir de los datos obtenidos de la dilución 2 ml en 25 ml, con un nivel de significancia del 95%.

En los gráficos 16, 17 y 18 para cada dilución se observa la tendencia lineal de los datos así como los resultados de la pendiente ($m \approx 1$), la ordenada al origen ($b \approx 0$) y el coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0.99$). Para todos los casos se cumplen con los criterios de linealidad.

También se realizó un análisis estadístico para los valores obtenidos de cada dilución, los cuales se muestran en las tablas 43, 45 y 47; como se observa en las tablas, los valores de $F_{calculada}$ son mayores a los valores de la $F_{crítica}$ cumpliendo con otro criterio de linealidad para la validación para las diluciones.

ANEXO II. PUREZA DE LA MATERIA PRIMA

Para la preparación de los placebos cargados se utilizó la Materia Prima Acetaminofén DC, para realizar los cálculos necesarios para la preparación de los placebos cargados se determinó la pureza de la materia prima Acetaminofén DC.

Para esto se preparan dos ensayos, el primero con materia prima y el segundo con estándar de Acetaminofén, siguiendo el procedimiento siguiente:

Se pesan aproximadamente 23 mg de Acetaminofén y se disuelven en 80 ml de NaOH 0.1N, una vez disuelto el Acetaminofén se coloca la solución en un matraz aforado de 250 ml y se lleva a volumen. Tomar con una pipeta volumétrica de 6 ml una alícuota y depositarla en un matraz aforado de 25 ml, se lleva a volumen con NaOH 0.1N. Se leen las muestras a 257 nm en el espectrofotómetro UV-vis.

Para el cálculo de la pureza se parte de la **Ley de Beer**:

$$A = \epsilon I C$$

Donde:

- A – Absorbancia
- ϵ – Coeficiente de Absortividad
- I – Longitud de la Celda
- C – Concentración del Analito

Teniendo dos ecuaciones para cada muestra:

$$A_{\text{estándar}} = \epsilon_{\text{acetaminofen}} I C_{\text{estándar}}$$

$$A_{\text{MP}} = \epsilon_{\text{acetaminofen}} I C_{\text{MP}}$$

Igualando las Ecuaciones:

$$A_{\text{estándar}}/C_{\text{estándar}} = \epsilon_{\text{acetaminofen}} = A_{\text{MP}}/C_{\text{MP}}$$

Despejando:

$$C_{MP} = (A_{MP} \times C_{estandar}) / A_{estandar}$$

Sustituyendo:

$$C_{MP} = (1.3778 \times 22.194 \text{ mcg/ml}) / 1.5537$$

$$C_{MP} = 19.6812 \text{ mcg/ml}$$

Pureza = 88.94%

ANEXO III. MONOGRAFÍAS DE EXCIPIENTES Y PRINCIPIO ACTIVO

Celulosa microcristalina PH 102.

El Avicel® PH 102 HFE es un nuevo excipiente obtenido por un proceso similar al “Spray-Drying” denominado “Co-Spray-Drying”, en el cual se agrega por atomización una solución coloidal de manitol a los cristales de celulosa microcristalina; dicho proceso involucra un incremento de temperatura por la aplicación de aire caliente o gas que ayuda a recuperar la mezcla de manitol-celulosa microcristalina como un coprocesado a manera de polvo. La composición final de la mezcla contiene un 10% de manitol aproximadamente ⁽³²⁾. A continuación se puede observar en la figura 6 una fotografía de la celulosa microcristalina.

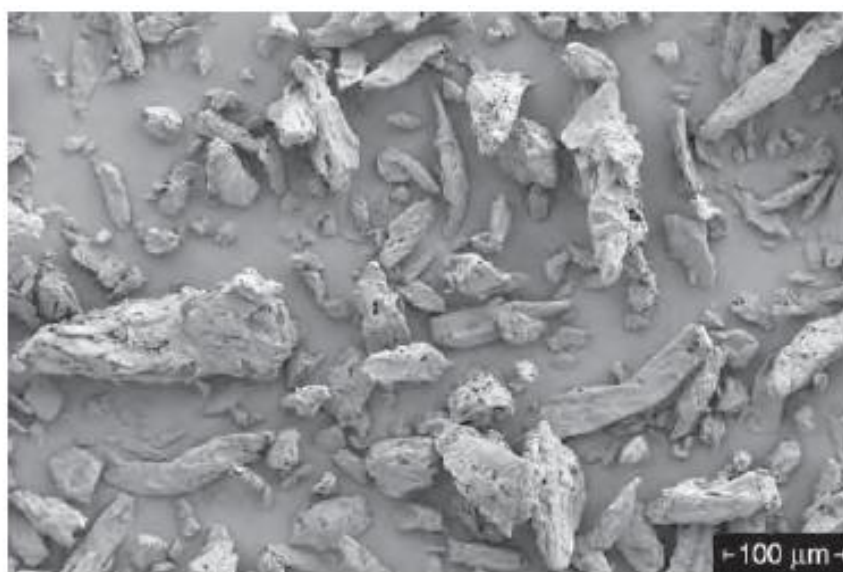


Figura 6. Fotografía de Celulosa Microcristalina PH 102. Fotografía magnificada 200x ⁽³³⁾.

En comparación a los grados tradicionales de celulosa microcristalina, el Avicel PH 102 como se observa en la figura 6, es un coprocesado que tiene ventajas significativas que pueden resolver problemas frecuentes en la formulación de mezclas para compresión directa, además, se ha reportado que cuenta con una sensibilidad al lubricante mucho menor ⁽³²⁾.

Crospovidona

Crospovidona es un polvo de color blanco a blanco-crema, finamente dividido, de libre flujo prácticamente insípido, inodoro o casi inodoro, higroscópico; como se puede observar a continuación en la figura 7.

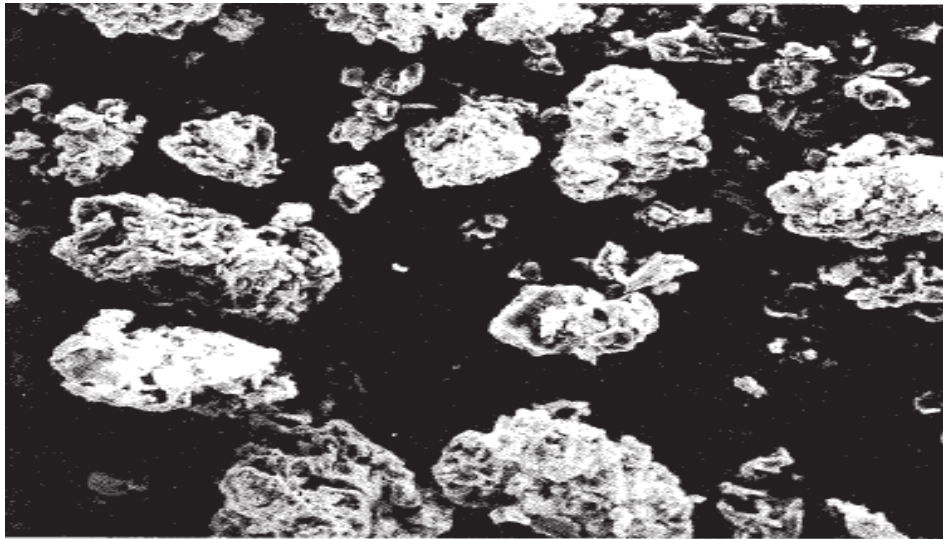


Figura 7. Imagen de Crospovidona (Polyplasdone XL-10) ⁽³³⁾.

Método de Obtención.

El Acetileno y formaldehído, se hacen reaccionar en presencia de un gran activo catalizador para formar butinediol, que se hidrogena a butanodiol y cyclodehydrogenated para formar butirolactona.

La Pirrolidona se produce haciendo reaccionar butirolactona con amoniaco. Esto es seguido por una reacción de vinilación en la que la pirrolidona y acetileno reaccionan bajo presión. El monómero vinilpirrolidona A continuación se polimeriza en solución, usando un catalizador. La Crospovidona se prepara en un proceso denominado "polimerización de palomitas de maíz".

INCOMPATIBILIDADES

La Crospovidona es compatible con la mayoría de los ingredientes farmacéuticos orgánicos e inorgánicos. Cuando se expone a un alto nivel de agua, la crospovidona puede formar aductos moleculares con algunos materiales.

Supertab 14 SD (Spray dried lactose)

La lactosa es un disacárido natural producido a partir de la leche de vaca y el cual contiene aproximadamente 4.6% de lactosa, correspondiente a aproximadamente 38% de los sólidos secos, se usa ampliamente en la industria farmacéutica para la fabricación de comprimidos, polvos y aerosoles, es un disacárido formado por una unidad de galactosa y otra de glucosa, también es constituyente de todas las leches precedentes de mamíferos, su producción a niveles industriales usa como materia prima a los sub productos generados en la producción de quesos ⁽³⁴⁾.

La α -lactosa monohidratada se emplea comúnmente como diluyente-aglutinante de tabletas, pero también a partir de ésta se obtiene a la lactosa “Spray Dried” (lactosa SD); en su manufactura una dispersión de pequeños cristales de lactosa amorfa son atomizados sobre cristales de α -lactosa monohidratada (80-85%) unidos a lactosa amorfa (15-20%). La adición del amorfo de lactosa proporciona mejores propiedades de compactibilidad. Tras este proceso se obtienen partículas de forma muy esférica, esta característica le proporciona a la Lactosa SD las buenas propiedades de flujo.

Este compuesto está específicamente diseñado para compresión directa, y es particularmente conveniente para ingredientes activos que no comprimen bien. Es usado en una proporción aproximada del 15% sobre la cantidad total de la formulación y a veces es preferida en combinación con celulosa microcristalina, dependiendo de las propiedades físicas y físico-mecánicas del ingrediente activo.

Debido a su solubilidad, es menos probable que la lactosa “spray dried” monohidratada provoque un incremento del tiempo de disolución in vitro del principio activo de la tableta. La compresibilidad de la lactosa “spray dried” no es afectada por la humedad y posee una baja sensibilidad al lubricante sobre la compresión ⁽³⁰⁾.

Estearil Fumarato Sódico

Sinónimos: Ácido fumárico, éster octadecilo, sal de sodio; Pruv, monoestearil fumarato de sodio.

Descripción: el Estearil fumarato de sodio es un polvo fino blanco con aglomerados de piso, de partículas en forma circular, a continuación se muestra en la figura 8 la estructura de las partículas del estearil fumarato de sodio.

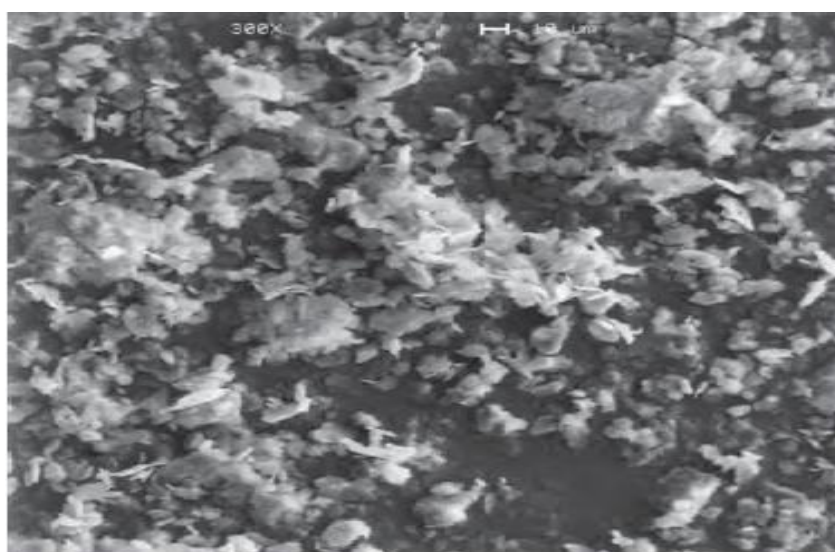


Figura 8. Fotografía de Estearil Fumarato de sodio. Magnificada a 300x ⁽³³⁾.

Estearil fumarato de sodio se presenta en una forma pura y suele ser de valor cuando el lubricante estearato-tipo menos puro es inadecuado debido a la incompatibilidad química. Estearil fumarato sódico es menos hidrofóbico que el estearato de magnesio o ácido esteárico y tiene un menor efecto de retardo en la disolución de la tableta en comparación con el estearato de magnesio.

Método de obtención: el alcohol esteárico se hace reaccionar con anhídrido maleico. El producto obtenido de esta reacción se somete a un paso de isomerización seguido por la formación de la sal para producir Estearil fumarato de sodio.

Certificado de análisis de Acetaminofén DC 90



Zhejiang Kangle Pharmaceutical Co., Ltd.

Kangle Building, No.112 Maanchi Road(West), Wenzhou, Zhejiang, China
 Tel: +86-577-8852 0260 8852 5636 Fax: +86-577-8851 6775
 Web Site: <http://www.zkpf.com> E-mail: [wzf@mail.wzptt.zj.cn](mailto:wpf@mail.wzptt.zj.cn)

Certificate of Analysis



Product: Acetaminophen DC90 Coarse
 Batch NO.: CD-0901004
 Packing: 50kg/drum

Quantity: 4000kgs
 Manuf Date: Jan,2009
 Expiry Date: Dec,2011

Test	Result	Specification
Description	Comply	White free flowing fine granules
Identification A (Acetaminophen)	Comply	Matches USP Reference standard
B (starch)		Iodine T.S. Produces violet to blue color
Water	1.78%	1.0%-2.2%
Free-P-Aminophenol	<10ppm	40ppm Max
Residue on Ignition	0.07%	0.20% max
Heavy Metals (Pb)	<10ppm	<10ppm
Assay	91.10%	87.5%-92.5%(Anhydrous basis)
Bulk density	0.576g/cm ³	0.5-0.65g/cm ³
Sieve test (cumulative):		
U.S.#12	0%	5% Max Retained
U.S.#20	17.6%	5% Min Retained
U.S.#40	65.1%	45% Min Retained
U.S.#60	87.5%	60% Min Retained
Microbiological:		
Total viable microbial count	< 10/g	<1000 microorganisms/gm
Yeast and mold	< 10/g	< 100 microorganisms/gm
Salmonella	Negative	Negative
Escherichia coli	Negative	Negative
Staphylococcus aureus	Negative	Negative
Pseudomonas aeruginosa	Negative	Negative

The Acetaminophen used in the manufacturing of Acetaminophen DC comply with EP6/USP31

Signature:

Analyst: 

Approver: 

La materia prima de Acetaminofén DC 90 Coarse utilizado en la preparación de los placebos cargados, fue donada por DVA Mexicana S.A. de C.V.

ANEXO IV. APARATO II DE LA USP (PALETAS)

Este aparato consiste en un vaso de vidrio u otro material inerte y transparente con tapa, un motor, un dispositivo giratorio y una paleta. A continuación en la figura 9 se muestran las especificaciones que debe tener la paleta utilizada en el aparato 2 de acuerdo a la USP.

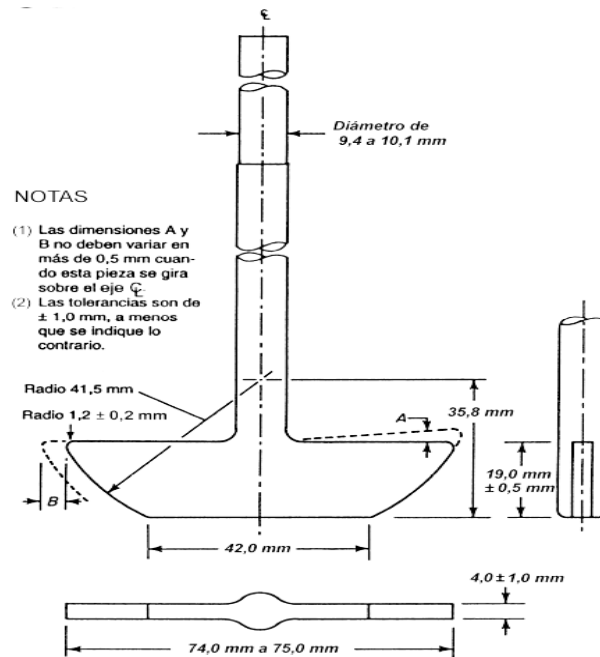


Figura 9. Esquema de la paleta del aparato II de la USP

El vaso debe estar inmerso en un baño de agua o enchaquetado de manera que permita que la temperatura del medio contenido por el vaso sea de $37 \pm 5^\circ\text{C}$ durante toda la prueba; a su vez, la tapa retarda la evaporación. La transparencia del vaso permite visualizar el proceso de desintegración de la forma.

El vaso cilíndrico con un fondo semiesférico de distintas dimensiones dependiendo de la capacidad del mismo: si el vaso es de 1 litro, la altura es de 160-210 mm y el diámetro interno es de 98-106 mm; si la capacidad es de 2 litros, la altura va de 280-300 mm y el diámetro interno también de 98-106 mm; si la capacidad es de 4 litros, la altura va de 280-300 mm y el diámetro interno de 145-155 mm.

A continuación se muestra en la figura 10 la imagen del aparato II de la USP.



Figura 10. Aparato II de la USP

Ninguna parte del aparato o de su entorno debe ser fuente de vibración, movimiento o agitación que no sea la proporcionada por el elemento rotatorio del mismo. La excentricidad del dispositivo giratorio no debe ser mayor de 2 mm del eje vertical central del vaso ni a menos de 2.5 cm del fondo del vaso y la velocidad de agitación elegida no debe variar más allá de $\pm 4\%$. La paleta y el elemento giratorio deben ser de acero inoxidable tipo 316; a menos que se especifique lo contrario. La distancia entre el fondo interno del vaso y el fondo de la paleta se mantiene a 25 ± 2 mm durante la prueba como se muestra a continuación en la figura 11.

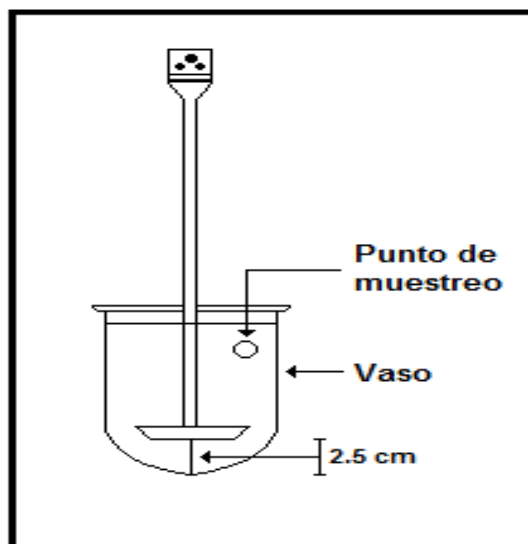


Figura 11. Esquema de los parámetros de agitación para el uso de paletas en el Aparato II.

Este método es utilizado para productos de liberación oral inmediata (IR), controlada (CR), extendida (ER) y retardada (RR). La forma farmacéutica utilizada generalmente es una tableta la cual se coloca libremente en el vaso antes de comenzar la prueba.

ANEXO V. DEFINICIONES

- **Absorbancia.** Grado de absorción de la luz o de otra energía radiante a su paso a través de un medio.
- **Analito.** Componente específico de una muestra del que se desea conocer la cantidad o presencia.
- **Concentración.** Cantidad del fármaco presente en el medicamento expresada como peso/peso, peso/volumen o unidad de dosis/volumen.
- **Soluciones de Calibración.** Conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.
- **Intervalo.** Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito, para las cuales se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.
- **Ley de Beer.** Ley que afirma que la absorbancia es directamente proporcional y lineal a la concentración de la especie absorbente.
- **Método Analítico.** Descripción de la secuencia de actividades, materiales y criterios que se deben cumplir al llevar a acabo el análisis para un componente específico de la muestra.
- **Muestra.** Porción del material a evaluar.
- **Placebo.** Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.
- **Placebo cargado.** Muestra que contiene todos los componentes de un producto y al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito.
- **Perfil de disolución.** A la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de una forma farmacéutica.
- **Validación del método analítico.** Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

ANEXO VI. ABREVIATURAS

AINE	Antiinflamatorio No Esteroideo
APAP	Paracetamol o Acetaminofén
Cant.	Cantidad
CIVIV	Correlación in Vitro - in Vivo
CNQFB	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos
Coef.	Coeficiente
COFEPRIS	Comisión Federal Para la Protección Contra Riesgos Sanitarios
Conc.	Concentración
cm.	Centímetros.
CV	Coeficiente de Variación.
F cal	Valor calculado correspondiente a la Distribución F de los datos.
F crítico	Valor crítico de la distribución F, encontrado en tablas.
FDA	Foods and Drugs Administration.
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
gl	Grados de Libertad
hrs	Horas
IC.	Intervalo de confianza
ICH	International Conference Harmonization
LIC	Límite inferior de confianza
Lt	Litros
LSC.	Límite superior de confianza
M	Concentración molar
máx.	Máximo
mcg	Microgramo
mg	Miligramos
min.	Minutos
ml	Mililitro
MPC	Mínimos Cuadrados Parciales
N	Concentración Normal
nm	Nanómetros

NOM	Norma Oficial Mexicana
pH	Índice de acidez
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación
r ²	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
S	Desviación Estándar
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
SCN	Sistema Nervioso Central
Sol.	Solución
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
Vol.	Volumen

ANEXO VII. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Propiedades Químicas del Acetaminofén.....	3
Tabla 2. Clasificación de los fármacos de acuerdo con el SCB.....	5
Tabla 3. Características de los Métodos de Análisis de Multicomponentes.....	12
Tabla 4. Características Generales de los diferentes Tipos de Validación	20
Tabla 5. Características Mínimas consideradas para validar un método analítico según la categoría a la cual pertenezca.....	23
Tabla 6. Características de validación para contenido químico de acuerdo a distintas referencias.....	24
Tabla 7. Variabilidad de los valores de pH iniciales y finales de cada uno de los medios de disolución.....	41
Tabla 8. Longitudes de onda donde se encuentran los puntos mínimos y máximos de absorbancia del Acetaminofén.....	43
Tabla 9. Resultados de las absorbancias obtenidas a partir de 13 longitudes de onda seleccionadas.....	44
Tabla 10. Resultados del análisis de PRESS a partir del tratamiento de los datos por el algoritmo de MCP, para las absorbancias de la tabla 9.....	45
Tabla 11. Resultados obtenidos de la regresión del programa ISHEJA del algoritmo de MCP.....	46
Tabla 12. Criterios de linealidad.....	46
Tabla 13. Concentración real y respuesta analítica obtenida por el método de MCP para cada curva de calibración.....	49
Tabla 14. Resultados de las características evaluadas para la linealidad de la curva de calibración No. 1.....	49
Tabla 15. Resultados del análisis de Variancia para la curva de calibración No. 1 con un nivel de significancia del 95%.....	50
Tabla 16. Resultados de las características evaluadas para la linealidad de la curva de calibración No. 2.....	51
Tabla 17. Resultados del análisis de Variancia para la curva de calibración No. 2 con un nivel de significancia del 95%.....	52
Tabla 18. Resultados de las características evaluadas para la linealidad de la curva de calibración No. 3.....	52
Tabla 19. Resultados del análisis de Variancia para la curva de calibración No. 3 con un nivel de significancia del 95%.....	53

Tabla 20. Criterios de aceptación Establecidos para la Validación de la linealidad del sistema.....	54
Tabla 21. Porcentajes de Recobro determinados a partir de las concentraciones obtenidas por el método de MCP.....	55
Tabla 22. Criterios de Aceptación Establecidos para la Validación de la Precisión y Exactitud del Sistema.....	56
Tabla 23. Formulación utilizada para la preparación de placebos cargados.....	57
Tabla 24. Estimaciones de los porcentajes recuperados a partir de placebos cargados para determinar la Linealidad del Método.....	59
Tabla 25. Comparación de los resultados de la regresión con los criterios de aceptación establecidos para la Validación de la Linealidad del Método.....	60
Tabla 26. Resultados del análisis de variancia para los datos de linealidad del Método.....	60
Tabla 27. Estimaciones de los porcentajes recuperados de los placebos cargados para determinar la Precisión y Exactitud del Método Analítico.....	61
Tabla 28. Criterios de aceptación establecidos para la Validación de la Precisión y Exactitud del Método.....	62
Tabla 29. Valores para evaluar la exactitud del método con un nivel de significancia del 95%.....	62
Tabla 30. Porcentajes de Recobro para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del Método.....	64
Tabla 31. Criterios de aceptación establecidos para repetibilidad y reproducibilidad.....	65
Tabla 32. Análisis de variancia del diseño anidado para evaluar la reproducibilidad.....	66
Tabla 33. Porcentajes recuperados a partir de las lecturas obtenidas de cada uno de los espectrofotómetros.....	67
Tabla 34. Análisis de Variancia de los datos obtenidos para la prueba de Tolerancia...	67
Tabla 35. Resultados de linealidad obtenidos a partir de Adiciones Patrón para la validación del método de Perfiles de Disolución.....	69
Tabla 36. Resultados del análisis de regresión obtenidos a partir de los datos de linealidad del método.....	70
Tabla 37. Resultados de Precisión y Exactitud obtenidos a partir de Adiciones Estándar para la validación del método de Perfiles de Disolución.....	71
Tabla 38. Resultados del porcentaje retenido para cada uno de los filtros utilizados en la validación de los métodos analíticos.....	73
Tabla 39. Resultados de la Prueba de Estabilidad del Acetaminofén en NaOH 0.1N...	74
Tabla 40. Criterios de validación para la prueba de Estabilidad de la muestra.....	74

Tabla 41. Comparación de los valores t_{cal} y $t_{critica}$ para cada uno de los tiempos de análisis.....	75
Tabla 42. Resultados de la concentración adicionada y la concentración recuperada para la Dilución 0.5 ml en 10 ml.....	84
Tabla 43. Resultados del análisis de variancia realizado a partir de los datos obtenidos de la Dilución 0.5 ml en 10 ml, con un nivel de significancia del 95%.....	85
Tabla 44. Resultados de la concentración adicionada y la concentración recuperada para la Dilución 0.5 ml en 50 ml.....	85
Tabla 45. Resultados del análisis de variancia realizado a partir de los datos obtenidos de la Dilución 0.5 ml en 50 ml, con un nivel de significancia del 95%.....	86
Tabla 46. Resultados de la concentración adicionada y la concentración recuperada para la Dilución 2 ml en 25 ml.....	87
Tabla 47. Resultados del análisis de variancia realizado a partir de los datos obtenidos de la Dilución 2 ml en 25 ml, con un nivel de significancia del 95%.....	88

ANEXO VIII. ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Espectro de Absorción de Acetaminofén en HCl 0.1N a pH 1.01.....	38
Gráfico 2. Espectro de Absorción de Acetaminofén en Búfer de Acetatos 0.05M a pH 4.52.....	38
Gráfico 3. Espectro de Absorción de Acetaminofén en Búfer de Fosfatos 0.05M a pH 6.8.....	39
Gráfico 4. Espectro de Absorción de Acetaminofén en NaOH 0.1N pH 12.5.....	39
Gráfico 5. Comparación entre los espectros de absorción de Acetaminofén en los diferentes medios utilizados a diferentes valores de pH.....	40
Gráfico 6. Comparación de los espectros de Absorción del Acetaminofén obtenidos de cada uno de los medios de disolución utilizando NaOH 0.1N como medio final de aforo.....	41
Gráfico 7. Puntos de Referencia para seleccionar las longitudes de onda utilizando el Espectro de absorción de Acetaminofén en NaOH 0.1N.....	43
Gráfico 8. Valores obtenidos en el análisis de PRESS a partir del tratamiento de los datos con el algoritmo de MCP del programa ISHEJA.....	45
Gráfico 9. Concentración Estimada contra la concentración Real del Acetaminofén de la Curva de Calibración No. 1.....	50
Gráfico 10. Concentración Estimada contra la concentración Real del Acetaminofén de la Curva de Calibración No. 2.....	51
Gráfico 11. Concentración Estimada contra la concentración Real del Acetaminofén de la Curva de Calibración No. 3.....	53
Gráfico 12. Miligramos Recuperados de Acetaminofén en función de los Miligramos Adicionados aplicando el Método de MCP.....	60
Gráfico 13. Representación Gráfica de los Intervalos de Confianza para cada uno de los niveles de concentración	63
Gráfico 14. Porcentajes de recobro de dos analistas en dos días diferentes.....	65
Gráfico 15. Representación grafica de los datos obtenidos para linealidad del método.....	69
Gráfico 16. Representación grafica de la concentración recuperada contra la concentración adicionada para la dilución 0.5 ml en 10 ml.....	84
Gráfico 17. Representación grafica de la concentración recuperada contra la concentración adicionada para la dilución 0.5 ml en 50 ml.....	86
Gráfico 18. Representación grafica de la concentración recuperada contra la concentración adicionada para la dilución 2 ml en 25 ml.....	88

ANEXO IX. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química del Acetaminofén.....	3
Figura 2. Pasos del algoritmo de MCP de la etapa de Calibración.....	15
Figura 3. Pasos del algoritmo de MCP de la etapa de Predicción.....	17
Figura 4. Diagrama de Flujo de las actividades a realizar.....	32
Figura 5. Procedimiento para la preparación de placebos cargados.....	58
Figura 6. Fotografía de celulosa microcristalina PH 102. Magnificada 200x...	91
Figura 7. Imagen de Crospovidona (Polyplasdone XL-10).....	92
Figura 8. Fotografía de Estearil Fumarato de Sodio. Magnificada 300x.....	94
Figura 9. Esquema de la paleta del aparato II de la USP.....	96
Figura 10. Aparato II de la USP.....	97
Figura 11. Esquema de los parámetros de agitación para el uso de paletas en el Aparato II.....	97