



# Universidad Nacional Autónoma de México

## Facultad de Química

“Validación de un Método  
Espectrofotométrico para Determinar  
Acetaminofén en un Producto  
Farmacéutico”

Tesis que para obtener el Título de:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P r e s e n t a :

Verónica Ledesma Peña



México D., F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**



## **Jurado Asignado:**

Presidente Prof.: **PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ**

Vocal Profra.: **MARÍA DEL SOCORRO RAMOS ALPÍZAR**

Secretario Profra.: **HONORIA FUENTES SIXTOS**

1er. Suplente Prof.: **JUAN RAMÍREZ BALDERAS**

2do. Suplente Prof.: **RAÚL LUGO VILLEGAS**

Sitio donde se desarrolló el Tema: Laboratorio 3-D, Edificio A  
Facultad de Química  
Ciudad Universitaria



---

**PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ**  
ASESOR



---

**VERÓNICA LEDESMA PEÑA**  
SUSTENTANTE

# Agradezco

A Dios

Por ser mi refugio y mi fortaleza

A mis Padres: Ma. Isabel Peña y Ricardo Ledesma

Por la larga espera.

Por encauzarme en el difícil camino de la vida, por enseñarme a cultivar valores nobles de la vida y permitirme hacer la libre elección de mis ideales, así como concederme la dicha de sentirme orgullosa de ustedes. Siempre tendré en mi corazón que no escatimaron esfuerzo alguno, sacrificando gran parte de su vida en formarme y educarme. Nunca podré pagar su esfuerzo. A ustedes a quienes nunca podré pagar todos sus desvelos...mi agradecimiento permanente.

A mis Hermanos: Alfredo, Lucina, Rosa, Ricardo, Luisa, Jaime, Roberto, y Patricia

Por su ejemplo constante, por sus innumerables cualidades humanas y sobre todo por su cariño.

Porque siempre han sido mi guía y apoyo.

Por mostrarme el camino y ayudarme a andarlo.

A mi Novio: Arturo Zamora

Porque has llenado mi vida de amor, ternura, cariño e ilusión.

Porque eres íntegro y generoso y me has enseñado que el verdadero amor no riñe, confía, tolera, perdona y olvida.

Porque en la calidez de tu sonrisa encuentro mil razones para seguir adelante.

A mi Amiga: Luz María Román

Por ayudarme a disfrutar largas horas de esfuerzo y desvelo.

Por brindarme tu amistad solidaria en todo momento que he necesitado.

Porque sé, disfrutas de este pequeño logro tanto como yo.

Porque la distancia no logra separarnos.

A mis sobrinos: Denisse, Víctor, Daniel, Mayanin, Adriana, Tania, Rickis e Isabella

Por todos los momentos de alegría que hemos compartido.

Al Profesor: Pedro Villanueva

Por los conocimientos que me has transmitido

Por tu apoyo y estímulo constante

Porque en ti encontré a un amigo.

A la Familia: Zamora Cruz

Por todas sus muestras de afecto y confianza que me han dado.

Por hacerme partícipe de momentos importantes en su vida.

A mis Amigos y Compañeros: Rafael Vilchis, Jorge Avendaño, Rachel, Armando, Larry, Faby, Nancy, Martha, y Claudia.

Por su amplia y valiosa ayuda que me brindaron, gracias por hacer mi estancia más agradable en el laboratorio.

A mis Amigos Ingenieros Petroleros: Fidel , Edmundo, Haydee, Iván Vinicio, Rafael y Lucy.

Por todos los momentos divertidos que he disfrutado a su lado.

A las Profesoras: Ma. Del Socorro Ramos y Honoria Fuentes.

Gracias por dedicar parte de su tiempo a la revisión de mi trabajo, por todas sus atenciones, comentarios y sugerencias, su colaboración ha sido de gran valor.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Mi más profundo y sincero agradecimiento a ésta Máxima casa de estudios por darme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

... Hoy puedo ver todo un pasado lleno de esfuerzos, de decepciones y logros, de trabajo, de exploración, el resumen de un quehacer que ahora, cuando ya empieza a ser posible echar la vista atrás, parece perfectamente consecuente y logrado.



## Índice

Introducción .....	4
Objetivos .....	7

### CAPITULO I “GENERALIDADES”

1.1 Monografía del Acetaminofén.....	8
1.2 Métodos Analíticos Utilizados para la Determinación de Acetaminofén.....	17

### Validación de Procesos

1.3 Antecedentes.....	20
1.4 Definición.....	23
1.5 Revisión de la Documentación Oficial Mexicana.....	23
1.6 Revisión en Documentos Oficiales Internacionales.....	28
1.7 Validación de Métodos Analíticos.....	29
1.8 Clasificación de Métodos Analíticos.....	30
1.9 Estrategias para la Validación de Métodos Analíticos .....	38

## CAPITULO II “DESARROLLO EXPERIMENTAL”

2.1	Fundamento del Método Desarrollado para Cuantificar Acetaminofén.....	41
2.2	Especificidad.....	44

### Parámetros de Validación del Sistema

2.3	Linealidad.....	44
2.4	Precisión.....	45

### Parámetros de Validación del Método

2.5	Linealidad del Método.....	46
2.6	Exactitud y Repetibilidad al 100%.....	47
2.7	Reproducibilidad.....	48
2.8	Estabilidad Analítica de la Muestra.....	48
2.9	Determinación de Acetaminofén en Productos Comerciales .....	49

## CAPITULO III “RESULTADOS”

3.1	Especificidad .....	54
-----	---------------------	----

## Resultados del Sistema

3.2	Linealidad .....	56
3.3	Precisión.....	58

## Resultados del Método

3.4	Linealidad del Método.....	60
3.5	Exactitud y Repetibilidad al 100%.....	65
3.6	Reproducibilidad.....	67
3.7	Estabilidad Analítica de la Muestra.....	69
3.8	Resultados de la Determinación de Acetaminofén en Productos Comerciales.....	71

## CAPÍTULO IV “CONCLUSIONES”

Conclusiones .....	73
ANEXO A .....	76
ANEXO B.....	81
BIBLIOGRAFÍA .....	87

## INTRODUCCIÓN

En la elaboración de medicamentos el objetivo principal es lograr medicamentos que cumplan con las necesidades requeridas de calidad, eficacia, seguridad, pureza e inocuidad.

Para cubrir éstas necesidades se han realizado investigaciones farmacéuticas, en las cuáles se han estudiado las variables involucradas en los procesos de fabricación para facilitar su fabricación, conservar las propiedades de los principios activos y así mantener y mejorar la calidad final del producto. La calidad se verifica mediante el uso de técnicas analíticas validadas que nos proporcionan resultados precisos y exactos, así mismo, por el uso de procesos analíticos validados.

El proceso de validación es un requerimiento básico de las Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos (Code of Federal Regulations 21, partes 210 y 211) y de las regulaciones de Buenas Prácticas de Fabricación de productos para propósitos médicos, (CFR 21, parte 820).

Dentro de un proceso de validación se deben considerar: Procesos de manufactura, procesos de limpieza, equipos, sistemas mecánicos, procesos de empaque, métodos analíticos, sistemas de control automático, instalaciones, material y personal.

Validar no es simplemente escribir un protocolo que se debe aprobar en el área de Aseguramiento de Calidad, ejecutarlo siguiendo las Buenas Prácticas de Fabricación y finalmente elaborar el reporte y documentar los resultados, actualmente, el ciclo de vida de un proceso de validación es



mucho más que eso, cada operación unitaria debe ser evaluada mediante pruebas físicas, químicas ó microbiológicas, según requerimientos. Para ello se deben establecer los métodos analíticos a ser aplicados durante la validación del proceso y éstos deben ser aprobados. Aunque en términos generales, cada sistema, equipo y cada proceso va a tener su particularidad y la tendencia es tener todos los componentes para considerar que ese programa de validación está completo.

Es indispensable llevar a cabo la validación de métodos analíticos pues de esta manera se certifica la validez de los métodos de análisis empleados, y se garantiza que al final del proceso se alcancen los atributos de calidad establecidos. La secuencia de las pruebas que constituyen la validación, permite darse cuenta de que el método, el cual se está evaluando sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

El presente trabajo se refiere a la validación de un método espectrofotométrico para cuantificar acetaminofén en tabletas como indicador de control de calidad

El acetaminofén es un analgésico y antipirético, indicado para estados febriles; el dolor de leve a moderado, para el alivio del dolor de cabeza, dental, reumático y síntomas del resfriado común. Las acciones analgésicas y antipiréticas del acetaminofén son similares a las de los salicilatos y se han atribuido a la inhibición de la ciclooxigenasa. La analgesia es de tipo central y periférica, mientras que la antipiresis se produce por una acción central sobre el centro termorregulador hipotalámico.

Los parámetros del sistema son:

- ▶ Linealidad
- ▶ Precisión

Los parámetros del método son:

- ▶ Linealidad
- ▶ Exactitud
- ▶ Repetibilidad
- ▶ Reproducibilidad
- ▶ Estabilidad

Los datos obtenidos en cada una de las determinaciones se someten a un análisis estadístico para demostrar la confiabilidad de los mismos.

## OBJETIVOS

- ⊕ Desarrollar un método espectrofotométrico UV-VIS para cuantificar acetaminofén en tabletas.
  
- ⊕ Efectuar la validación del método analítico desarrollado, evaluando los parámetros correspondientes a especificidad, linealidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad.
  
- ⊕ Comprobar que el método analítico que se ha propuesto es: específico, preciso, exacto y lineal.
  
- ⊕ Una vez validado el método analítico, cuantificar acetaminofén en tabletas elaboradas por diferentes laboratorios farmacéuticos.

## CAPÍTULO I GENERALIDADES

### 1.1 MONOGRAFÍA DEL ACETAMINOFÉN

▶ **Nombre Químico**

p-acetamidofenol, p-acetaminofenol, p-hidroxiacetanilida, 4'-hidroxiacetanilida, p-acetilaminofenol, N-(4-hidroxifenil)acetamida, 4'-hidroxiacetanilida

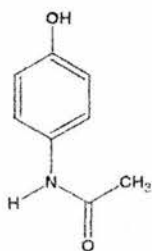
▶ **Nombre Genérico**

Acetaminofén, acetofenum, paracetamol.

▶ **Fórmula Condensada.**



▶ **Fórmula Desarrollada**



▶ **Masa Molecular**

151.17 g/mol

Contiene no menos del 98.0 por ciento y no más del 101.0 por ciento de acetaminofén, calculado con referencia a la sustancia seca.

▶ **Sustancias de referencia**

Acetaminofén, secar durante 18 horas sobre gel de sílice, p-aminofenol, P-Cloro-acetanilida.

▶ **Descripción**

Polvo blanco cristalino, inodoro, tiene un sabor ligeramente amargo.

▶ **Solubilidad**

Fácilmente soluble en alcohol y metanol; soluble en acetona, agua caliente y solución 1N de hidróxido de sodio; poco soluble en cloroformo.

1 parte de acetaminofén	Es soluble en:
	70 de agua
	20 de agua caliente
	7 de etanol
	13 de acetona
	50 de cloroformo
	40 de glicerol
	10 de metanol
1 de propilenglicol	

▶ **pH**

Entre 5.1 y 6.5. A 4 g de la muestra, agregar 40 mL de agua libre de dióxido de carbono, agitar durante 5 minutos, separar los sólidos y determinar el pH en el líquido sobrenadante.



▶ **Temperatura de Fusión**

Entre 168° y 172° C

▶ **Contenido de Agua**

No más de 0.5%

▶ **Residuo de Ignición**

No más de 0.1%

▶ **Cloruros**

No más de 140 ppm

▶ **Sulfatos**

No más de 200 ppm

▶ **p- Aminofenol libre**

No más del 0.005%

▶ **p-Cloroacetanilida**

No más del 0.005%

▶ **Sustancias fácilmente carbonizables**

Disolver 500 mg de la muestra con 5 mL de SR de ácido sulfúrico: la solución no presenta más color que el que corresponde a la solución de comparación

▶ **Metales Pesados**

No más de 10 ppm

▶ **Ensayos de identidad**

- a) El espectro IR de una dispersión de la muestra previamente seca en bromuro de potasio, exhibe máximos solamente a las mismas longitudes de onda que las de una preparación similar de la SRef de acetaminofén.
- b) El espectro UV de una solución (1:200 000) de la muestra preparada en una mezcla de solución 0.1 N de ácido clorhídrico-metanol (1:100) exhibe máximos y mínimos solamente a las mismas longitudes de onda que las de una preparación similar de la SRef de acetaminofén.
- c) A 10 mL de una solución (1:100) de la muestra, agregar 1 gota de SR de cloruro férrico: se desarrolla una coloración violácea.
- d) Calentar 100 mg de la muestra con 1 mL de ácido clorhídrico durante 3 minutos, agregar 10 mL de agua y enfriar: no debe producirse precipitado. Agregar 0.05 mL de una solución 0.0167 M de dicromato de potasio. Se desarrolla una coloración violeta que no debe cambiar a roja.

▶ **Valoración**

*Preparación de la muestra.* Disolver 120 mg de la muestra con 10 mL de metanol, en un matraz volumétrico de 500 mL, llevar al aforo con agua. Pasar 5 mL de ésta solución a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar al aforo con agua.

*Preparación de referencia.* Solución que contenga 12 µg/mL de la SRef de acetaminofén, preparada de manera similar a la preparación de la muestra.

*Procedimiento.* Determinar la absorbancia de la preparación de la muestra y de la preparación de referencia a 244 nm, utilizando agua

como blanco de ajuste. Calcular la cantidad en miligramos de acetaminofén mediante la fórmula:

$$10C(A_m/A_{ref})$$

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

▶ **Condición de Almacenaje**

Envases bien cerrados, protegidos de la luz.

▶ **Indicaciones Terapéuticas**

Analgésico-antipirético. El acetaminofén es usado como analgésico-antipirético, utilizado en el tratamiento de dolor, mialgias, artralgias, dolor crónico del cáncer, dolor en el post-parto, postoperatorio y en el tratamiento de la fiebre.

▶ **Farmacodinamia**

Controla eficazmente la fiebre a través de su acción sobre el centro termorregulador, ofrece un efecto analgésico eficaz en el tracto gastrointestinal, deprimiendo selectivamente las vías del dolor, el acetaminofén es inhibidor débil de la biosíntesis de las prostaglandinas, aunque algunas pruebas sugieren que puede ser más efectivo contra las enzimas del SNC que las de la periferia, esto puede explicar en parte su bien documentada capacidad para reducir la fiebre (acción central) y para inducir analgesia, la actividad antipirética reside en su estructura amino-benceno.



## ► Farmacocinética

El acetaminofén se absorbe rápidamente y casi totalmente en el tracto gastrointestinal, la concentración plasmática llega al máximo en 30 a 60 minutos y la vida media plasmática es de 1 a 4 horas.

El acetaminofén tiene una distribución relativamente uniforme en casi todos los líquidos corporales, su unión a proteínas plasmáticas varía entre 20 y 50%, puede recuperarse entre el 90 al 100% de la droga en la orina el primer día, casi nada se excreta sin cambios, la mayoría se excreta después de la conjugación hepática con ácido glucurónico (60%) con ácido sulfúrico (35%) o cisteína (3%), se han detectado pequeñas cantidades de los metabolitos hidroxilados o desacetilados. Los niños tienen menor capacidad de glucuronización de la droga que los adultos, cuando se ingieran dosis altas de acetaminofén experimenta una N-hidroxilación seguida de deshidratación espontánea con formación de N-acetil-p-benzoquinona, el metabolismo generalmente es considerado responsable de la hepatotoxicidad.

La administración del acetaminofén en los pacientes con deterioro en la función renal provoca mayor acumulación de acetaminofén conjugado en el plasma, pero solamente cambios menores de las concentraciones plasmáticas del acetaminofén libre.

## ► Contraindicaciones

Está contraindicado en pacientes con alergia al medicamento, enfermedad hepática, en pacientes con trastornos de la coagulación o con antecedentes de ingesta de anticoagulantes, en úlcera péptica activa, o durante la lactancia.

▶ **Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia**

No deberá emplearse en pacientes lactantes ni en el 1er. trimestre del embarazo, su uso en el 2do. y 3er. trimestre no ha reportado alteraciones en humanos.

▶ **Reacciones secundarias y adversas**

A dosis terapéuticas generalmente es bien tolerado, hay erupciones cutáneas ocasionales y otras reacciones alérgicas, la erupción es generalmente eritematosa o urticaria, pero a veces es más seria y puede acompañarse con fiebre y lesión en mucosas.

Se ha visto sensibilidad al acetaminofén en pacientes que son sensibles a los salicilatos, en casos aislados, el acetaminofén ha provocado neutropenia, pancitopenia y leucopenia, el efecto adverso más serio de la sobredosis aguda de acetaminofén es una necrosis hepática, centrolobulillar potencialmente fatal que depende de la dosis, también puede ocurrir una necrosis túbulo renal y coma hipoglucémico, el acetaminofén puede causar metahemoglobinemia y trombocitopenia.

▶ **Interacciones medicamentosas y de otro género**

No debe administrarse conjuntamente con anticoagulantes, cuando se administra conjuntamente con metoclopramida puede aumentarse la velocidad de absorción del acetaminofén, al administrarse con anticonceptivos orales puede inducirse el metabolismo hepático del acetaminofén.

▶ **Alteraciones en los resultados de pruebas de laboratorio**

Puede ocasionarse con el uso de acetaminofén: neutropenia, leucopenia y pancitopenia, elevación de transaminasas de deshidrogenasa láctica,

elevación de bilirrubinas, tiempo de protrombina alargado, azoemia transitoria, hipoglucemia, glucosuria.

► **Precauciones en relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre fertilidad**

No hay reportes de carcinogénesis, mutagénesis ni alteraciones en la fertilidad con el uso del acetaminofén.

► **Dosis y vías de administración**

Oral. Las dosis recomendadas para adulto son 300 a 600 mg cada 4 ó 6 horas sin rebasar la cantidad de 2.3 g/día cuando se administra a corto plazo, si su prescripción es a largo plazo se recomiendan 300 mg cada 4 a 6 horas, ya que tienen efecto acumulativo.

Para los niños pequeños la dosis única es de 60 a 120 mg. Según la edad y el peso, la dosis diaria no debe pasar de 1.2 g, no debe administrarse durante más de 10 días ni en niños muy pequeños excepto con aprobación de un médico.

Otro esquema de dosificación recomendada en adultos o niños mayores de 12 años es 325 a 650 mg cada 4 horas, cuando se requieran 500 mg o 1 g se recomienda iniciar con 500 mg y seguir con 500 mg o máximo 1 g cada 6 horas.

Entre 2 ó 3 años se recomiendan 160 mg, entre 4 a 5 años 240 mg, de 6 a 8 años 320 mg, de 9 a 10 años 400 mg y 11 años 480 mg, la dosis puede ser repartida cada cuatros horas si es necesario.

► **Manifestaciones y manejo de la sobredosificación o ingesta accidental**

El acetaminofén puede ocasionar necrosis hepática, localizada en el hepatocito en la región centrolobulillar del hígado, células que contienen



la mayor actividad del sistema mixto citocromo P-450-oxidasa, en las dosis recomendadas el acetaminofén es conjugado dando glucurónido especialmente en adultos y sulfato especialmente en niños, se oxida una pequeña porción dando un metabolito tóxico muy reactivo, el acetimidoquinona o la semiquinona, el cual es inactivado normalmente por conjugación con glutatión, cuando la dosis de acetaminofén es superior a 10 g. Las enzimas que catalizan la conjugación con glucurónido y sulfato se saturan, y entonces una proporción mayor del compuesto es convertida en su metabolito activo.

El daño hepático se produce cuando se agotan los depósitos de glutatión. Si la concentración del fármaco en plasma es superior a 200 y 50  $\mu$ /mL a las 4 y 12 horas después de su ingestión respectivamente, es probable que se produzca la necrosis.

El tratamiento es con lavado gástrico o emesis seguido por la administración dentro de las 24 horas de una sustancia que estimula la síntesis de glutatión, como la N-acetilcisteína diluida en jugo de fruta o refresco, la dosis de carga es 140 mg/Kg vía oral y luego 70 mg/Kg cada 4 horas administrando en total 17 dosis.

En el régimen anterior no se usa carbón activado ya que absorbería la acetilcisteína. Los niños menores de 6 años son menos susceptibles al daño hepático, incluso cuando sus concentraciones plasmáticas se encuentran dentro del intervalo de toxicidad para los adultos.

Por el contrario, los alcohólicos que toman dosis terapéuticas de acetaminofén pueden presentar efectos hepáticos. También puede utilizarse carbón activado como tratamiento único en intoxicaciones agudas.

## 1.2 MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACETAMINOFÉN

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

El acetaminofén es un fármaco de importancia mundial, ya que habitualmente se utiliza para el alivio temporal del dolor leve a moderado, como antiinflamatorio y como antipirético. Se puede obtener sin receta médica solo o en combinación con otras sustancias activas. La investigación para la determinación de acetaminofén ha despertado gran interés y se han desarrollado múltiples métodos analíticos que pueden ser utilizados en la industria o en laboratorios de instituciones de enseñanza.

Los métodos analíticos para su determinación son:

- Titulométricos
- Espectroscópicos
- Fluorimétricos
- Electroquímicos
- Cromatográficos

### ► Métodos Titulométricos

La titulometría es uno de los métodos analíticos, que cuenta con mayor información sobre la determinación de acetaminofén en muestras farmacéuticas, en este tipo de métodos el acetaminofén es determinado en forma indirecta por el titulante. Los métodos titulométricos, utilizan reacciones de óxido-reducción para determinar al acetaminofén.

Los métodos titulométricos trabajan con cantidades de miligramos de acetaminofén, los resultados oscilan entre 0.4 a 0.78 de desviación estándar y un por ciento de recobro de 99.8 a 107.4% en general.

El análisis de acetaminofén por éste método, resulta bastante económico, debido a que la técnica no hace uso de aparatos especializados como es el caso de los métodos espectrofotométricos y cromatográficos, esto da una ventaja, debido a que sólo se gasta en reactivos.

Desafortunadamente los métodos titulométricos para determinar acetaminofén, no son directos y requieren de una previa hidrólisis, para su determinación en preparaciones farmacéuticas o utilizar una técnica de extracción especial y esto induce a un intervalo de incertidumbre mayor en el análisis.

### ► Métodos de absorción o espectrofotométricos

Se basan principalmente en la detección de acetaminofén en el rango del visible, hay una gran variedad de trabajos que ofrecen diversas técnicas para determinar acetaminofén en estado puro, así como en presencia de otras sustancias activas.

La gran mayoría de los métodos se enfocan en la formación de compuestos coloridos, a través de reacciones de óxido-reducción con acetaminofén, este tipo de reacciones ofrecen la ventaja de que la determinación se vuelve específica sólo para el acetaminofén.

Este tipo de métodos trabajan con cantidades de microgramos y sus resultados en general oscilan entre 0.5 a 1.4 de desviación estándar y 99.8 a 100.8 por ciento de recobro.

Los métodos de absorción ofrecen un campo de estudio amplio en la determinación de acetaminofén en mezclas farmacéuticas, la detección del método es exacta, precisa y sensible, así el uso de este tipo de métodos es bastante confiable.



### ► Métodos fluorimétricos

Son métodos muy sensibles, se basan principalmente en la reacción del acetaminofén con otros compuestos fluorimétricos, que forman un compuesto que tiene la propiedad de fluorecer. Esto se tiene que realizar debido a que el acetaminofén por sí mismo no tiene esa propiedad.

En general los métodos fluorimétricos trabajan con cantidades de microgramos, sus resultados en general oscilan entre 1.0 y 1.6 de desviación estándar.

### ► Métodos electroquímicos

Los métodos electroquímicos son muy sensibles y precisos, principalmente se basan en la determinación de acetaminofén por reacciones de oxidación.

En este tipo de métodos el acetaminofén es hidrolizado a p-aminofenol, ya que es más fácil de oxidar aminas aromáticas primarias. El p-aminofenol es oxidado en el electrodo (de carbono vidriado), y el producto puede seguir siendo oxidado hasta obtener benzoquinona.

Una característica de este tipo de métodos electroquímicos, es que debido al uso de un potencial, se puede oxidar solamente al acetaminofén y por lo tanto es un método altamente selectivo.

En los métodos electroquímicos se trabaja con intervalos de concentración de  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-4}$ , y límites de detección del orden de picogramos.

El uso de detección electroquímica para la determinación de acetaminofén es uno de los métodos más sensibles, precisos y exactos para el uso de rutina en el laboratorio de análisis farmacéutico.

## ► Métodos cromatográficos

La determinación de acetaminofén en mezclas farmacéuticas y en muestras biológicas se desarrolló principalmente en la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

La gran versatilidad de los métodos de cromatografía líquida de alta resolución, proporciona un campo amplio en la determinación de acetaminofén, no solo en las diferentes técnicas de separación de acetaminofén, sino también en el análisis de muestras biológicas.

Estos métodos manejan límites de detección bajos, del orden de nanogramos y los resultados que reportan generalmente están entre 96.1 a 100.9 de por ciento de recobro.

Por lo tanto, se puede observar que hay una gran variedad de métodos analíticos útiles para la determinación de acetaminofén, pero pocos son los métodos que cumplen con ser sencillos, precisos, exactos y rápidos, para ser utilizados en laboratorios de análisis farmacéuticos.

## VALIDACIÓN DE PROCESOS

### 1.3 ANTECEDENTES

Los antecedentes históricos de las Buenas Prácticas de Fabricación inician en 1906, cuando el gobierno de los Estados Unidos confirmó las denuncias de adulteración en el envasado de carnes, creando la Food and Drug Administration (FDA), con la finalidad de controlar los alimentos y medicamentos.

En 1938 un hecho dramático fue causado por el elixir de sulfanilamida con dietilenglicol como excipiente, causando 100 muertes, antes de que pudiesen darse cuenta de este hecho, un mensaje que llegó entonces a la FDA, fue que los productos deberían tener ALTA SEGURIDAD.



Otra tragedia significativa ocurrió el 4 de julio de 1962, cuando los periodistas reportaron la histórica tragedia de la talidomida, así como en esas fechas surgieron las intoxicaciones provocadas por contaminación cruzada durante la fase de fabricación y acondicionamiento de penicilina y dietilbestriol.

Un poco después, el medicamento Tylenol fue contaminado con arsénico causando pánico y muerte en los Estados Unidos.

Durante muchos años la regulación de la FDA, en cuanto al control de los medicamentos, consistió únicamente en la toma y análisis de muestras de control, con la finalidad de verificar si cumplían con las especificaciones analíticas establecidas, es decir, sólo se hacían determinaciones acerca de la calidad, pero no se investigaba sobre los factores que podrían influir en la misma. Por lo que:

- ▶ En 1967 se solicitó a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el establecimiento de normas de fabricación y de control de calidad que garanticen la seguridad del medicamento elaborado y se recomendó la aplicación de dichas normas a todos los estados miembros de la región. La FDA observó que las nuevas reglamentaciones deberían ser implementadas y elaboradas de modo que pudieran ser aplicadas fácilmente, éstos propósitos generan más de 100 clases diferentes de procedimientos que deberían ser validados.
- ▶ En 1978 se incluyó la validación aplicada a un proceso en las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) por la FDA.
- ▶ En 1994 se emitió la guía sobre la inspección de formas sólidas orales puntos pre/post aprobatorios para el desarrollo y su validación, emitida por la FDA.
- ▶ En 1996 en el CFR 21 parte 211, se adiciona una nueva subparte, la subparte L, sobre validación. La Sección 211.220 considera la validación de los procesos farmacéuticos.

En México los antecedentes son:

- ▶ En 1978 se realiza el primer taller de validación por parte de la Asociación Farmacéutica Mexicana (AFM).
- ▶ En 1998 se emitió la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos (15-Enero-1999).

#### 9.11 Validación.

Actualmente, la presente Norma está sujeta a revisión, las modificaciones que se han realizado se presentan en el PROYECTO de la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-SSA1-2003, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.

### 14. Validación

#### 14.1 Política.

Es un requerimiento de esta Norma que los fabricantes de medicamentos determinen que actividades de validación son necesarias para demostrar el control de los aspectos críticos de sus operaciones particulares.

Debe utilizarse un enfoque de análisis de riesgos para evaluar el ámbito y grado de validación.

Todas las instalaciones, equipos, sistemas críticos y computacionales (que impacten en la calidad del producto) deben estar calificados y los métodos de limpieza y analíticos deben validarse al inicio de la operación y terminados antes de la liberación de un producto.

En términos generales, la validación está determinada por las regulaciones.

## 1.4 DEFINICIÓN

La NOM-059-SSA1-1993 de Buenas Prácticas de Fabricación define el concepto de Validación de Procesos como:

“Evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y características de calidad predeterminadas”

La FDA define Validación de Procesos como:

“Establecimiento de la evidencia documentada que provee un alto grado de seguridad de que en un proceso específico el producto se genera consistentemente con especificaciones y características de calidad predeterminadas”.

## 1.5 REVISIÓN DE LA DOCUMENTACIÓN OFICIAL MEXICANA

Los requerimientos solicitados en México, en los cuales se menciona la necesidad de contar con métodos analíticos validados, así como una guía mínima que indica qué parámetros debe cumplir un método para considerarlo validado, se mencionan a continuación:



## Reglamento de Insumos para la Salud

Publicado en el Diario Oficial el 4 de febrero de 1998 referente a los establecimientos que se destinan a la fabricación de insumos, establece lo siguiente:

<b>Artículo</b>	<b>C o n t e n i d o</b>
15	Los establecimientos que se destinen a la fabricación de insumos, llevarán al control analítico de éstos. Dicho control deberá incluir:  III. La validación de las Técnicas empleadas

## NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-SSA1-1993

Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.

<b>Numeral de la Norma</b>	<b>C o n t e n i d o</b>
5.6	El encargado del área de producción se encargará de realizar las siguientes funciones, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que correspondan al responsable sanitario, conforme a la Ley General de Salud y al Reglamento de Insumos para la Salud:
5.6.3	Que se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados.
5.7	El encargado del área de calidad, se encargará de realizar las siguientes funciones, sin perjuicio de las obligaciones y responsabilidades que correspondan al responsable sanitario, conforme a la Ley General de Salud y al Reglamento de Insumos para la Salud:
5.7.4	Que se lleven a cabo estudios de validación de los procesos de fabricación y de los sistemas involucrados.

<b>9.11.3</b>	Los métodos analíticos deben ser validados, de acuerdo con lo establecido en el apartado 9.12 "Control del Laboratorio Analítico".
<b>9.12.3</b>	Se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en cualquier farmacopea internacional ni en la FEUM.

**PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA PROY-NOM-059-SSA1-2003**  
**Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la Industria**  
**Química Farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.**

<b>Numeral de la Norma</b>	<b>C o n t e n i d o</b>
3.82	Validación. Es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas.
3.84	Validación del proceso. La evidencia documentada de que el proceso, operado dentro de parámetros establecidos, puede rendir efectiva y reproduciblemente para producir un producto médico que satisfaga sus especificaciones determinadas y atributos de calidad.
5.8	El responsable del más alto nivel jerárquico del área de producción se encargará de que la producción de los medicamentos se realice de acuerdo a los estudios de validación y órdenes maestras aprobadas, garantizando que se cumple con las especificaciones de producto establecidas y el contenido de esta norma.
5.9.5	Aprobar todos los estudios del Plan Maestro de Validación.
7.5.7.5	Evaluación del estado de la validación del proceso y de la metodología analítica.
9.8.3	Se debe contar con métodos de análisis validados de acuerdo a esta norma para materias primas, producto a granel, producto en proceso y producto terminado.
14.	Validación.
14.2	Planeación para la validación.
14.2.1	Las actividades de validación deben estar integrados en un Plan Maestro de Validación (PMV) ó equivalente el cual debe incluir los elementos clave que lo integran

14.2.2.5	Métodos analíticos.
14.2.4.5	Mantenimiento del estado validado (revalidación)
14.3	Documentación
14.4	Calificación.
14.5	Validación de Procesos
14.5.1	La validación del proceso debe completarse normalmente antes de la distribución y venta del producto (validación prospectiva)
14.6	Validación de la limpieza.
14.6.4	Deben utilizarse métodos analíticos validados cuyo límite de detección y cuantificación sea lo suficientemente sensible para detectar y cuantificar el nivel aceptable establecido del residuo o contaminante.
14.7	Métodos analíticos
14.7.1	Deben ser aprobados de acuerdo a un protocolo aprobado, los métodos analíticos usados para:
14.7.1.1	Evaluación de materias primas
14.7.1.2	Evaluación de producto a granel, en proceso y terminado
14.7.1.3	Validaciones
14.7.2	En el caso de métodos farmacopeicos para producto procesado o producto terminado deberá realizarse pruebas que demuestren la aplicabilidad del método a su producto e instalaciones
14.7.3	Cualquier cambio en un método analítico validado debe ser sometido al proceso de control de cambios
14.7.4	Los métodos analíticos usados para medir los parámetros críticos de procesos o de validación de limpieza, deben ser validados antes de cualquier estudio de validación.
14.8	Sistemas computacionales
14.9	Sistemas críticos
14.10	Proveedores
14.11	Mantenimiento del estado validado



NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-164-SSA1-1998.

Buenas Prácticas de Fabricación para Fármacos

<b>Numeral de la Norma</b>	<b>C o n t e n i d o</b>
<b>16.1</b>	Los controles de laboratorio e inspecciones deben apoyarse en normas, PNO's o manuales que contengan las especificaciones para garantizar la confiabilidad de sus resultados. Tales controles deben incluir:
<b>16.1.5</b>	Validación de métodos analíticos utilizados por la empresa, no farmacopeicos o farmacopeicos que tengan desviaciones frente a la farmacopea de referencia.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-073-SSA1-1993

Estabilidad de medicamentos

<b>Numeral de la Norma</b>	<b>C o n t e n i d o</b>
<b>5.5</b>	Cuando se cambie el método analítico durante el estudio de estabilidad, se debe demostrar que los dos métodos son equivalentes mediante el proceso de validación.
<b>5.10.2</b> <b>5.7.4</b>	Información general, especificaciones y métodos analíticos: Información de linealidad, precisión, exactitud, reproducibilidad, repetibilidad y especificidad del método analítico indicativo de estabilidad.
<b>6.</b>	<b>Fármacos</b>  Para fines de registro de un medicamento con fármacos nuevos en México, el fabricante del medicamento debe presentar ante la Secretaría de Salud estudios de estabilidad acelerada y/o a largo plazo de tres lotes del (los) fármaco(s) efectuados por el fabricante de los mismos, utilizando métodos analíticos validados.

## 1.6 REVISIÓN DE DOCUMENTOS OFICIALES INTERNACIONALES

### United States Food And Drug Administration (FDA)

En 1990 durante la conferencia de “Validación de Métodos Analíticos”: Se establece que la biodisponibilidad, bioequivalencia y estudios farmacocinéticos deben cumplir con la descripción del método.

### United States Pharmacopeia (USP)

Refiere: “Validación de Métodos Compendiales” (1225). Los procedimientos para asegurar los niveles de calidad de productos farmacéuticos son sometidos a varios requerimientos. De acuerdo a la Sección 501 de la Federal Food, drug, and Cosmetic Act., ensayos y especificaciones en monografías de la United States Pharmacopeia y al National Formulary que constituyen los estándares legales.

La regulación actual de Buenas Prácticas de Fabricación [21 CFR 211.194 (a)] establece que los métodos que son usados para valorar productos farmacéuticos de acuerdo a especificaciones establecidas cumplan con estándares propios de exactitud y seguridad, además, de acuerdo con estas regulaciones [21 CFR 211.194 (a)(2)], el uso de métodos analíticos descritos en la USP y en el NF no requieren ser validados, simplemente se debe verificar la conveniencia de su uso bajo las condiciones actuales de trabajo. Las propuestas dadas a un método analítico compendiado deben justificarse por suficientes resultados de laboratorio para documentar su validez.

El texto trata de ser lo más parecido a lo que la Tripartite International Conference on Harmonization (ICH) establece en su documento “Validation of Analytical Procedures and the Methodology” referente a procedimientos analíticos que son aplicados en la Comunidad Europea, Japón y Estados Unidos.



## Comunidad Europea

Criterios para las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Señala que se determine: especificidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, linealidad rango, sensibilidad, límites de detección y límites de cuantificación.

### 1.7 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Dentro de un proceso de validación tenemos que considerar: los procesos de manufactura, procesos de limpieza, equipos, sistemas mecánicos, procesos de empaque, métodos analíticos, sistema de control automático, instalaciones, materiales y personal.

La validación constituye un concepto general, que abarca todo el proceso de fabricación y control.

El término validación desde el punto de vista de Control de Calidad, se emplea para establecer la calidad del método y autorizar su uso en el laboratorio.

Los métodos deben ser exactos, por la identidad entre el valor real y el resultado del análisis, deben ser precisos por la coincidencia entre los resultados analíticos de diferentes análisis de una misma muestra, deben ser reproducibles por la coincidencia de los resultados analíticos de una misma muestra analizada por diferentes analistas y laboratorios.

Así, el laboratorio debe usar métodos de ensayo, incluyendo métodos para muestreo, que satisfagan las necesidades del cliente y que sean apropiadas para los análisis y calibraciones que realice. Deben usarse preferentemente los métodos publicados en normas internacionales, regionales o nacionales como Farmacopeas. También podrán usarse los métodos desarrollados o adaptados por el laboratorio, si son apropiados para el uso pretendido y si estos son validados. El laboratorio debe asegurarse de que se usa la última edición vigente de una norma. Cuando sea necesario la

norma debe ser complementada con detalles adicionales para asegurar su aplicación consistente

La validación del método analítico es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir, cumple con su propósito.

Es muy importante el papel que juega un método analítico en la producción de medicamentos con calidad, así como la validación de procesos, por lo que las regulaciones determinan la obligación de validar métodos analíticos

## 1.8 CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

### En función de su estado regulatorio

- ▶ Métodos Farmacopéicos: Todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP, EP)
- ▶ Métodos no Farmacopéicos: Aquellos métodos no compendiados en una Farmacopea.

### En función de su aplicación (NOM-059-SSA1 Y NOM-073-SSA1)

- ▶ Método para producto a granel
- ▶ Método para producto terminado
- ▶ Método para materia prima
- ▶ Métodos indicadores de estabilidad

### En función de su propósito analítico

- ▶ Método para cuantificar el analito (contenido o potencia)
- ▶ Método para establecer la presencia del analito a un límite
- ▶ Método para identificar el analito

## En función de la naturaleza de la respuesta analítica

- ▶ Método físico químico, cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje) o químico (consumo de iones, consumo de un acomplejante)
- ▶ Métodos biológicos, cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento microbiano, inhibición).

Para hacer una validación acertada sobre el método analítico adecuado para los fines perseguidos en la USP XX26/NF 21 como “Validación de Métodos Compendiales” se ha determinado una clasificación en categorías para los ensayos en los cuales se describen los parámetros de desempeño a evaluar durante la validación del método analítico:

### Categoría I

Métodos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de los activos a granel o ingredientes activos (que comprenden también a los conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

### Categoría II

Métodos analíticos para la determinación de impurezas y compuestos degradados en los activos a granel o compuestos de degradación en productos farmacéuticos terminados (lo cual comprende análisis cuantitativos y pruebas límite).

### Categoría III

Métodos analíticos para la determinación de características de funcionamiento (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco).

### Categoría IV

Pruebas de identificación o pruebas de propiedades físicas.

NOTA: No todos los métodos se ajustan fácilmente a una de las cuatro categorías arriba citadas: Para estos métodos, cada elemento de dato debe ser considerado según un criterio de caso por caso de aplicación a la medición que pretende hacerse del método.



## CATEGORÍA DE ENSAYOS

CLASIFICACIÓN					
Parámetro de desempeño	I	II		III	IV
	Identificación	Cuantitativo, % área, % en peso	Límite	Contenido /Potencia /Valoración	Pruebas específicas
Exactitud	-	+	-	+	+§
Precisión- Repetibilidad	-	+	-	+	+§
Precisión- Precisión intermedia	-	+ <sup>1</sup>	-	+ <sup>1</sup>	+§
Especificidad	+ <sup>2</sup>	+	+	+Φ	+§
Límite de detección	-	- <sup>3</sup>	+	-	-
Límite de Cuantificación	-	+	-	-	-
Intervalo	-	+	-	+	-
Linealidad	-	+	-	+	-
Rango	-	+	-	+	-
Robustez	-	+	- <sup>3</sup>	+	+§

Notas: Éstos parámetros de desempeño también se pueden encontrar en CNQFB 2000, ICH marzo 1995, USP 26 y FDA 2000

- Significa que éstas características normalmente no son evaluadas
- + Significa que éstas características normalmente son evaluadas
- 1 La reproducibilidad en este caso es una buena característica, no se requiere la precisión intermedia
- 2 La especificidad puede ser compensada por adición de un segundo método analítico
- 3 Puede ser necesario en algunos casos
- § Puede no ser necesario en algunos casos
- Φ La especificidad en pruebas de liberación puede ser compensada por la prueba de impurezas



En la “Guía de Validación de Métodos Analíticos”, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, se indica que en función de la aplicación analítica del método, la tabla siguiente indica los parámetros de desempeño a estudiar.

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO/ POTENCIA/ VALORACIÓN	PRUEBAS DE IMPUREZAS		IDENTIFICACIÓN
		CONTENIDO/ VALORACIÓN	LÍMITE	
PRECISIÓN/ ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	SI	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	NO	NO
ESPECIFICIDAD	SI <sup>3</sup>	SI	SI	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SI	SI	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI	SI	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA <sup>2</sup>	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA <sup>2</sup> DE LA MUESTRA	*	*	NO	NO
LÍMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	NO
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	NO
ROBUSTEZ	*	*	*	NO
TOLERANCIA	*	*	*	NO

- \* PUEDE SER REQUERIDO DEPENDIENDO DE LA NATURALEZA DEL MÉTODO
- 1 La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina
- 2 También es definido como un estudio de tolerancia
- 3 Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra

**MATRÍZ DE EQUIVALENCIA DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

EQUIVALENTE	PROPÓSITO	USO
CONTENIDO O POTENCIA	CUANTIFICA AL ANALITO	<p>Métodos para producto a granel.                      Métodos para producto terminado.                      Métodos para materia prima.                      Métodos indicadores de estabilidad.                      Métodos para fármacos.                      Métodos para cuantificar al analito en la prueba de disolución.                      Valoración.                      Ensayos de cuantificación.                      Determinación del principio activo liberado.                      Sustancias relacionadas.                      Titulación.                      Uniformidad de dosis.</p>
LÍMITE	ESTABLECE LA PRESENCIA DEL ANALITO A UN LÍMITE	<p>Métodos límite de impurezas.                      Métodos límite de residuos.                      Métodos para determinar el nivel de limpieza.                      Prueba límite.                      Sustancias relacionadas.</p>
IDENTIFICACIÓN	IDENTIFICA AL ANALITO	Ensayo de identidad.

La definición de cada uno de los parámetros de desempeño es la siguiente:

Parámetro de desempeño	Definición
Especificidad	La selectividad (especificidad) de un método analítico es su capacidad para detectar inequívocamente al analito en presencia de otros componentes, los cuales pueden estar presentes en la matriz de la muestra (los estudios de selectividad son efectuados antes de cualquier otro elemento de validación).
Linealidad del Sistema	Es la capacidad del instrumento de medición de obtener resultados analíticos directamente proporcionales a la concentración del analito.
Linealidad del Método	Es la habilidad para obtener resultados analíticos reproducibles.
Precisión del Sistema	Expresa la concordancia de las respuestas obtenidas de dos o más muestras que contienen solamente al analito de interés obtenidas bajo condiciones idénticas usando un mismo método analítico.
Precisión intermedia	Expresa la precisión con diferentes analistas y en diferentes días
Precisión del Método	Expresa la concordancia de las respuestas obtenidas de dos o más muestras obtenidas.
Exactitud	Expresa la concordancia entre el valor obtenido y el valor conocido del analito en la muestra. Generalmente se expresa como por ciento de recobro.
Límite de detección (LD)	Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecida, este puede ser determinado por la señal/ruido o basado en la curva de calibración y desviación estándar.
Límite de cuantificación (LQ)	Es la mínima concentración de una sustancia que es cuantificada bajo las condiciones establecidas de operación.
Límite de reporte	Es un valor que especifica el nivel en el cual los picos deben ser reportados en un método. Por lo común, es aplicado a impurezas en ingredientes activos farmacéuticos o compuestos de degradación en medicamentos, y es consistente con las guías Q3A y Q3B del ICH.
Robustez	Es la capacidad del método para proporcionar resultados confiables al realizar cambios internos en los parámetros del método (pH y polaridad de la fase móvil, flujo, presión, etc).
Rango	Es el intervalo entre los niveles de concentración alta y baja del analito, estudiadas en la linealidad.



Tolerancia	Grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la muestra bajo modificaciones externas al método, como diferentes proveedores de reactivos, diferentes tipos de columna, equipos, condiciones ambientales, diferentes analistas.
Estabilidad analítica de la muestra	Propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.
Adecuabilidad del sistema	Propiedad de reproducibilidad y resolución que permiten verificar si un sistema de análisis es adecuado para la ejecución del método analítico.

En la actualidad existen diversos documentos que indican como evaluar cada uno de los parámetros de desempeño arriba mencionados, por ejemplo:

- ▶ USP XXVI, Capítulo “Validación de Métodos Compendiales”
- ▶ Guía de Validación de Métodos Analíticos , edición 2002, CNQFB.

#### Concordancia con Guías Internacionales:

- Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures. ICH-Q2A, March 1995.
- Guideline on the validation of Analytical Procedures; Methodology; Availability; Notice ICHQ2B.
- USP24. Validation of Compendial Methods.
- Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. CDER. November 1994, CMC 3.



## Métodos que no requieren validación

### ► Métodos Compendiados.

Los métodos analíticos descritos en publicaciones oficiales y reconocidos (tal como Farmacopeas) de un ingrediente o formulación particular, no requiere revalidación; sin embargo, el usuario debe verificar y documentar sus adecuaciones bajo las condiciones reales de trabajo.

## Revalidación

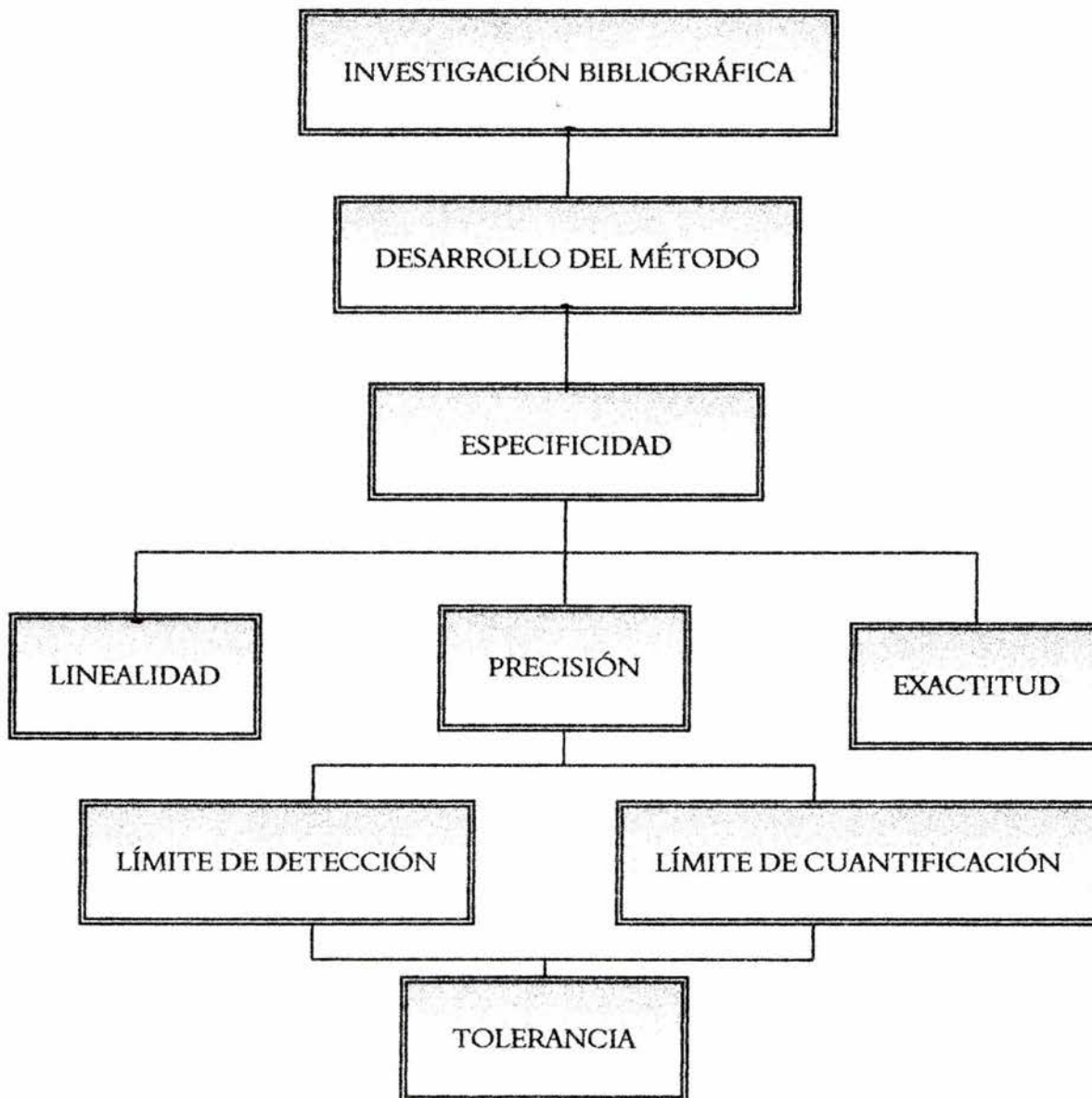
Cuando ya se encuentran establecidos, los ensayos generales son usados en un producto nuevo, ensayo nuevo durante el proceso, producto intermedio nuevo, o una materia prima nueva, el ensayo requiere validación.

La revalidación puede ser requerida cuando un método es transferido de la investigación a un laboratorio químico, a menos que, métodos analíticos de soporte hayan participado en la transferencia de los métodos y determinación de la resistencia o tolerancia del ensayo.

Un método analítico debe ser revalidado cuando la formulación del producto terminado es cambiada de manera importante. La revalidación puede ser requerida también cuando hay cambios en el método analítico o cuando se cambia el proceso de síntesis del activo y el perfil de impurezas pudo haber cambiado.

## 1.9 ESTRATEGIAS PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

El proceso de validación de un método analítico puede ser esquematizado de la siguiente manera:



Los elementos que se deben tomar en cuenta para realizar una validación son los siguientes:

- ▶ Recursos humanos
- ▶ Calificación de personal
- ▶ Instalaciones
- ▶ Equipos
- ▶ Servicios
- ▶ Calibración
- ▶ Documentación
- ▶ Métodos analíticos

La Validación también toma en cuenta:

- ▶ Características del producto.
- ▶ La capacidad del diseño del equipo y su limitación
- ▶ La capacidad de todo el proceso y sus limitaciones incluyendo consideraciones ambientales.
- ▶ Especificaciones del producto, límites o criterios para los distintos parámetros.
- ▶ Los sistemas de aseguramiento de calidad necesarios para monitorear el desempeño.
- ▶ Verificar que los sistemas, servicios, personal, equipos e instalaciones estén validados.

Los pasos a seguir para realizar la validación son los siguientes:

- ▶ Establecer las especificaciones de materias primas, materiales, graneles y producto terminado.
- ▶ Establecer procedimientos que especifiquen qué sucedería de presentarse cambios significativos en los parámetros de evaluación previamente establecidos.
- ▶ Definir el alcance del personal involucrado en el proceso de validación.



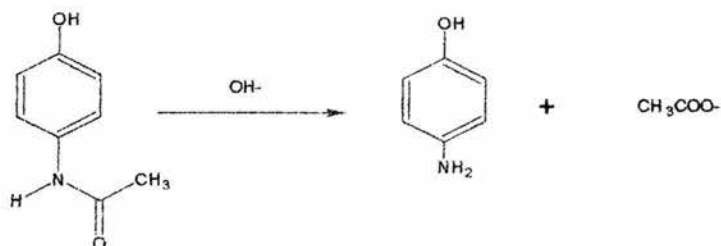
## Consideraciones generales

- ▶ La selección de un método analítico es el primer paso para establecer una metodología analítica.
- ▶ El químico debe conocer perfectamente lo que se pretende medir o cuantificar y conocer la precisión y exactitud requeridas, sin perder de vista el aspecto económico y la disponibilidad de recursos en la aplicación del método seleccionado.
- ▶ Definir por qué se eligieron ciertas condiciones analíticas es parte del desarrollo del método.
- ▶ La validación del método desarrollado implica demostrar a través de estudios de laboratorio que las características especificadas para el método cumplen los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas.
- ▶ Antes de iniciar la validación propiamente dicha del método, es importante demostrar su especificidad para evitar, en lo posible, dar marcha atrás cuando se ha avanzado en la validación del método.
- ▶ Si el método no es específico, es necesario regresar al punto de partida, es decir, al desarrollo del mismo y tratar de modificar el método en la medida de lo posible para eliminar o separar las interferencias que lo hacen inespecífico.

## CAPÍTULO II DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 FUNDAMENTO DEL MÉTODO DESARROLLADO PARA CUANTIFICAR ACETAMINOFÉN

La reacción de hidrólisis que se lleva a cabo en la molécula de acetaminofén en medio básico es la siguiente:



En donde, el producto de hidrólisis es el p-aminofenol. Por lo tanto, se realiza una determinación indirecta del acetaminofén, evaluando la absorbividad del hidrolizado.

Los criterios de aceptación o rechazo de los parámetros analíticos evaluados se han establecido considerando las recomendaciones propuestas en la Guía Oficial de Validación de Métodos Analíticos editado por la Secretaria de Salud y el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

#### Material:

- ▶ Matraces volumétricos de 10 mL
- ▶ Navecillas para pesar
- ▶ Vasos de precipitado de 100 mL
- ▶ Pipetas volumétricas de 1 mL
- ▶ Espátula Cromo-Níquel

- ▶ Micro pipeta Wilson Auto-ajustable de 200  $\mu\text{L}$
- ▶ Micro pipeta HTL de 100  $\mu\text{L}$

#### Equipo:

- ▶ Balanza analítica Sartorius BP 210S, Máx 210 g , d = 0.1 mg
- ▶ Espectrofotómetro UV/VIS Spectronic 21 Milton Roy Company
- ▶ Celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico

#### Reactivos:

- ▶ Etanol RA
- ▶ Sustancia de referencia de acetaminofén
- ▶ Acetaminofén cristalino
- ▶ Avicel
- ▶ Kollidón VA 64
- ▶ Kollidón CL
- ▶ Estearato de magnesio
- ▶ Aerosil 2000

### DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para determinar la longitud de onda de máxima absorción del acetaminofén, se realizó un barrido espectrofotométrico de una disolución estándar preparada en concentraciones de 3, 6 y 9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

A las disoluciones preparadas se les determina la absorbancia utilizando un espectrofotómetro Spectronic 21 y celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico, utilizando como blanco y disolvente etanol RA en un intervalo de longitud de onda de 230 a 260 nm

La longitud de onda de máxima absorción del acetaminofén obtenida experimentalmente en disolución etanólica es 244 nm.



La disolución que corresponde a la concentración de 6  $\mu\text{g/mL}$  se considera el 100%

Parámetros de validación del sistema:

- ▶ Linealidad
- ▶ Precisión

En la evaluación del sistema se trabajó con sustancias de referencia.

**Preparación de la disolución de acetaminofén en concentración de 6  $\mu\text{g/mL}$**

Pesar exactamente alrededor de 60 mg de acetaminofén sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar etanol RA, agitar hasta completa disolución, llevar al aforo y homogeneizar. De la disolución anterior tomar una alícuota de 1 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con etanol RA y homogeneizar. Tomar una alícuota de 0.1 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con etanol RA y homogeneizar.

**Preparación de la disolución problema en concentración de 6  $\mu\text{g/mL}$**

Pesar 20 tabletas por separado y obtener el peso promedio, colocar en un mortero y triturar hasta obtener polvo fino, pesar con exactitud el equivalente a 60 mg de acetaminofén transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar etanol RA, agitar hasta completa disolución, llevar al aforo y homogeneizar, de la disolución anterior tomar una alícuota de 1 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con etanol RA, homogeneizar. Tomar una alícuota de 0.1 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con etanol RA y homogeneizar.

## 2.2 ESPECIFICIDAD

Se realizó un barrido espectrofotométrico en un intervalo de longitud de onda entre 240 a 270 nm de las siguientes disoluciones:

Acetaminofén, sustancia de referencia.

Muestra (Por duplicado)

Placebo

Las concentraciones de cada una de las disoluciones corresponden al 100% del método, es decir, 6 µg/mL

Utilizar un espectrofotómetro Spectronic 21 y celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico, utilizando como blanco y disolvente etanol RA para determinar las abosobancias.

► Criterio de aceptación: La respuesta obtenida es consecuencia únicamente de la presencia del acetaminofén.

El espectro de absorción de la muestra debe corresponder en máximos y mínimos con la de la sustancia de referencia.

## 2.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para determinar éste parámetro, se preparó por triplicado 5 niveles de concentración de la disolución de referencia por pesada independiente correspondientes a las concentraciones de: 3.6, 4.8, 6.0, 7.2, 8.4 µg/mL. La concentración de 6.0 µg/mL corresponde a la del 100% de la muestra. Se mide la absorbancia bajo las mismas condiciones de trabajo, utilizando un espectrofotómetro Spectronic 21 y celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico, usar como blanco y disolvente etanol RA

Determinar:

Relación de la concentración vs. absorbancia, para ello, trazar la gráfica de concentración (x) vs. absorción (y), incluir en ella la ecuación, la línea de ajuste y el coeficiente de determinación.

- a) El valor de la pendiente ( $b_1$ ).
  - b) La ordenada al origen ( $b_0$ ).
  - c) Coeficiente de determinación ( $r^2$ )
  - d) Intervalo de confianza para la pendiente [ $IC(\beta_1)$ ].
- ▶ Criterio de aceptación:  $r^2 \geq 0.980$ , el intervalo de confianza para la pendiente  $IC(\beta_1)$  no debe incluir al cero

## 2.4 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD)

La precisión del Sistema se llevó a cabo, preparando por sextuplicado disoluciones de acetaminofén que representan el 100% de la muestra (6  $\mu\text{g/mL}$ ); preparadas por pesadas independientes. Posteriormente se mide la absorbancia de cada una de las disoluciones a una longitud de onda de 244 nm, utilizando un espectrofotómetro Spectronic 21 y celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico, como blanco y disolvente etanol RA

Determinar:

- a) Desviación estándar (S)
- b) Coeficiente de variación de la respuesta analítica (CV)

- ▶ Criterio de aceptación:  $CV \leq 1.5\%$

Parámetros de validación del método:

- ▶ Linealidad
- ▶ Exactitud
- ▶ Repetibilidad



- ▶ Reproducibilidad
- ▶ Estabilidad

Para evaluar al método se trabaja con los excipientes y sustancias de referencia, en la reproducibilidad (actualmente llamada precisión intermedia) se prueba el método con producto terminado.

## 2.5 LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad del método se determinó analizando placebos cargados, en un intervalo de concentraciones correspondientes al 80, 100 y 120% de acetaminofén en la muestra.

Se prepara cada concentración por triplicado, manteniendo constante la cantidad de placebo en los tres niveles. Se miden la absorbancia de cada una de las disoluciones a una longitud de onda de 244 nm, utilizando un espectrofotómetro Spectronic 21 y celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico, usar como blanco y disolvente etanol RA Utilizar como referencia los resultados de acetaminofén, determinar la cantidad recuperada del analito.

Determinar:

Cantidad adicionada vs. cantidad recuperada:

- a) Valor de la pendiente ( $b_1$ ).
- b) La ordenada al origen ( $b_0$ ).
- c) Coeficiente de determinación ( $r^2$ )
- d) Intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(\beta_1)$ ).
- e) Intervalo de confianza para la ordenada al origen ( $IC(\beta_0)$ ).
- f) Coeficiente de variación de regresión ( $CV_{y/x}$ )
- g) Porcentaje de recobro de cada placebo o muestra adicionada (%)
- h) Promedio aritmético ( $\bar{y}$ )
- i) Desviación estándar (S)
- j) Coeficiente de variación (CV)

k) Intervalo de confianza para la media del porcentaje de recobro ( $IC(\mu)$ ).

- ▶ Criterio de aceptación: *Cantidad adicionada vs cantidad recuperada*  $r^2 \geq 0.9800$ , el intervalo de confianza para la pendiente  $IC(\beta_1)$  debe incluir a la unidad, el intervalo de confianza para la ordenada al origen  $IC(\beta_0)$  debe incluir al cero, el  $CV_{y/x}$  no mayor del 3.00%, *Porcentaje de recobro*  $CV \leq 3\%$ , debe incluir el 100% ó, que el promedio aritmético del por ciento de recobro esté incluido en el intervalo: 97-103%

## 2.6 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

Para efectuar la exactitud y repetibilidad del método al 100% se preparó por sextuplicado placebos adicionados con acetaminofén (sustancia de referencia) en una cantidad que corresponda al 100%. Las disoluciones se preparan por pesada independiente y se realizan las diluciones correspondientes para obtener una concentración final de 6  $\mu\text{g/mL}$ . Se mide la absorbancia de cada una de las disoluciones a una longitud de onda de 244 nm, utilizando un espectrofotómetro Spectronic 21 y celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico, usar como blanco y disolvente etanol RA

Utilizando como referencia los resultados de acetaminofén, determinar la cantidad recuperada del analito.

Determinar:

- a) Media aritmética ( $\bar{y}$ )
  - b) Desviación estándar (S)
  - c) Coeficiente de variación (CV)
  - d) Intervalo de confianza para la media poblacional ( $IC(\mu)$ ).
- ▶ Criterio de aceptación:  $CV \leq 3\%$ , El  $IC(\mu)$  debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro esté incluido en el intervalo: 97-103%.

## 2.7 REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del método se llevó a cabo mediante el trabajo de dos analistas, determinando por triplicado y en dos días diferentes placebos cargados de acetaminofén a una concentración del 100%, es decir, 6  $\mu\text{g/mL}$ . Las condiciones de trabajo son las mismas, o muy similares, y se utilizó el mismo material y equipo.

Determinar:

- a) Media aritmética ( $\bar{y}$ )
- b) Desviación estándar (S)
- c) Coeficiente de variación (CV)
- d) Porcentaje de recobro (%)

► Criterio de aceptación:  $CV \leq 3\%$

## 2.8 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Para determinar la estabilidad analítica del acetaminofén, se almacenan tres muestras preparadas a una concentración del 100% a diferentes condiciones ambientales, el *Cuadro No. 1* muestra las condiciones de temperatura y tiempo.

Estabilidad analítica de la muestra: “Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas”. Guía de Validación de Métodos Analíticos.



<i>Condiciones de almacenaje</i>	<i>Análisis</i>
Temperatura ambiente; Oscuridad	2, 24 y 36 horas
Temperatura ambiente; Luz blanca	2, 24 y 36 horas
Refrigeración	2, 24 y 36 horas

Cuadro No.1 Estabilidad analítica de la muestra

Al término de cada una de las condiciones de almacenaje, se mide la absorbancia de cada una de las disoluciones a una longitud de onda de 244 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y etanol RA como blanco.

Determinar:

- Media aritmética del análisis inicial ( $\bar{y}_0$ )
- Media aritmética del análisis en cada condición de almacenaje ( $\bar{y}_1$ )
- Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial  $|d_i|$

▶ Criterio de aceptación:  $|d_1| \leq 3\%$ ,  $|d_2| \leq 3\%$ ,  $|d_3| \leq 3\%$

## 2.9 DETERMINACIÓN DE ACETAMINOFÉN EN PRODUCTOS COMERCIALES

Finalmente, cuando el método analítico que se ha propuesto ha sido validado, y sus parámetros han sido aceptados, se aplica a la cuantificación de acetaminofén en diversos productos comerciales, considerando que, aunque no conocemos a los excipientes ni su concentración, la respuesta del espectrofotómetro a la longitud de onda de 244 nm será nula, así, la absorbancia obtenida será directamente proporcional a la concentración de acetaminofén.

- PRODUCTO I: (Tabletas de 500 mg)  
PRODUCTO II: (Tabletas de 250 mg)  
PRODUCTO III: (Tabletas de 750 mg)  
PRODUCTO IV: (Tabletas de 750 mg)

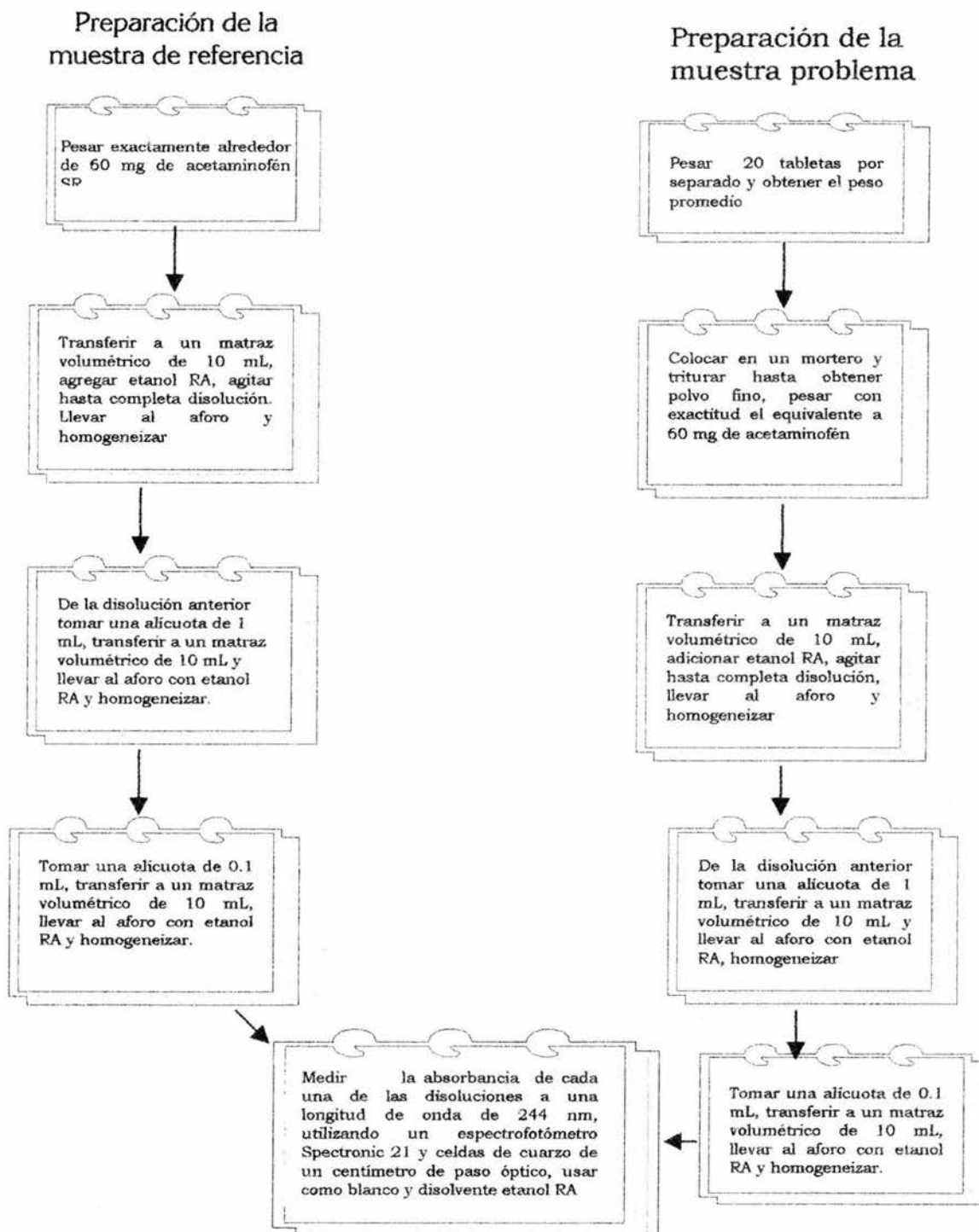
#### Preparación de la Muestra Problema:

Pesar 20 tabletas individualmente, obtener el peso promedio, colocar en un mortero de porcelana y triturar hasta polvo fino, pesar el equivalente a 60 mg de acetaminofén, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar un poco de etanol RA y agitar hasta completa disolución, aforar a la marca con etanol RA. De la disolución anterior tomar una alícuota de 1 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con etanol RA, homogeneizar. Tomar una alícuota de 0.1 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con etanol RA y homogeneizar. Se mide la absorbancia de cada una de las disoluciones a una longitud de onda de 244 nm, utilizando un espectrofotómetro Spectronic 21 y celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico, usar como blanco y disolvente etanol RA.

#### Preparación de la Muestra de Referencia

Pesar 60 mg de acetaminofén sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar etanol RA, agitar hasta completa disolución, llevar al aforo, homogeneizar. De la disolución anterior tomar una alícuota de 1 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con etanol RA, homogeneizar. Tomar una alícuota de 0.1 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar al aforo con etanol RA y homogeneizar. Medir la absorbancia de cada una de las disoluciones a una longitud de onda de 244 nm, utilizando un espectrofotómetro Spectronic 21 y celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico, usar como blanco y disolvente etanol RA.

## Diagrama de flujo del método analítico para determinar acetaminofén en tabletas





Determinar:

a) Porcentaje de recobro (%)

- ▶ La FEUM, en su 7<sup>a</sup> edición, menciona que el contenido de acetaminofén en el producto debe estar dentro del intervalo del 95-105%

### CAPÍTULO III RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### Barrido Espectrofotométrico de la sustancia de referencia.

La Fig. No.3.1 muestra la longitud de onda máxima que presenta el acetaminofén experimentalmente. Las diferentes curvas corresponden a concentraciones de 3, 6 y 9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de acetaminofén, sustancia de referencia.

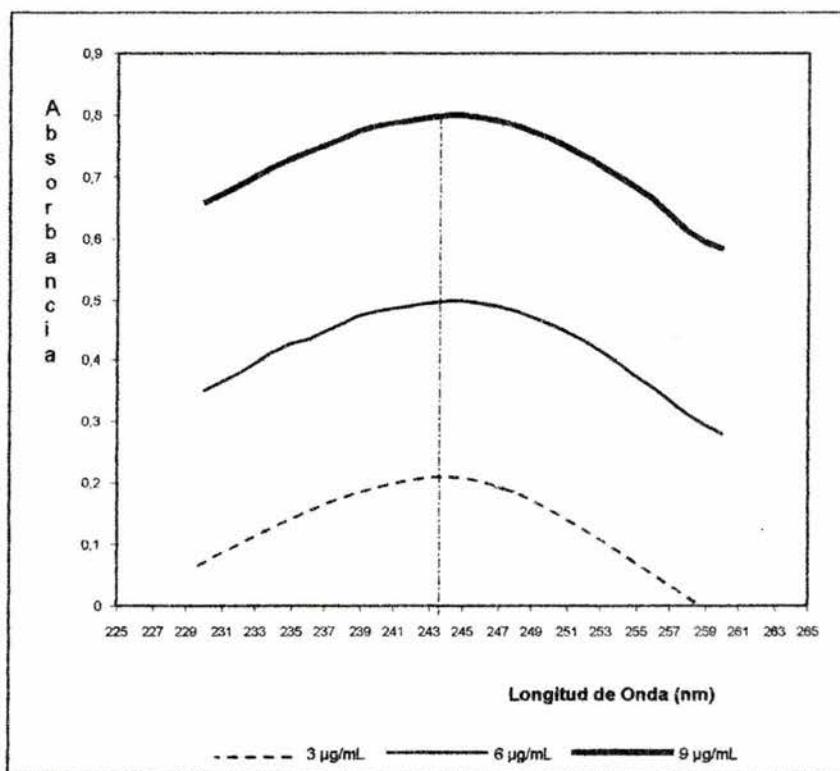


Fig. No. 3.1 Barrido espectrofotométrico de la disolución de acetaminofén S.R.

Se puede observar que se presenta un máximo de absorción, a una longitud de onda de 244nm en las tres curvas. La disolución de concentración de 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se tomó como referencia al 100% del estudio.

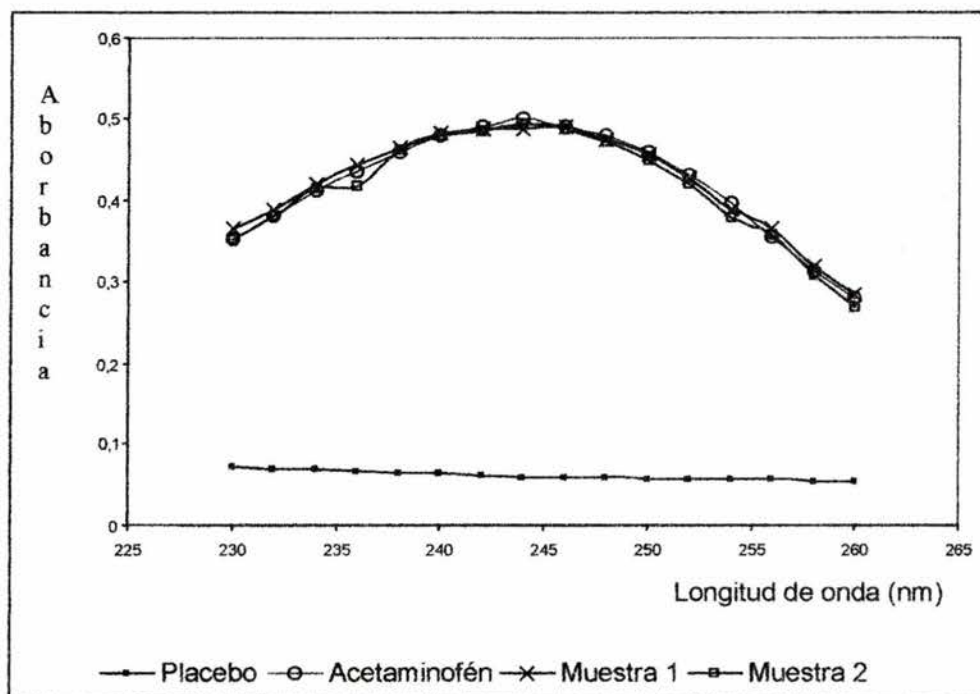
### 3.1 ESPECIFICIDAD

En la *Tabla No. 3.1* se presentan los resultados de la evaluación de la Especificidad del Sistema.

Muestra	Réplica	Absorbancia determinada a $\lambda = 244 \text{ nm}$
Placebo	1	0.061
Muestra	1	0.494
Muestra	2	0.498
Acetaminofén S. R.	1	0.501

**Tabla No. 3.1 Resultados de la especificidad del sistema**

En la *Fig. No. 3.2* se presentan los espectros de absorción obtenidos del placebo, la muestra problema por duplicado y de la sustancia de referencia, para evaluar la especificidad del Sistema.



**Fig. No. 3.2 Especificidad del sistema, Absorbancia vs Longitud de onda.**



Analizando los resultados de la Tabla No. 3.1 y la gráfica de los espectros de absorción Fig. 3.2, se deduce que el método analítico propuesto para la determinación de acetaminofén es específico, ya que cumple con los siguientes criterios de aceptación:

- ▶ El placebo, que contiene todos los componentes del producto, excepto al acetaminofén, presenta una absorbancia despreciable, lo que indica que, los excipientes de la formulación no interfieren en la respuesta del acetaminofén al aplicar el método analítico propuesto.
- ▶ Los espectros de absorción obtenidos al aplicar el método analítico propuesto a las disoluciones de acetaminofén y muestras, son muy semejantes, presentando una longitud de máxima absorción a 244 nm.

Por lo tanto, el método analítico propuesto es específico, ya que, la respuesta que se obtiene es debida únicamente a la presencia de acetaminofén en la muestra.

## RESULTADOS DEL SISTEMA

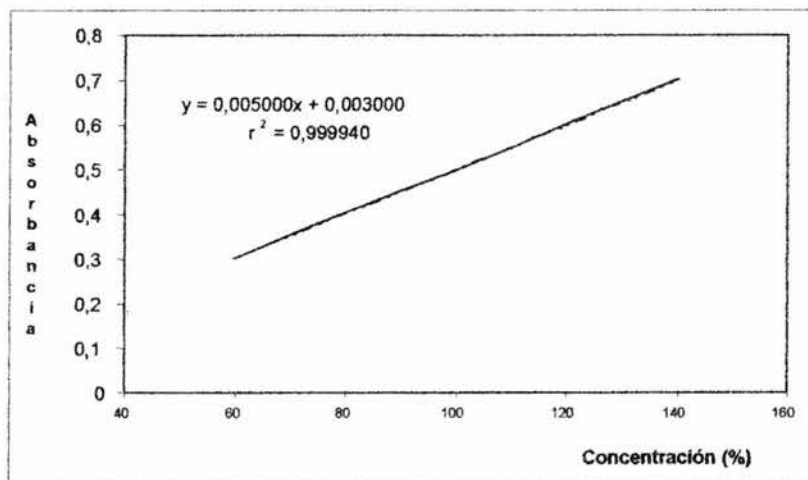
## 3.2 LINEALIDAD

En la *Tabla No. 3.2* se presentan los resultados de la evaluación de la linealidad del sistema.

Concentración		Absorbancia determinada a $\lambda = 244 \text{ nm}$	Promedio de absorbancia
%	$\mu\text{g/mL}$		
60	3.6	0.302	0.303
60	3.6	0.304	
60	3.6	0.303	
80	4.8	0.402	0.403
80	4.8	0.403	
80	4.8	0.406	
100	6.0	0.502	0.502
100	6.0	0.502	
100	6.0	0.503	
120	7.2	0.606	0.605
120	7.2	0.605	
120	7.2	0.604	
140	8.4	0.701	0.702
140	8.4	0.704	
140	8.4	0.703	

**Tabla No. 3.2** Linealidad del sistema

En la *Fig. No. 3.3* se observa la relación de la concentración (%) en función de la respuesta analítica.



**Fig. No. 3.3** Linealidad del sistema

La *Tabla No. 3.3* muestra los resultados correspondientes a la evaluación de la linealidad e incluye los criterios de aceptación requeridos. Las fórmulas necesarias para el cálculo de cada uno de los parámetros se presentan en el *Anexo. A*, para el cálculo del intervalo de confianza de la pendiente,  $IC(\beta_1)$ , se estimó el valor de  $t_{0.975, n=15}$ . con el uso de la tabla del *Anexo B*.

Parámetros calculados experimentalmente	Criterios de aceptación
Pendiente ( $b_1$ ) = 0.0050	
Ordenada al origen ( $b_0$ ) = 0.0008	
Coef. de determinación ( $r^2$ ) = 0.9999	$r^2 \geq 0.980$
Intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1) = 0.0047$ a $0.0053$	$IC(\beta_1)$ no debe incluir al cero

**Tabla No. 3.3** Parámetros calculados para evaluar la linealidad del sistema.

- ▶ Los resultados obtenidos muestran que el sistema de medición es lineal, ya que el coeficiente de determinación es 0.9999 cumpliendo así, ampliamente con el criterio de aceptación requerido.

De igual manera, el intervalo de confianza para la pendiente al no incluir al cero, cumple con el criterio de aceptación requerido.



### 3.3 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD)

La Precisión del sistema se llevó a cabo realizando por sextuplicado muestras de disolución estándar, a una concentración de 6.0  $\mu\text{g/mL}$ , correspondiente al 100% del análisis.

La *Tabla No. 3.4* contiene los resultados que se obtuvieron al evaluar la precisión del sistema, los valores de la desviación estándar (S) y del coeficiente de variación (CV) calculados a partir de los datos de la *Tabla 3.4*, se muestran en la *Tabla 3.5*; así mismo, se presentan los criterios de aceptación para éstos parámetros. En el *Anexo A* se describen las fórmulas necesarias para realizar los cálculos.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancias obtenidas a $\lambda = 244 \text{ nm}$	Cantidad Recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% De Recobro
6.0	0.502	5.988	99.8
6.0	0.508	6.060	101.0
6.0	0.508	6.060	101.0
6.0	0.511	6.096	101.6
6.0	0.506	6.036	100.6
6.0	0.508	6.060	101.0

**Tabla No. 3.4 Precisión del sistema**

Parámetros calculados experimentalmente	Criterios de aceptación
n = 6	
Media aritmética ( $\bar{y}$ ) = 101	
Desviación Estándar (S) = 0.6572	
Coefficiente de variación (CV) = 0.65%	CV $\leq$ 1.5%

**Tabla No. 3.5** Parámetros calculados para evaluar la precisión del sistema

- ▶ Los resultados muestran un coeficiente de variación mucho menor que el valor considerado en el criterio de aceptación, así  $0.65\% < 1.5\%$ , por lo que se comprueba que el método analítico propuesto es repetible.

## RESULTADOS DEL MÉTODO

## 3.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO

La *Tabla No. 3.6*, contiene los resultados obtenidos al aplicar el método analítico propuesto a una serie de disoluciones correspondientes al 80, 100 y 120% de acetaminofén en la muestra. La cantidad recuperada y el porcentaje (%) de recobro se calculó utilizando los resultados de la disolución de referencia de acetaminofén.

n	Concentración		Absorbancia determinada a $\lambda = 244 \text{ nm}$	Cantidad recuperada ( $\mu\text{g/ml}$ )	% de Recobro
	%	( $\mu\text{g/ml}$ )			
1	80	4.80	0.407	4.84	101.0
2	80	4.80	0.408	4.85	101.2
3	80	4.80	0.400	4.77	99.5
4	100	6.00	0.506	6.00	100.6
5	100	6.00	0.507	6.04	100.8
6	100	6.00	0.506	6.03	100.6
7	120	7.20	0.607	7.24	100.7
8	120	7.20	0.609	7.27	101.0
9	120	7.20	0.604	7.21	100.1

Tabla No. 3.6 Linealidad del método

Los resultados de la tabla anterior son procesados para obtener los valores que determinan la linealidad del método analítico propuesto, y se presentan en la *Tabla No. 3.7*, se muestran además los criterios de aceptación, para determinar si los resultados experimentales cumplen o no con las especificaciones. Las fórmulas necesarias para su cálculo se describen en el *Anexo A*. Para el cálculo del intervalo de confianza de la pendiente  $IC(\beta_1)$ , y de la ordenada al origen  $IC(\beta_0)$ , el valor de  $t_{0.975, n=9}$  se determinó usando la tabla del *Anexo B*



Parámetros calculados experimentalmente	Criterios de aceptación
<i>Cantidad adicionada vs cantidad recuperada</i>	
Pendiente ( $b_1$ ) = 1.0083	
Ordenada al origen ( $b_0$ ) = -0.0188	
Coef. de determinación ( $r^2$ ) = 0.9993	$r^2 \geq 0.9800$
Intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1) = 1.0083 \pm 0.2293$ Límite superior: 1.2376 Límite inferior: 0.7789	$IC(\beta_1)$ debe incluir a la unidad
Intervalo de confianza para la ordenada al origen $IC(\beta_0) = -0.1583 \pm 0.1394$ Límite superior: 0.1205 Límite inferior: -0.1583	$IC(\beta_0)$ debe incluir al cero
Coefficiente de Variación ( $CV_{y/x}$ ) = 0.47%	$CV_{y/x}$ no mayor del 3.00%

Tabla No. 3.7 Parámetros calculados para evaluar la linealidad del método.

En la Fig. No. 3.4, se observa la recta obtenida al graficar los datos de la concentración inicial en función de la absorbancia, se incluye además la ecuación que representa a la gráfica y el coeficiente de correlación.

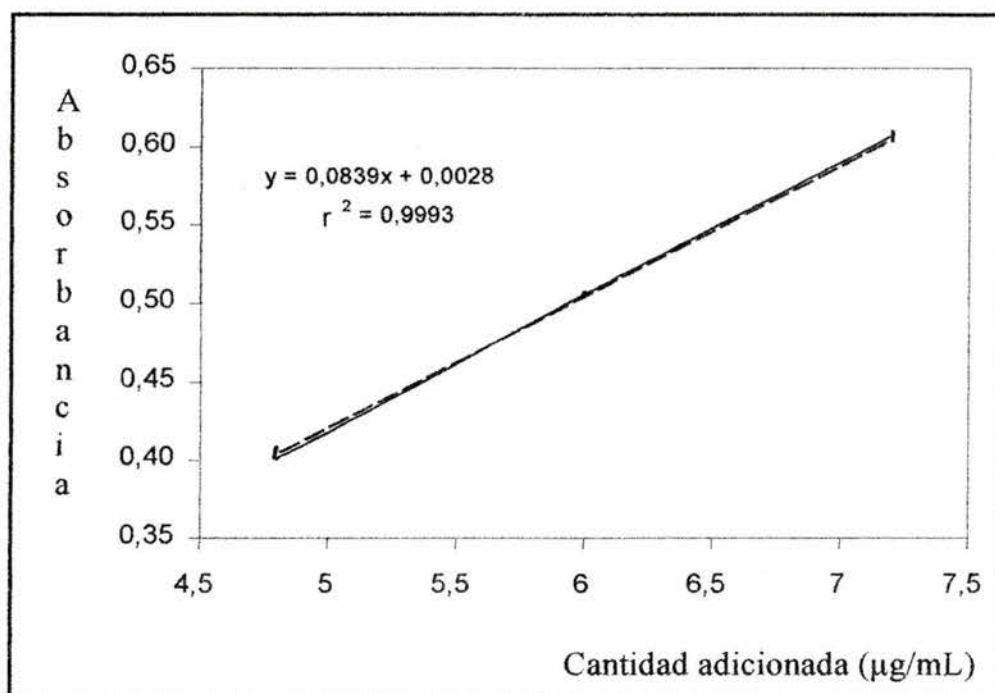


Fig. 3.4 Linealidad del método

Los resultados relacionados al porcentaje de recobro se integran en la *Tabla No.3.8*, las fórmulas necesarias para su cálculo se describen en el *Anexo A*. Para el cálculo del Intervalo de confianza de la media poblacional,  $IC(\mu)$ , el valor de  $t_{0,975, n=9}$ , se determinó utilizando la tabla contenida en el *Anexo B*.

Parámetros calculados experimentalmente <i>Porcentaje de recobro</i>	Criterios de aceptación
Promedio aritmético del % de recobro ( $\bar{y}$ ) = 100.61	
Desviación estándar (S) = 0.51912	
Coficiente de Variación (CV) = 0.52%	CV $\leq$ 3%
Intervalo de confianza para la media poblacional  IC( $\mu$ ) = 100.21 $\pm$ 0.399  Límite superior: 101.0112 Límite inferior: 100.2132	IC( $\mu$ ) debe incluir al 100% ó, que el promedio aritmético del % de recobro esté incluido en el intervalo: 97-103%

Tabla No. 3.8 Parámetros calculados para evaluar la linealidad del método.

Por los resultados obtenidos, se deduce que el método analítico sugerido es lineal.

- Ordenada al origen ( $b_0$ ): El intervalo de confianza incluye al cero, cumpliendo así, con el requisito de proporcionalidad señalado en la Ley de Lambert-Beer. La proporcionalidad se determina aplicando la prueba estadística de "t de student", considerando:

$$H_0 : b_0 = 0$$

$$H_A : b_0 \neq 0$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\text{Criterio de aceptación: } |t_{(\text{calculada})}| < |t_{(0.975, n=9)}|$$



El intervalo de confianza incluye al cero,  $H_0$  no se rechaza, y se considera que el valor de la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero. Además,  $|t_{(calculada)}| = 1.940$ , es menor que el valor de “t” tabulada  $|t_{(0.975, n=9)}| = 2.365$

- ▶ Coeficiente de determinación  $r^2=0.9993$  cumple con el criterio de aceptación que establece que, para considerar que se sigue una trayectoria lineal el valor de  $r^2$  debe ser mayor o igual 0.98.
- ▶ Coeficiente de variación de la regresión ( $CV_{y/x}$ ): El criterio de aceptación, indica que para un método espectrofotométrico, el valor del coeficiente de variación no deberá ser mayor al 3%, y experimentalmente se obtuvo 0.47%, por lo tanto cumple con la especificación.
- ▶ Porcentaje de recobro ( $\mu$ ): Experimentalmente se obtuvo que el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro es de 100.21% a 100.01%, intervalo que incluye al promedio aritmético y al 100%, cumpliendo así con los criterios de aceptación.
- ▶ Coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro: Experimentalmente se obtuvo un coeficiente de variación de 0.51%, el valor se encuentra muy por debajo de lo que marca el criterio de aceptación, que es de 3% para métodos espectrofotométricos.

Todos los parámetros cumplen con los criterios de aceptación.

### 3.5 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

Las absorbancias obtenidas de seis muestras, preparadas a una concentración del 100% se muestran en la *Tabla No. 3.9*, se incluyen los valores del porcentaje (%) de recobro y la cantidad recuperada.

n	Cantidad adicionada de acetaminofén (µg/mL)	Absorbancia determinada a $\lambda = 244 \text{ nm}$	Cantidad recuperada (µg/mL)	% de Recobro
1	6.00	0.498	5.97	99.5
2	6.10	0.500	5.99	98.2
3	6.00	0.499	6.01	100.2
4	6.08	0.509	6.06	99.8
5	6.01	0.503	6.02	100.2
6	6.00	0.499	5.98	99.8

**Tabla No. 3.9. Exactitud y repetibilidad al 100%**

Al procesar los datos de la *Tabla No. 3.9*, se obtienen los valores de la media, desviación estándar, coeficiente de variación y el intervalo de la media poblacional. La *Tabla No. 3.10* contiene los resultados antes mencionados y además, los criterios de aceptación.

Parámetros calculados experimentalmente	Criterios de aceptación
$\bar{y} = 99.61$	$\bar{y} = 97 - 103\%$
Desviación estándar ( s ) = 1.7740	
Coefficiente de Variación (CV) = 1.77%	CV ≤ 3%
Intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu) = 99.61 \pm 0.724$ Límite superior: 100.460 Límite inferior: 99.015	El IC( $\mu$ ) debe incluir al 100% ó, que el promedio aritmético del porcentaje de recobro incluya el intervalo : 97-103%

Tabla No. 3.10 Parámetros calculados para evaluar la repetibilidad

Al aplicar la prueba estadística “t” de student, se considera:

$$H_0 : \bar{y} = 100$$

$$H_A : \bar{y} \neq 100$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\text{Criterio de aceptación: } |t_{(\text{calculada})}| < |t_{(0.750, n=6)}|$$

$$t_{(\text{calculada})} = 0.05913$$

$$t_{(0.750, n=6)} = 2.571$$

- ▶ El valor  $|t_{(\text{calculada})}|$  es menor que  $|t_{(0.750, n=6)}|$ , por lo tanto, la hipótesis nula no se rechaza, indicando así, que la media no es significativamente diferente del 100%.
- ▶ El intervalo de confianza para la media poblacional  $IC(\mu)$ , incluye al 100%, además el valor de  $\bar{y}$  es igual a 99.61%, que está dentro del intervalo de 97-103%.
- ▶ El coeficiente de variación no excede el 3%. Por lo tanto, resulta evidente que el método analítico propuesto es exacto y repetible.



### 3.6 REPRODUCIBILIDAD

El ensayo se realizó por triplicado en dos días diferentes y llevado a cabo por dos analistas. Cada una de las muestras a analizar contenía el equivalente al 100% de acetaminofén. Las absorbancias fueron determinadas bajo las mismas condiciones de trabajo.

Los resultados obtenidos se registran en la *Tabla No.3.11*.

Día / Analista	1			2		
	Conc. (µg/mL)	Absorbancia $\lambda= 244$ nm	% de Recobro	Conc. (µg/mL)	Absorbancia $\lambda= 244$ nm	% de Recobro
1	6.09	0.505	99.34	5.99	0.502	100.56
	6.13	0.504	98.65	6.01	0.505	100.82
	6.05	0.501	99.36	6.06	0.508	100.59
2	5.97	0.507	101.90	5.96	0.501	100.36
	6.00	0.509	101.79	5.99	0.504	100.96
	5.98	0.507	101.73	6.00	0.508	101.59

**Tabla No. 3.11 Resultados de la reproducibilidad**

En la *Tabla No. 3.12* se presentan los resultados correspondientes a la evaluación de la reproducibilidad e incluye los criterios de aceptación requeridos. Las fórmulas necesarias para su cálculo se presentan en el *Anexo. A*.

Parámetros calculados experimentalmente	Criterios de aceptación
Media Aritmética ( $\bar{y}$ ) = 100.63	
Desviación estándar (S) = 1.066	
Coefficiente de Variación (CV) = 1.059%	

**Tabla No. 3.12 Evaluación de la reproducibilidad**

► El coeficiente de variación obtenido experimentalmente es menor al 3%, que es el valor máximo que se puede obtener al utilizar un método espectrofotométrico, por lo tanto, el método es reproducible.

Además, realizamos la prueba F, para determinar si hay diferencias significativas entre los analistas. En la *Tabla No. 3.14* se presentan los resultados del porcentaje de recobro y en la *Tabla No. 3.15* los resultados del análisis de varianza.

% DE RECOBRO		
Día (k)	Analista 1 (i)	Analista 2(j)
1	99.34	101.90
	98.65	101.79
	99.36	101.73
2	100.56	100.36
	100.82	100.96
	100.59	100.59

**Tabla No.3.14 Resultados de estabilidad (absorbancias)**

Fuente de Variación (FV)	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados (sc)	Media de cuadrados (mc)	F (Calculado)	F (tablas) (0.05, GL num/GL den)
Analista (Ai)	1	0.99	1.99	2.42	7.15
Día (Di)	1	0.33	1.33	1.62	3.13
Interacción Analista-Día (Ai-Di)	1	0.82	0.52	0.15	2.05
Error experimental (E)	8	5.36	0.89	-----	-----

**Tabla No.3.15 Resultados del análisis de varianza**

- El análisis de varianza indica que;  $F_{A(Cal)} \leq F_{A(Tab)}$  ;  $F_{D(Cal)} \leq F_{D(Tab)}$  ;  $F_{AD(Cal)} \leq F_{AD(Tab)}$  , se deduce que no hay diferencias significativas entre los analistas, por lo que el método es reproducible.

### 3.7 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

Se realizó esta prueba con el objetivo de evidenciar cómo varía la concentración de acetaminofén en la muestra al verse influenciada por diversos factores ambientales, como: luz, temperatura y tiempo de almacenamiento. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la *Tabla No. 3.16*; los resultados se registran en absorbancias, posteriormente se hicieron los cálculos necesarios para transformarlos en porcentaje (%) de recobro y se muestran en la *Tabla No. 3.17*.

Muestra	Tiempo de almacenamiento (horas)			
	0	2	24	36
	Absorbancias			
Temp.Amb(25°C), oscuridad	0.514	0.514	0.516	0.515
Temp.Amb(25°C), luz blanca	0.511	0.513	0.514	0.514
Refrigeración (- 3°C)	0.509	0.507	0.501	0.510

**Tabla No.3.16 Resultados de estabilidad (absorbancias)**



Muestra	Tiempo de almacenamiento (Horas)			
	0	2	24	36
	Porcentaje de recobro			
Temp. Amb(25°C), oscuridad	102.79	102.79	103.19	102.99
Temp. Amb(25°C), luz blanca	102.19	102.59	102.79	102.79
Refrigeración (- 3°C)	102.79	101.39	100.21	101.99

Tabla No.3.17 Resultados de estabilidad (% de recobro)

La *Tabla No. 3.18* muestra los resultados de las medias aritméticas en cada condición de almacenaje, además, las diferencias de las medias aritméticas y los criterios de aceptación para facilitar su posterior análisis.

Parámetros calculados experimentalmente	Criterios de aceptación
$\bar{y}_0 = 102.59$	
$\bar{y}_1 = 102.25$	
$\bar{y}_2 = 102.06$	
$\bar{y}_3 = 102.59$	
$ d_1  = 0.34$	$ d_1  \leq 3\%$
$ d_2  = 0.53$	$ d_2  \leq 3\%$
$ d_3  = 0.00$	$ d_3  \leq 3\%$

Tabla No. 3.18 Evaluación de la estabilidad analítica de la muestra

- Ningún valor de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial es mayor del 3%, por lo tanto, la concentración de acetaminofén en las muestras no sufre ningún cambio significativo en el tiempo y condiciones ambientales a las que fueron sometidas.

### 3.8 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE ACETAMINOFÉN EN PRODUCTOS COMERCIALES

Los resultados del contenido de acetaminofén, en cada uno de los medicamentos que se analizaron aplicando el método analítico propuesto y validado, se muestran en la *Tabla No. 3.19*.

Nombres de los Productos comerciales	Resultados			
	Muestra	Absorbancia $\lambda = 244 \text{ nm}$	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de Recobro
PRODUCTO I (Tabletas de 500mg)	1	0.517	6.16	102.78
	2	0.509	6.07	101.19
	3	0.516	6.15	102.58
PRODUCTO II (Tabletas de 250 mg)	1	0.518	6.17	102.98
	2	0.523	6.23	103.97
	3	0.523	6.23	103.97
PRODUCTO III (Tabletas de 750 mg)	1	0.511	6.09	101.59
	2	0.508	6.05	100.99
	3	0.513	6.11	101.98
PRODUCTO IV (Tabletas de 750 mg)	1	0.525	6.26	104.37
	2	0.520	6.20	103.37
	3	0.518	6.19	103.17

Tabla No. 3.19 Resultados de la aplicación del método analítico validado.

- De acuerdo a los resultados, el contenido de acetaminofén en cada una de las muestras excede el 100% de recobro. La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, indica que en la valoración de acetaminofén en tabletas, el contenido del principio activo debe estar incluido en el intervalo del 95- 105%.

Por lo que, el contenido de acetaminofén en cada uno de los medicamentos analizados, cumple con la especificación.

Los resultados obtenidos de la validación del método analítico para determinar acetaminofén en tabletas se integran en la *Tabla No. 3.20*

PARÁMETROS	RESULTADOS
Especificidad	Cumple con el criterio
Sistema	
Linealidad	$r^2 = 0.9999$ $IC(\beta_1) = 0.0047 - 0.0053$
Precisión	CV = 0.65%
Método	
Linealidad	$r^2 = 0.9993$ CV = 0.52% $CV_{y/x} = 0.47\%$
Repetibilidad y Exactitud al 100% (precisión intermedia)	CV = 1.77%
Reproducibilidad	CV = 1.059%
Estabilidad analítica de la muestra	Cumple con criterio

**Tabla No. 3.20** Resultados del estudio de validación



## CAPÍTULO IV CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la determinación de los diversos parámetros, se desprenden las siguientes conclusiones:

- ▶ **Especificidad:** El método analítico desarrollado es específico, ya que el placebo presenta una absorbancia despreciable si se compara con la respuesta obtenida del acetaminofén, lo que indica la nula interferencia de las sustancias presentes en la formulación.

Se observa además, que la respuesta de la disolución de referencia es igual o muy semejante a la respuesta obtenida de la disolución que contiene al placebo cargado con acetaminofén al 100%.

### **Para el Sistema:**

- ▶ **Linealidad:** Se comprobó la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del acetaminofén en un rango de 60 a 140%, es decir, se tomaron cinco puntos experimentales que dieron como resultado un coeficiente de variación de 0.9999, lo que indica la tendencia lineal del sistema.
- ▶ **Precisión:** El sistema para el método analítico propuesto es repetible, ya que se obtuvo un coeficiente de variación de 0.67%, demostrándose de esta manera, que los valores de varios ensayos analíticos que se realizaron sobre una muestra homogénea fueron muy semejantes entre sí.

### Para el Método:

- ▶ **Linealidad:** El método propuesto para valorar acetaminofén en tabletas es lineal, ya que se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.993, menor que el valor que marca el criterio de aceptación, utilizando concentraciones de 80, 100 y 120% de acetaminofén en las muestras. En el intervalo de confianza de la ordenada al origen se incluye al cero, cumpliendo así con el requisito de proporcionalidad establecido en la ley de Lambert-Beer. La prueba de proporcionalidad se determinó mediante la prueba estadística de "t" de student, cumpliendo satisfactoriamente con los requisitos.

En cuanto a los porcentajes de recobro, el intervalo de confianza incluye al promedio aritmético y al 100%, con un coeficiente de variación de 0.51%, por lo tanto, existe una relación directa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

- ▶ **Exactitud y repetibilidad al 100%:** Los resultados de las pruebas realizadas con placebo cargado al 100% demostraron que en la prueba estadística "t" de student, el valor de la media experimental no es significativamente diferente del 100%, por lo que se puede asegurar que el método tiene la capacidad de dar resultados lo más cercano posible al valor verdadero.

El método es exacto y repetible, ya que en las pruebas realizadas bajo las mismas condiciones, analizadas por un solo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos, y durante una sesión de trabajo, se obtiene un coeficiente de variación mucho menor al 3.0% requerido.

- ▶ **Reproducibilidad:** El método analítico es reproducible ya que, al medir la precisión de los ensayos realizados sobre una misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en dos días diferentes, el coeficiente de variación fue igual a 1.059%; el criterio de aceptación para métodos espectrofotométricos es de 3.0%, por lo tanto, se puede concluir que el método analítico es repetible.

Los resultados del análisis de varianza demuestran que no hay ninguna diferencia significativa en las determinaciones realizadas entre los analistas y que el hecho de realizarlas en diferentes días tampoco influye en los resultados.

- ▶ **Estabilidad:** El método es estable, ya que al término de cada una de las condiciones de almacenaje se midió la absorbancia de cada una de las muestras y en éstas no se observó ningún cambio significativo con respecto a la respuesta inicial.

De esta manera se comprobó que el método analítico desarrollado para la determinación de acetaminofén en tabletas, provee de un alto grado de seguridad, ya que es un método específico y los resultados se generan consistentemente.

Al determinar acetaminofén en diferentes productos comerciales aplicando el método desarrollado y validado, se comprobó que todos los productos se encuentran dentro de los límites de contenido que marca la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

El método analítico desarrollado es muy fácil de aplicar tanto en la industria como en los laboratorios de enseñanza, y proporciona gran confiabilidad en los resultados.



## ANEXO A

## FÓRMULAS PARA EL CÁLCULO DE:

## ▶ LINEALIDAD DEL SISTEMA

*Pendiente:*

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n= número de mediciones (concentración – respuesta analítica)

*Ordenada al origen:*

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

*Coefficiente de determinación:*

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

*Intervalo de confianza para la pendiente:*

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

$t_{0.975, n-2}$  = Referirse al Anexo B, para determinar el valor de la “t” de student.

## ▶ PRECISIÓN DEL SISTEMA

*Media aritmética:*

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

*Desviación estándar:*

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

*Coefficiente de variación:*

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

n = número de mediciones

## ▶ LINEALIDAD DEL MÉTODO

CANTIDAD ADICIONADA VS CANTIDAD RECUPERADA

*Pendiente:*

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

n = número de mediciones (concentración – respuesta analítica)

*Ordenada al origen:*

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

*Coefficiente de determinación:*

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

*Intervalo de confianza para la pendiente:*

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$S_{b_1} = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

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

$t_{0.975, n-2}$  = Referirse al Anexo B, para determinar el valor de la "t" de student.

*Intervalo de Confianza para la Ordenada al origen:*

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$$

$$S_{b_0} = \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$$

*Coefficiente de variación de regresión:*

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

PORCENTAJE DE RECOBRO

*Media aritmética:*

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

*Desviación estándar:*

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



*Coefficiente de variación:*

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

n = número de mediciones

*Intervalo de confianza para la media poblacional:*

$$IC (\mu) = y \pm t_{0.0975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$t_{0.0975, n-1}$  = Referirse al *Anexo B*, para determinar el valor de la "t" de student.

n = número de recobros

► EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

*Media aritmética*

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

*Desviación estándar:*

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

*Coefficiente de variación:*

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

n = número de mediciones

*Intervalo de confianza para la media poblacional:*

$$IC (\mu) = y \pm t_{0.0975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$t_{0.0975, n-1}$  = Referirse al *Anexo B*, para determinar el valor de la "t" de student.

n = número de recobros

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## ▶ REPRODUCIBILIDAD

*Media aritmética*

$$\check{y} = \frac{\sum y}{n}$$

*Desviación estándar:*

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

*Coefficiente de variación:*

$$CV = \frac{S}{\check{y}} * 100$$

n = número de mediciones

## ▶ ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA

*Media aritmética del Análisis inicial:*

$$\check{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$$

n<sub>0</sub> = número de muestras del análisis inicial.

*Media aritmética del Análisis de cada condición de almacenaje:*

$$\check{y}_1 = \frac{\sum y_1}{n_1}$$

n<sub>1</sub> = número de muestras del análisis de la i-ésima condición de almacenaje.

*Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética de análisis inicial.*

$$|d_i| = |\check{y}_1 - \check{y}_2|$$

**ANEXO B**

Para estimar el valor de la "t" de student en:

► LINEALIDAD DEL MÉTODO Y DEL SISTEMA

$$t_{cal} = \frac{(b - \beta)}{S_{y/x} \left[ \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}}$$

$$S_{y/x} = \left[ \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 2} \right]^{1/2}$$

► EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100%

$$t_{cal} = \frac{r - \mu}{\sigma_y}$$

$$\sigma_y = \frac{S}{(n)^{1/2}}$$



## TABLA ESTADÍSTICA DE LA DISTRIBUCIÓN “t” DE STUDENT

GRADOS DE LIBERTAD	T <sub>0.975</sub>	GRADOS DE LIBERTAD	T <sub>0.975</sub>	GRADOS DE LIBERTAD	T <sub>0.975</sub>
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993
25	2.060	50	2.009	75	1.992

Para determinar la reproducibilidad del método se realiza un análisis de varianzas. Los resultados obtenidos se registran de acuerdo a la siguiente tabla.

% DE RECOBRO		
DÍA (k)	ANALISTA No. 1 (i)	ANALISTA No. 2 (j)
1	Y <sub>111</sub>	Y <sub>211</sub>
	Y <sub>112</sub>	Y <sub>212</sub>
	Y <sub>113</sub>	Y <sub>213</sub>
2	Y <sub>121</sub>	Y <sub>221</sub>
	Y <sub>122</sub>	Y <sub>222</sub>
	Y <sub>123</sub>	Y <sub>223</sub>

Dónde:

“Y” Primer subíndice es el resultado de cada analista

“Y” Segundo subíndice es el día del análisis

“Y” Tercer subíndice es para indicar cada réplica realizada

Se realizan las siguientes operaciones para elaborar la tabla del análisis de varianzas.

$$I. \quad \sum Y_{ijk} = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + \dots + Y_{223})$$

$$II. \quad \sum Y_i^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$III. \quad \sum Y_j^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$IV. \quad \sum Y_{ij}^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$V. \quad \sum Y_{ijk}^2 = [(Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + (Y_{121})^2 + \dots + (Y_{223})^2]$$

Posteriormente se realiza el análisis de varianza, como lo indica la siguiente Tabla:

FUENTE DE VARIACIÓN (FV)	GRADOS DE LIBERTAD (GL)	SUMA DE CUADRADOS (SC)	MEDIA DE CUADRADOS (MC)	F <sub>CALCULADA</sub>	F <sub>TABLAS</sub> $\left[ 0.05, \frac{GL_{num}}{GL_{den}} \right]$
Analista (A) A <sub>i</sub>	(i-1)	$\frac{\sum Y_i^2}{jk} - \frac{(\sum Y_{ijk})^2}{ijk}$	$\frac{SC_A}{(i-1)}$	$\frac{MC_A}{MC_{AD}}$	$\left[ 0.05, \frac{(j-1)}{(j-1)} \right]$
Día (D) D <sub>j</sub>	(j-1)	$\frac{\sum Y_{ijk}^2}{k} - \frac{\sum Y_i^2}{jk}$	$\frac{SC_D}{(j-1)}$	$\frac{MC_D}{MC_{AD}}$	$\left[ 0.05, \frac{(j-1)}{(i-1)(j-1)} \right]$
Interacción Analista-Día (A-D) A <sub>i</sub> -D <sub>j</sub>	(i-1)(j-1)	$\frac{\sum Y_{ijk}^2}{k} - \frac{\sum Y_i^2}{jk} - \frac{\sum Y_j^2}{ik} + \frac{\sum Y_{ijk}^2}{ijk}$	$\frac{SC_{D'}}{(i-1)(j-1)}$	$\frac{MC_{AD}}{MC_E}$	$\left[ 0.05, \frac{(j-1)(j-1)}{ij(k-1)} \right]$
Error experimental (E) E <sub>ijk</sub>	I <sub>j</sub> (k-1)	$\frac{\sum Y_{ijk}^2 - \sum ij^2}{k}$	$\frac{SC_E}{ij(k-1)}$		



TABLA ESTADÍSTICA DE LA DISTRIBUCIÓN "F" DE FISHER

$$F_{0.05, gln, gld}$$

$\frac{gld}{gln}$	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
3	0.11	0.15	0.18	0.21	0.23	0.25	0.26	0.27	0.28	0.29	0.29	0.30	0.30	0.31	0.31	0.32	0.32	0.32	0.33
4	0.11	0.16	0.19	0.22	0.24	0.26	0.28	0.29	0.30	0.31	0.31	0.32	0.33	0.33	0.34	0.34	0.35	0.35	0.35
5	0.11	0.16	0.20	0.23	0.25	0.27	0.29	0.30	0.31	0.32	0.33	0.34	0.34	0.35	0.36	0.36	0.36	0.37	0.37
6	0.11	0.16	0.20	0.23	0.26	0.28	0.30	0.31	0.32	0.33	0.34	0.35	0.36	0.36	0.37	0.38	0.38	0.38	0.39
7	0.11	0.16	0.21	0.24	0.26	0.29	0.30	0.32	0.33	0.34	0.35	0.36	0.37	0.38	0.38	0.39	0.39	0.40	0.40
8	0.11	0.17	0.21	0.24	0.27	0.29	0.31	0.33	0.34	0.35	0.36	0.37	0.38	0.39	0.39	0.40	0.40	0.41	0.41
9	0.11	0.17	0.21	0.24	0.27	0.30	0.31	0.33	0.35	0.36	0.37	0.38	0.39	0.39	0.40	0.41	0.41	0.42	0.42
10	0.11	0.17	0.21	0.25	0.27	0.30	0.32	0.34	0.35	0.36	0.37	0.38	0.39	0.40	0.41	0.41	0.42	0.43	0.43
11	0.11	0.17	0.21	0.25	0.28	0.30	0.32	0.34	0.35	0.37	0.38	0.39	0.40	0.41	0.42	0.42	0.43	0.43	0.44
12	0.11	0.17	0.21	0.25	0.28	0.30	0.33	0.34	0.36	0.37	0.38	0.39	0.40	0.41	0.43	0.43	0.43	0.44	0.44
13	0.11	0.17	0.21	0.25	0.28	0.31	0.33	0.34	0.36	0.38	0.39	0.40	0.41	0.42	0.43	0.43	0.44	0.44	0.45
14	0.11	0.17	0.22	0.25	0.28	0.31	0.33	0.35	0.37	0.38	0.39	0.40	0.41	0.42	0.44	0.44	0.44	0.45	0.45
15	0.11	0.17	0.22	0.25	0.28	0.31	0.34	0.35	0.37	0.38	0.39	0.41	0.42	0.43	0.44	0.44	0.45	0.45	0.46
16	0.12	0.17	0.22	0.25	0.29	0.31	0.34	0.35	0.37	0.38	0.40	0.41	0.42	0.43	0.44	0.44	0.45	0.46	0.46
17	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.31	0.34	0.35	0.37	0.39	0.40	0.41	0.42	0.43	0.45	0.45	0.46	0.46	0.47
18	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.34	0.35	0.37	0.39	0.40	0.41	0.42	0.44	0.45	0.45	0.46	0.46	0.47
19	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.34	0.36	0.38	0.39	0.40	0.42	0.43	0.44	0.45	0.45	0.46	0.47	0.47
20	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.34	0.37	0.38	0.39	0.41	0.42	0.43	0.44	0.46	0.46	0.46	0.47	0.48
21	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.34	0.37	0.38	0.39	0.41	0.42	0.43	0.44	0.46	0.46	0.47	0.47	0.48
22	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.34	0.37	0.38	0.40	0.41	0.42	0.44	0.45	0.46	0.46	0.47	0.48	0.48
23	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.34	0.37	0.38	0.40	0.41	0.42	0.44	0.45	0.46	0.46	0.47	0.48	0.48
24	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.35	0.37	0.38	0.40	0.41	0.43	0.44	0.45	0.47	0.47	0.47	0.48	0.49
25	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.35	0.37	0.38	0.40	0.41	0.43	0.44	0.45	0.47	0.47	0.47	0.48	0.49
26	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.35	0.37	0.39	0.40	0.42	0.43	0.44	0.46	0.47	0.47	0.48	0.48	0.49
27	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.35	0.37	0.39	0.40	0.42	0.43	0.44	0.46	0.47	0.47	0.48	0.49	0.49
28	0.12	0.17	0.22	0.26	0.29	0.32	0.35	0.37	0.39	0.40	0.42	0.43	0.44	0.46	0.47	0.47	0.48	0.49	0.49
29	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.32	0.35	0.37	0.39	0.40	0.42	0.43	0.45	0.46	0.47	0.47	0.48	0.49	0.50
30	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.32	0.35	0.37	0.39	0.40	0.42	0.43	0.45	0.46	0.47	0.47	0.48	0.49	0.50
31	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.33	0.35	0.37	0.39	0.41	0.42	0.43	0.45	0.46	0.47	0.48	0.48	0.49	0.50
32	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.33	0.35	0.37	0.39	0.41	0.42	0.43	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.49	0.50
33	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.33	0.35	0.37	0.39	0.41	0.42	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.49	0.50
34	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.33	0.35	0.37	0.39	0.41	0.42	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.50	0.50
35	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.33	0.35	0.37	0.39	0.41	0.42	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.50	0.50
36	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.33	0.35	0.37	0.39	0.41	0.42	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.50	0.51
37	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.33	0.35	0.37	0.39	0.41	0.43	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.50	0.51
38	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.33	0.35	0.37	0.39	0.41	0.43	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.50	0.51
39	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.33	0.35	0.38	0.39	0.41	0.43	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.50	0.51
40	0.12	0.17	0.22	0.26	0.30	0.33	0.35	0.38	0.40	0.41	0.43	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.49	0.50	0.51



F<sub>0.05,gl<sub>1</sub>,gl<sub>2</sub></sub> (Continuación)

gl <sub>1</sub> \ gl <sub>2</sub>	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
3	0.33	0.33	0.33	0.33	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
4	0.36	0.36	0.36	0.36	0.35	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
5	0.38	0.38	0.38	0.38	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.41	0.41	0.41
6	0.39	0.40	0.40	0.40	0.40	0.41	0.41	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.43	0.43	0.43
7	0.41	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.42	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
8	0.42	0.42	0.42	0.43	0.43	0.43	0.44	0.44	0.44	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.46	0.46	0.46
9	0.43	0.43	0.43	0.44	0.44	0.45	0.45	0.45	0.45	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.47	0.47	0.47	0.47
10	0.44	0.44	0.44	0.45	0.45	0.45	0.46	0.46	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.48	0.48	0.48	0.48
11	0.44	0.45	0.45	0.45	0.46	0.46	0.46	0.47	0.47	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.49	0.49	0.49	0.49
12	0.45	0.45	0.46	0.46	0.47	0.47	0.47	0.48	0.48	0.48	0.48	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.50	0.50	0.50
13	0.46	0.46	0.46	0.47	0.47	0.48	0.48	0.48	0.48	0.49	0.49	0.49	0.49	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.51
14	0.46	0.47	0.46	0.47	0.47	0.48	0.48	0.48	0.49	0.49	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.51	0.51	0.51	0.51
15	0.46	0.47	0.47	0.48	0.48	0.49	0.49	0.49	0.50	0.50	0.50	0.50	0.51	0.51	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52
16	0.47	0.47	0.48	0.48	0.49	0.49	0.49	0.50	0.50	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52	0.52	0.53
17	0.47	0.48	0.48	0.49	0.49	0.50	0.50	0.50	0.51	0.51	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52	0.52	0.53	0.53	0.53
18	0.48	0.48	0.49	0.49	0.50	0.50	0.50	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.53	0.53	0.53	0.53	0.54
19	0.48	0.49	0.49	0.49	0.50	0.50	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54
20	0.48	0.49	0.49	0.50	0.50	0.50	0.51	0.51	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.54
21	0.49	0.49	0.50	0.50	0.51	0.51	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55
22	0.49	0.49	0.50	0.50	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52	0.53	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55
23	0.49	0.50	0.50	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52	0.53	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
24	0.49	0.50	0.50	0.51	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56
25	0.50	0.50	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52	0.53	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56
26	0.50	0.50	0.51	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.56
27	0.50	0.50	0.51	0.52	0.52	0.52	0.53	0.54	0.53	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.57
28	0.50	0.51	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57
29	0.50	0.51	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57
30	0.51	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57
31	0.51	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57	0.57
32	0.51	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57	0.58
33	0.51	0.51	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.55	0.54	0.55	0.56	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57	0.57	0.58
34	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57	0.58	0.58
35	0.51	0.52	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57	0.58	0.58	0.58
36	0.51	0.52	0.52	0.53	0.54	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.58	0.58	0.58	0.58
37	0.51	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57	0.58	0.58	0.58	0.58
38	0.51	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59
39	0.51	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.58	0.58	0.58	0.59	0.59
40	0.51	0.52	0.53	0.53	0.54	0.54	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57	0.58	0.58	0.59	0.59	0.59

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arreguín Rosas José Emilio, (2002), "Métodos Analíticos para la determinación de Acetaminofén en medicamentos", Tesis, UNAM, Facultad de Química.
2. Code of Federal Regulations 21; Parts 210 y 211, August 29, 1996  
<http://www.fda.gov/cder/dmpq/cgmpregs.htm>
3. Compendio Farmacéutico USP XXVI, Validation of Compendial Methods.
4. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 7ª ed. México (2000)
5. Goodman & Gilman, "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica", Vol. 1, 10ª ed. Ed. Mc.Graw Hill Interamericana
7. Guía de Validación de Métodos Analíticos; Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos; edición 2002.
6. Hernández Solórzano, Débora (2002), "Validación de un Método Espectrofotométrico para la Determinación de Ketonazol en una preparación Farmacéutica", Tesis, UNAM, Facultad de Química

9. Informacéutico AFM; Volúmen 9, No.5, noviembre 2002.
10. Laurrauri Mora, Roger Miguel (1999), "Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la estabilidad de acetaminofén en solución pediátrica", Tesis, UNAM, FES Zaragoza.
11. Serrato Santiago, Jorge Manuel, (1992), "Fundamentos y Políticas de un Programa de Validación de Operaciones Farmacéuticas", Tesis, UNAM, Facultad de Química.
12. Valcarcel, M.(1995), "La Calidad en los laboratorios Analíticos", Ed. Reverté.
13. Vázquez García, Río Gil, (2004), "Importancia de la Validación de Sistemas Críticos en la Industria Farmacéutica", Tesis, UNAM, Facultad de Química.
14. Wayne W. Daniel, (1996), "Bioestadística, Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud". Ed. UTEHA