VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Desarrollo y Validación de un Método Analítico por Espectrofotometría UV-Vis para la Cuantificación de Paracetamol en Tabletas Comerciales

Development and Validation of an Analytical UV–Vis Spectrophotometric Method for the Quantification of Paracetamol in Commercial Tablets

Angel Tadeo Tovar Quintero[1], Dayan Esmeralda Vargas Bolaños[1], Marco Efraín Vidal Yépez[1], Braulio Antonio Zúñiga Méndez[1], Joyal Panikulangara Varghese[2] Enrique Eduardo Salazar Calderon[1], Perla Iliana Ramírez Morales[1], Antonio Murillo Salas[3], Luis Manuel Orozco Castellanos[1].

[1]Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N Guanajuato, Gto. 36050, México
[2]Bharata Mata College (Autonomus), Thrikkakara, Kochi, Kerala 682021, India
[3]Departamento de Matemáticas, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N Guanajuato, Gto. 36050, México. pi.ramirezmorales@ugto.mx , amurillos@ugto.mx, orozcoz@ugto.mx

Resumen

Se desarrolló y validó un método analítico de sencillo y de bajo costo para la cuantificación de paracetamol en tabletas comerciales mediante espectrofotometría UV-Vis. La validación se realizó conforma a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) y a las guías del Consejo Internacional de Harmonización (ICH); evaluando la especificidad, linealidad, exactitud, precisión, intervalo, límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) del método, así como la estabilidad del estándar utilizado a diferentes tiempos. El uso de agua destilada como solvente, tras el tratamiento de la tableta, permitió determinar una $\lambda_{máx}$ de 243 nm, sin interferencias por parte de los excipientes. El método presentó un intervalo de trabajo lineal de 6.0 a 20.0 µg/mL, con coeficientes de determinación R^2 superiores a 0.999 en todas las réplicas. Los límites de detección y cuantificación fueron de 0.482 µg/mL y 1.462 µg/mL respectivamente. Los análisis del recobro arrojaron porcentajes entre el 97% y el 102, mientras que los coeficientes de variación fueron inferiores al 2% lo que confirma una buena exactitud y precisión. La valoración dio un contenido promedio de 100.36% de paracetamol, entrando en el intervalo de aceptación de la FEUM para este principio activo. En conjunto, los resultados indican que el método desarrollado y validado es confiable, robusto y adecuado para su implementación.

Palabras clave: Validación, Método analítico, Espectrofotometría UV-Vis, Tableta, Paracetamol.

Abstract

A straightforward and cost-effective analytical method was developed and validated for the quantification of paracetamol in commercial tablets using UV-Vis spectrophotometry. Validation was performed according to the Mexican Pharmacopoeia (FEUM) and the International Council for Harmonisation (ICH) guidelines, evaluating specificity, linearity, accuracy, precision, range, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ), as well as the stability of the standard over time. The use of distilled water as the solvent, following tablet preparation, allowed the determination of a λmax of 243 nm, with no interference from excipients. The method exhibited a linear working range from 0.482 µg/mL y 1.462 µg/mL, with coefficients of determination (R^2) greater than 0.999 for all replicates. The LOD and LOQ were found to be 2 µg/mL and 6 µg/mL, respectively. Recovery rates ranged from 97% to 102%, while the coefficients of variation were below 2%, confirming satisfactory accuracy and precision. The assay yielded an average paracetamol content of 100.36%, which falls within the acceptance criteria established by the FEUM for this active pharmaceutical ingredient. Overall, the results indicate that the developed and validated method is reliable, robust, and suitable for implementation in routine quality control.

Key words: Validation, Analytical method, UV-Vis spectrophotometry, Tablet, Paracetamol.

ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Introducción

El acetaminofén (paracetamol), también conocido como N-acetil-para-aminofenol, es un analgésico y antipirético con nulas propiedades antiinflamatorias. Aunque todavía no se conoce con exactitud su mecanismo de acción, su capacidad de reducir el dolor está relacionada a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, ya que puede inducir analgesia al inhibir a la isoenzima ciclooxigenasa, particularmente la isoforma COX-2, al actuar como cosustrato reductor en el sitio de la peroxidasa.[1] El acetaminofén es un medicamento que tiene una gran demanda en México, de acuerdo con la Secretaría de Salud, este se encuentra presente en más de 400 medicamentos comercializados en el país, tanto en su forma individual como en formulaciones combinadas.[2]

El gran consumo de este medicamento vuelve indispensable contar con métodos que permitan asegurar su calidad durante y después de la fabricación. La fiabilidad de los resultados analíticos resulta esencial para garantizar que se cumpla con los requisitos de calidad y pueda tenerse un producto seguro, que cumpla con las características de identidad, pureza eficacia y calidad para su uso.[3]

Debido a esto, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), establece la validación de un método analítico, la cual consiste en demostrar, mediante estudios realizados en laboratorio, que dicho método posee las características de desempeño necesarias para su aplicación analítica. Para ello, se evalúan diversos parámetros que permiten comprobar su confiabilidad, entre los que se incluyen la verificación, precisión y linealidad del sistema, en adición de la especificidad/selectividad, la exactitud, la linealidad, el intervalo de trabajo, su precisión, los límites de detección y cuantificación, así como la robustez y la tolerancia del método (estas últimas cuando sea necesario).[4]

En este contexto, la validación de un método analítico para el acetaminofén tiene como objetivo demostrar que el procedimiento es adecuado y que, durante la aplicación del método, proporcionará resultados cercanos al valor real del analito presente en la forma farmacéutica evaluada.[3]

Tanto a nivel nacional como internacional, se han establecido diferentes normativas y guías para garantizar esa confiabilidad en el método analítico. En México contamos con la NOM-059-SSA1-2015, que aborda las buenas prácticas de fabricación de medicamentos y la NOM-177-SSA1-2013, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.[5,6] Mientras que, a nivel internacional se siguen las guías del Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH por sus siglas en inglés) como la son la ICH Q2(R2) para la validación de métodos analíticos y la ICH Q14 para el desarrollo de los métodos analíticos.[7,8] Cada una de ellas son de gran apoyo para demostrar que el método satisface las necesidades de su propósito. La confiabilidad de un producto farmacéutico está dada por los métodos por medio de los que se realizan inspecciones de calidad. De ahí la importancia de contar con procedimientos validados.

Bajo esta perspectiva, la validación del método para cuantificar acetaminofén se realizó por medio de la técnica de espectrofotometría ultravioleta visible, por la facilidad del método y los bajos recursos que requiere. Esta técnica emplea la radiación electromagnética en las regiones ultravioleta y visible (180-380 nm y 380-750 nm). Cuando una molécula absorbe energía en este rango de longitudes de onda, los electrones de ciertos grupos funcionales experimentan transiciones desde un estado basal hacia niveles de mayor energía, originando un espectro de absorción característico. Para obtener la concentración de un analito se suele utilizar la longitud de onda que corresponde a la máxima absorción mediante un barrido espectral; posteriormente, la absorbancia se puede relacionar directamente con la concentración del compuesto en la muestra, de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer.[9]

Por lo anterior, el objetivo de este proyecto es validar un método analítico para la cuantificación de una marca comercial de tabletas de acetaminofén mediante espectrofotometría UV-Vis, evaluado diversos parámetros con la finalidad de demostrar que el método es adecuado para satisfacer las necesidades del control de calidad.

ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Materiales y métodos

Balanza analítica; Marca: Accuris, Modelo: Serie Dx. Espectrofotómetro UV/Vis; Marca: PerkinElmer, Modelo: LAMBDA XLS+, versión del software: 8282 V1.1.0. Se utilizaron tabletas comerciales de paracetamol de 500mg de un solo lote fabricadas por Laboratorios Alpharma, S.A. de C.V. y distribuidas por Farmacias Similares.

Preparación de la solución intermedia de trabajo para las tabletas

Se trituró una tableta comercial de paracetamol de 500 mg en un mortero ágata hasta obtener un polvo homogéneo. A partir del material pulverizado, se pesó una cantidad equivalente a 10 mg de paracetamol, la cual se disolvió en agua destilada mediante agitación en un vortex. La solución se transfirió a un matraz aforado de 10 mL y se llevó al volumen con agua destilada para obtener una solución madre con una concentración de 1000 µg/mL. Posteriormente, se preparó una solución intermedia de 200 µg/mL transfiriendo 2 mL de la solución madre a un matraz aforado de 10 mL y completando el volumen con agua destilada.

Preparación del estándar secundario de paracetamol

Se pesaron aproximadamente, dado el ajuste de pureza qué se efectuó, 10 mg de estándar secundario de paracetamol y se disolvieron en agua destilada mediante agitación en un vortex. La solución obtenida se aforó a 10 mL con agua destilada para obtener una solución madre con una concentración de 1000 µg/mL. A partir de esta solución, se preparó una solución intermedia de 200 µg/mL (ppm) transfiriendo 2 mL a un matraz aforado de 10 mL y completando el volumen con agua destilada.

Especificidad

La especificidad del método se evaluó mediante la comparación de los barridos espectrales obtenidos del estándar secundario de paracetamol y de la muestra problema obtenida a partir de tabletas. Con las soluciones intermedias de 200 µg/mL, se prepararon soluciones de trabajo con concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL, elaboradas por triplicado. Los barridos espectrales se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible en un intervalo de longitudes de onda de 200 a 800 nm, utilizando agua destilada como blanco y celdas de cuarzo para realizar las lecturas. Finalmente, los resultados obtenidos fueron procesados y comparados mediante hojas de cálculo de Microsoft Excel.

Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo se determinó a partir de los resultados obtenidos durante la evaluación de la linealidad, tomando en cuenta varios niveles desde 6 hasta 20 µg/mL. Para ello, se analizó la relación entre la concentración de paracetamol y la absorbancia mediante la curva de calibración, considerando la ecuación de regresión, la pendiente y el coeficiente de determinación (R^2). Además, se aseguró que los niveles de concentración presentaran valores aceptables de exactitud y precisión. Con base en estos criterios, se definió el intervalo de concentraciones en el que el método presentó un comportamiento lineal y una respuesta adecuada. Siendo estos los 5 niveles asignado:

- Nivel 1 (Límite Inferior): 6.0 µg/mL
- Nivel 2 (Medio-Bajo): 10.0 µg/mL
- Nivel 3 (Punto Central): 12.0 µg/mL
- Nivel 4 (Medio-Alto): 16.0 µg/mL
- Nivel 5 (Límite Superior): 20.0 µg/mL

VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Límites de detección y cuantificación

A partir de la solución intermedia de 200 µg/mL se prepararon soluciones de trabajo con concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 µg/mL. Las absorbancias de cada una de las soluciones se determinaron en un espectrofotómetro UV-Visible utilizando la longitud de onda de máxima absorción del paracetamol (243 nm) y el modo de lectura a la longitud de onda simple. Los valores de absorbancia obtenidos fueron registrados y posteriormente analizados en Microsoft Excel para construir la curva de calibración y determinar el valor de la desviación estándar residual, mediante la función "ESTIMACIÓN.LINEAL". El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se calcularon a partir de la pendiente de la recta y de la desviación estándar residual, de acuerdo con el procedimiento descrito en la guía ICH Q2(R2).

Linealidad

La linealidad del método se evaluó a partir de la solución intermedia preparada con tabletas comerciales de paracetamol. A partir de esta solución se prepararon, por triplicado, soluciones de trabajo con concentraciones de 6, 10, 12, 16 y 20 µg/mL. Las determinaciones se realizaron de manera independiente por tres operadores durante un período de tres días, efectuando cada uno de ellos una réplica del ensayo por día. Las absorbancias se determinaron en un espectrofotómetro UV-visible previamente acondicionado, utilizando la longitud de onda de máxima absorción del paracetamol (243 nm) en el modo de lectura a longitud de onda simple. Los valores obtenidos se registraron y posteriormente se emplearon para construir las curvas de calibración y evaluar la linealidad del método mediante Microsoft Excel. Siendo el criterio de aceptación que los valores del coeficiente de determinación R^2 mayor a 0.9900 para cada replica.

Exactitud

La exactitud del método se evaluó a partir de los resultados obtenidos en la prueba de linealidad. Para ello, se calculó el porcentaje de recobro de los niveles de concentración evaluados, comparando la concentración obtenida experimentalmente con la concentración teórica. Siendo el criterio de aceptación que el valor se encuentre en un rango de 97.0% a 103.0%

Precisión

La precisión del método se evaluó con los resultados obtenidos de la prueba de linealidad. Se determinó la repetibilidad y la precisión intermedia mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV%) de las absorbancias obtenidas para cada nivel de concentración. La repetibilidad se evaluó comparando los resultados obtenidos por los distintos operadores en un mismo día, mientras que la precisión intermedia se determinó comparando los resultados obtenidos durante los tres días. Siendo el criterio de aceptación que el valor del coeficiente de variación no supere el 2.0%

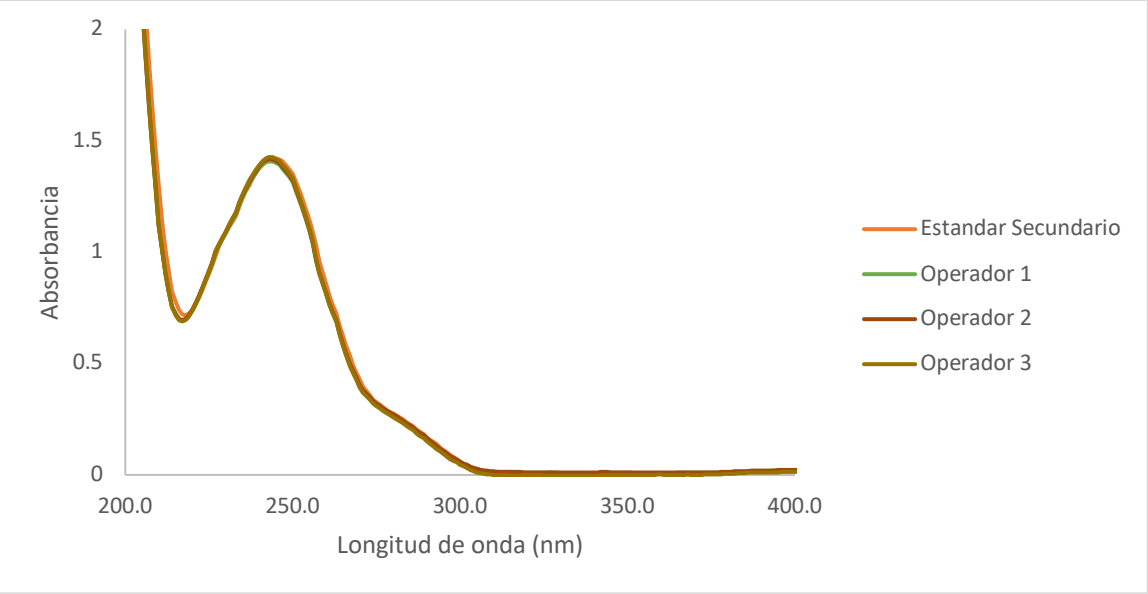
Estabilidad

La estabilidad del paracetamol se evaluó durante un periodo de 24 horas. A partir de una solución intermedia de 200 µg/mL se prepararon concentraciones de 6, 10, 12, 16 y 20 µg/mL. Cada concentración se hizo por triplicado y el ensayo fue realizado por dos operadores independientes, realizando una repetición cada uno. Las lecturas iniciales de longitud de onda simple se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible previamente acondicionado, empleando la longitud de onda de máxima absorción del paracetamol (243 nm). Concluidas las mediciones iniciales, las soluciones se conservaron en una incubadora a 36°C. Posteriormente, las absorbancias se determinaron nuevamente, con las mismas soluciones a las 4, 8, 12 y 24 horas, manteniendo las mismas condiciones instrumentales y de medición para cada intervalo de tiempo. Al finalizar la prueba, los valores obtenidos fueron registrados y analizados en hojas de cálculo de Microsoft Excel para su análisis.

Resultados y Discusión

Especificidad

La comparación de los barridos espectrales obtenidos del estándar secundario de paracetamol y de la tableta de Alpharma comprobó que la longitud de onda de máxima absorción del paracetamol en espectrofotometría UV fue de 243 nm, por lo que esta fue la longitud de onda empleada para la cuantificación del analito. Asimismo, los barridos espectrales mostraron un comportamiento y una forma similares entre el espectro obtenido del estándar secundario y el de la tableta de paracetamol a dicha longitud de onda (Gráfica 1), lo que sugiere que el método analítico es específico para la detección y posterior cuantificación del principio activo presente en la tableta. Además, la ausencia de interferencias atribuibles a los excipientes en la longitud de onda seleccionada confirma la especificidad del método y sugiere una identificación y cuantificación confiables del analito.



Gráfica 1. Concentración de 20 ppm. *Comparación de los barridos espectrales obtenidos del Estándar Secundario y los barridos espectrales correspondientes a la tableta Alpharma realizados por tres operadores diferentes, donde se muestra un comportamiento y una forma idénticos y se confirma que la longitud de onda de máxima absorción es 243 nm.*

Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se determinaron mediante las curvas de calibración construidas a partir de las absorbancias obtenidas a las concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 y 20 µg/mL. Para ello, se empleó la desviación estándar residual de la línea de regresión ($S_{y/x}$) y la pendiente (m) de cada una de las curvas de calibración realizadas de acuerdo con las ecuaciones establecidas por la guía ICH Q2 (R2).

$$LOD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{m} \qquad LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m}$$

Tabla 1*. Resultados de las curvas de calibración construidas para la determinación del límite de detección y cuantificación realizadas con el estándar.*

	Absorbancia			
Concentración (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio
1	0.086	0.088	0.085	0.086
2	0.155	0.151	0.149	0.152
3	0.219	0.228	0.210	0.219
4	0.299	0.316	0.294	0.303
5	0.371	0.360	0.362	0.364
6	0.428	0.426	0.436	0.430
10	0.711	0.718	0.733	0.721
20	1.381	1.379	1.383	1.381

Tabla 2. *Determinación de Límites de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ) de las curvas de calibración obtenidas.*

Curva	Pendiente (m)	$S_{y/x}$	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
1	0.0697	0.01019	0.483	1.462
2	0.0687	0.01019	0.489	1.483
3	0.6708	0.01019	0.475	1.439
Promedio	0.0697	0.01019	0.482	1.462

Como resultado, se obtuvo un límite de detección de 0.482 µg/mL y un límite de cuantificación de 1.462 µg/mL, lo que sugiere que el método presenta una sensibilidad adecuada para detectar bajas concentraciones de paracetamol.

Intervalo de trabajo

Por cuestiones prácticas, se evaluaron concentraciones superiores para determinar el verdadero límite inferior del rango de trabajo. Se comprobó que el nivel de 6,0 µg/mL era la concentración más baja que cumplía estrictamente todos los parámetros de linealidad, exactitud y precisión exigidos bajo las condiciones en que se trabajó.

Siendo así que, el intervalo de trabajo se estableció formalmente de 6,0 a 20,0 µg/mL. Esta elección no solo garantiza la fiabilidad analítica en toda la extensión del rango, sino que también resulta apropiada para cubrir el entorno dinámico de la concentración objetivo (20,0 µg/mL), ya que 6,0 µg/mL representa un porcentaje significativo (30 %) de dicha concentración, mientras que el valor de 1,46 µg/mL se descarta por no ofrecer la robustez necesaria para la cuantificación rutinaria.

Linealidad

Se obtuvieron los siguientes datos del estándar y de cada operador para cada uno de los 3 días:

***Tabla 3**. Resultados del estándar en cada uno de los 3 días a 5 niveles*

		Absorbancia			
Día	Concentración (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Desviación Estándar
1	6	0.429	0.436	0.434	0.004
	10	0.680	0.699	0.697	0.010
	12	0.828	0.837	0.838	0.006
	16	1.076	1.110	1.099	0.017
	20	1.350	1.365	1.413	0.033
2	6	0.436	0.436	0.473	0.021
	10	0.696	0.699	0.710	0.007
	12	0.846	0.856	0.848	0.005
	16	1.164	1.144	1.143	0.012
	20	1.374	1.388	1.411	0.019
3	6	0.436	0.436	0.473	0.021
	10	0.694	0.718	0.704	0.012
	12	0.829	0.831	0.826	0.003
	16	1.089	1.102	1.115	0.013
	20	1.378	1.389	1.383	0.006

Tabla 4. *Valor del coeficiente R^2 para cada una de las lecturas de los 3 días*

	Coeficiente R^2		
Día	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	0.9996	0.9998	0.9986
2	0.9993	0.9996	0.9993
3	0.9999	0.9992	0.9995

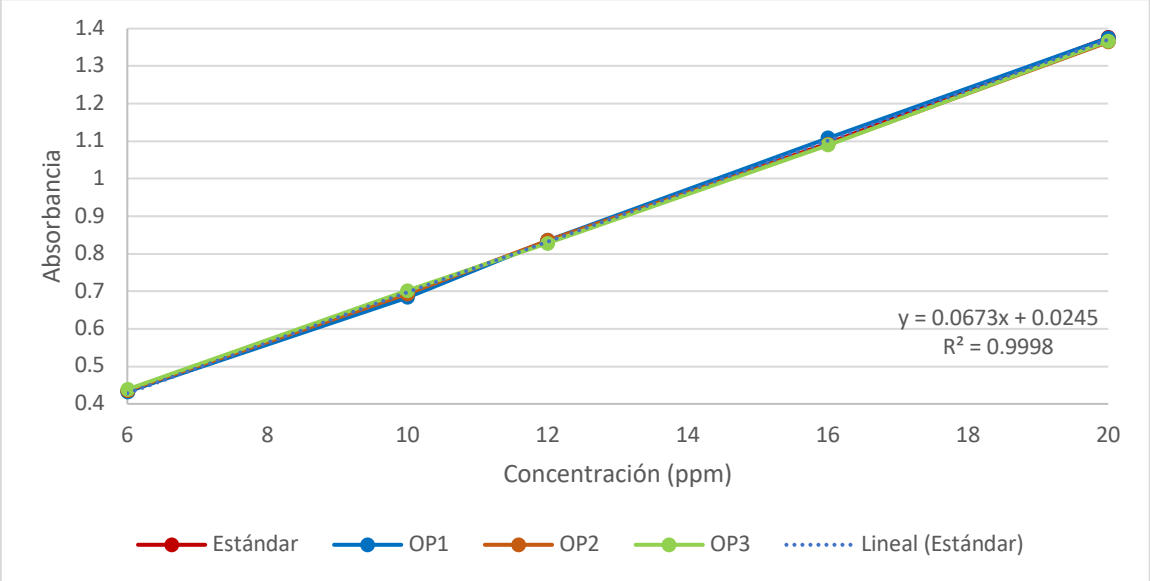
***Tabla 5**. Resultados del día 1 las 3 réplicas a 5 niveles cada una para la prueba de Linealidad.*

		Absorbancia			
Operador	Concentración (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Desviación Estándar

	6	0.441	0.431	0.426	0.007
	10	0.676	0.684	0.692	0.008
1	12	0.820	0.843	0.845	0.014
	16	1.097	1.097	1.133	0.021
	20	1.352	1.374	1.399	0.023
	6	0.443	0.432	0.433	0.006
	10	0.681	0.705	0.693	0.012
2	12	0.823	0.850	0.833	0.014
	16	1.091	1.094	1.089	0.003
	20	1.365	1.366	1.362	0.002
	6	0.436	0.437	0.443	0.004
	10	0.690	0.701	0.714	0.012
3	12	0.828	0.815	0.842	0.013
	16	1.087	1.086	1.098	0.007
	20	1.369	1.343	1.388	0.023

Tabla 6. *Valor del coeficiente R^2 para cada una de las lecturas de los 3 operadores del día 1*

	Coeficiente R^2		
Operador	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	0.9990	0.9994	0.9996
2	0.9991	0.9994	0.9999
3	0.9996	0.9997	0.9995



Gráfica 2. *Relación entre la concentración (ppm) y la absorbancia promedio de cada replica y estándar del día 1. La ecuación de la recta, así como el valor de R^2 corresponden a los resultados del estándar.*

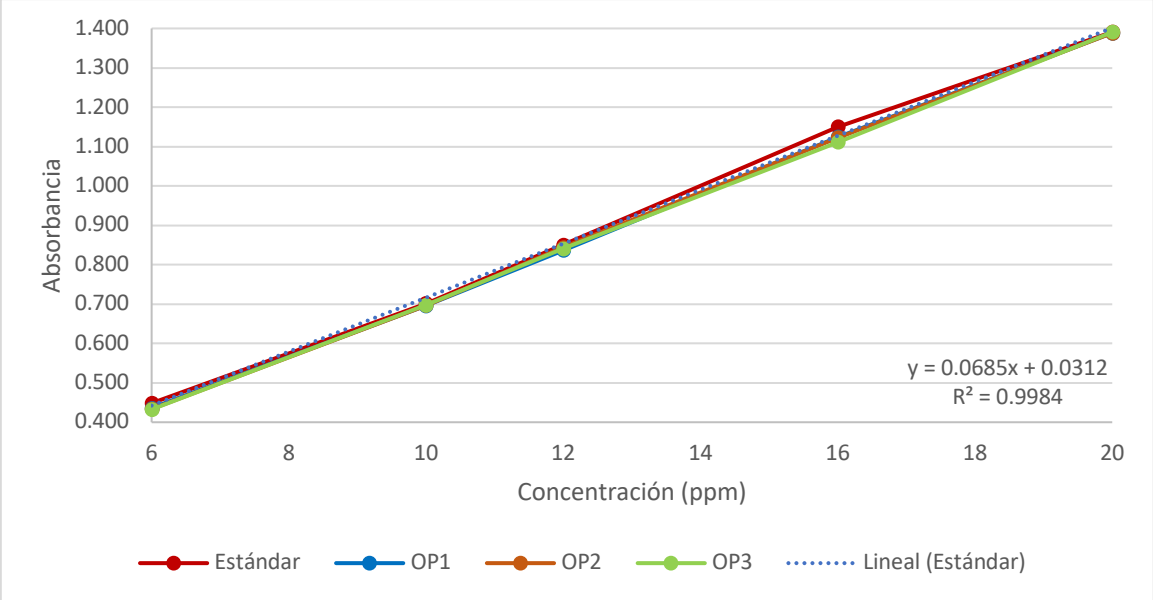
***Tabla 7**. Resultados del día 2 las 3 réplicas a 5 niveles cada una para la prueba de Linealidad.*

		Absorbancia			
Operador	Concentración (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Desviación Estándar
1	6	0.436	0.433	0.441	0.004
	10	0.696	0.697	0.695	0.001
	12	0.825	0.840	0.845	0.011
	16	1.123	1.125	1.126	0.002
	20	1.382	1.389	1.395	0.006
2	6	0.438	0.436	0.428	0.005
	10	0.697	0.701	0.693	0.004
	12	0.841	0.850	0.841	0.006
	16	1.122	1.127	1.120	0.004
	20	1.390	1.390	1.385	0.003
3	6	0.433	0.431	0.435	0.002
	10	0.697	0.697	0.699	0.001
	12	0.835	0.841	0.847	0.006

	16	1.097	1.120	1.117	0.012
	20	1.386	1.400	1.386	0.008

Tabla 8. *Valor del coeficiente R^2 para cada una de las lecturas de los 3 operadores del día 2*

	Coeficiente R^2		
Operador	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	0.9993	0.9997	0.9995
2	0.9997	0.9997	0.9998
3	0.9997	0.9999	0.9998



Gráfica 3. *Relación entre la concentración (ppm) y la absorbancia promedio de cada replica y estándar del día 2. La ecuación de la recta, así como el valor de R^2 corresponden a los resultados del estándar.*

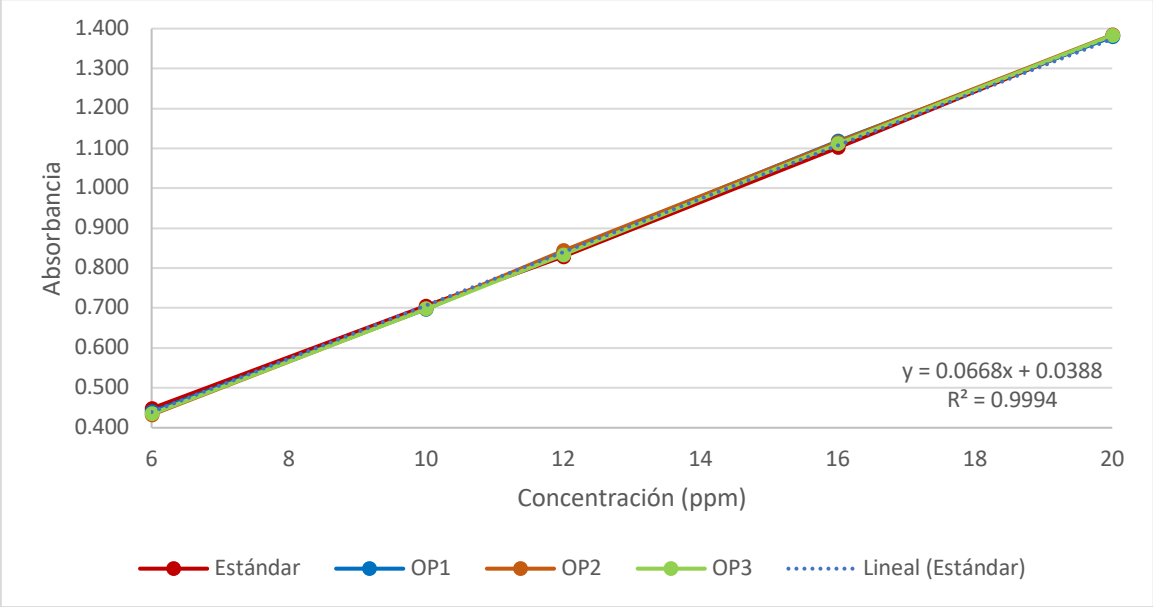
***Tabla 9**. Resultados del día 3 las 3 réplicas a 5 niveles cada una para la prueba de Linealidad.*

		Absorbancia			
Operador	Concentración (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Desviación Estándar
1	6	0.440	0.441	0.438	0.001
	10	0.699	0.691	0.702	0.006

	12	0.835	0.845	0.843	0.005
	16	1.107	1.126	1.121	0.010
	20	1.384	1.378	1.376	0.004
	6	0.431	0.434	0.432	0.001
	10	0.705	0.697	0.696	0.005
2	12	0.837	0.849	0.845	0.006
	16	1.110	1.124	1.113	0.008
	20	1.380	1.385	1.387	0.004
	6	0.434	0.435	0.436	0.001
	10	0.697	0.700	0.698	0.002
3	12	0.835	0.834	0.831	0.002
	16	1.104	1.113	1.119	0.008
	20	1.371	1.399	1.379	0.015

Tabla 10. *Valor del coeficiente R^2 para cada una de las lecturas de los 3 operadores del día 3*

	Coeficiente R^2		
Operador	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3
1	0.9998	0.9991	0.9997
2	1.0000	0.9996	0.9999
3	0.9998	0.9999	0.9997



Gráfica 4. *Relación entre la concentración (ppm) y la absorbancia promedio de cada replica y estándar del día 3. La ecuación de la recta, así como el valor de R^2 corresponden a los resultados del estándar.*

Con base a los valores del coeficiente R^2 se observó que cada una de las réplicas, así como el estándar, independientemente del día, mostraron resultados aceptables para los criterios de aceptación establecidos; además que, no hubo diferencias significativas entre ellos, como se muestra en las gráficas.

Exactitud

Con base a los datos obtenidos en la prueba de Linealidad, tomando en cuenta la ecuación de la recta de cada día y la concentración esperada para cada nivel, se calculó la concentración obtenida para cada lectura; con el promedio de estas se obtuvo el porcentaje de recobro para cada replica en cada uno de los 3 días.

$$\%\ de\ Recobro = \frac{Concentración\ _{Obtenida}}{Concentracion_{teórica}}(100)$$

Tabla 11. *Resultados del día 1 las 3 réplicas a 5 niveles cada una para la prueba de Exactitud.*

		Concentración Obtenida (ppm)				
Operador	Concentración Teórica (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio	Recobro (%)
1	6	5.904	5.860	5.976	6.064	98.555
	10	9.705	9.719	9.690	9.798	97.047
	12	11.584	11.800	11.887	12.053	97.974
	16	15.934	15.963	15.977	16.114	99.736
	20	19.720	19.821	19.908	20.068	99.083

2	6	6.217	6.049	6.064	6.110	101.830
	10	9.752	10.104	9.936	9.931	99.309
	12	11.864	12.262	12.017	12.048	100.400
	16	15.844	15.889	15.813	15.849	99.054
	20	19.915	19.930	19.869	19.904	99.522
3	6	6.110	6.125	6.217	6.151	102.510
	10	9.890	10.058	10.242	10.063	100.635
	12	11.941	11.742	12.140	11.941	99.507
	16	15.782	15.767	15.951	15.833	98.958
	20	19.976	19.593	20.267	19.945	99.726

***Tabla 12**. Resultados del día 2 las 3 réplicas a 5 niveles cada una para la prueba de Exactitud.*

		Concentración Obtenida (ppm)				
Operador	Concentración Teórica (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio	Recobro (%)
1	6	6.186	6.033	5.972	6.064	101.065
	10	9.676	9.798	9.921	9.798	97.982
	12	11.818	12.155	12.186	12.053	100.442
	16	15.935	15.935	16.471	16.114	100.712
	20	19.731	20.052	20.420	20.068	100.338
2	6	5.933	5.904	5.788	5.875	97.912
	10	9.719	9.777	9.661	9.719	97.191
	12	11.815	11.959	11.815	11.863	98.858
	16	15.919	15.992	15.890	15.934	99.586
	20	19.836	19.836	19.764	19.812	99.059
3	6	5.860	5.831	5.889	5.860	97.672
	10	9.719	9.719	9.748	9.729	97.288
	12	11.728	11.815	11.916	11.820	98.496
	16	15.558	15.890	15.847	15.765	98.532
	20	19.778	19.980	19.778	19.846	99.228

***Tabla 13**. Resultados del día 3 las 3 réplicas a 5 niveles cada una para la prueba de Exactitud.*

		Concentración Obtenida (ppm)				
Operador	Concentración Teórica (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio	Recobro (%)
1	6	5.961	5.976	5.946	5.961	99.349
	10	9.756	9.634	9.786	9.725	97.254
	12	11.737	11.874	11.844	11.819	98.488
	16	15.700	15.989	15.913	15.868	99.172
	20	19.754	19.662	19.632	19.683	98.414
2	6	5.843	5.873	5.858	5.858	97.635
	10	9.834	9.715	9.700	9.749	97.495
	12	11.770	11.933	11.874	11.859	98.825
	16	15.745	15.954	15.790	15.830	98.936
	20	19.691	19.766	19.796	19.751	98.755
3	6	5.873	5.888	5.903	5.888	98.131
	10	9.715	9.759	9.730	9.735	97.346
	12	11.740	11.725	11.680	11.715	97.625
	16	15.656	15.790	15.879	15.775	98.595
	20	19.557	19.974	19.676	19.736	98.680

Se aprecia que todos los resultados se encuentran dentro del intervalo de ±3% de 100% establecido como criterio de aceptación para esta validación.

Precisión

Para esta prueba de evaluó tanto la repetibilidad, como la precisión intermedia esto mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV%) entre operadores en un mismo día y entre los 3 diferentes días, respectivamente, esto tomando los resultados de las concentraciones de la prueba de Linealidad

Repetibilidad

***Tabla 14**. Resultados del día 1 para la prueba de Repetibilidad (Precisión)*

Operador	Concentración Teórica (ppm)	Concentración Promedio (ppm)	Desviación Estándar	Coeficiente de variación (%)
1	6	6.064	0.110	1.820
	10	9.798	0.122	1.250
	12	12.053	0.204	1.691

	16	16.114	0.309	1.919
	20	20.068	0.345	1.717
	6	6.110	0.093	1.524
	10	9.931	0.176	1.773
2	12	12.048	0.201	1.666
	16	15.849	0.039	0.243
	20	19.904	0.032	0.160
	6	6.151	0.058	0.942
	10	10.063	0.176	1.749
3	12	11.941	0.199	1.666
	16	15.833	0.102	0.644
	20	19.945	0.338	1.693

***Tabla 15**. Resultados del día 2 para la prueba de Repetibilidad (Precisión)*

Operador	Concentración Teórica (ppm)	Concentración Promedio (ppm)	Desviación Estándar	Coeficiente de variación (%)
	6	5.913	0.058	0.988
	10	9.705	0.014	0.149
1	12	11.757	0.156	1.330
	16	15.958	0.022	0.138
	20	19.817	0.094	0.475
	6	5.875	0.076	1.302
	10	9.719	0.058	0.595
2	12	11.863	0.083	0.703
	16	15.934	0.052	0.327
	20	19.812	0.042	0.211
	6	5.860	0.029	0.493
	10	9.729	0.017	0.172
3	12	11.820	0.094	0.796
	16	15.765	0.181	1.146
	20	19.846	0.117	0.589

***Tabla 16**. Resultados del día 2 para la prueba de Repetibilidad (Precisión)*

Operador	Concentración Teórica (ppm)	Concentración Promedio (ppm)	Desviación Estándar	Coeficiente de variación (%)
1	6	5.961	0.015	0.256
	10	9.725	0.081	0.829
	12	11.819	0.072	0.609
	16	15.868	0.150	0.946
	20	19.683	0.063	0.322
2	6	5.858	0.015	0.254
	10	9.749	0.073	0.753
	12	11.859	0.083	0.699
	16	15.830	0.110	0.693
	20	19.751	0.054	0.272
3	6	5.888	0.015	0.253
	10	9.735	0.023	0.234
	12	11.715	0.031	0.265
	16	15.775	0.112	0.713
	20	19.736	0.215	1.088

Precisión intermedia

***Tabla 17**. Resultados de los 3 días para la prueba de Repetibilidad (Precisión)*

	Concentración Promedio (ppm)					
Concentración Teórica (ppm)	Día 1	Día 1	Día 3	Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de variación (%)
6	6.074	5.883	5.902	5.953	0.105	1.765
10	9.907	9.718	9.737	9.787	0.104	1.064
12	11.936	11.813	11.798	11.849	0.076	0.639
16	15.850	15.886	15.824	15.853	0.031	0.194
20	19.844	19.825	19.723	19.797	0.065	0.328

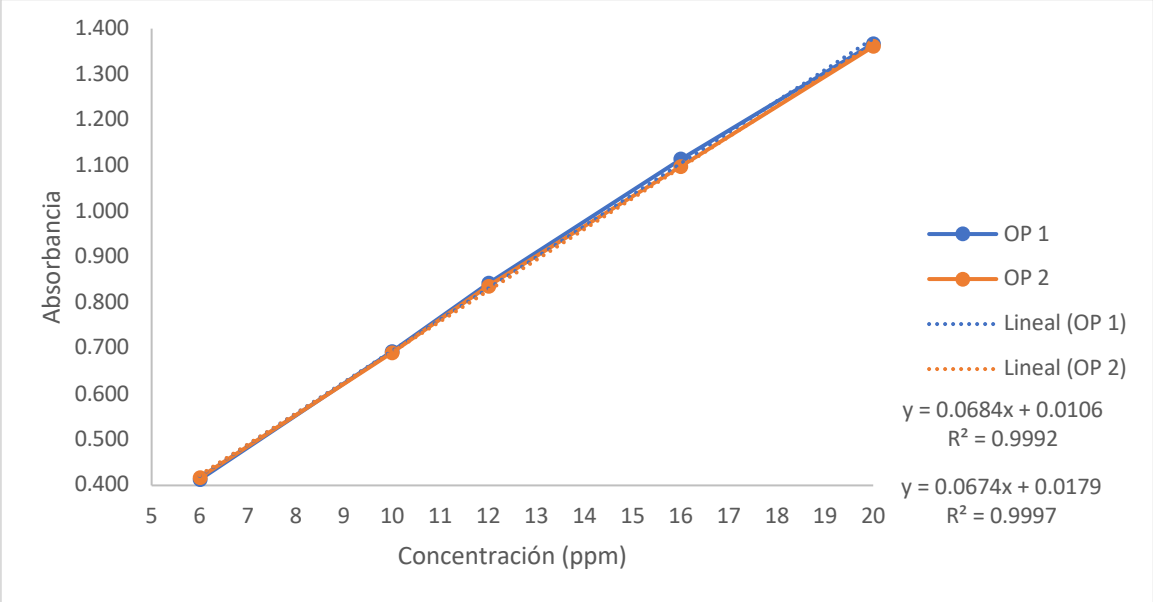
Se aprecia que tanto en los resultados dentro del mismo día, como entre diferentes días (con diferentes operadores) ninguna sobrepasa el 2.0% de valor del coeficiente de variación; indicando así que son precisos conforme a lo establecido.

Estabilidad

Se evaluó la capacidad del estándar secundario de paracetamol en solución para mantener sus propiedades analíticas e integridad química a lo largo del tiempo bajo condiciones controladas de almacenamiento. Esto nos permitió definir el tiempo máximo de conservación operacional de las muestras antes de su lectura en el laboratorio. Se obtuvieron los siguientes resultados:

***Tabla 18**. Resultados de estabilidad Hora 0*

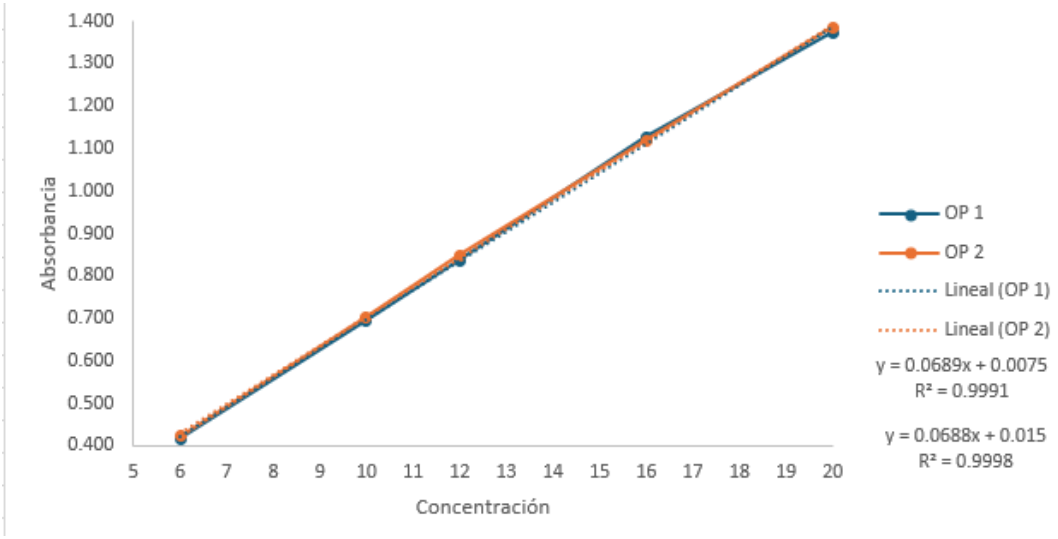
		Absorbancia			
Operador	Concentración (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Desviación Estándar
1	6	0.409	0.419	0.410	0.00805
	10	0.689	0.695	0.695	0.05064
	12	0.849	0.849	0.830	0.16037
	16	1.108	1.118	1.116	0.07736
	20	1.358	1.375	1.368	0.12491
2	6	0.418	0.416	0.418	0.01712
	10	0.683	0.697	0.691	0.10421
	12	0.837	0.835	0.836	0.01483
	16	1.093	1.094	1.107	0.11587
	20	1.335	1.368	1.379	0.33973



Gráfica 5. *Comparativa de operador OP1 y OP2 en tiempo 0*

Tabla 19*. Resultados de estabilidad Hora 4*

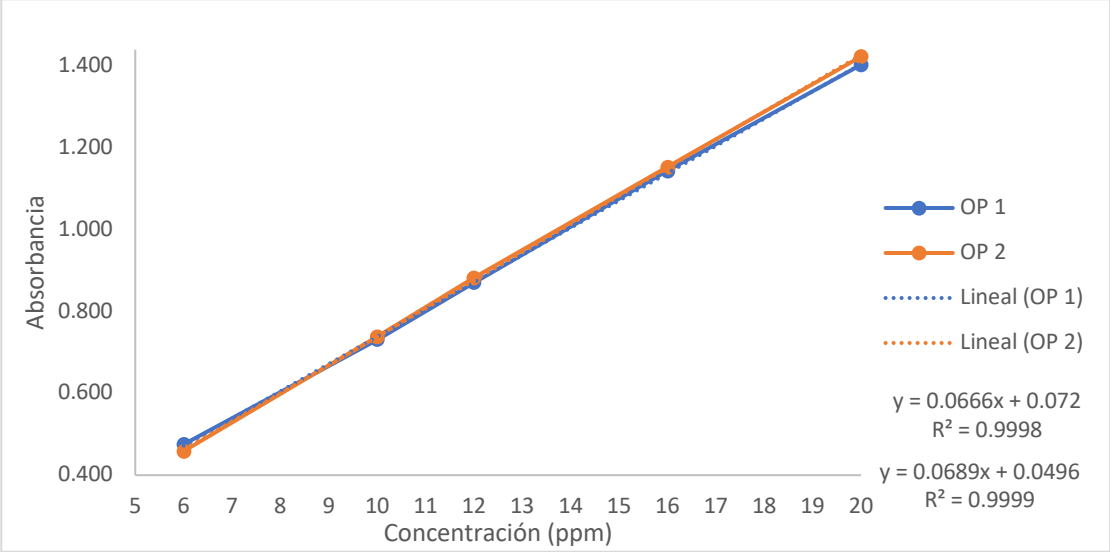
		Absorbancia			
Operador	Concentración (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Desviación Estándar
1	6	0.417	0.412	0.420	0.05908
	10	0.690	0.699	0.694	0.03679
	12	0.837	0.834	0.839	0.03679
	16	1.127	1.119	1.137	0.13184
	20	1.342	1.387	1.390	0.39310
2	6	0.415	0.424	0.431	0.11900
	10	0.693	0.706	0.708	0.12083
	12	0.851	0.843	0.853	0.07850
	16	1.112	1.124	1.124	0.10279
	20	1.374	1.397	1.388	0.17196



Gráfica 5. *Comparativa de operador OP1 y OP2 en tiempo 4*

***Tabla 20**. Resultados de estabilidad Hora 8*

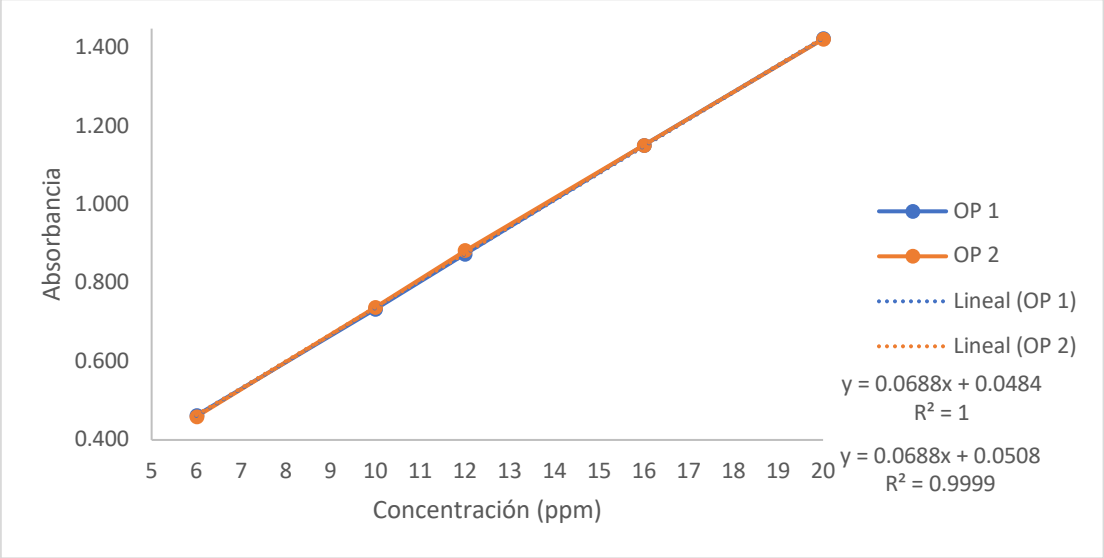
		Absorbancia			
Operador	Concentración (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Desviación Estándar
1	6	0.458	0.475	0.466	0.12434
	10	0.725	0.741	0.729	0.12173
	12	0.867	0.876	0.870	0.00669
	16	1.134	1.140	1.156	0.16626
	20	1.375	1.415	1.419	0.35571
2	6	0.450	0.461	0.465	0.11524
	10	0.730	0.742	0.743	0.10733
	12	0.865	0.891	0.890	0.21855
	16	1.140	1.158	1.160	0.14153
	20	1.413	1.432	1.424	0.14153



Gráfica 6. *Comparativa de operador OP1 y OP2 en tiempo 8*

Tabla 21*. Resultados de estabilidad Hora 12*

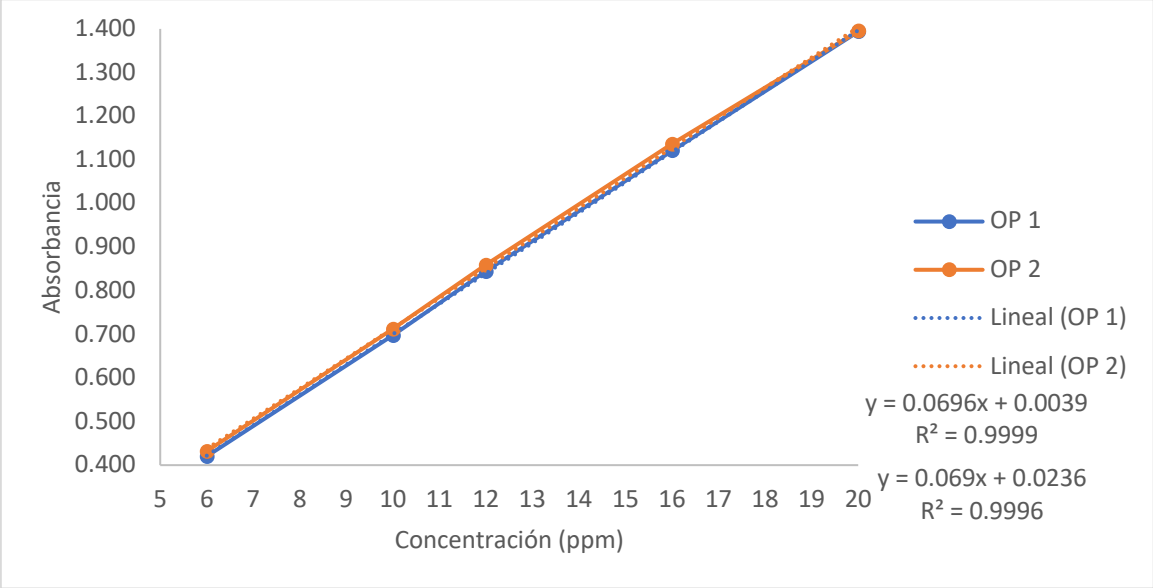
		Absorbancia			
Operador	Concentración (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Desviación Estándar
1	6	0.458	0.464	0.466	0.06086
	10	0.721	0.744	0.736	0.17070
	12	0.871	0.877	0.876	0.04699
	16	1.135	1.156	1.165	0.22507
	20	1.412	1.427	1.433	0.15813
2	6	0.449	0.461	0.468	0.14256
	10	0.731	0.741	0.744	0.10099
	12	0.872	0.890	0.887	0.14308
	16	1.136	1.158	1.162	0.20771
	20	1.411	1.434	1.424	0.17110



Gráfica 7. *Comparativa de operador OP1 y OP2 en tiempo 12*

Tabla 22*. Resultados de estabilidad Hora 24*

		Absorbancia			
Operador	Concentración (ppm)	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Desviación Estándar
1	6	0.420	0.420	0.421	0.00844
	10	0.695	0.692	0.706	0.10776
	12	0.832	0.851	0.849	0.15263
	16	1.108	1.123	1.131	0.17070
	20	1.390	1.393	1.398	0.05908
2	6	0.423	0.438	0.435	0.11776
	10	0.713	0.715	0.708	0.05349
	12	0.855	0.860	0.862	0.05349
	16	1.131	1.136	1.141	0.07418
	20	1.382	1.402	1.400	0. 16342



Gráfica 8. *Comparativa de operador OP1 y OP2 en tiempo 24*

Durante la evaluación de la estabilidad a las 0, 4, 8 y 12 horas, se observó una tendencia atípica de incremento en los valores de absorbancia a medida que transcurrió el tiempo.

Desde la perspectiva de la química farmacéutica, el paracetamol es una molécula de alta estabilidad hidroquímica en medio acuoso a temperatura ambiente. Una degradación del analito se manifestaría como una pérdida de señal (disminución de la absorbancia), por lo que este aumento en la respuesta fotométrica no debería de responder a un fenómeno de inestabilidad química del fármaco. Ante esta situación, se consideró a los siguientes puntos como condiciones que pudieron afectar a la medición:

1. Inestabilidad o deriva del espectrofotómetro: Es decir, variaciones en la intensidad de la fuente de luz (lámpara deuterio/tungsteno) o deriva del detector a lo largo de la jornada de trabajo.
2. Falta de reajuste del blanco (Auto-cero): Si no se recalibró la línea base con el blanco de agua destilada antes de cada tiempo de medición, el sobrecalentamiento del equipo puede desplazar la lectura.
3. Efectos de evaporación o material de celda: Evaporación microscópica del solvente en las soluciones de trabajo si permanecieron destapadas, o cambios en la transparencia de las celdas de polipropileno empleadas.

Por eso mismo es que a la muestra de 24 horas, al dejar el equipo en reposo, este vuelve a dar resultados parecidos a la hora 0, debido a que este ya estuvo bastante tiempo sin uso.

Valoración de la tableta

La valoración del contenido de paracetamol en las tabletas comerciales se determinó de acuerdo con lo establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), empleando la ecuación correspondiente para calcular el porcentaje de principio activo presente en la muestra. Para el cálculo se emplearon los valores promedio de absorbancia obtenidos para la muestra durante la evaluación de la linealidad, así como las absorbancias de la preparación de referencia obtenidas en la determinación de los límites de detección y cuantificación.

$$\%\ Principio\ activo = \frac{100 \cdot CD(\frac{A_m}{A_{ref}})}{M}$$

Donde:
C= Cantidad por mililitro de paracetamol en la preparación de referencia
D= Factor de dilución de la muestra
A_m= Absorbancia obtenida con la preparación de la muestra
A_{ref}= Absorbancia obtenida con la preparación de referencia
M= Cantidad de principio activo indicada en el marbete

A partir de este cálculo se determinó un contenido promedio de 100.366% del principio activo con respecto a la cantidad declarada en el marbete, lo que corresponde a 501.83 mg de paracetamol por tableta. Estos resultados indican que el contenido de principio activo es similar al valor nominal de 500 mg especificado por el fabricante.

De acuerdo con los criterios de aceptación establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) para la valoración de las tabletas de paracetamol, el contenido del principio activo debe encontrarse entre 90.0% y 110.0% de la cantidad indicada en el marbete. En este estudio, las tabletas comerciales fabricadas por Alpharma, S.A. de C.V. presentaron un contenido dentro del intervalo de aceptación, lo que demuestra que cumplen con las especificaciones para este ensayo y demuestran que el producto contiene una adecuada cantidad de principio activo.

Conclusión

El método analítico desarrollado y validado presentó buenos resultados en cada uno de los parámetros en que se evaluó el paracetamol de las tabletas. Se tuvo una adecuada especificidad, no se observó interferencia por parte de los excipientes y se estableció una longitud de onda de máxima absorción de 243 nm. Asimismo, se tuvo un comportamiento lineal en el intervalo de 6.0 a 20.0 µg/mL, con coeficientes de determinación de 0.999, porcentajes de recuperación dentro del intervalo de aceptación (97%-102%) y coeficientes de variación menores al 2%, validando la exactitud y precisión. Los límites de detección y cuantificación obtenidos mostraron que hubo una sensibilidad suficiente para el intervalo de trabajo propuesto. Aunque en las pruebas de estabilidad se observó variaciones en la absorbancia, estos factores no se asocian a la degradación del analito, sino a factores instrumentales. En cuanto a la valoración de las tabletas, se determinó un contenido promedio de 100.366% del principio activo con respecto a la cantidad declarada, lo cual entró dentro del intervalo establecido por la FEUM. Todos estos resultados permiten concluir que el método es confiable, reproducible y de bajo costo para cuantificar paracetamol en tabletas comerciales.

Agradecimientos

Agradecemos a los miembros del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica por prestarnos sus instalaciones para poder desarrollar la investigación; al laboratorio de LETRA ambiental por permitirnos utilizar el espectrofotómetro UV-Visible y a la Universidad de Guanajuato con el programa Verano de la Ciencia por permitirnos realizar esta estancia de investigación.

Referencias

(1) Gerriets, V., Patel, P., & Nappe, T. M. (2024). Acetaminophen. En StatPearls. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482369/

(2) Secretaría de Salud. (2015, 8 de julio). Precauciones para el uso adecuado de paracetamol en esta temporada invernal. Gobierno de México. https://www.gob.mx/salud/prensa/precauciones-para-el-uso-adecuado-de-paracetamol-en-esta-temporada-invernal

(3) Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., & Carda-Broch, S. (2012). Is it necessary to validate an analytical method or not? That is the question. Journal of Chromatography A, 1232, 101–109. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.050

(4) Secretaría de Salud. (2014). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (13.ª ed., Vol. II, Apéndice III: Validación de métodos analíticos, pp. 2787–2795). Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

(5) Secretaría de Salud. (2016). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5424575&fecha=05/02/2016

(6) Secretaría de Salud. (2013). NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados, centros de investigación o instituciones hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. Diario Oficial de la Federación. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013

(7) International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2023). ICH harmonised guideline Q2(R2): Validation of analytical procedures. https://www.ich.org/page/quality-guidelines

(8) International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. (2023). ICH harmonised guideline Q14: Analytical procedure development. https://www.ich.org/page/quality-guidelines

(9) Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). Principios de análisis instrumental (7.ª ed.). Cengage Learning.