

**UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA**

Tesi doctoral de

ENCARNACIÓN GARCÍA MONTOYA

**Optimización, validación y modelización de un proceso de
fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación
interactiva multimedia**

Data de lectura: 5 de juny de 2001

Lloc: Facultat de Farmacia

**Directors de la tesi: Drs. Josep M. Suñé Negre, Josep R. Ticó Grau i Jordi
Gratacós Roig**

JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVO

Diversas frases premonitorias que aparecen a menudo en la prensa auguran un futuro prometedor para la tecnología multimedia y la formación universitaria. Frases como *“La enseñanza a distancia será la forma general de educar en la sociedad de la información”* o *“Las Universidades tradicionales llegan a sus límites físicos de capacidad”* de Reinar Roll (secretario del Internacional Council for Distance Education, ICDE), en la conferencia inaugural del curso 1996 de la UOC (Universitat Oberta de Catalunya), pueden ser constatadas ya hoy. A lo largo de su conferencia, él mismo se encargaba de esclarecer el titular, para concluir que los materiales pedagógicos de la enseñanza a distancia comenzaban a converger y a mezclarse con las aulas tradicionales de la Universidad presencial. Y realmente, así ha sido, la mayoría de asignaturas de la licenciatura de Farmacia ofrecen hoy temas o prácticas por ordenador. Además de la creciente preocupación de la Universidad por este tipo de temas y tecnologías y su aplicación a la docencia (véase sino los trabajos o ponencias desarrollados en los 5 congresos o jornadas **(1-5)** celebrados en Barcelona por la Universidad de Barcelona durante el año 2000).

En esta línea el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultat de Farmàcia de la Universidad de Barcelona y más concretamente el equipo dirigido por los profesores JM Suñé Negre y JR Ticó Grau acometió el diseño de una aplicación interactiva multimedia, como experiencia innovadora y pionera dentro de la docencia farmacéutica universitaria, creada por y para la docencia universitaria. El proyecto fue integrado y aceptado por la Universidad de Barcelona dentro del programa d'INNOVACIÓ DOCENT DEL GAIU N° 7/ IV/ TIM-C /18/ Suñé, en el año 1998.

Capítulo 1:

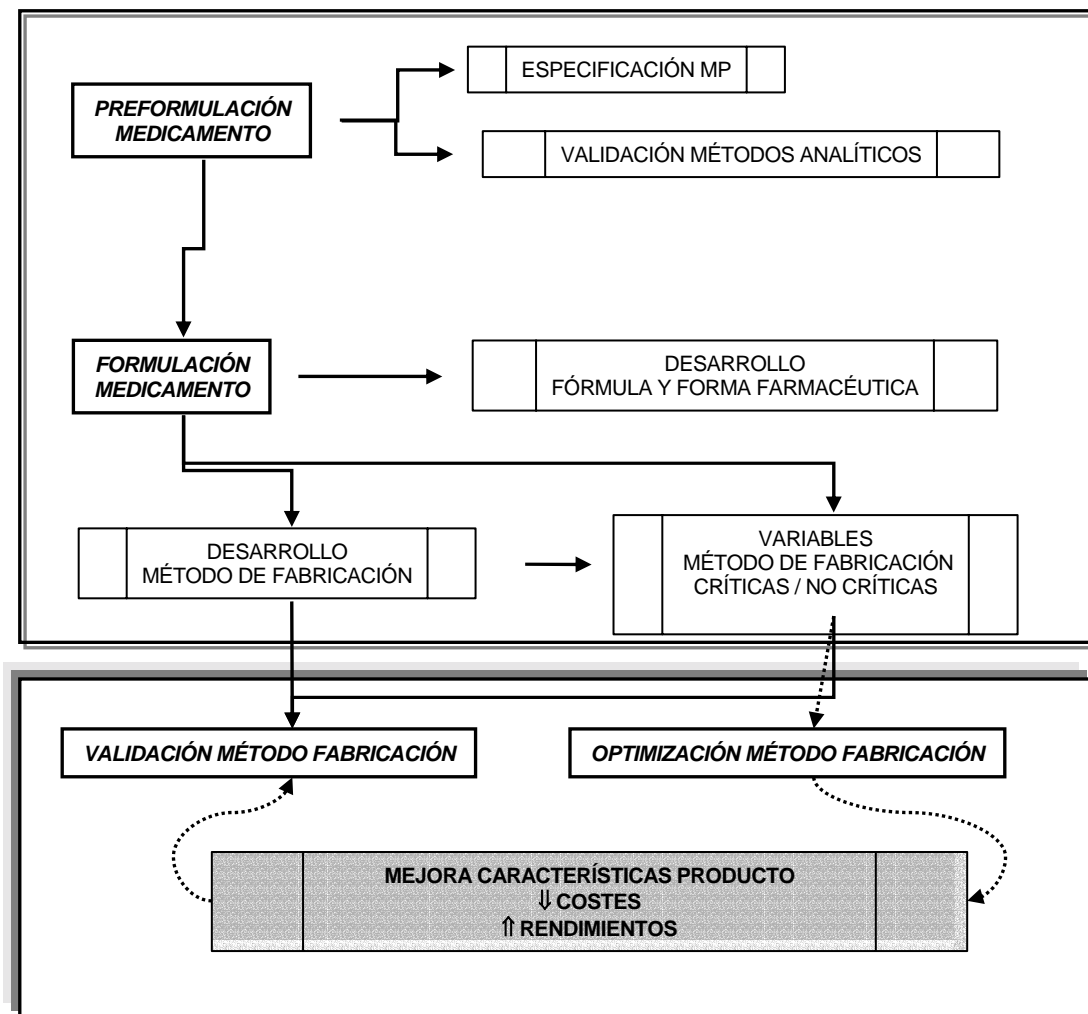
VALIDACIÓN FARMACÉUTICA: CONSIDERACIONES BÁSICAS

1.1 INTRODUCCIÓN

La vocación de la industria farmacéutica desde siempre ha sido producir medicamentos de calidad y con total garantía de seguridad. Desde el “*hágase según arte*” hasta el cumplimiento de las ICH, con los años, se han ido desarrollando recomendaciones e incorporando requerimientos que han evolucionado hasta una reglamentación estricta. La industria farmacéutica disfruta de una imagen de calidad excelente. Al elaborar sus productos destinados a curar la enfermedad, salvar vidas o mejorar la calidad de vida, no puede haber el mínimo margen para el error. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de control y fabricación, se exige una mejora continua y máximas garantías de la calidad. Y es en el avance para conseguir un total dominio de la calidad, cuando surge el concepto de validación.

Hoy en día, todos los técnicos de la industria farmacéutica, incluidos los de distribución, marketing, desarrollo, garantía de calidad, producción, registros, están de acuerdo con el axioma de que “*la calidad no se controla en un producto, la calidad se construye durante su fabricación*” (1). La calidad del medicamento se consigue en todos y cada uno de los pasos de su proceso de producción, desde su investigación hasta el último análisis sobre el producto final (2). La garantía de la calidad de un producto (farmacéutico o no) deriva de una cuidadosa (y sistemática) atención a todos aquellos factores que pueden influir en su calidad: selección de

sus componentes y materiales, diseño (de producto y proceso) adecuado y control (estadístico) del proceso. Alcanzar este nivel de calidad de los medicamentos requiere garantizar que cada una de las etapas de la producción se realiza de forma adecuada y cumpliendo aquellos parámetros de calidad que se han establecido previamente (cuadro 1). Y este **máximo grado de seguridad tan sólo lo proporcionan los procesos de validación**. No hay que olvidar que para obtener medicamentos seguros y eficaces de forma continuada, es necesario que su calidad sea constante. Este objetivo sólo se alcanza cuando las especificaciones que se aplican están basadas en procedimientos validados y por lo tanto, permiten comparar resultados de lotes de reciente fabricación con aquellos que fueron utilizados para ensayos farmacológicos y toxicológicos (2-5).



Cuadro 1: Resumen de las fases de formulación de un medicamento e integración de la validación.

1.2 CONCEPTO DE VALIDACIÓN

La validación ha sido un concepto amplio y comúnmente definido. Sin embargo, los múltiples artículos publicados por expertos y estudiosos, poco han aportado a las ideas de Nash (6), quien en 1979 concluía en un artículo pionero, ya clásico en la materia, que la validación tendría su apogeo y reconocimiento dentro de al menos 15 años¹. Hoy, 20 años después, resulta que ha sido así: la validación es una especificación que se sobreentiende cuando se está desarrollando cualquier procedimiento farmacéutico, ya sea de análisis o de producción. Incluso los pasos y fases citados para desarrollar una validación, no difieren de algunas validaciones que se llevan a cabo hoy en día. Nash planteaba como parámetros básicos a asegurar la **calibración** de los equipos y el **mantenimiento** del proceso y de los equipos, la **cualificación** de equipos y productos y una atención especial a los **cambios**: deberán ser auditados y monitorizados los pasos claves en el proceso (6).

El concepto de validación, en concordancia con la fabricación de medicamentos, surgió hace 20 años (7-8). Fue cuando la FDA (Food and Drug Administration) revisó las normas relativas al control de la fabricación de los productos farmacéuticos. Estas normas son conocidas como las GMP² (Good Manufacturing Practices) o cGMP³ (current Good Manufacturing Practices). En 1978, la palabra validación apareció por vez primera en algunas secciones de las GMP. Sin embargo, en el capítulo de definiciones, el término no aparecía. Más tarde en un documento interno de la FDA se definía validación de forma sencilla: *un proceso de fabricación validado es uno que ha sido comprobado que hace lo se proponía o intentaba hacer*. En este momento destacan las aportaciones que hizo Loftus, como inspector de la FDA, a su entendimiento y difusión. Ni que decir tiene, que la definición ha sido revisada, corregida, completada y actualizada,...; en los 20 años posteriores y hasta hoy se han añadido ideas que pudieron parecer subliminales o incluso novedosas pero de las cuales se deben destacar tres aspectos principales:

→ Necesidad de documentar el proceso de validación, es decir disponer de **todo por escrito**.

→ Necesidad de que provea un alto grado de seguridad de proceso, es decir la **certeza** de que el sistema

¹ "It has taken approximately 15 years for biopharmaceutics and drug dissolution testing to reach their present state of acceptance. Acceptance of process validation may require just as much time" (Nash, 1979).

² En castellano, NCF= Normas de Correcta Fabricación.

³ cGMP = current Good Manufacturing Practices. Current= se traduce por corriente, en curso o de uso corriente. Se ha de tener en cuenta que en USA los nuevos requerimientos de las normas GMP se incorporan inmediatamente y se imponen al resto de laboratorios, aunque no estén reflejados explícitamente en la ley. Para estar al día, conviene consultar publicaciones como *Gold Sheet o GMP Trends* o la *página web de la FDA en el apartado de Warning Letters*.

trabajaré correctamente.

→ Necesidad de que el proceso producirá repetidamente productos aptos, es decir que **cumplan las especificaciones**.

En el estado español, la validación ha sido también motivo de trabajos y revisiones de expertos, entre los cuales cabe destacar los trabajos y publicaciones llevados a cabo por AEFI [VI Jornadas Nacionales de AEFI (9) (Pamplona, 1985) y X Encuentro de AEFI (2) (Toledo, 1989)], o los trabajos del profesor Cemeli (10-12) que son de los más referenciados en trabajos posteriores o los desarrollados más recientemente por el profesor Salazar Macián (13-15), que forman hasta el momento, los únicos tratados publicados en lengua castellana en nuestro país.

La idea de cualificación o validación no es básicamente una idea nueva (16-17), sin embargo, siempre ha estado rodeada de confusión (18). Todos los expertos coinciden (19) en que la validación no es un descubrimiento innovador (10, 13), quizás lo único innovador sea la exigencia de formalizar y documentar **todo**⁴ lo que se venía haciendo hasta ahora, de una forma más sistematizada. El cumplimiento de la capacidad de calidad de los aparatos o de su funcionamiento adecuado también fue comprobado en el pasado. Sin embargo, hoy, no sólo es comprobar o calibrar, también se deben aplicar pruebas de optimización, monitorización y verificación tanto a los equipos como a los procedimientos de producción y de control. Estas actividades estaban menos organizadas entonces y se hacían sin referirse a protocolos establecidos o prácticamente sin documentación. Éste es el elemento relativamente nuevo que trae la validación: la documentación. Debe quedar claro que el término validación como el de cualificación se refieren al proceso formal y sistemático de establecer que el equipo es operativo y el procedimiento es adecuado para el proceso previsto.

Quizás no existe otra definición más clara y a la vez sencilla que la que hizo Chapman (20) hace ya algunos años: *“la validación es el sentido común organizado y documentado”*. En esta frase vuelven a estar resumidos los pilares básicos de la validación: la **organización** y la necesidad de **documentar** resultados, es decir disponer de documentación que demuestre lo que se afirma. Si no existe una estructura clara que marque qué hacer, cómo y para qué se hace cada paso, la validación puede resultar no válida o incluso liosa. Mucho más sencillo resulta el tema de la documentación o registro; la frase *“lo que no se escribió no se hizo, lo que no está escrito no se ha hecho”* es un clásico en la terminología de la validación y todo el mundo la corrobora, ya que cuando se lleva a cabo un ensayo, lo que menos cuesta es registrarlo. Finalmente, el programa de validación

⁴ “Establishing documented evidence that a system does what it purports to do” (1977).

queda formalizado con la documentación que demuestra que las pruebas realizadas dan una uniformidad entre lotes y éstos cumplen los criterios de calidad (entre límites definidos).

Paradójicamente, existe todavía alguna confusión sobre lo que es validación de un proceso y qué constituye la documentación de un proceso de validación. Un problema claro es que genéricamente se ha venido usando el término **validación** para cubrir el concepto amplio de las NCF, que en realidad versan mayoritariamente sobre locales, equipos, componentes, procedimientos y cualificación del proceso⁵ (21). El término específico de proceso de validación debería reservarse para las pruebas de las etapas finales del producto y de la secuencia de desarrollo del proceso. Las NCF y la validación están íntimamente relacionadas: el objetivo principal de ambas es asegurar la consistencia del proceso y del producto. Para ello en la fase del diseño del proceso hay que identificar los parámetros críticos del mismo y la influencia que tienen en el proceso. A continuación se debe estudiar la tolerancia máxima de cada parámetro identificado como crítico.

Otro concepto íntimamente relacionado con los estudios de validación es aplicar la **filosofía del peor caso** (22). Este estudio proporciona los intervalos seguros para el proceso, es decir aquellos que aseguran que siempre se obtendrá producto correcto. Por supuesto que estos intervalos se habrán obtenido con pruebas documentadas que demuestran que si se sobrepasan estas especificaciones hay probabilidad de que el producto no cumpla las especificaciones de calidad.

Por lo tanto, la validación puede definirse como una aproximación sistemática para asegurar la calidad del producto, basada en la **identificación de las variables del proceso** que más influyen en las características de calidad del producto, con el objeto de obtener un método de fabricación y unos métodos de control establecidos, de manera que se asegure que si se siguen al pie de la letra se alcanzarán todas las especificaciones del producto (23). Este estudio puede y debe aprovecharse para optimizar el proceso. En la fase de optimización se tiene que estudiar aquella combinación de parámetros que llevan a la consecución de una mejora en la calidad del producto, la mejora del rendimiento del proceso, un tiempo adecuado del mismo y un coste razonable. De hecho, la validación supondrá una demostración o prueba que un proceso funciona tal y como se espera del mismo (24). Los parámetros escogidos para un programa de validación deben ser indicadores relevantes del control del proceso, con lo cual es imprescindible demostrar la relación parámetro \Leftrightarrow proceso durante el estudio de validación. Es decir es una progresión lógica de actividades que acompañan al desarrollo de un producto farmacéutico. La validación no permite cambiar los métodos

⁵ Las llamadas en formación de personal: "**Filosofía de las 5 M**". Entendiéndose por ellas: MÁQUINAS, MEDIOS, MÉTODOS, PERSONAL (MEN), MATERIALES.

operativos sin haber analizado al detalle el valor del cambio. Validar representa la voluntad de invertir en el conocimiento del proceso, en la comprensión de las relaciones entre los diferentes parámetros y en la comprensión de las relaciones entre proceso y su entorno para al final establecer las óptimas y repetirlo (25). En caso de modificaciones o que se pretenda mejorar deberá procederse a un proceso de revalidación u otra validación nueva.

Sin embargo, la cualificación y la validación son vocablos que también se confundían hace algún tiempo. Definitivamente, la **cualificación** se refiere esencialmente al funcionamiento de la maquinaria, equipos y aparatos de laboratorio, de los cuales se ha de demostrar experimental y documentalmente que funcionan de acuerdo con el uso previsto. La **validación** se refiere a procesos, sistemas y métodos y supone establecer una evidencia documentada de que un proceso se realiza y produce un producto que está dentro de las especificaciones predeterminadas (14). Finalmente, cabe destacar la definición de validación promulgada por las autoridades oficiales de la FDA (26):

“Establishing documented evidence which provides a high degree of assurance that a specific process will consistently produce a product meeting its pre-determined specifications and quality attributes⁶”

recogida a su vez por las NCF (27):

“Validación es la obtención de pruebas, con arreglo a las Normas de Correcta Fabricación, de que cualquier procedimiento, proceso, material, actividad o sistema produce en realidad el resultado previsto”.

1.3 PRIORIDADES DE LA VALIDACIÓN.

Desde un punto de vista industrial (y realmente práctico) los esfuerzos de validación deberían ir hacia los productos comercialmente más importantes (23). Desde un punto de vista de seguridad farmacéutica deben incluirse, además, los productos con dosis muy bajas, los inestables químicamente y los de baja solubilidad o baja absorción. He aquí el trabajo del profesional al aunar sus conocimientos y experiencia para cumplir sus objetivos de seguridad farmacéutica a la vez que provee un beneficio económico para su Compañía. Está claro que la validación sólo puede convencer a los economistas con rentabilidad y sus influencias positivas en la cuenta de resultados⁷ y por supuesto, no existe (como siempre) una única visión o planteamiento para

⁶ “Validación es establecer una evidencia documentada que provea un alto grado de garantía de que un proceso específico producirá, de forma adecuada, un producto que cumpla con sus especificaciones predeterminadas y atributos de calidad”.

⁷ De hecho, según Tazón (33) los trabajos de cualificación y validación en un proyecto suponen aproximadamente un 12% de la inversión, pero reduce un 20% los costes posteriores de mantenimiento de la instalación.

llevar a cabo una validación, sino que a cada caso particular habrá que aplicar unos principios generales extraídos de las guías publicadas por las agencias oficiales FDA (26), NCF (27).

La validación del procedimiento de fabricación en lotes piloto e industriales es indispensable para garantizar la calidad farmacéutica del medicamento. Ni que decir tiene que la validación más económica es la que se inicia desde el primer momento, ya que los cambios lote a lote cuestan dinero y tiempo, no sólo por los fallos o reprocesamientos, sino también por el despliegue de controles extras, de personas o de tiempo. Si todas estas pruebas se practican desde el inicio, dentro de la optimización del proceso, se ahorrarán recursos. El técnico no sólo demostrará que dirige perfectamente sus procedimientos y que conoce sus puntos críticos, debe igualmente demostrar a través de su documentación que posee la experiencia necesaria para llevar a cabo la fabricación y la comercialización de su producto. La validación aporta la garantía de una transposición de escala bien conducida, sin dificultad mayor, pero también aporta la equivalencia del producto industrial con el utilizado para los ensayos clínicos. Del éxito de la validación depende igualmente el aprovisionamiento del mercado a tiempo y en cantidad adecuada sin rupturas de stock, que son tan perjudiciales para la empresa.

Muchas han sido las razones que se han publicado para justificar la validación (1); entre las habituales se encuentran la reducción de costes (derivados del ahorro en el número de muestras a controlar, el propio coste del control, la disminución de anomalías en los productos y por ende de rechazos, retratamientos y recontroles), pero la más importante es la garantía que proporciona al fabricante ya que **un proceso validado** *“es un proceso sin problemas para producir calidad”*. Otra razón importante es la mejora de la logística interna del flujo de fabricación (se pueden adecuar los tiempos de suministro y espera al flujo real) y la inestimable ventaja de detectar a tiempo los errores (detectar una anomalía en la misma fase donde se produce gracias a los indicadores de control del proceso); por supuesto la última razón viene impuesta por las exigencias de las autoridades sanitarias.

La validación es una operación costosa, pero desde un punto de vista de productividad económica puede optimizarse en sí mismo, si se aplican con ciertos criterios “ahorradores” de recursos, es decir (28):

- Comenzar el ejercicio lo antes posible, al poner en marcha un procedimiento de fabricación tras el desarrollo y asignando los parámetros de control de la misma manera.
- Definir claramente las funciones de validación y operaciones críticas y documentar sólo éstas en la validación frente al resto de no críticas.
- Subcontratar algunas validaciones o las más complicadas a proveedores (climatización, equipos

acondicionamiento,...).

- Disponer de documentos “tipo” de PNT y Protocolos que se adapten a las futuras validaciones.
- Practicar reagrupamientos de validación, práctica muy útil en las validaciones de limpieza, validando sólo el producto más problemático y extrapolando las conclusiones al resto de productos,...
- Validar el caso más desfavorable (por tipo de máquina o tipo de producto).
- Utilizar herramientas estadísticas (diseño factorial, capacidad, planes de experiencias).
- Racionalizar la validación en sí misma (iniciarlo para los productos nuevos, o los más interesantes económicamente, etc.).

1.4 TIPOS DE VALIDACIÓN

Hoy existen básicamente tres aproximaciones a la validación de un proceso de fabricación: validación retrospectiva, validación prospectiva y validación concurrente (**12, 29**).

Validación retrospectiva: estudio para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que estaba previsto sobre la base de una revisión y análisis de información histórica.

Validación prospectiva: estudio para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en un protocolo planificado.

Validación concurrente: estudio para demostrar y establecer evidencia documentada de que un proceso hace lo que debe hacer basado en información generada durante una implementación real del proceso. También se le denomina **revalidación**. La validación concurrente es muy utilizada cuando se ha variado una etapa del proceso, ante cambios de proveedores de excipientes, para productos fabricados de tarde en tarde, cambios en las fórmulas de recubrimiento, sustitución o adición de excipientes. Da una información muy valiosa para modificar y corregir el proceso de fabricación o para cuando aparezcan problemas durante la fabricación. Podría considerarse como una evaluación continua del proceso, mientras se controla al máximo para procurar que el producto final sea correcto (**28**).

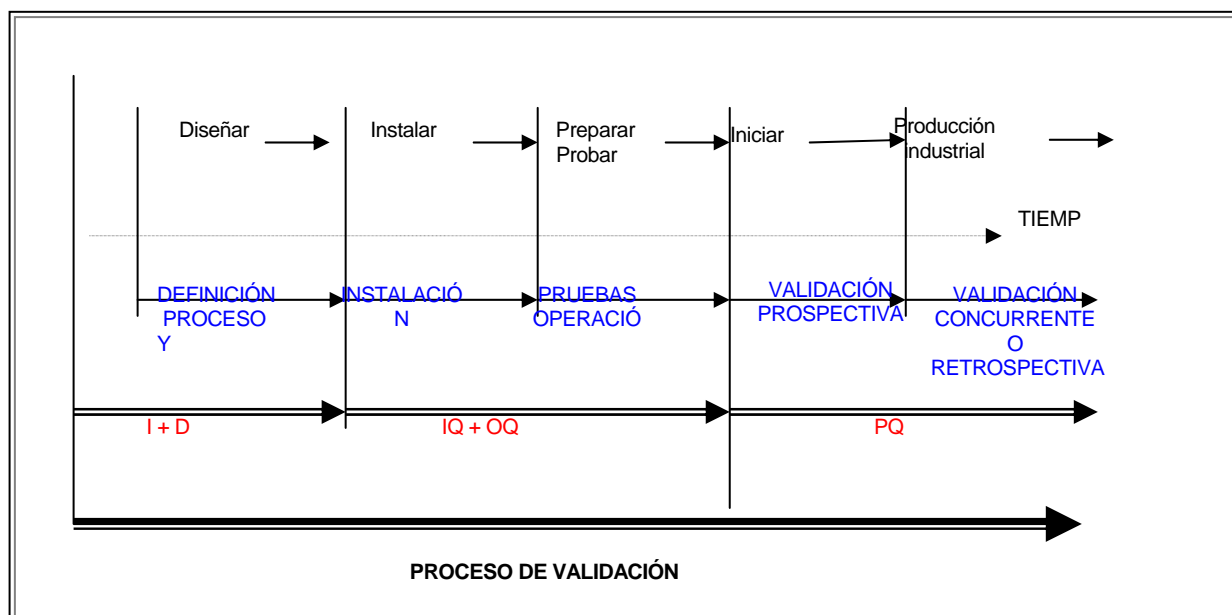
Cualquiera de ellas es aceptada y válida para dar evidencia documentada y demostrar que un proceso hace lo que debe hacer. Sin embargo, cada aproximación tiene sus características y limitaciones y por lo tanto, antes de desarrollar una validación deberá evaluarse qué tipo de validación puede dar la mayor información sobre la seguridad y la estabilidad del proceso. Por ejemplo para una fase de mezclado primario, alguien podría

aplicar una validación prospectiva para controlar una superficie de variación conocida mayor tal como la variabilidad entre las distintas localizaciones del mezclado, la cual es correcta si es lo que se pretende. Sin embargo, difícilmente puede ser utilizada la validación prospectiva para documentar la homogeneidad lote a lote, porque en la validación prospectiva, sólo se usan tres lotes (es decir un número demasiado reducido). Si se quiere evaluar y estudiar qué y cómo influyen los factores en el proceso de homogeneidad de mezclado, será más adecuada una validación concurrente o incluso retrospectiva (si existen datos), con la cual evaluar la homogeneidad lote a lote. Para productos nuevos se practica una validación prospectiva, mientras que para productos existentes se suele aplicar la validación retrospectiva (ver cuadro 2) (30). Sin embargo, la validación concurrente proporciona más información y ayuda a seguir estudiando el proceso previamente validado prospectivamente.

En la práctica, además deben realizarse revalidaciones (29), que son “repeticiones” parciales de la validación completa, en función de los cambios que se hayan practicado en el proceso. Cambios o hechos habituales que obligan a revalidar son:

- cambios en componentes críticos (calidad materias primas, proveedores,...),
- cambios o sustituciones de piezas del equipo o de materiales de acondicionado,
- cambios en la planta o instalaciones (localización o tamaño),
- aumento o disminución del tamaño del lote,
- si varios lotes secuenciales no cumplen los límites.

Aunque no hayan cambios significativos, es útil revalidar el proceso periódicamente para evaluar que se siguen cumpliendo los parámetros preestablecidos y no ha habido variaciones importantes en el proceso que influyan en su capacidad de calidad.



Cuadro 2: Proceso de validación e integración de sus fases (DQ= Cualificación del diseño, IQ= Cualificación de la Instalación, OQ= Cualificación de la operación, PQ= Cualificación del procedimiento).

Otra responsabilidad del trabajo de validación (31) de la planta piloto es la validación de los procedimientos de limpieza para el equipo usado en la fabricación de medicamentos. La necesidad de este trabajo es obvia por la naturaleza sensibilizante de algunos principios activos y las consecuencias potenciales de su contaminación cruzada. Se ha de comprobar si los procedimientos de limpieza son suficientemente seguros para garantizar que los restos de principios activos han sido retirados a un nivel eficaz. Además las conclusiones de la validación pueden ser perfectamente utilizadas posteriormente en la fabricación industrial. Suelen utilizarse tres métodos de validación de limpieza:

- Determinación del residuo de principio activo en las aguas de lavado.
- Valoración del principio activo recuperado según la prueba del algodón (se pasa un algodón impregnado en disolvente sobre la superficie).
- Fabricación de un placebo en la máquina limpia; se asegura que existe el mismo riesgo que en un lote normal y se valora el placebo respecto al principio activo del lote anterior.

1.5 METODOLOGÍAS PARA LA VALIDACIÓN

Es muy importante monitorizar el proceso constantemente de forma que los cambios significativos se localicen antes o en el mismo tiempo que ocurren, con lo cual podría ejercerse una acción correctiva inmediata para mantener al producto bajo control.

Con objeto de alcanzar una validación adecuada, es esencial un profundo conocimiento del proceso farmacéutico (32). El resultado final del proceso es variable (esterilidad, riqueza, disolución) por lo que el enfoque estadístico es esencial para el proceso de validación. No existe una recomendación única para validar productos y cuales son los controles o ensayos a llevar a cabo durante su fabricación. Sin embargo, sí hay unos procedimientos comunes a discutir: muestreo, análisis estadístico y control.

Hay que partir de la idea que un proceso de fabricación es un proceso continuo que implica un número de pasos determinados. Como ejemplo en este trabajo, si se considera el proceso de fabricación de comprimidos a partir de una materia prima, es posible comprobar que está compuesto por una serie de etapas críticas, entre ellas: premezclas de excipientes y principio activo, amasado, mezclado con el lubricante y compresión. Cada etapa es crítica y pueden sobrevenir problemas durante su proceso. Por ejemplo, si no existe una mezcla uniforme en el primer mezclado, la segregación puede ocurrir en el amasado final y pueden tenerse pérdidas durante el trasvase del producto, desde el mezclador a los bidones en cuyo caso la uniformidad de contenido de los comprimidos puede presentar una variabilidad difícil de aceptar. Si aparece un problema en alguna etapa de las críticas del proceso, el producto final puede no cumplir las especificaciones de identidad, riqueza, calidad y pureza. En la práctica, es preceptivo evaluar cada una de las etapas críticas del proceso de fabricación para asegurar que los ingredientes están adecuadamente mezclados, que no ha habido segregación, que no han habido pérdidas de principio activo y que se hace un adecuado control del proceso sobre el peso de los comprimidos durante la compresión que redundará en la confianza de que el producto será apto.

Para alcanzar este objetivo, los materiales intermedios o acabados se analizan sobre la base de su riqueza, uniformidad de dosis, disolución o disgregación de acuerdo con los planes de muestreo premarcados (por la Farmacopea, normas ISO, normas MIL STANDARD,...). Un proceso de fabricación pasará test si para cada etapa crítica del proceso de fabricación y para el producto final cumple las especificaciones requeridas de identidad, riqueza, calidad y pureza del principio activo. En la práctica, para la validación de un proceso de fabricación los límites de aceptación se establecen en base a planes de muestreo y a las especificaciones de la Farmacopea. Estos límites se marcan de manera que si la muestra de validación cumple los límites, exista una alta probabilidad de que otra muestra pase el análisis (33). Estos límites se aplican usualmente para evaluar el paso entre etapas críticas del proceso de validación (29).

1.5.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS FASES CRÍTICAS DEL PROCESO

Se han propuesto muchas metodologías de análisis de proceso para enfocar el trabajo de validación de un

proceso de fabricación. El más habitual desarrollado por la mayoría de autores es aplicar un método de análisis para investigar cuáles son las fases más críticas del proceso. Como **fase crítica** se definió *“algo que puede ser o es probable que sea la causa de un producto inaceptable”*. Esta tarea la deben llevar a cabo los departamentos de Investigación y Desarrollo que deben reflejar los puntos débiles de la fórmula y su grado de importancia, en función del desarrollo y pruebas llevadas a cabo; en caso de que no se haya hecho en esta fase, el técnico de validación deberá recomponer la información de partida.

Es necesario establecer una metodología de validación, ya que no existe una normativa al respecto. Partiendo de un producto medicamentoso, se establecen los elementos que conforman su calidad que deberán analizarse para ver si son fases críticas, por ejemplo las siguientes para unos comprimidos:

- Especificaciones que debe cumplir (iniciales y al caducar).
- Ausencia de contaminación (microbiológica o cruzada o de sustancias relacionadas,...).
- Identificación.
- Utilización del producto (presencia y funcionamiento de los elementos y accesorios para dosificar, aplicar o administrar el producto).
- Inviolabilidad (hermeticidad, esterilidad,...).
- Información ligada al producto (datos estabilidad, dosis).

Cualquier operación que pueda afectar a estos elementos deberá ser validada y, en su caso, ser considerada como etapa crítica o con prioridad alta para ser estudiada en la validación.

El Plan de Trabajo se basará en:

Primera etapa: describir de forma detallada todas las operaciones o funciones a identificar y justificar su **carácter crítico o no crítico**. Sólo las etapas consideradas críticas necesitarán documentación exhaustiva.

Segunda etapa: comprobar y controlar las **funciones / operaciones críticas** separadamente y controlar las funciones críticas conjuntamente. Dar límites de variación para cada parámetro crítico del procedimiento, basándose en estudios estadísticos.

Tercera etapa: comprobar la reproducibilidad del procedimiento.

Para cada tipo de validación, la FDA requiere muestras representativas y apropiadas que se analizarán estadísticamente en cada fase crítica para evaluar que los productos cumplen con las especificaciones. Los

resultados de cada fase crítica darán información útil sobre el cumplimiento del proceso de validación. Además de los controles de proceso, Chapman (20) clasificó unas determinadas variables como importantes en la caracterización del cumplimiento del proceso:

Parámetros de control: valores de las variables operativas que se usan como nivel de control de la estabilidad del proceso. Por ejemplo: el peso máximo y mínimo obtenidos a partir de $\pm 2,5\%$ del peso teórico del comprimido.

Variables operativas: factores (incluidas las variables de control), que pueden afectar potencialmente al estado del proceso y de su control, que provocarán un producto final correcto o no. Por ejemplo para comprimidos puede ser el % de humedad relativa del granulado; si es excesiva puede provocar problemas de compresión.

Estado de control: condición en que todas las variables operativas que pueden afectar al cumplimiento del proceso permanecen entre los márgenes del sistema, de manera que el proceso cumple como estaba previsto y produce producto apto. Por ejemplo, comprimidos con dureza y peso dentro de los márgenes de control.

Margen de fallo: valor de un parámetro de control que si se supera indica efecto adverso en el control o en el cumplimiento del producto final. Por ejemplo si por avería del temporizador se mezcla más tiempo del especificado en la guía podría ocurrir desagregación de la mezcla; si se ha estudiado previamente, se puede decidir sobre la marcha para resolver la incidencia.

Peor caso: valor más alto y más bajo de un parámetro de control que es evaluado en la validación. A partir de estos resultados se establece el margen de fallo de los parámetros de control. Por ejemplo, la altura de los comprimidos, puede provocar fallo de que no quepan en el blíster o por ejemplo un fallo de dureza de los comprimidos podría afectar al perfil de disolución de los comprimidos. Este parámetro ha evolucionado con el tiempo hacia márgenes más cortos coincidentes con los intervalos de trabajo.

Cualificación de la instalación: verificación documentada de que todos los aspectos claves de la instalación cumplen con las normas y con su diseño previo y que las recomendaciones del instalador se han considerado exactamente. Por ejemplo, comprobar la velocidad de mezclado de un mezclador (rpm), si los mandos han sido instalados ergonómicamente para el operador, si no hay peligro de volcado o descarga eléctrica como consecuencia de la acumulación de carga electrostática, etc.

Cualificación operativa: verificación documentada de que un sistema o subsistema cumple (como se

proponía) todos los márgenes de operación previstos. Por ejemplo, comprobar como tras 20 horas de secado en estufa el granulado cumple las especificaciones de humedad residual. Si se han instalado protecciones para el operador, mandos de seguridad, etc.

Protocolo de validación: plan experimental prospectivo que cuando se ejecuta como se propone produce evidencia documentada de que el sistema ha sido validado. El protocolo debe incluir información tal como: formulación, procedimiento de fabricación, objetivos, planes de muestreo, planes de análisis y criterios de aceptación para cada ensayo que tenga que hacerse para cada fase crítica del proceso.

Los planes de muestreo, análisis y criterios de aceptación si se establecen estadísticamente (34) aseguran un alto grado de confianza de que el proceso cumple con lo que estaba previsto. Para redactar el protocolo de validación y dado que los procedimientos varían de producto a producto, es importante tener en cuenta los siguientes puntos para entender perfectamente el proceso:

- cuáles son las fases críticas (establecer puntos para la monitorización de estas fases),
- equipos a usar en cada fase (que cumplan los requerimientos de cualificación),
- posibles problemas (estudiarlos basándose en el peor caso posible),
- controles a cumplir (conocer el estado de control, parámetros de control y márgenes de fallo),
- planes de muestreo (representativos del lote),
- planes de análisis (sobre la base de tamaño, riesgos, etc.),
- criterios de aceptación,
- información pertinente del proceso,
- controles o especificaciones de referencia (dados por las monografías oficiales),
- resumen y conclusión para la validación.

Antes de diseñar el procedimiento de validación, será necesaria una revisión de los pasos críticos en el proceso de fabricación. A modo de ejemplo para comprimidos un análisis simplificado del mismo sería el basado en:

Homogeneidad y riqueza después de mezclar y antes de comprimir. Se investigan tres tiempos de mezclado para determinar el efecto del tiempo de mezclado en la homogeneidad de la mezcla. Si hay muchas variables para considerar, puede hacer inalcanzable la experiencia desde un punto de vista económico: en este caso se debe hacer diseño factorial fraccionado con márgenes concretos para las

variables en base a la experiencia o la bibliografía consultada.

Mantenimiento de la homogeneidad durante el almacenamiento antes de comprimir.

Efecto de compresión en la uniformidad, dureza, friabilidad, disgregación y disolución.

El análisis exhaustivo del proceso de fabricación de los comprimidos por granulación húmeda se realiza en el capítulo 5 de este trabajo.

1.6 CUALIFICACIÓN

Otro planteamiento más moderno de la validación (35-37) es desarrollarla basándose en cuatro apartados (ver cuadros 3 y 4) o bloques denominados: cualificación del diseño (DQ), cualificación de la instalación (IQ), cualificación de la operación (OQ) y cualificación de la prestación (PQ). En este punto, la traducción del término anglosajón performance ha sido difícil, y los diferentes expertos lo han ido traduciendo por cumplimiento, proceso, funcionamiento, pero quizás la que parece más acertada es prestación, es decir la capacidad de prestar un servicio. Algunos autores han ampliado las “Q” con dos más: Cualificación del Mantenimiento (MQ) y Cualificación del cierre de la validación (CQ), que habitualmente son incluidas en la PQ. Para ello el sistema se subdivide en subsistemas o unidades indivisibles a las cuales se les aplica el estudio pormenorizado de sus características, cumplimientos, etc. (38).

<u>SECUENCIA DE VALIDACIÓN</u>	
1.	ORGANIZACIÓN / PLANIFICACIÓN: PLAN MASTER VALIDACIÓN: CALENDARIOS, RESPONSABLES DE VALIDACIÓN
2.	CUALIFICACIÓN DEL DISEÑO (DESIGN QUALIFICATION)
3.	CUALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN (INSTALLATION QUALIFICATION)
	* CALIBRACIONES
	* PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO
4.	CUALIFICACIÓN OPERACIONAL (OPERATIONAL QUALIFICATION)
5.	CUALIFICACIÓN DE LA PRESTACIÓN (PERFORMANCE QUALIFICATION)
6.	DOCUMENTACIÓN Y CERTIFICACIÓN

Cuadro 3: Secuencia de validación de un producto

FASES DE LA CUALIFICACIÓN	CONSIDERACIONES PRÁCTICAS	PRUEBAS	DOCUMENTACIÓN
DQ CUALIFICACIÓN DE DISEÑO	Acordar con el proveedor las condiciones, modificaciones, reservar la documentación relacionada,...	Verificar documentalmente que el sistema corresponde a las exigencias definidas y que los elementos críticos han sido tenidos en cuenta,...	Especificaciones técnicas del usuario, ... Documentos Técnicos del equipo: proporcionados por el proveedor (planos, ...) Manuales Técnicos: mantenimiento, utilización, limpieza, ...
IQ CUALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN	Identificar que los elementos críticos previstos han sido instalados	Controles estadísticos según proveedor (pruebas, ...) Controles estáticos: equipos, partes, ... Control de calibración	Redacción de los Procedimientos Normalizados de Trabajo: PNTs mantenimiento, utilización, limpieza Planos, Fichas Técnicas, ... PNTs control de equipo PNTs calibración PNTs cambios
OQ CUALIFICACIÓN DE OPERACIÓN	Controlar funciones críticas: velocidad, temperatura, capacidad, ...	Controles estáticos de los componentes sin producto ni placebo Controles dinámicos con placebo	Manual de operación Procedimiento de puesta en servicio Guía de Fabricación (para placebo) PNTs relacionados
PQ CUALIFICACIÓN DE PRESTACIÓN	Controlar que el equipo funciona con nuestro procedimiento de trabajo, producto y que cumple las especificaciones	Controles dinámicos con producto	Guía de Fabricación (para producto) PNTs relacionados

Cuadro 4: Resumen de las fases de la cualificación de equipos.

Aunque estos conceptos también han planteado confusiones (39), ya que en ocasiones se ha considerado sinónimos validación y cualificación y se utilizan para cualquier concepto relacionado con la fabricación, con este fin se ha preparado un cuadro resumen (cuadro 5). Estas confusiones se analizan en un artículo que ejemplifica deficiencias NCF y demuestra que seguramente son consecuencia de que no se entendían (y entonces no se aplicaban) bien los conceptos.

Sistemas (agua, aire, vapor, etc.)	Se validan
Procesos (producción comprimidos, etc.)	
Equipos	Se cualifican
Materiales	
Locales	
Personal	Se forman y certifican

Cuadro 5: Términos relacionados con la validación.

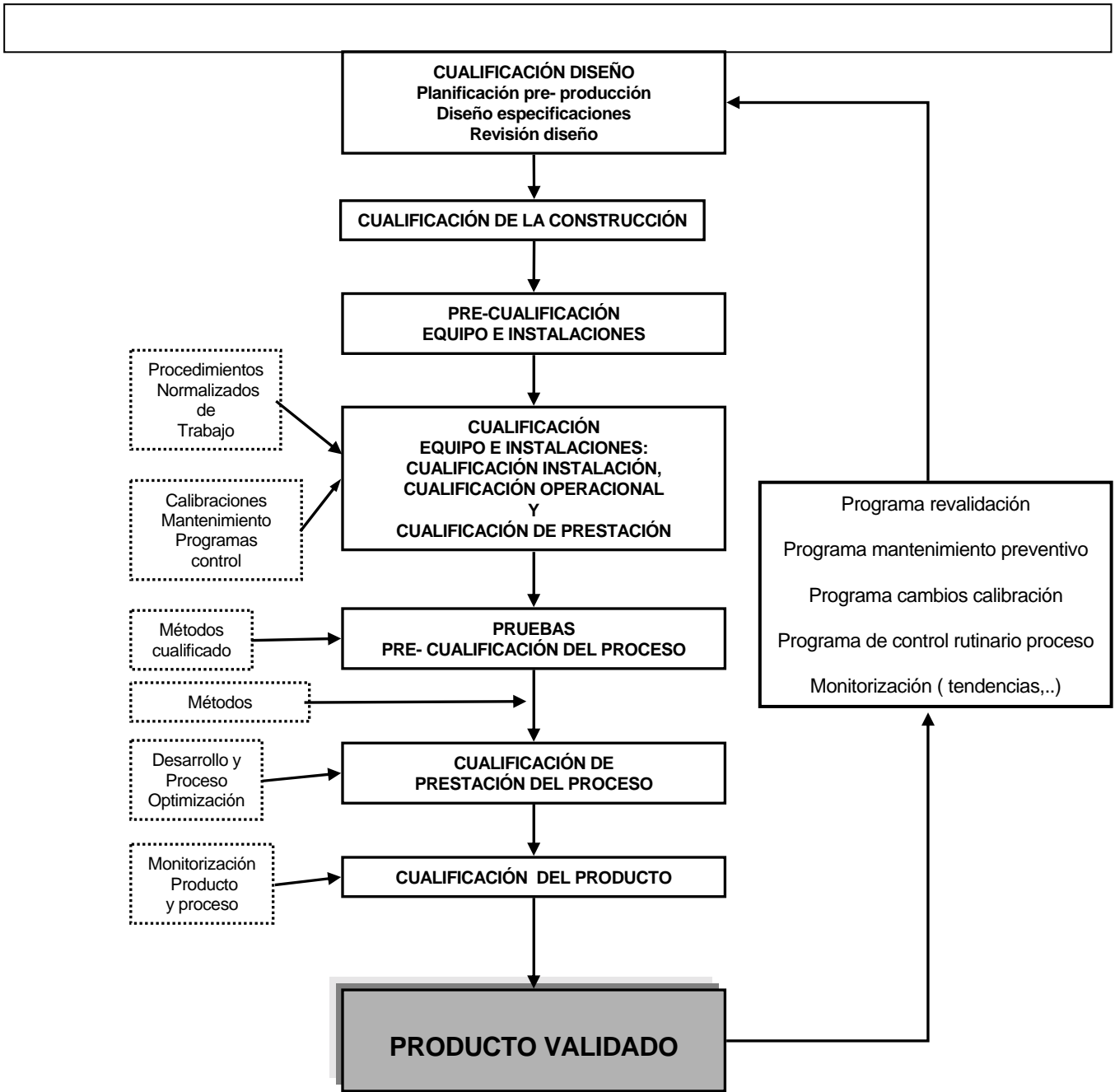
Normalmente la mayoría de autores aplican esta metodología desarrollando las IQ y OQ individualmente en todos los equipos y a continuación se integra una PQ para el proceso completo que integraría la validación de la elaboración del producto farmacéutico. Por ejemplo, para un producto en emulsión semisólido, supondría cualificar todos los equipos utilizados en su elaboración individualmente (es decir que el baño es capaz de alcanzar las temperaturas necesarias, o que el agitador hace una agitación homogénea y adecuada a las revoluciones adecuadas, etc.) y a continuación, comprobar que el paso por todos ellos es capaz de proporcionar un producto dentro de especificaciones.

Respecto a la cualificación de equipos puede hallarse una extensa bibliografía para desarrollarlas, aunque dos guías interesantes son las documentadas en los artículos referenciados como **37** y **40**.

En el presente trabajo se respetarán las recomendaciones de la FDA sobre las fases a desarrollar en una validación de un nuevo producto o bien en una validación concurrente de un producto no validado previamente; todas estas fases se han resumido en el cuadro 7, mostrando gráficamente sus interrelaciones, mientras que en el cuadro 6 se han resumido los “resultados” de las fases de cualificación.

IQ	→	El equipo se ha instalado correctamente
		¡LISTO PARA PUESTA EN MARCHA!
OQ	→	El equipo funciona en condiciones estandares
		¡LISTO PARA PRODUCIR!
PQ	→	El equipo trabaja con “ mis ” condiciones particulares
		¡LISTO!

Cuadro 6: Resultados de las fases de la cualificación de un equipo



Cuadro 7: Interrelación de las fases y pruebas de validación (41, 42, 43)

1.6.1 PLAN MASTER DE VALIDACIÓN

Documento que describe los propósitos o intenciones para alcanzar el objetivo. Organiza la ejecución de las siguientes fases (DQ, IQ, OQ, PQ) y de la documentación implicada.

Entre los puntos que suele incorporar el Plan Master de Validación **(15)** se encuentran los siguientes:

- Introducción
- Alcance de la validación
- Glosario de términos que aparecen en el documento de validación
- Diseño
- Cualificación de las materias primas
- Clasificación ambiental de las instalaciones (aire, temperatura,...)
- Descripción del proceso
- Descripción de los equipos y complementos
- Archivo histórico de los equipos
- Documentación de la instalación y construcciones
- Descripción protocolos
- Listas PNT
- Programas de Plan de validación
- Requerimientos de los protocolos de validación
- Programas de monitorización del medio ambiente
- Procedimientos de ensayos analíticos
- Programa calibración
- Programa formación
- Programa mantenimiento preventivo
- Programa de control de cambios
- Programa de control de documentos

- Personal responsable
- Equipos a cualificar
- Protocolo de validación
- Procedimiento de fabricación
- Firmas de aprobación.

Dependiendo del tipo de validación el Plan Master de Validación se compondrá de unas u otras pruebas. Ver cuadro 8, donde se resumen, según la referencia (15).

VALIDACIÓN PROSPECTIVA	VALIDACIÓN PROSPECTIVA PREVIA	Desarrollo farmacotécnico de la forma farmacéutica: Estudio de los factores críticos del proceso	Tres lotes a escala piloto Ensayo de estabilidad acelerada y a largo plazo
	VALIDACIÓN INDUSTRIAL	Desarrollo de la cualificación del equipo de fabricación (DQ, IQ, OQ) Validación del proceso de fabricación (PQ) con lote a escala industrial Estadística de los datos: INFORME DE VALIDACIÓN MÉTODO DE FABRICACIÓN	Un lote a escala industrial Ensayo de estabilidad acelerada y a largo plazo ⁸ Guías de fabricación Control proceso
VALIDACIÓN CONCURRENTE	Validación del proceso de fabricación (PQ) con tres lotes Estadística de los datos: INFORME DE VALIDACIÓN		Tres primeros lotes (PQ) Ensayo de estabilidad acelerada y a largo plazo
VALIDACIÓN RETROSPECTIVA	Validación del proceso de fabricación en base a los resultados estadísticos de un mínimo de 10 lotes consecutivos, sin incidencias de análisis ni de fabricación		10 lotes consecutivos tamaño lote real

Cuadro 8: Programa de validación para un nuevo producto (adaptado de la referencia (15))

⁸ Las condiciones de estabilidad a largo plazo dependen del la zona climática. En nuestro país 25°C/ 60% HR.

1.6.2 CUALIFICACIÓN DEL DISEÑO (DQ)

En este protocolo se definen los requerimientos, las especificaciones y descripciones de los equipos. Es una fase eminentemente organizativa (saber qué se necesita, qué posibilidades presenta el mercado, qué prestaciones y cómo satisfacen o no las necesidades y, en función del examen llevado a cabo, qué deberá adaptarse). Constituirá una evidencia documentada de que la calidad es tenida en cuenta y construida desde su diseño. Debe ser una fase previa a la fase de compra e instalación del equipo. Deberá requerirse previamente a los proveedores ya que sino a posteriori resulta difícil recoger esta información y documentos; incluso si es un equipo a desarrollar por el proveedor deben describirse ahora las especificaciones técnicas.

Objetivos de la cualificación del diseño:

- Redactar un pliego de condiciones que debe cumplir el equipo: para ello debe realizarse un análisis de las necesidades⁹ y es imprescindible la colaboración de los departamentos de ingeniería, producción, garantía de calidad y del suministrador.
- Verificar la conformidad del equipo con los principios NCF
- Incluir las especificaciones adecuadas al equipo: operacionales, eléctricas, medioambientales, físicas..
- Asegurar que el proveedor entregará el manual de operación que incluya:
 - Requerimientos para la instalación del equipo
 - Procedimientos de instalación del equipo

Si la instalación/equipo estuviera **en uso**, puede obviarse la DQ del equipo, aunque si fuera necesario llevarla a cabo, en la DQ se debería incluir:

- relación de productos fabricados durante el último año: fecha, nº lote y resultado,

⁹ Puntos a tener en cuenta en este análisis:

Análisis de las instalaciones (donde se ubicarán los equipos): clasificación, tipos,...

Descripción, esquema de las instalaciones/equipos.

Procedimientos de utilización.

Procedimientos de limpieza.

Procedimientos de mantenimiento (programas de mantenimiento, recambios,...).

Productos a emplear para la limpieza, mantenimiento,..., PNTs de uso, limpieza y mantenimiento.

Criterios de aceptación: del producto elaborado, residuos de limpieza.

- relación de intervenciones por averías.

1.6.3 FASE DE CUALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN (IQ)

El protocolo de cualificación de la instalación (IQ) incluirá la documentación completa que demuestra que el equipo está instalado conforme con el diseño aprobado previamente y las especificaciones técnicas, normas, códigos y reglamentaciones. Estas actividades se llevan a cabo durante el montaje. Para ello se debe elaborar previamente una planificación de la instalación. La verificación consistirá en: controles, conformidad y contrastación o calibración.

La importancia de este paso está en la verificación y comparación de las características diseñadas para el equipo frente a las instaladas:

- de las especificaciones (operacionales, eléctricas,...) del diseño original,
- de las órdenes de compra,
- de los contratos,
- identificación del equipo, nombre, número de serie, planos, características, etc.,
- conexión a servicios (vapor, agua...),
- programas de mantenimiento y limpieza,...
- que las recomendaciones del fabricante han sido adecuadamente consideradas,
- que existe una buena interrelación con otros sistemas del laboratorio, SPC¹⁰,
- que se han comprobado consideraciones referentes a seguridad operativa,
- requerimientos de uso.

En este momento debe comprobarse que se dispone de toda la documentación (planos, fichas técnicas, etc.). Se recomienda hacer un listado previo con los puntos a comprobar y que en éste colabore el proveedor e incluso la verificación se haga en presencia del mismo.

En resumen, el certificado IQ significa que las instrucciones han sido leídas, comprendidas y el equipo ha sido debidamente instalado, es decir que existe conformidad material pero todavía no se ha puesto en marcha.

¹⁰ Statistical Process Control: Control Estadístico del Proceso.

1.6.3.1 EJEMPLO DE INFORME PARA: CUALIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1.6.3.1.1 INFORMACIÓN GENERAL DEL EQUIPO

- Descripción del equipo: planos, esquemas y medidas
- Características del equipo: listado de componentes (bombas, válvulas, conexiones,...), localización, fabricante, marca, modelo, nº serie, etc.
- Especificaciones del fabricante.
- Materiales del equipo en contacto con el producto: certificación y compatibilidad con los productos.
- Materiales del equipo que no entran en contacto con el producto: **instrumentos críticos** (tipo, fabricante, equipo, localización, certificado calibración, PNT calibración) y **no críticos** (idem).
- Esquema, planos de las instalaciones (eléctrica, mecánica,...).
- Productos para la limpieza, certificación de origen y comprobación analítica.
- Listado de software asociado a la instalación y localización en archivos.
- Relación cambios introducidos en el sistema.

1.6.3.1.2 CONEXIONES NECESARIAS: FLUIDOS Y ENERGÍAS

Localización y características a conocer: fuente, presión, calidad y capacidad del vapor, agua, aire comprimido, electricidad, vacío, nitrógeno, extractores de polvo, sistemas de acondicionamiento de aire...

1.6.3.1.3 DOCUMENTACIÓN

- Manual operación.
- Lista de referencias de los documentos técnicos.
- PNT instalación, PNT mantenimiento preventivo (listas de recambios, PNT sustitución piezas), Sanitización (limpieza, productos, desinfección,...).
- Lista y referencias de los PNT de mantenimiento.
- Los procedimientos normalizados de trabajo estrictamente no son parte de la secuencia de validación. Son una parte importante para la correcta y consistente funcionalidad del equipo.
- Estos procedimientos deberían formar la base de las calificaciones operacionales y validación, se deben

redactar en base a la documentación del proveedor si no se ha hecho ya en al fase DQ. Los PNT deben contener considerables detalles y su preparación requerirá una extrema minuciosidad y rigor.

1.6.3.1.4 CONTROLES ESPECÍFICOS

➤ Controles de calibración o de contrastación.

Conformidad demostrada con patrones certificados o patrones de control. La calibración demuestra que una medida o dispositivo sensor produce los resultados deseados entre los límites especificados comparado frente a un patrón dentro de un intervalo de medida adecuado.

Todos los elementos críticos para el proceso de validación deben ser calibrados. Los patrones de calibración usados deben compararse frente a patrones certificados. Debe mantenerse un archivo documentado de los patrones que incluirá: nombre del instrumento, número identificación, localización, procedimiento de calibración, intervalo de incertidumbre, fecha de calibración inicial, intervalo de recalibración y control del instrumento usado para realizar la calibración.

➤ Controles de conformidad

1. conformidad con planos y documentos contractuales
2. emplazamiento, dimensiones de los instrumentos (tolvas, mandos de control,...)
3. naturaleza de los materiales: certificados de análisis
4. detalles técnicos: pendientes de tuberías, soldaduras, conexiones, etc.
5. identificación de equipos, componentes, redes de fluidos
6. controles eléctricos y neumáticos
7. sincronización de bucles de instrumentación
8. conexiones con otros servicios

Las modificaciones o discrepancias que se detecten deberán registrarse y ser descritas, justificadas y consideradas antes de la certificación, e incluso deberá llevar a revisar la IQ o OQ previas.

1.6.3.1.5 CERTIFICADO DE ACEPTACIÓN DE LA INSTALACIÓN

(firmado por fabricante y comprador).

1.6.4 FASE DE CUALIFICACIÓN OPERACIONAL/ FUNCIONAL (OQ)

Es la prueba documentada que establece que el equipo es capaz de funcionar repetidamente dentro de los límites determinados y cumpliendo las especificaciones. Después de que la cualificación de la instalación y **de que la calibración** se hayan completado, es necesario determinar si el equipo o sistema trabaja como se pretendía entre los márgenes operativos. Son ensayos en dinámico es decir con la máquina “en marcha”.

Se hace basándose en dos tipos de ensayos:

1.- Recogida y registro de los valores actuales de los parámetros críticos del equipo, para cada fase, ciclo y punto de consigna, sin placebo.

En este ensayo se comprueba la funcionalidad de base que proporcionan los componentes eléctricos, mecánicos, de instrumentación, comandos de control y de telecomunicación (señalizaciones, secuencias de alarma, paros de emergencia, válvulas y bombas).

2.- Pruebas de puesta en marcha con placebo

Esta prueba es una simulación de las condiciones normales de trabajo. Se probarán las condiciones de trabajo normales, condiciones de trabajo escalonadas (con diferentes condiciones de sobrecalentamiento, sobrecarga, altas vibraciones, ...), alarmas, paros de emergencia.

Un método para obtener un plan control completo será utilizar un PROTOCOLO DE OPERACIÓN o PNT de utilización o Procedimiento de puesta en servicio. Este documento será el que marque los pasos y criterios de aceptación para certificar el sistema o equipo.

Todas las **características importantes de control del equipo** se deberían incluir en esta comprobación: usos, rpm, presiones, temperaturas, ciclos de tiempo y registradores de datos.

Además todos los **aspectos de seguridad** existentes deben controlarse, incluyendo dispositivos de protección (para el personal y el equipo) sistemas de cierre, indicadores y alarmas.

Generalmente se hace sin producto (con placebo) o en condiciones simuladas, incluyendo los límites extremos o anómalos que se puedan encontrar en una operación normal. En esta cualificación interviene el personal usuario (mecánicos, operadores, técnicos,...).

1.6.4.1 EJEMPLO DE INFORME PARA: CUALIFICACIÓN OPERACIONAL

Los apartados que incluirá son:

- 1.- PNTs APLICABLES
- 2.- LISTA DE PRODUCTOS CON QUE SE UTILIZARÁ EL EQUIPO
- 3.- DESCRIPCIÓN DEL PROCESO
- 4.- VARIABLES CLAVES DEL PROCESO
- 5.- EQUIPO AUXILIAR NECESARIO PARA REALIZAR LAS PRUEBAS
- 6.- CALIBRACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS o certificado de calibración
- 7.- CALIBRACIÓN DEL EQUIPO auxiliar o certificado de calibración
- 8.- VARIABLES DEL PROCESO A CONTROLAR; objetivo, criterios aceptación (valores recomendados), procedimientos
- 9.- PRUEBAS DE VALIDACIÓN: tres pruebas con placebo en condiciones más adversas dentro de las condiciones de trabajo normales (carga máxima, mínima exposición, vibración ...) => demostrarán que el proceso es reproducible y homogéneo.

1.6.5 CUALIFICACIÓN DE PRESTACIÓN (PQ)

Programa documentado para demostrar que una operación, cuando se lleva a cabo entre unos parámetros determinados, cumplirá perfectamente la función propuesta y cumplirá los criterios de aceptación predeterminados repetitivamente, para cada una de las localizaciones y situaciones previstas (funcionamiento normal y extremo).

Una vez transcurrido cierto tiempo de funcionamiento, es necesario demostrar que el sistema se ha mantenido y calibrado de forma adecuada con el fin de no perder las especificaciones funcionales.

1.6.6 ANÁLISIS E INFORME

Tras el cumplimiento y verificación satisfactoria de cada control y certificación, se redacta un informe completo compilado incluyendo los resultados, fallos, revisiones, puntos mejorados, mejoras a realizar en un futuro y las conclusiones completas.

DICTAMEN FINAL: según las conclusiones parciales de cada fase.

1.6.7 CERTIFICACIÓN

El paso final es tener el equipo y sistema certificado y aceptado por el Comité de Validación. En este momento la instalación está validada e inspeccionable según las NCF por la FDA o la UE.

Archivo: Responsable de Validación.

1.7 OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE FABRICACIÓN

Otro concepto relacionado con la validación es la optimización de los procesos. Realmente, hoy nadie se conforma con sólo validar un proceso, siempre se intenta optimizar a la vez el procedimiento de elaboración, con lo cual se aporta alguna ventaja o mejora al proceso de fabricación sin alterar sus especificaciones fundamentales (dosis, biodisponibilidad, etc.) en caso de productos existentes o si son nuevos buscando una mayor eficacia y rentabilidad del proceso. Así, **optimizar, será obtener una eficiencia máxima del proceso manteniendo el estándar de calidad**. La idea *“siempre debería considerarse la posibilidad de que haya una forma distinta de hacerlo mejor”* (44) es una idea muy válida a tener en cuenta en los trabajos de validación, con lo cual debería aplicarse esta metodología de optimización en las revalidaciones periódicas o revalidación por cambios. Por otra parte no debe perderse la idea de que *“un proceso óptimo es aquél que permite obtener un producto con la calidad establecida al mínimo coste”* (44); con lo cual no sólo es interesante desde un punto de vista farmacéutico sino que la optimización es imprescindible para cualquier proyecto. Es la gran respuesta de la validación a las personas que en sus inicios la vieron como una traba a la competitividad económica de la empresa. Realmente la optimización demuestra que *“la calidad es barata”* (15).

La optimización industrial que ha venido aplicando la industria automovilística y aeronáutica en la que la premisa “fabricar al mínimo coste con el nivel de calidad exigido”, desde antaño ha sido una visión

respetada y reconocida por la sociedad, con lo cual puede servir de ejemplo para la industria alimentaria y farmacéutica.

La calidad de diseño debería establecerse tan pronto como fuese posible durante la fase de desarrollo, porque los cambios lote a lote cuestan tiempo y dinero. La experiencia adquirida de tales cambios conforma el proceso de optimización, pero no puede definirse como validación. Un proceso con continuos cambios y que no ha sido exactamente fijado no puede ser validado **(45-47)**. Es necesario, entonces, aunar los objetivos del departamento de desarrollo e investigación galénica con los tradicionales de un proceso de optimización **(48-49)**, para dar lugar a unos resultados que deberían ir en torno a:

- Confirmación de la fórmula y forma farmacéutica.
- Confirmación para empezar la fabricación de los lotes industriales.
- Descripción y fijación del proceso (parámetros de calidad, proceso, etc.).
- Bases para desarrollar la validación.

Los objetivos del desarrollo son establecer las especificaciones del producto, la calidad de diseño, los parámetros críticos, los parámetros control de proceso, las vías de optimización y de escalado del proceso.

Los objetivos de optimización son:

- Encontrar los posibles puntos críticos de la formulación durante el desarrollo de la fórmula para evitar que aparezcan más tarde.
- Mejorar, dentro de lo posible, los aspectos de calidad del producto.
- Marcar tolerancias para los parámetros de proceso.
- Mejorar el procedimiento de fabricación hacia un ahorro económico. Ejemplos de parámetros para optimizar son: flujo de un granulado, tiempos de disolución, tiempos de disgregación, otros parámetros farmacotécnicos, etc.

Por lo tanto, muchas veces se ha considerado la optimización del proceso como una consecuencia natural del estudio de validación, que ha sido tratado científicamente en base a las variables del proceso y su control **(50)**.

1.8 HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS ÚTILES PARA LA VALIDACIÓN Y LA OPTIMIZACIÓN FARMACÉUTICA

Hay muchas herramientas que pueden utilizarse como parte de una validación (51-53): cartas de control, estudios de capacidad, diseño de experimentos, análisis de tolerancias, diseño de métodos robustos, análisis modal de fallos y efectos, planes de muestreo y pruebas de fallos. Se ha preparado un resumen de las mismas en el cuadro 8.

Aunque es útil detenerse en las causas de las **no conformidades** del laboratorio farmacéutico, éstas suelen ocurrir por **errores** que cometen los operadores (entonces evitables) o por **exceso de variación del proceso** (más difíciles de evitar). Obtener un proceso que cumpla repetitivamente las especificaciones requiere una aproximación equilibrada usando herramientas de pruebas de fallos y de reducción de la variabilidad. Cuando una falta de conformidad ocurre a causa de un error, debería utilizarse métodos de pruebas de fallos. Estos métodos intentan hacer imposible que ocurra un error o al menos que si ocurre no sea indetectable.

Sin embargo, algunas no conformidades no son resultados de errores, sino que son resultado de variabilidades excesivas del proceso. Para reducir la variación y dirigir adecuadamente un proceso se requiere identificar el proceso y sus características controlando las entradas variables (inputs) y estableciendo controles en dichas entradas para asegurar que las salidas (outputs) cumplan los requerimientos. Una respuesta del plan de validación es el desarrollo de un plan de control: la fase final del proceso de validación requiere demostrar que el plan funciona (es decir que el proceso proporciona los resultados previstos). Una herramienta será el estudio de **capacidad de calidad de un proceso o de una máquina (54-58)** concreta. Un estudio de capacidad mide la aptitud para cumplir la especificación repetitivamente¹¹. Esta herramienta es apropiada para características mensurables donde la ausencia de conformidad se debe a variaciones fuera de control o a la variabilidad del proceso. El análisis debe realizarse no sólo en condiciones normales, sino también para las condiciones peores (worst case); así en caso de errores potenciales durante la fabricación, las pruebas pueden demostrar que los métodos designados para prevenir los errores funcionan.

Los índices de capacidad de máquina relacionan las tolerancias del producto (C_p) o el nivel de centraje de la

¹¹ Demostrar que los datos numéricos generales para cada parámetro crítico están entre los límites estadísticos de control (es decir ± 3 desviaciones estándares) y que no existe una causa de variación asignable al proceso.

máquina en el valor nominal (C_{pk}) con la capacidad de la máquina respecto a la variable estudiada. Se considera que un proceso es capaz siempre que el índice supere la unidad. Aunque actualmente el grado de exigencia de calidad en el sector farmacéutico impone que supere 1,33 para decir que una máquina es capaz ($\pm 4\sigma$), mientras que para el proceso se asigna 1,0 ($\pm 3\sigma$). En otras industrias incluso se requiere superar 1,67 ($\pm 5\sigma$) y las últimas tendencias en ingeniería de calidad requieren 2 ($\pm 6\sigma$).

$$C_p = \frac{LTS - LTI}{6\sigma}$$

$$C_{pk} = \text{valor mín} \left[\frac{LTS - m}{3\sigma} \right] \text{ ó } \left[\frac{LTI - m}{3\sigma} \right]$$

LTS = Límite tolerancia superior

LTI = Límite de tolerancia inferior

m = media del proceso

σ = desviación estándar del proceso.

El C_{pk} indica la dispersión del proceso además de controlar que no se excedan las especificaciones, ya que un proceso descentrado puede dar un valor de C_p mayor de uno y sin embargo existir valores que se salgan del intervalo de tolerancia.

Cuanto más centrado se encuentre el proceso más se acercará la media al valor nominal, por lo que C_{pk} , siempre será menor que C_p , pudiendo llegar a ser cero, si estuviese el proceso centrado sobre un extremo del intervalo de tolerancias y negativo si se encontrara fuera de tolerancias.

Los planes de muestreo pueden usarse para optimizar el número de muestras que han de ser controladas y demostrar con ellas que se cumple la especificación. Una nueva tendencia en ingeniería de calidad es plantear que el proceso esté centrado en la especificación y que a cada lado del valor nominal quede un margen de 6 sigmas (es decir 6 desviaciones estándares del proceso), lo cual aseguraría que el 99,999 % de la producción cumplirá tolerancias o lo que es lo mismo sólo 0,002 unidades por millón de las producidas tiene probabilidad de ser defectuosa lo que es lo mismo que decir que habrá cero defectos; el problema para aplicar esta metodología en el laboratorio farmacéutico es que es muy difícil o improbable que las máquinas tradicionales lo cumplan, ya que algunas ya presentaban problemas para cumplir tres sigmas a cada lado del valor nominal, en este caso (considerado correcto a principios de los 90) la seguridad aceptable era que si se cumplía el 99,73% de los productos probablemente serán correctos, pero según la probabilidad 2700

productos de cada millón serán defectuosos respecto a esta especificación (59), número inaceptable para otras industrias (electrónica, aeronáutica,...) pero no para la industria farmacéutica.

El objetivo se basará, para las características medibles de los productos farmacéuticos, en optimizar la media y reducir la variación del proceso. Optimizar el proceso puede ser centrarlo, maximizar o minimizar la media según convenga. Pero en todos los casos se requiere asegurar que todas las unidades están dentro de especificaciones. Reducir las variaciones requiere que se alcance un proceso capaz y estable y que se mantenga entre especificaciones. A pesar de la gran variedad de herramientas estadísticas aplicables a la validación y optimización de los procesos, es de resaltar que la mayoría de trabajos publicados para la optimización de comprimidos utilizan el diseño factorial (60, 61) y las superficies de respuesta (62) por su sencillez y fácil aplicación, frente a otros métodos de mezclas o combinatorias más elaboradas (63, 64).

HERRAMIENTA	CARACTERÍSTICAS DE LA HERRAMIENTA	APLICACIÓN EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA
Plan de muestreo estadístico	Mediante una muestra representativa se rechaza o aprueba un lote de producto	El resultado permite dar resultados del tipo: “con un 95% de confianza el defecto está por debajo del 1%”.
Estadística paramétrica (t Student)	Estudio estadístico para determinar si existen diferencias significativas entre resultados, muestras de poblaciones, etc.	Decidir si existen diferencias significativas entre operadores, dosificadores, etc.
Análisis de la media (ANOM)	Estudio estadístico para determinar si existen diferencias significativas entre instrumentos, etc.	Decidir si existen diferencias significativas entre operadores, dosificadores, etc.
Análisis de la variancia (ANOVA)	Estudio estadístico para determinar si existen diferencias significativas entre instrumentos, etc.	Decidir si existen diferencias significativas entre operadores, dosificadores, etc. Para demostrar que los resultados obtenidos cumplen las especificaciones.
Estudios de capacidad del proceso	Se toman pequeñas muestras durante el proceso, se calcula la media y su intervalo y se representan gráficamente respecto al tiempo. Indicadores: C_p y C_{pk} ⁽¹²⁾ .	Para determinar si los procesos o equipos son estables: media centrada y variación pequeña.
Control de fallos	Se provocan fallos en el proceso para estudiar que reacciona de forma correcta.	Útil para comprobar la estabilidad y fiabilidad del proceso bajo control ante “el peor caso posible” (WORST CASE).
Intercambio de componentes (PCA)	Se comprueban qué causas provocan la diferencia entre dos unidades de producto, introduciendo reducciones en los componentes. El análisis se lleva a cabo mediante tablas y gráficas especialmente diseñadas.	Útil para determinar variables críticas más importantes del proceso.
Gráfica de control	Para detectar cambios de condiciones durante el proceso. Se toman 5 unidades consecutivas, se calcula su media y su intervalo y se registran gráficamente. En la gráfica se dibujan los límites de control, entre los que se deben mantener los puntos; si se superan indicarán que ha existido un cambio y por lo tanto debe ser investigado para determinar y anular la causa. La estabilidad de la media indica si el proceso cambia, mientras que la estabilidad en el intervalo indica que la variabilidad del proceso no aumenta.	Útil en validación retrospectiva y concurrente, para determinar las causas de variación del proceso.
Diseño de experimentos (doe)	Supone introducir cambios controlados en 1 o 2 variables del proceso y comprobar	Optimización de fabricación y en el desarrollo de formas farmacéuticas: encontrar las variables que más afectan a la

¹² Cumplir un $C_{pk} > 1,33$ implica que el proceso puede dar 64 productos no conformes sobre 1 millón de producidos.

		el cambio en 1 o 2 respuestas del proceso, para establecer la relación más interesante. Utiliza: investigación de experimentos, estudios de superficie de respuesta y el análisis de la variancia.	calidad.
APROXIMACIÓN AL DISEÑO ROBUSTO POR RESPUESTA DUAL		Se realizan estudios de superficie de respuesta para modelar la media y la variación del proceso por separado. Los resultados se utilizan para obtener márgenes de las variables que minimicen la variación y centren la respuesta en el intervalo de control.	Optimización de fórmulas y de fabricación.
ANÁLISIS DE CAUSAS Y EFECTOS (FMEA)		Análisis sistemático de fallos potenciales. Incluye la identificación de modelos de fallos, determinación de causas y consecuencias y el desarrollo de un análisis de riesgos asociados. Incluye establecer un plan de control detallado y el registro de las acciones correctoras y controles implementados. Se inicia desde el nivel de componentes (enfoque desde arriba) empezando con fallos potenciales y desarrollándolo hasta sus consecuencias.	Útil en el diseño del proceso para identificar problemas potenciales.
ÁRBOL DE ANÁLISIS DE FALLOS o "DIAGRAMA DE ESPINA DE PEZ"		Se listan las posibles consecuencias y se investigan hasta acabar en las causas. Los factores (y sus distintos niveles) que pueden influir en la calidad o consistencia se listan y ensayan para conocer su efecto sobre la variable final.	Caracterización del proceso: determinar las variables críticas, para eliminar las causas de problemas.
ESTUDIOS CALIBRACIÓN	DE	Se estudia la precisión y exactitud de un equipo de medida y la reproducibilidad con respecto a diferentes operadores.	Imprescindible para cualquier resultado farmacéutico.
MÉTODOS DE ENSAYO DE ERRORES	DE	Se disponen autocontroles o verificaciones dentro del proceso que hacen imposible que ocurra un defecto o que si ocurre sea imposible que no se detecte.	Útil en control de proceso, al detectarse se para la máquina.
HISTOGRAMAS, GRÁFICO MULTIVARIANTE O DE PARETO ¹³		Gráficamente se determina cual es la principal causa de variación del proceso para su control.	Útil para determinar las características críticas del proceso y eliminar las causas principales de error.
ESTUDIO DE SUPERFICIES DE RESPUESTA		Modelo basado en establecer relaciones entre los valores de las variables de entrada y sus respuestas en las variables de salida. El proceso se experimenta en diferentes sentidos (denominados diseños factoriales/trials) y se establece la ecuación que ajusta la relación entre variables de entrada y de salida. La ecuación se utiliza para buscar la	Muy útil en diseño factorial, para desarrollo de formas farmacéuticas. Útil para la optimización del n° de variables para control

¹³ Pareto demostró que el 80% de la variación de un proceso es causada por sólo el 20% de las variables.

		relación óptima usando los métodos de diseño robusto y estableciendo intervalos operativos usando análisis de tolerancias. El número de ensayos dependerá del número de variables a estudiar, por lo que es importante introducir las mínimas variables de entrada pero asegurando que sean las críticas, ya que si no el estudio perdería valor. Para ello se suele utilizar un estudio previo (screening) para determinar las variables críticas.	del proceso.
DISEÑO ROBUSTO		Se trata de reducir las variaciones basándose en ajustar los blancos (targets). El objetivo se propone seleccionar los blancos para las entradas de manera que resulte un cumplimiento con una mínima variación (incluye los tres siguientes).	Muy útil en diseño factorial, para desarrollo de formas farmacéuticas. Útil para la optimización del nº de variables para control del proceso.
ANÁLISIS TOLERANCIAS	DE	Implica desarrollar un diseño experimental para modelar la media de la variable de salida y entonces usando una aproximación estadística al análisis de tolerancias predecir la variación de la variable de salida. Requiere estimar la cantidad que las variables de entrada variarán durante la fabricación a largo término.	Muy útil en diseño factorial, para desarrollo de formas farmacéuticas. Útil para la optimización del nº de variables para control del proceso.
SELECCIÓN EXPERIMENTOS DISEÑOS FACTORIALES FRACCIONADOS (29, 34)	DE O	El objetivo principal es determinar las variables críticas. Se desarrolla el experimento con diferentes valores para las entradas (ensayos) y medir los resultados en las variables de salida. Con esto se puede definir que variables de entrada afectan a los resultados. Normalmente se necesitan dos ensayos por variable y así se simplifica el tiempo, se recomienda empezar con todas las posibles variables hasta encontrar las importantes. Las superficies de respuesta ayudan a determinar estas relaciones.	Determinar las variables críticas del proceso.
MÉTODO DE TAGUCHI		Se desarrollan diseños experimentales para entender profundamente la relación entre las entradas y las respuestas en la media y la variación. Los resultados se utilizan para centrar la media y disminuir la variación. En este caso las entradas deben variarse con pequeñas modificaciones de unas a otras para parecerse a una fabricación.	Muy útil en diseño factorial, para desarrollo de formas farmacéuticas. Útil para la optimización del nº de variables para control del proceso.
ANÁLISIS TOLERANCIAS	DE	Se establecen márgenes de trabajo para las variables de entrada que aseguren que los resultados serán conformes. Es necesario disponer de una ecuación que relacione entradas y salidas (si no es posible utilizar una superficie de respuesta). Deben establecerse intervalos (mediante estudios de capacidad) para las entradas que deben controlarse y comprobar el intervalo para los resultados. Si el intervalo no entra en las tolerancias del proceso, se deben estrechar los intervalos de las entradas hasta	Optimización del proceso de elaboración y su autocontrol.

	conseguir que los resultados entren dentro de tolerancias.	
ANÁLISIS DE LA VARIANCI DE COMPONENTES	Se estima la contribución a la variabilidad de diferentes superficies de variación.	
REGRESIÓN MÚLTIPLE	Se busca la mejor relación variable y respuesta.	Conocer las variables independientes del proceso.
GRÁFICAS DE BURBUJA	Representación gráfica de 4 variables del experimento.	Conocer el proceso y la incidencia de las variables en el mismo.
FUNCIÓN ANDREW'S	Se calcula una función que relacione los experimentos.	Optimización, separación de grupos.

Cuadro 8: Herramientas estadísticas útiles para la validación u optimización farmacéutica.

1.9 ¿Y DESPUÉS DE LA VALIDACIÓN QUÉ...?

Después de lo expuesto, se puede comprobar la incidencia e implicación económica de las validaciones en la rentabilidad empresarial del laboratorio farmacéutico; tanto el trabajo como los recursos destinados a la validación como el desembolso al adquirir nuevos equipos están perfectamente compensados por la seguridad de obtener un producto final de calidad.

El principal objetivo de cualquier empresa, farmacéutica o no, es producir productos de calidad al mínimo coste posible. Para lograr este objetivo la filosofía de la validación es esencial. En la industria farmacéutica utiliza materiales caros, instalaciones y equipos sofisticados y personal altamente cualificado, todo lo cual hace imprescindible el uso eficiente de estos recursos para la supervivencia de la compañía. El coste de los fallos de producto (rechazos, reprocesos, retiradas, reclamaciones) es una parte significativa del coste directo de producción. Y éste es uno de los únicos puntos de que se dispone para mejorar la productividad (50) y la competitividad en la industria del futuro. La industria farmacéutica y su ámbito está movilizada para definir y realizar una mejor validación con un mínimo coste (65).

La experiencia demuestra que la necesidad de validar debe unirse a otros ámbitos de la industria:

- Integración de las estrategias de validación en la estrategia industrial y económica.
- Transferencia o reagrupamiento de lugares de producción con modificaciones o revalidaciones de los equipos. Puntualizar claramente las modificaciones y su documentación para hacerlos conforme a la reglamentación en vigor. Establecer la estrategia de validación para una transferencia o cambio de equipo, de ingredientes, de tamaño de lote, etc. Analizar y definir la necesidad real de la validación y ejecutar la validación.
- Nuevos sistemas de soporte de validación para equipos complejos proporcionados por proveedores (por ej. máquinas de comprimir automatizadas, líneas de acondicionado, etc.).
- La liberación paramétrica para un proceso del cual está totalmente controlada su evolución.

Y como consideración final, vale la pena reflexionar sobre las consideraciones transmitidas por el profesor Cemeli en la conclusión de su capítulo (11):

*“...la validación tiende a garantizar la calidad del medicamento. Exige un cúmulo de requisitos que deben cumplirse en cada momento de fabricación y control, a base de comprobaciones **lógicamente** establecidas y **rígidamente** verificadas. No obstante **no constituye innovación en modo alguno**, pues desde siempre la industria farmacéutica consciente de su grado de responsabilidad, ha actuado en el sentido de vigilar y mejorar la calidad del medicamento”.*

1.10 BIBLIOGRAFÍA

- 1** Rudolph JS. Validation of solid dosage forms. En: Berry IR y Nash R, editores. Pharmaceutical process validation. New York: Marcel Dekker; 1993. p. 167-190.
- 2** La Validación de la teoría a la práctica. Actas del X Encuentro de AEFI: 5-7 octubre de 1989. Toledo, 1989. p. 9-20, p. 79-101.
- 3** Berry I. Process validation: practical applications to pharmaceutical products. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1988; 14 (2&3): 377-389.
- 4** Baudrand B. Présentation du thème. *STP Pharma Pratiques* 1997; 7 (5): 326.
- 5** Ylla-Català M. La validación un reto actual. Normas para la práctica de una correcta validación. *Ciencia e Industria Farmacéutica* 1983; 2(2ª época) (1): 25-28.
- 6** Nash R. Process validation for solid dosage forms. *Pharmaceutical Technology* 1979; 3 (June): 105-107.
- 7** Edwards C. Validation of solid dosage forms, the FDA view. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1989; 15 (6&7): 1119-1133.
- 8** Totzlaff Rf, Sheperd. RE, Loblan AJ. The validation story: perspectives on the systematic GMP inspection approach and validation development. *Pharmaceutical Technology* 1993; (march): 100-116.
- 9** La validación, una contribución a la mejora de la Calidad en la Industria. VI Jornadas Nacionales de AEFI. Pamplona, 1985.
- 10** Cemeli J. La validación: una filosofía y un sistema. La validación. VI Jornadas Nacionales de AEFI. Pamplona, 1985.
- 11** Cemeli J. Validación de procesos y análisis de medicamentos. En: Faulí Trillo C. Tratado de Farmacia Galénica. Madrid: Ed Luzán; 1993. p. 115-123.
- 12** Dalmau R, Suñé Negre JM^a, Cemeli J. Control de calidad en la industria farmacéutica: concepto de validación. *Industria Farmacéutica* 1989; IV (3): 85-91.
- 13** Salazar R. Aplicación del concepto de Calidad Total a la Industria Farmacéutica. Real Academia de Farmacia de Barcelona, discurso de recepción. Barcelona: Romargraf S.A., 1991.
- 14** Salazar R. Normas de Correcta Fabricación de medicamentos y normas de Buenas Prácticas de Laboratorios. En: Faulí C. Tratado de Farmacia Galénica. Madrid: Ed Luzán; 1993. p. 105-113.
- 15** Salazar R. Introducción al estudio de la validación: concepto y generalidades. Validación Industrial. Barcelona: Romargraf. 1999. p. 9-70.
- 16** Chemtab C. Principes généraux de la validation des procedés de validation. *STP Pharma Pratiques* 1995; 5(3): 222-228.
- 17** Skepnek E. FDA validation and certification. The righth way. *STP Pharma Pratiques* 1991; 1 (6): 641-646.
- 18** Neal C. Back to the basics. A philosophical overview. *Journal of Validation Technology* 1997; 3 (3): 281-283.
- 19** Salazar R. Validación de procesos en la fabricación de formas farmacéuticas no estériles: coordinador. Seminario del Programa Superior de Formación Farmacéutica. Formación continuada Les Heures. Universidad de Barcelona. Barcelona. Marzo 1997. Ponentes: Amela J, Bas E, Ylla-Català M, Raboso F, Salazar R.
- 20** Chapman KG. A suggested validation lexicon. *Pharmaceutical Technology* 1983; 7: 51-57.
- 21** Murray S. Couper. Quality control in the pharmaceutical industry. London: Ed. Academic Press. 1979 p. 2-7.
- 22** Chapman K. Worlwide opportunities though validation. *STP Pharma Pratiques* 1992; 2 (5): 415-422.
- 23** Lieberman A, Lachman L, Swartz J. Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. 2ª Edición. New York: Marcel Dekker; 1990.
- 24** Morris JM. Development pharmaceuticals and process validation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1990; 16 (11): 1749-1759.
- 25** Acquier R. De la maîtrise à l'anticipation. *STP Pharma Pratiques* 1997; 7 (5): 327-331.
- 26** Guidelines on General Principles of process Validation. Food & Drug Administration. May 1987.
- 27** Normas de Correcta Fabricación de medicamentos. Vol IV. Oficina de publicaciones oficiales de las Comunidades Europeas. Luxemburgo. 1992.
- 28** Roman S. Pourquoi valider et comment valider?. *STP Pharma Pratiques* 1997; 7 (5): 332-338.
- 29** Shein-Chung Chow, Jen-Pei Lin. Statistical design and analysis in pharmaceutical science. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 8-22, p. 199-217.
- 30** Chapman KG, Amer G, Boyce G, Brower G, Green C, Hall W, Larpaz D, Mullendore B. Proposed validation standard VS-1. *Journal of Validation Technology* 2000; 6 (2): 502-509.
- 31** Jeater JP, Jacobs RA. Validation of new formulations. En: Carleton FJ, Agalloco JP. Validation of aseptic pharmaceutical processes. New York: Marcel Dekker; 1986. p. 507-525.
- 32** Bolton S. Pharmaceutical Statistics. New York: Marcel Dekker; 1997. p. 490-514.
- 33** Philippon F. FDA et inspection, cGMP et BPF: differences et similitudes. *STP Pharma Pratiques* 1996; 6 (5): 374-377.
- 34** Veit E. Use of statistic to increase validation efficiency. *Journal of Validation Technology* 1996; 2 (3): 207-214.
- 35** Tazón F, Alonso MJ. Validación de instalaciones Industriales. Seminario del Programa Superior de Formación Farmacéutica. Formación continuada Les Heures. Universidad de Barcelona. Barcelona, 10 de Diciembre 1998.
- 36** Lerin I, Salazar R, Suñé JM, Tico JR. Validación de sistemas de

- tratamiento de agua en la industria farmacéutica (I). *Industria Farmaceutica* 1999; XIV (5): 97-106.
- 37** André T, Baner T, Fontaine L, Guillebert D, Menozzi P, Michel P, Nacher F. Guide de qualification d'un équipement dans les industries de la Santé. *STP Pharma Pratiques* 1999; 9 (3): 212-224.
- 38** King PG. Process Validation for New Processes. *Journal of Validation Technology* 1998 4 (3): 234-242.
- 39** Fuller R. Compliance and validation: a two-year retrospective look at GMP deficiencies. *Journal of Validation Technology* 1998 4 (4): 309-318.
- 40** King J. A practical approach to equipment validation. *Journal of Validation Technology* 1997; 4 (1): 84-89.
- 41** Vincent DW, Revie D. The validation life cycle of a biotechnology derived drug (part III of a three-part series). *Journal of Validation Technology* 1999; 5 (4): 365-402.
- 42** Vincent DW, Revie D. The validation life cycle of a biotechnology derived drug (part II of a three-part series). *Journal of Validation Technology* 1999; 5 (3): 272-294.
- 43** Vincent DW, Revie D. The validation life cycle of a biotechnology derived drug (part I of a three-part series). *Journal of Validation Technology* 1998; 5 (2): 167-188.
- 44** Mañosa J, Gargallo A, Segado X, R Salazar (coordinador). Optimización de los procesos farmacéuticos. Seminario del Programa Superior de Formación Farmacéutica. Formación continuada Les Heures. Universidad de Barcelona. Barcelona, 15 de Diciembre 1998.
- 45** Derrieu PH, Deutsch J. Déroulement d'une validation: approche concrète. *STP Pharma Pratiques* 1997; 7 (5): 340-344.
- 46** Lingnau J. Optimization and validation of manufacturing processes. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1989; 15 (6&7): 1029-1046.
- 47** Porter SC, Versepunt RP, Cunningham CR. Process optimization using design of experiments. *Pharmaceutical Technology Europe* 1998; april: 44-52.
- 48** Doornbos D, DeHaan P. Optimization techniques in formulation and processing. En: J.Swarbrick, JC Boylan, editores. Encyclopedia of pharmaceutical technology. New York: Marcel Dekker; 11, 1995: 77-160.
- 49** Bolton. Statistical methods. En: J.Swarbrick, JC Boylan, editores. Encyclopedia of pharmaceutical technology. New York: Marcel Dekker; 14; 1996: 290-292.
- 50** Kieffer RG, Nally JD. Why validation?. En: Carleton FJ, Agalloco JP, editores. Validation of aseptic pharmaceutical processes. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1999. p.1-16.
- 51** GHTF Study Group 3. Quality Systems Drafts for comments. Process Validation compliance. 1998. *Journal of Validation Technology* 1998; 4 (2): 319-349.
- 52** Dills D. Quality Tools. Why use them with validation?. *Journal of Validation Technology* 1997 4 (1): 73-82.
- 53** Dills D. Quality Tools. Statistical Process control and its use in validation (II). *Journal of Validation Technology* 1998 4(2): 143-150.
- 54** Fuller. Process Capability Indices. *Journal of Validation Technology* 1997 3(5): 284-285.
- 55** Daley J. A practical approach to conducting capability studies. *Journal of Validation Technology* 1997 4(1): 31-37.
- 56** Kieffer R, Torbeck L. Validation and process capability. *Pharmaceutical Technology* 1998; (June): 66-76.
- 57** Nash RA. Understanding the process capability index concept. *Journal of Validation Technology* 1998; 4 (2): 152-160.
- 58** Liria J. Estudios de capacidad de proceso. XIX Symposium de AEFI. Barcelona, 1 diciembre de 1998: 149-158.
- 59** Pozueta L, Grima P, Tort-Martorell X: Seis sigma: "Nuevas ideas" para la mejora de la calidad. Cursos de Verano San Sebastián. Universidad del País Vasco. Agosto 2000.
- 60** Porter SC, Cunningham CR, Versepunt RP. Process optimization using design of experiments. *Pharmaceutical Technology* 1997; 21 (10): 60-70.
- 61** Timmins P, Delargy AM, Howard JR, Rowlands EA. Evaluation of the granulation of a hydrophilic matrix sustained release tablet. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1991; 17 (4): 531-550.
- 62** Iskandarani B, Clair JH, Patel P, Shiromani PK, Dempski RE. Simultaneous optimization of capsules and tablet formulation using response methodology. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1993; 19 (16): 2089-2101.
- 63** Wherlé P, Nobelis P, Stamm A. Principales méthodes d'optimisation employées en génie pharmaceutique. I. Les méthodes exploratoires. *STP Pharma* 1989; 5 (6/7): 481-489.
- 64** Wherlé P, Nobelis P, Stamm A. Principales méthodes d'optimisation employées en génie pharmaceutique. II. Les méthodes d'optimisation proprement dites. *STP Pharma* 1989; 5 (10): 661-673.
- 65** Leroux H, Tanu C. Validation. Maîtrise et stratégie. *STP Pharma Pratiques* 1997; 7 (5): 368-371.

Para su diseño se necesita establecer una modelización matemática del proceso que se pretende simular mediante la tecnología informática. Para ello, se ha escogido y desarrollado una formulación sencilla de la forma farmacéutica comprimidos, que fue dividida en diversos sistemas que, a su vez, fueron estudiados en profundidad (para lo cual se ha desarrollado la cualificación de todos los equipos que integran cada uno de los sistemas y la validación del proceso de fabricación y de análisis). Toda esta experimentación llevada a cabo en tiempo real, a fin de pormenorizar al máximo todas las pruebas, características y requerimientos que están establecidos para una especialidad farmacéutica habitual. Y ha servido para desarrollar algunas clases prácticas de laboratorio de dos asignaturas del departamento.

El Plan de Trabajo se ha establecido para cumplir los siguientes subobjetivos:

❶ Desarrollar una fórmula de comprimidos sencilla aplicable a las prácticas de la asignatura Farmacia Galénica II. Este desarrollo implica:

- *Fase de formulación*: en la cual se estudian las características de los ingredientes de la fórmula (capítulo 2).
- *Fase de desarrollo analítico*: en la cual se obtiene y optimiza un método de control validado para el principio activo y la forma farmacéutica desarrollada (capítulo 3).
- *Fase de desarrollo farmacotécnico (I): formulación y compatibilidad*: en la cual se desarrolla y ajusta la fórmula y se completan los estudios de compatibilidad (capítulo 4).
- *Fase de desarrollo farmacotécnico (II): cualificación del proceso*: en la cual se cualifican los equipos implicados en la producción (capítulo 5).
- *Fase de desarrollo farmacotécnico (III): optimización del proceso*: en la cual se establecen los márgenes de elaboración y de seguridad (capítulo 6).
- *Fase de validación prospectiva*: en la cual se fabrican y analizan tres lotes y se redacta la guía definitiva (capítulo 7).
- *Fase de validación retrospectiva*: en la cual se analizan los datos obtenidos en los lotes fabricados en las prácticas por alumnos de la licenciatura (capítulo 8).

❷ Desarrollar una técnica analítica sencilla y robusta aplicable a las prácticas de Farmacia Galénica III.

❸ Aplicar las Normas de Correcta Fabricación (NCF) en todo el proceso de fabricación (implementando

PNT¹, guías de fabricación,...) tanto en el SDM² (Servei de Desenvolupament del Medicament) como en los laboratorios de prácticas previamente mencionadas.

④ Cualificar y optimizar el proceso de fabricación de los comprimidos de paracetamol.

⑤ Validar el proceso de fabricación: prospectiva y retrospectivamente.

- validación prospectiva del proceso:

⊗ validación del método de análisis

⊗ validación del proceso de fabricación

- validación retrospectiva (análisis de los datos de los lotes fabricados por los alumnos):

⊗ datos de fabricación frente a datos de análisis

⑥ Obtener un modelo informático como base del programa de simulación multimedia del proceso de fabricación anterior.

⑦ Evaluar la Aplicación Interactiva Multimedia desarrollada.

⑧ Discusión y conclusiones.

Los planes de estudio universitarios se han ido reforzando con la voluntad de ofrecer a los estudiantes una enseñanza de calidad orientada a una formación adecuada a las perspectivas que demanda la sociedad. Las sucesivas reformas suponen la reorientación de los enfoques tradicionales, superando planteamientos exclusivamente teóricos, y aumentando el carácter aplicado de las materias. Con la utilización de las nuevas tecnologías multimedia, podrá disponerse de materiales pedagógicos capaces de ofrecer temas, detalles o información que escapa de los objetivos de la clase tradicional. Estos materiales facilitarán a los estudiantes otras vías opcionales de aprendizaje. Con la asistencia de estos materiales el profesor puede disponer de una gama de recursos considerablemente mayor, aunque la responsabilidad en estos momentos recae en los propios docentes, ya que los sistemas educativos no se adaptan a los cambios tecnológicos con la rapidez

¹ A partir de ahora se utilizarán las siglas NCF para hacer referencia a Normas de Correcta Fabricación y PNT para Procedimientos Normalizados de Trabajo.

² Planta piloto de la Universidad de Barcelona, Facultat de Farmàcia, inaugurada en 1996.

con que cambia su entorno y cuando lo han hecho de forma impuesta, han traído al aula la llamada “tecnofobia”.

Existen muchos ejemplos de la enseñanza multimedia con óptimos resultados. Los ámbitos más comunes o de mayor implantación de estas tecnologías a la formación son la educación de adultos y la educación escolar, aunque progresivamente están llegando a todas las áreas de la enseñanza, incluida la universitaria (1-7). Por otra parte, según la base de datos TESEO (del Ministerio de Educación Cultura y Deporte) en nuestro país se han defendido 40 tesis doctorales sobre la temática multimedia; 5 de ellas desarrollaron sistemas de experto especialmente dirigidos a la enseñanza de la medicina, más concretamente 3 a radiodiagnóstico y 2 simuladores para casos clínicos. Todas ellas concluyen la validez, adecuabilidad e idoneidad de la utilización de herramientas multimedia como material didáctico para la enseñanza a nivel universitario de materias de Ciencias de la Salud.

Otro punto interesante que aportan las tecnologías multimedia aplicadas a la educación es el económico: si se demuestra su validez para la enseñanza práctica, será posible formar a los profesionales en todos los campos de la tecnología farmacéutica¹... Con el presente trabajo se aporta un acercamiento real, práctico y útil que supone el aprovechamiento de las nuevas tecnologías de la información para la enseñanza universitaria de la tecnología farmacéutica y se investiga pedagógicamente la aplicabilidad del sistema y su validez.

En resumen en la presente memoria se estudiará en una primera fase la filosofía de la validación farmacéutica, las diferentes metodologías y aplicaciones aplicadas hasta el momento. La segunda fase la componen varios capítulos y servirá para definir el producto farmacéutico que servirá como base para la programación de la tercera fase. La última parte del trabajo está compuesta por el estudio de los precedentes tecnológicos a fin de transponerlos a la tecnología multimedia y analizar los resultados obtenidos con los grupos piloto de alumnos. Con lo cual el trabajo ha sido dirigido a mejorar y optimizar (y en consecuencia demostrar) que la tecnología multimedia es perfectamente aplicable a la enseñanza de las ciencias.

¹ Un ejemplo típico (prohibitivo por sus connotaciones de contaminación y coste) sería la fabricación de medicamentos estériles. Mediante la tecnología multimedia es posible disponer de unidades didácticas prácticas especialmente preparadas para la ejercitación de los futuros profesionales, con las cuales se podrá profundizar en el proceso tecnológico y en las Normas de Correcta Fabricación (NCF).

BIBLIOGRAFÍA:

- 1** Jornades de Creativitat a l'Ensenyament Universitari. Barcelona, 5-7 octubre del 2000
- 2** II Jornades Multimedia Educativa. Barcelona, 5-7 julio de 2000
- 3** 1er Congreso Internacional: "Docencia Universitaria e Innovación". Barcelona, 26-28 junio de 2000
- 4** Primera Trobada de Professors de Ciències de la Salut (20-21 /enero/2000). Campus de Bellvitge. Universitat de Barcelona.
- 5** IV Jornada sobre la Docència Universitària, dedicada al tema Noves Tecnologies en la Docència Universitària. Barcelona, 7 novembre del 2000.
- 6** Primera Jornada de la Reflexió a la innovació pedagògica en l'ensenyament de ciències aplicades a Farmàcia. Universitat de Barcelona. Facultat de Farmàcia. Barcelona, 13 de febrero de 1998.
- 7** I Jornades Multimèdia Educatiu. Institut de Ciències de l'Educació. Barcelona, 5-7 julio de 1999.

Capítulo 2:

DESARROLLO FARMACOTÉCNICO (I): FASE DE PREFORMULACIÓN

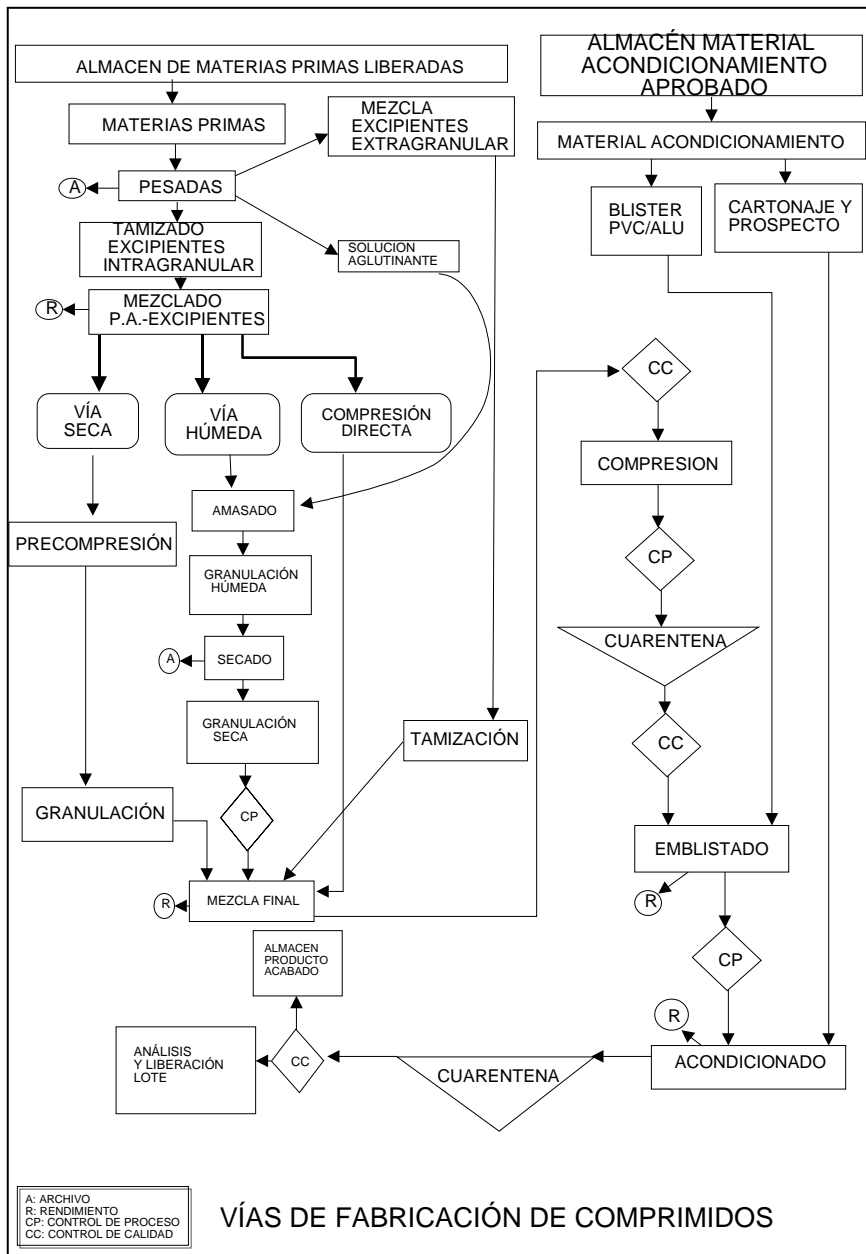
2.1. INTRODUCCIÓN: JUSTIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

Actualmente más de la mitad de los medicamentos se administran en la forma farmacéutica **comprimidos**. La justificación de ello radica en las numerosas ventajas que presenta frente a otras formas farmacéuticas, ya que desde un punto de vista industrial es la forma farmacéutica con una fabricación industrial más fácil a gran escala gracias al desarrollo de su mecanización. El principio de la fabricación de los comprimidos es muy sencillo, pero por contra su realización suele ser bastante compleja: no es suficiente con situar una dosis de polvo en una matriz de una máquina de comprimir y comprimirla con los punzones. Para obtener un comprimido es necesario que el polvo tenga unas propiedades físicas y mecánicas¹ muy específicas (**1, 2**).

El punto de partida, pues, se encuentra en desarrollar unos comprimidos reproducibles desde el punto de vista galénico, es decir que ante cualquier eventualidad de fabricación o control (por otra parte, hecho habitual en la enseñanza práctica de la galénica) no se malogre el obtener los comprimidos dentro de especificaciones. El proceso de desarrollo estudiado en detalle debe aportar datos suficientes para ser transcrito como un modelo matemático y así obtener una simulación de su proceso de fabricación. Toda

¹ Estas propiedades (1, 2) son: la capacidad de fluidez (libre y uniforme), la capacidad de apilamiento y la compresibilidad (capacidad de compresión).

formulación deberá pasar por unas etapas de optimización. Se inicia con una preformulación tentativa, en que se considera la dosis de principio activo y tamaño final del comprimido. Igualmente se tendrá en cuenta la finalidad del comprimido, las incompatibilidades entre los componentes y los caracteres reológicos de los mismos. Tras diversas aproximaciones sucesivas de perfeccionamiento, se llegará a la fórmula definitiva.



Cuadro 1: Secuencia de operaciones en la elaboración de comprimidos

Entre las diferentes posibilidades de principios activos, se escogió el **paracetamol**, por tratarse de una sustancia relativamente asequible y accesible, con suficiente bibliografía publicada tanto analítica como

galénica (3) para facilitar establecer un modelo. Al limitar la variabilidad del principio activo se pretendió evitar variabilidades aleatorias que pudieran influir en el establecimiento del modelo informático de simulación. Además este principio activo también es escogido repetidamente para modelar estudios de compresión (por ejemplo el estudio de varios almidones pregelatinizados, (4) y es uno de los principios activos más utilizados hoy en día en la práctica sanitaria. La dosis escogida fue 150 mg ya que es una dosis pediátrica de la que existen bastantes productos comercializados) e interesaba fabricar comprimidos pequeños para no elevar los costes de la práctica pero se quiso mantener el carácter de “realidad” (pedagógicamente es más motivador conocer que lo que se hace es útil..).

Se estableció como vía de fabricación, la granulación por vía húmeda acuosa, con la finalidad de que al ser una aplicación informática eminentemente educativa, los alumnos desarrollasen su formación con el método más completo, pudiéndose así estudiar más equipos y completar más controles de proceso (ver cuadro 1).

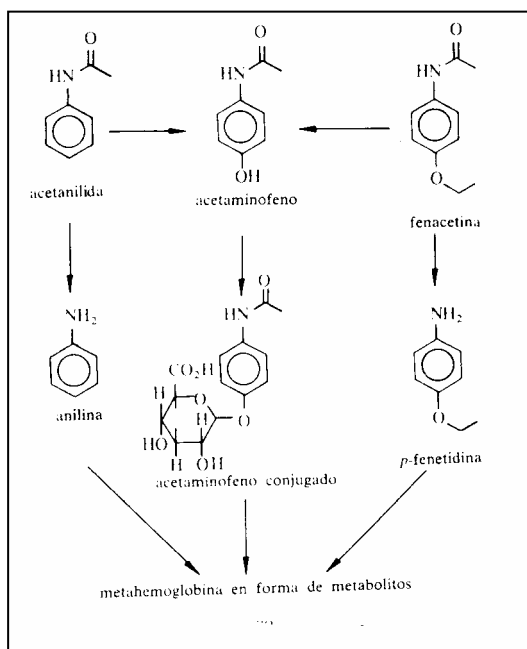
2.2. CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

2.2.1. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA (5-17)

Se trata de un derivado sintético del para-aminofenol, con propiedades analgésicas y antipiréticas, pero sin actividad antiinflamatoria. Se administra por vía oral o rectal en el tratamiento del dolor leve o moderado y para la fiebre. Es el analgésico de elección en pacientes para los cuales están contraindicados los salicilatos u otros antiinflamatorios no esteroídicos, tales como asmáticos, individuos con historial de úlcera péptica, o en niños en los que los salicilatos no se pueden utilizar debido al riesgo del síndrome de Reye. Por ello se le considera uno de los antitérmicos-analgésicos más seguros y eficaces de la farmacoterapéutica actual.

El paracetamol se usa extensamente como analgésico y antipirético, sobre todo en mezclas con otros analgésicos (ácido acetilsalicílico, fenazona, amidopirina, etc.), estimulantes (cafeína), antitusivos (codeína), etc. Se ha demostrado su eficacia en el tratamiento de dolores de tipo agudo, con lo cual constituye uno de los fármacos más utilizados para combatir procesos con dolor agudo de intensidad moderada y asociado con codeína para dolores intensos. También se recomienda para el tratamiento del dolor crónico (enfermedades reumáticas). Incluso la OMS lo considera tratamiento de primera elección farmacológica para el dolor neoplásico.

La estructura de acetaminofeno es la que le confiere actividad antipirética, pero la anilina posee elevada toxicidad para usarla en clínica. El acetaminofeno es el metabolito que se produce a partir de la acetanilida y la fenacetina (pero no se recomienda su uso ya que ambas producen metahemoglobina). Por ello se introduce un grupo aceto en el grupo amino para reducir la toxicidad manteniendo la acción antipirética (ver cuadro 2). El mecanismo de acción del paracetamol no está determinado totalmente. Actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas en el sistema nervioso central (SNC) especialmente en el tálamo y bloqueando la generación de los impulsos dolorosos a nivel periférico.



Cuadro 2: Metabolismo del p-aminofenol

La antipiresis se debe a la acción del paracetamol sobre el centro hipotalámico regulador de la temperatura del SNC, para producir una vasodilatación periférica que da lugar a un aumento del flujo de sangre a la piel, de sudoración y de pérdida de calor. La acción central puede incluir la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en el hipotálamo.

2.2.1.1. CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS (5-11, 18-20)

El acetaminofeno se absorbe rápidamente y casi por completo en el tracto gastrointestinal . Cuando se administran pequeñas dosis la absorción varía considerablemente con la velocidad de vaciado gástrico y la presencia de alimentos (en este caso se retrasa). Se distribuye de manera relativamente uniforme por la mayor parte de líquidos corporales (saliva,...), a excepción del adiposo y su conjugación a proteínas plasmáticas es de un 10%, siempre que se superen las concentraciones de 60 µg/ml en plasma.

Experimenta metabolismo de primer paso y se metaboliza principalmente por conjugación para formar glucurónidos, sulfatos o conjugados de la cisteína. La 3-hidroxilación también ocurre seguida de conjugación u o-metilación del grupo hidroxilo.

Las vías principales de biotransformación (por los enzimas microsómicos hepáticos) son:

- desacetilación: formando metabolitos que dan lugar a metahemoglobina y otros metabolitos tóxicos,
- acetaminofeno conjugado (glucuronato y sulfato).

Aproximadamente el 2% se excreta inalterado por la orina (cuadro 3). Los conjugados glucurónico (20-30%) y sulfato (40-60%) no son tóxicos y representan un 95% del producto excretado. Un 3% se oxida por el sistema citocromo P450 hepático a un intermediario químicamente reactivo (probablemente la N-acetilbenzoquinona o n-acetilbenzoquinoneimida) que se combina con el glutatión hepático para dar una sustancia atóxica: conjugado de la cisteína y el ácido mercaptopúrico.

En caso de dosis masivas únicas de paracetamol, el glutatión hepático se agota y el intermediario arilante (imidoquinona **(16)** reactivo en exceso se fija (hasta 10-12 días después de la dosis) mediante enlaces covalentes a las macromoléculas hepatocelulares ocasionando necrosis del tejido hepático.

METABOLITOS EXCRETADOS EN ORINA	
1-4 %	paracetamol inalterado
<1%	3-metiltio-4-OH-acetanilida
20-30%	conjugado sulfato
40-60%	conjugado glucurónico
5-10%	{ 3-OH-3-sulfato
	{ 3- metoxiglucuronato
	{ 3- metoxisulfato
5-10%	conjugado cisteína y ácido mercaptopurínico

Cuadro 3: Metabolitos del paracetamol.

También se ha descubierto un conjugado con cisteína y metabolitos producidos por hidroxilación y desacetilación. Los metabolitos hidroxilados son la base de la formación de la metahemoglobina y la hepatotoxicidad.

Los parámetros farmacocinéticos característicos son:

- biodisponibilidad: 75-90%
- semivida de eliminación: 1,5-3 horas
- $t_{\text{máxima}}$: 30-90 minutos
- aclaramiento total: 4,5-5,5 mg/kg /minuto
- volumen distribución: 1l/kg

2.2.1.1.1. CONCENTRACIÓN TERAPÉUTICA

En plasma, habitualmente entre 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones plasmáticas suelen variar según los individuos. En algunos sujetos con la función renal deteriorada se acumulan los conjugados glucurónico y sulfato.

2.2.1.1.2. REACCIONES ADVERSAS

A dosis terapéuticas, se observan ligeros aumentos de enzimas hepáticos sin ictericia y de tipo reversible. Se han descrito también lesiones cutáneas y muy ocasionalmente leucopenias de diversos tipos.

Una intoxicación aguda con una dosis única de 6 g o más, puede manifestarse con mareos, náuseas, vómitos, pérdida del apetito, dolor abdominal, somnolencia, confusión, hipotensión, sensibilidad hepática, arritmia cardíaca, ictericia e insuficiencia renal y hepática agudas, con necrosis hepática. En estos casos se emplea como antídoto la acetilcisteína en infusión intravenosa antes de transcurrir 8 horas después de la ingestión masiva.

El mecanismo de la intoxicación aguda, origina un cuadro tóxico de necrosis hepática, a veces complicado con lesiones agudas renales, cardíacas y pancreáticas. Dicha intoxicación se debe a la actividad del metabolito reactivo arilante N-acetilbenzoquinona, cuando se ha consumido el 70-78% del glutatión hepático y ya no puede fijar el metabolito, el cual reacciona con proteínas hepáticas. La dosis hepatotóxica en adultos es de 250 mg/kg/día y en niños no se deberían superar los 150 mg/kg/día.

2.2.1.1.3. INTERACCIONES

La absorción del paracetamol se acelera con metoclopramida. Su excreción puede verse afectada y las concentraciones plasmáticas alteradas cuando se usa junto con probenecid.

Potencia el efecto de acenocumarol y warfarina, e inhibe la acción de bromuro de glicopirronio y bromuro de propantelina. Potencia la toxicidad del cloranfenicol.

Su respuesta se ve alterada por barbitúricos y su efecto se inhibe por colestipol, colestiramina y estrógenos. Se incrementa su toxicidad por alcohol etílico y se aumenta el efecto y la toxicidad por isoniazida.

El paracetamol puede alterar valores analíticos en sangre, produciendo un aumento biológico de transaminasas (ALT y AST), fosfatasa alcalina, amoníaco, bilirrubina, creatinina, lactato deshidrogenasa (LDH) y urea; y un aumento por interferencia analítica de glucosa, teofilina y ácido úrico. En orina origina una reducción biológica por interferencia analítica de glucosa y un aumento por interferencia analítica de metadrenalina y ácido úrico.

2.2.1.1.4 SENSIBILIDAD CRUZADA

Los pacientes que presentan problemas con el ácido salicílico pueden no presentarlos al paracetamol, aunque se han descrito broncoespasmos causados por el paracetamol en algunos asmáticos sensibles al ácido acetilsalicílico.

2.2.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICO - QUÍMICA (6-8, 18-25)

Polvo cristalino, blanco, inodoro y ligeramente amargo. El paracetamol es un ácido débil.

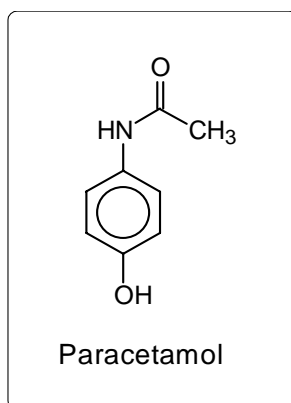


Figura 1: Fórmula del paracetamol

2.2.2.1. SINONÍMIAS

acetaminofeno,
p-acetamidofenol,
p-acetaminofenol,
p-acetilaminofenol,
N-acetil-p-aminofenol,
4'-hidroxiacetanilida,
p-hidroxiacetanilida,
4-hidroxifenilacetamida,
N-(4-hidroxifenil)acetamida,
N-p-hidroxiifenilacetamida.

2.2.2.2 NOMBRES GENÉRICOS

acetaminophen,

acetophenum,
 paracetamolum,
 paracetamol.
 CAS [103-90-2]

2.2.2.3. FÓRMULA MOLECULAR

$C_8H_9NO_2$ Pm: 151,16

2.2.2.4. COMPOSICIÓN ELEMENTAL (18-20)

C 63.56 % **H** 6.00 % **N** 9.27 % **O** 21.17%

2.2.2.5. SOLUBILIDAD (18-20, 26)

Soluble en 70 partes de agua y en 20 de agua hirviendo, en 7-10 partes de etanol, en 13 partes de acetona, soluble en metanol, dimetilformamida, dicloruro de etileno, acetato de etilo y en soluciones de hidróxidos alcalinos. Muy ligeramente soluble en cloroformo (1 en 50) y prácticamente insoluble en éter, éter de petróleo, pentano, benceno y diclorometano. Una solución acuosa saturada presenta un pH entre 5,1 y 6,5, a 25 °C (ver cuadro 4).

DISOLVENTE	TEMPERATURA	SOLUBILIDAD mg /ml
AGUA	20	11,3-14,5
	25	11,66-13,85
	37	19,20
SOL. REGULADORA pH 6,0	100	52
	37	23,8

Cuadro 4: Datos sobre la solubilidad del paracetamol.

2.2.2.6. PUNTO DE FUSIÓN

Dependiendo de la monografía que se trate se especifican intervalos más anchos 168- 172°C (26) o más estrechos 169- 170,5 °C (18-20).

2.2.2.7. CONSTANTE DE DISOCIACIÓN (18-20)

pK_a 9,5 (25 °C)

2.2.2.8. DENSIDAD (18-20)

d_{21°C} = 1,293

2.2.2.9. ANÁLISIS TÉRMICO DIFERENCIAL (DTA) (19, 20)

Endoterma de fusión sobre 171 °C

2.2.2.10. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) (19, 20)

Endoterma de fusión sobre 171 °C (ver figura 11, más adelante).

Calor latente de fusión: 6.8 kcalorías /mol.

2.2.2.11. ENSAYOS COLORIMÉTRICOS (18, 27)

REACTIVO	COLORACIÓN	λ MEDIDA	DE REF
Cloruro férrico	Violeta – Azul	-	(18, 19)
Reactivo de Nessler	Pardo ²	-	(18)
Reactivo Liebermann's	Violeta	-	(18)
Solución etanólica de α -naftol en medio alcalino	Verde	420 nm	(27, 28)
Aril acilamidasa y cresol cobre amoniaco	No indicada	615 nm	(20)
4N-HCl diluido con agua	No indicada	395 nm	(20)
5% de ácido tricloroacético y Sol. 1% de ortocresol y 4M-NH ₄ OH	No indicada	615 nm	(20)
0.05N HCl y NaClO y Sol. 2% de fenol	Azul	625 nm	(20)
Etanol, Sol. de NaClO, 0.1N HCl, 0.4% NaAsO ₂ y Sol. 6% fenol	No indicada	625 nm	(20)
4N NaOH, 2M-cloruro de hidroxil amonio y 6% FeCl ₃	No indicada	520 nm	(20)
Oxidación espontánea de mezclas alcalinas de 4-aminofenol y fenol	No indicada	625 nm	(20)
10% HCl, 0.1M-K ₃ (CN) ₆ , 0.1M-fenol, y 5% NaOH	No indicada	627 nm	(20)
HNO ₂	No indicada	430 nm	(20)
2-nitroanilindiazotizado	Roja	520 nm	(20)
Ciocalteau-Folin	Azul	660 nm	(23)
Cl ₃ CCOOH	Azul	620 nm	(20)

Cuadro 5: Relación de métodos colorimétricos utilizados para el análisis del paracetamol.

2.2.2.12. SÍNTESIS INDUSTRIAL (17, 19, 20, 29)

Existen diversas vías de obtención del paracetamol, aunque la tradicional se basa en la reducción del p-nitrofenol a p-aminofenol (por tratamiento con HCl/H₂O en presencia de H₂ y Pd/C como catalizador y posterior reducción hasta pH 6 con NH₄OH) el cual se acetila calentando con una mezcla de anhídrido acético y ácido acético glacial (ver figura 2). El producto se puede purificar mediante recristalización a partir de una mezcla de etanol y agua, agua caliente u otro disolvente apropiado.

Otra síntesis publicada (30) es la llamada Hoescht-Celonese (figura 3, parte B).

² Textualmente en inglés brown, traducido por pardo.

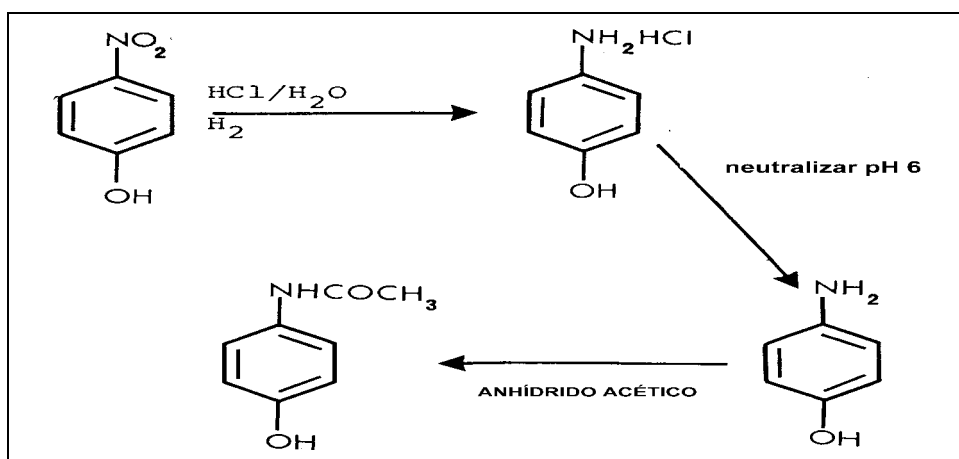


Figura 2: Síntesis del paracetamol según la referencia 19.

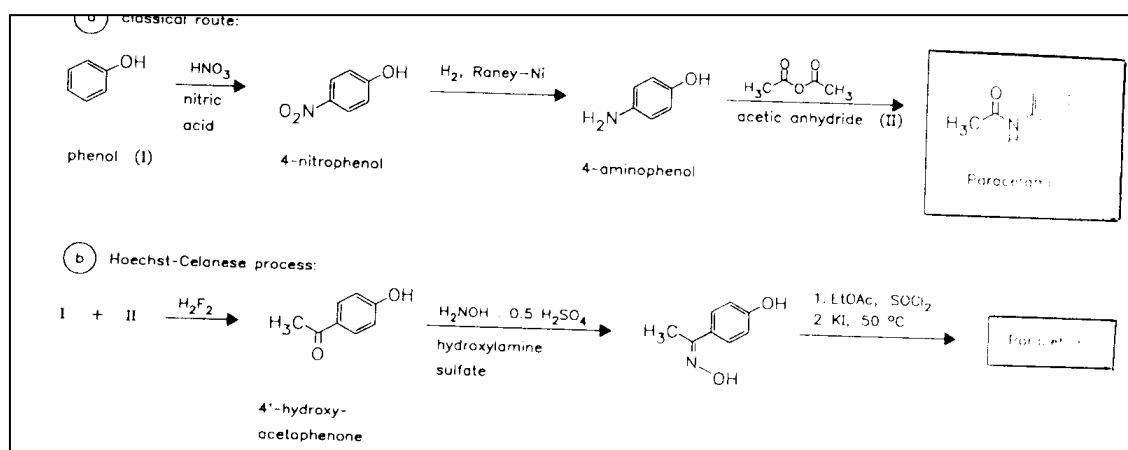


Figura 3: Síntesis del paracetamol según la referencia 30.

2.2.2.13. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Sistema TD (18): Rf 15 (determina paracetamol). Fase móvil: cloroformo: acetona (4:1).

Sistema TE (18): Rf 45 (determina paracetamol).

Fase móvil: acetato de etilo: metanol: solución concentrada de amoníaco (85:10: 5).

Sistema TF (18): Rf 34 (determina paracetamol). Fase móvil: acetato de etilo.

Sistema USP 24 (23)

Para determinar paracetamol en comprimidos: Fase móvil: cloruro de metileno : metanol (4:1).

Para determinar impurezas (4-aminofenol): Fase móvil: hexano : acetona (3:1).

Sistema RFE I (21) y Ph Eur III (22)

Para determinar impurezas (4-aminofenol): Fase móvil: metanol: 1,1,1-tricloroetano: éter isopropílico (1:4:5).

Sistema Analytical Profiles (20)

Para identificar paracetamol: Fase móvil: cloroformo: isopropanol (19:5), agente revelador: solución de ácido molibdenofosfórico ($R_f = 0,40$).

2.2.2.14. CROMATOGRAFÍA DE GASES

Sistema GA (18, 20): RI 1687

2.2.2.15. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN

Sistema HD (18):

- Columna: ODS-silica (ODS-Hypersil, 5 μm , 16 cm * 5 mm $\varnothing_{\text{interno}}$).
- Eluyente: alcohol isopropílico: ácido fórmico 0,1 M: dihidrógeno fosfato potásico 13,61 g/l (540:1:1000).

Sistema HW (18):

- Columna: ODS-silica (ODS-Hypersil, 5 μm , 16 cm * 5 mm $\varnothing_{\text{interno}}$).
- Eluyente: alcohol isopropílico: ácido fórmico 0,1 M: dihidrógeno fosfato potásico 13,61 g/l (176:1:1000).

Sistema USP 24 (23) (para valorar comprimidos o cápsulas, no para la materia prima):

- Columna L1: ODS-silica (3-10 μg , 30 cm * 3,9 mm $\varnothing_{\text{interno}}$).
- Eluyente: agua, metanol (3:1).

Sistema JPXIII (25):

- Columna: ODS-silica (ODS-Silica, 5 μm , 15 cm * 4 mm $\varnothing_{\text{interno}}$).
- Eluyente: 0,05 mmol/l solución fosfato potásico monobásico pH 4,7 : metanol (4: 1).

Resumen de técnicas HPLC extraídas de la referencia **20**, cuadro 6.

COLUMNA	ELUYENTE	FLUJO	λ DETECCIÓN
Corasil (60 cm * 2,1 mm)	ác. acético: cloroformo: diclorometano	1 ml/min	254
Bio-Rad A-27 resina 10-12 μ m (100 cm * 0,22 cm)	0,015 M – solución reguladora acetato sódico / ácido acético a pH 4,4	8.5 ml/min	254 o 280
Pellidon (30 cm * 2 mm)	40 mM – solución reguladora fosfato pH 7,4	0.35 ml /min	amperometría
ODS-silica 6 μ m (12.5 cm * 5 o 7 mm)	Agua: metanol: ácido fórmico (85: 15: 0,15)	No indicado	254
Micropack CN (15 cm * 2,1 mm)	Hexano: diclorometano:metanol: ácido acético	No indicado	254
Chrosorb SI-60	No indicado	No indicado	No indicado
Bondapack C ₁₈ (20 cm * 3,99 mm)	Solución 3,5 % de acetonitrilo en solución reguladora de acetato de sodio (pH 4)	2 ml/min	254
Radial- PAK C ₁₈ (20 cm *8 mm)	Acetonitrilo: metanol: agua (3:3: 44)	1.8-2.2 ml/min	254
Bondapack C ₁₈ 10 μ m (20 cm * 3,9 mm)	1% ác. Acético-metanol-etilacetato (900:150:1)	No indicado	No indicado
Nucleosil 5 C ₁₈ (15 cm * 4,6 mm)	Metanol: solución reguladora de fosfato pH 3 (4:5)	1 ml/min	240
Corasil 37-50 μ m C ₁₈ + precolumna	Metanol: agua (15:85)	1 ml/min	240

Cuadro 6: Resumen de algunas técnicas HPLC para cuantificar Paracetamol.

2.2.2.16. ESPECTRO ULTRAVIOLETA (18-20, 26)

Solución acuosa: banda principal a 244 nm ($A_1^1 \cong 668$ a) y banda secundaria a 280 nm. La adición de ácido no afecta a ninguna de las bandas (ver figura 4).

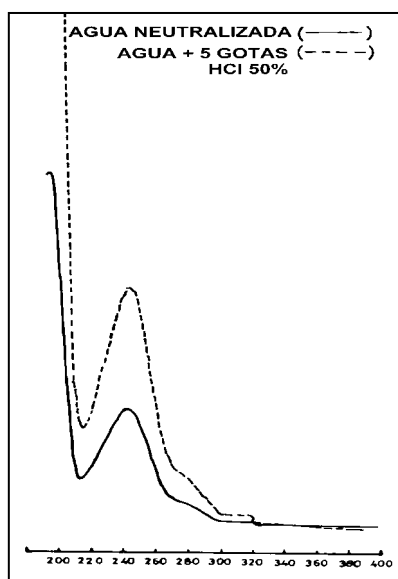


Figura 4: (de la referencia 20): Espectro UV en solución acuosa.

Solución ácido clorhídrico 0,1N: máxi

Solución alcalina de metanol neutralizado o hidróxido sódico 0,1 N: 257 nm ($A_1^1 = 715$ a). La adición de metóxido de sodio a la solución metanólica de paracetamol causa un deslizamiento del máximo de absorbancia de 243 nm a 262 nm (ver figura 5).

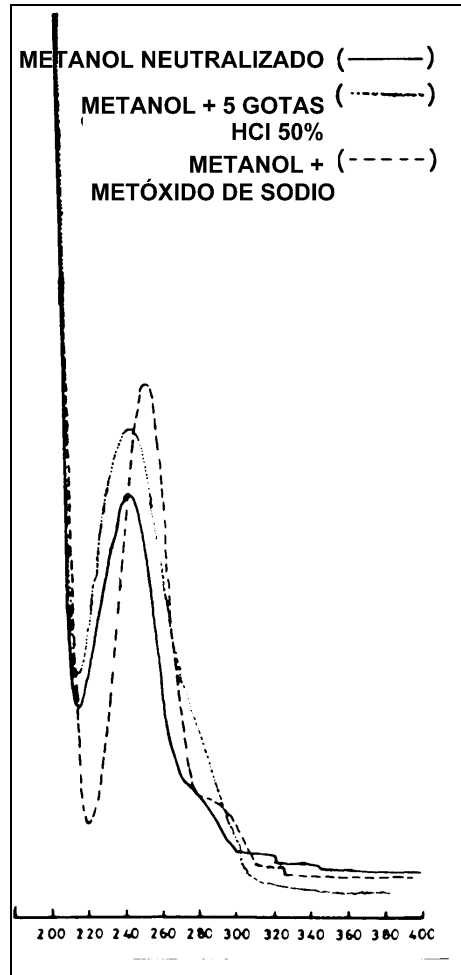


Figura 5: (de la referencia 20): Espectro UV en solución alcalina.

2.2.2.17. ESPECTRO INFRARROJO (18-20, 26)

Comprimido de bromuro potásico: picos principales a las frecuencias 1657, 1612, 1565, 1506, 1263, 1227 (ver figura 6) (18). Además se pueden interpretar las siguientes bandas generales en su espectro:

Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación
800-860	Anillo benceno sustituido en posición para
1440	{ Vibraciones aromáticas
1505	
1560	
1651	Enlace C=O
3160	Enlace O-H
3324	Enlace N-H

Cuadro 7: Identificación de las bandas de la molécula de paracetamol.

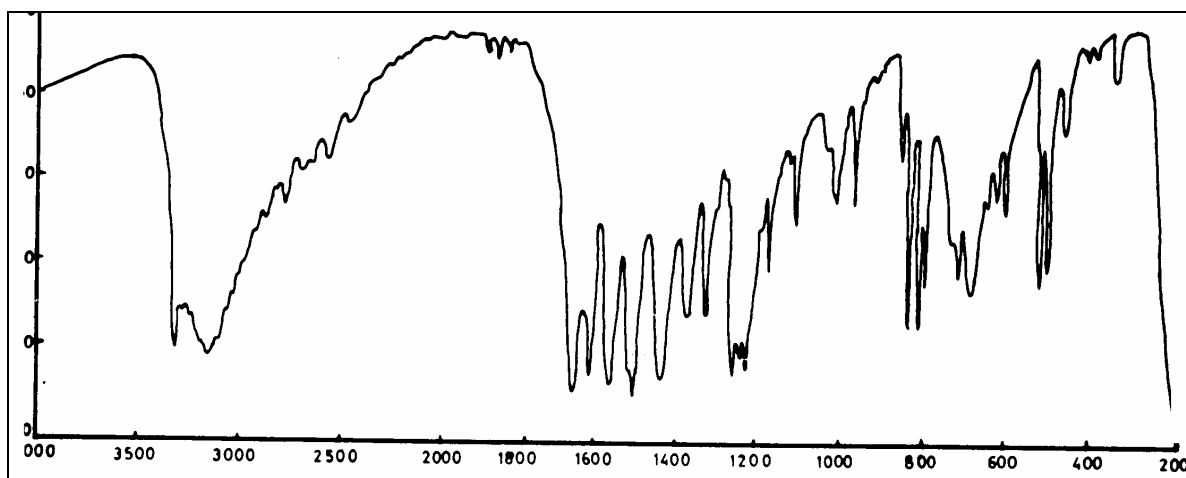


Figura 6 (de las referencias 19 y 20): Espectro IR del paracetamol.

2.2.2.18. ESPECTRO DE MASAS

Principales picos del paracetamol a 109, 151, 43, 80, 108, 81, 53, 52 (figura 7); principales picos del conjugado de cisteína 141, 43, 183, 44, 140, 80, 108, 52; principales picos del conjugado del ácido mercaptúrico 43, 141, 183, 42, 87, 41, 140, 165 **(18)**.

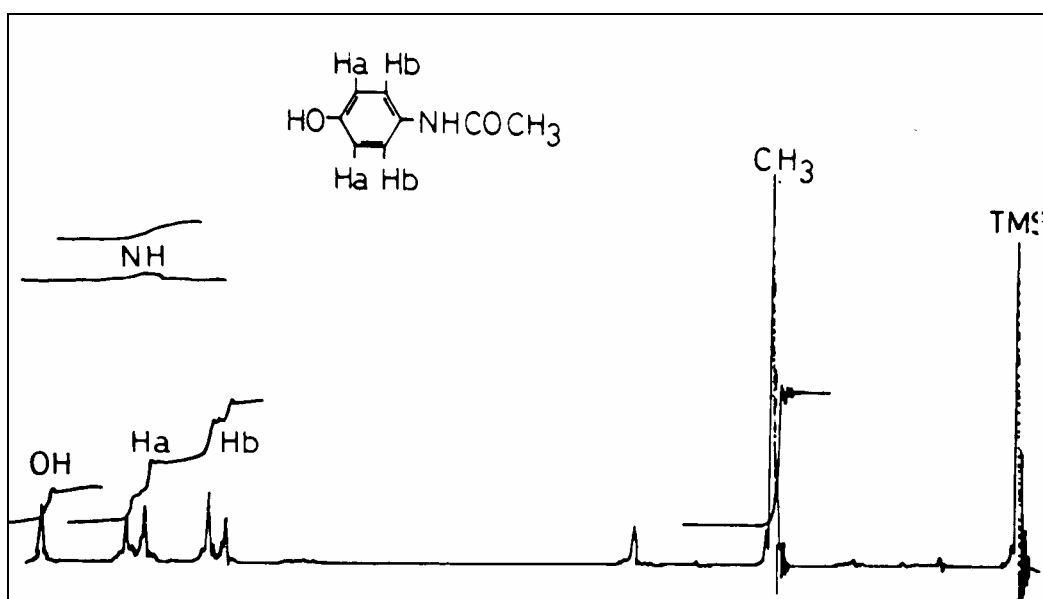


Figura 7: Espectro NMR H.

2.2.2.19. PERFIL DE IMPUREZAS

Las impurezas que suelen acompañar al paracetamol están relacionadas con sus precursores (cuadro 4). Las distintas Farmacopeas destacan dos principales **(19-23, 25)**.

- p-cloroacetanilida
- p-aminofenol o amino-4-fenol.

La monografía de la materia prima exige su análisis (por cromatografía en capa fina para la p-cloroacetanilida o colorimétrica **(21-23, 25)** para el p-aminofenol) y especifica los límites máximos (<0,001% y <0,005%, respectivamente), mientras que para los comprimidos de paracetamol, no aparece especificación al respecto. En el cuadro 8 aparecen las diferentes impurezas relacionadas con el

paracetamol en la bibliografía **(19, 20)**.

IMPUREZA	ORIGEN
p-nitrofenol	Precursor sintético
p-aminofenol	Intermediario sintético
p-cloroacetanilida	Impureza
p-acetoxiacetanilida	Impureza de síntesis (38)
o-acetilparacetamol	Impureza (por acetilación del paracetamol)
Azobenceno	Producto de reducción del nitrobenzono (precursor)
Azoxibenceno	Producto de reducción del nitrobenzono (precursor)
Quinona	Oxidación del p-aminofenol (intermediario sintético)

Cuadro 8: Impurezas y productos de degradación del paracetamol.

2.2.2.20. ESTABILIDAD (5-7, 18-23, 25, 27)

Las principales recomendaciones de conservación que se dan en las monografías **(6, 7, 21, 22)** son:

- mantener el producto por debajo de 40 °C (preferiblemente entre 15 y 30 °C),
- almacenar en recipientes herméticos y protegidos de la luz.

Analizando la influencia de los diferentes factores sobre la estabilidad del paracetamol, se ha confeccionado el siguiente resumen (cuadro 9):

FACTOR	REFERENCIA	RESULTADO
LUZ	(19) (31)	Muy sensible a la luz en solución (se disocia el enlace N-C) En solución etanólica, se mostró una importante fotodegradación, que puede retardarse si se acondiciona en frascos topacio.
CALOR	(19) (32)	En estado sólido es muy estable a $T^a \leq 45 \text{ }^\circ\text{C}$ A altas temperaturas (99 $^\circ\text{C}$ durante 80 minutos) aparece degradación (Figura 7, parte b).
HUMEDAD	(19)	Si existen trazas del p-aminofenol, se produce degradación por hidrólisis del p-aminofenol, que después se oxida y que al final da coloración parda o negra, produciendo la quinonimina y sustancias relacionadas.
OXIDACIÓN	(19)	Relativamente estable excepto por la hidrólisis del p-aminofenol

Cuadro 8: Estabilidad del paracetamol a diferentes factores.

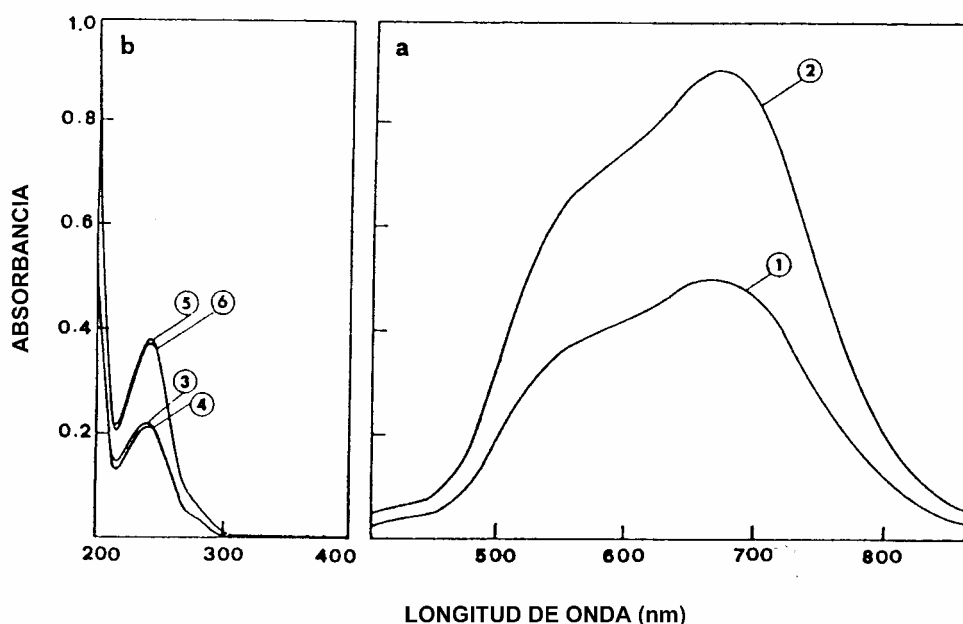


Figura 8: Curvas UV de degradación del paracetamol.

PARTE A: Paracetamol tratado con molibdato: espectro del producto coloreado: curva 1 (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y curva 2 (5,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Blanco referencia: el reactivo. El máximo a 670 nm corresponde al azul de molibdeno formado por reducción del Mo(VI) provocado por el fármaco.

PARTE B: Paracetamol puro: Curvas 3 y 4: Paracetamol (3,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Curvas 5 y 6. Paracetamol (5,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Curvas 3 y 5 Paracetamol sin tratar. Curvas 4 y 6 tratado a 99 $^\circ\text{C}$ y 80 minutos.

En cuanto a la estabilidad en solución, la degradación del paracetamol aparece catalizada tanto en medio ácido como en medio básico. Se mostró degradación según cinética de reacción de primer orden tanto con respecto a la concentración de paracetamol como con respecto a la concentración de iones hidroxilo o hidrogeniones.

Otros ensayos sobre la estabilidad en solución, en el intervalo de pH que va de 2 a 9, mostró que el pH entre 5 y 6 es el más estable y arrojaba valores de $t_{1/2}$ a 25 °C entre 19,78 y 21,80 años, mientras que a pH 2 la vida media es 0,73 años y a pH 9 de 2,3 años **(19, 20)**.

En general las fórmulas galénicas comercializadas son adecuadas ya que, según un estudio publicado en 1991 de comprimidos de paracetamol comercializadas en España **(33)**, de las diez formulaciones analizadas tras 5 años en estabilidad 8 se mostraron estables y sólo dos tenían problemas con la disolución del producto.

2.2.2.21. COMPATIBILIDAD CON OTROS PRINCIPIOS ACTIVOS

La compatibilidad con excipientes ha sido revisada en algunos trabajos, mostrándose en su mayoría como compatibles **(19)**. El principal problema se presenta cuando se combina el ácido acetilsalicílico en comprimidos, ya que puede darse acetilación del p-aminofenol **(34)** con formación de o-acetil-p-aminofenol y diacetil-p-aminofenol (ambos aparecen en comprimidos efervescentes a los 45 meses del estudio de estabilidad a temperatura ambiente).

2.2.3. CARACTERIZACIÓN GALÉNICA

Según el Catálogo de Especialidades Farmacéuticas del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, las formas farmacéuticas que contienen paracetamol en el mercado español son **(36)**:

2.2.3.1 ESPECIALIDADES FARMACÉUTICAS NACIONALES COMERCIALIZADAS DE PARACETAMOL

2.2.3.1.1. VÍA ORAL

1. cápsulas	500 mg
2. sobre efervescente	500 mg, 1 g
3. solución (por 5 ml)	120 mg
4. gotas solución (por ml)	100 mg
5. suspensión (por 5 ml)	120 mg
6. comprimidos	160 mg, 250 mg, 500 mg, 650 mg
7. comprimidos masticables	160 mg
8. comprimidos recubiertos	500 mg
9. comprimidos efervescentes	500 mg, 1 g

2.2.3.1.2. VÍA RECTAL

supositorios 125 mg, 150 mg, 250 mg, 300 mg, 325 mg, 500 mg, 600 mg, 650 mg

2.2.3.2. ESPECIALIDADES EXTRANJERAS COMERCIALIZADAS DE PARACETAMOL

Por otra parte, en la bibliografía extranjera se han encontrado las siguientes formas farmacéuticas y dosis para el paracetamol (5):

2.2.3.2.1. VÍA ORAL

- | | |
|--|--------------------------------|
| 1. cápsulas | 500 mg |
| 2. cápsulas (polvo para preparar solución) | 80 mg y 160 mg |
| 3. sobre (polvo para preparar solución) | 1 g |
| 4. granulado | 80 mg |
| 5. suspensión (por 5 ml) | 100 mg, 160 mg |
| 6. comprimidos | 325 mg, 500 mg, 650 mg |
| 7. comprimidos masticables | 60 mg, 160 mg |
| 8. comprimidos recubiertos | 160 mg, 325 mg, 500 mg |
| 9. liofilizado oral (35) (microencapsulado con etilcelulosa) | 500 mg |
| 10. solución (por ml) | 48 mg, 100 mg |
| 11. solución (por 5 ml) | 120 mg, 130 mg, 160 mg, 167 mg |

2.2.3.2.2. VÍA RECTAL

supositorios 80 mg, 120 mg, 125 mg, 325 mg, 650 mg

2.2.3.2.3. VÍA INYECTABLE

En este caso se presenta como proparacetamol (DCI) clorhidrato en la dosis de 1 g y 2 g que expresadas en paracetamol son 500 mg y 1 g, respectivamente. Vía IM e IV (35).

Existen, a su vez, diferentes combinaciones en el mercado con otros productos, entre éstas son de destacar por el número de especialidades existentes: las de paracetamol-AAS, paracetamol-fosfato de codeína, paracetamol-citrato de difenilamina, paracetamol-AAS-cafeína (5, 36), paracetamol-ácido ascórbico (35). Todo lo cual demuestra que es un principio activo muy utilizado como analgésico y de amplia difusión en la terapéutica actual.

2.2.3.3. CARACTERÍSTICAS GALÉNICAS ESPECIALES

En este punto interesa conocer si el principio activo presenta polimorfismo, eutécticos, etc. que pudieran influir en la solubilidad y disolución del principio activo a partir de la forma farmacéutica, etc. Y todas aquellas características que los autores hayan detectado y pudieran influir en la formulación, para establecer unos intervalos que faciliten su modelización posterior.

2.2.3.3.1. CARACTERÍSTICAS CRISTALINAS

En los primeros artículos **(19)** sobre la síntesis del paracetamol se describió que cristalizaba en forma de cristales blancos monoclinicos. Más tarde se describieron cambios en la estructura cristalina del paracetamol, durante el proceso de fusión.

Finalmente, se ha concluido que existen dos tipos de cristales para el paracetamol:

→ Prismas hexagonales: obtenidos por cristalización con alcoholes, esteres, cetonas, agua, dioxano y acetonitrilo.

→ Agujas romboédricas finas: por cristalización con benceno, tolueno, diclorometano y otros disolventes clorados.

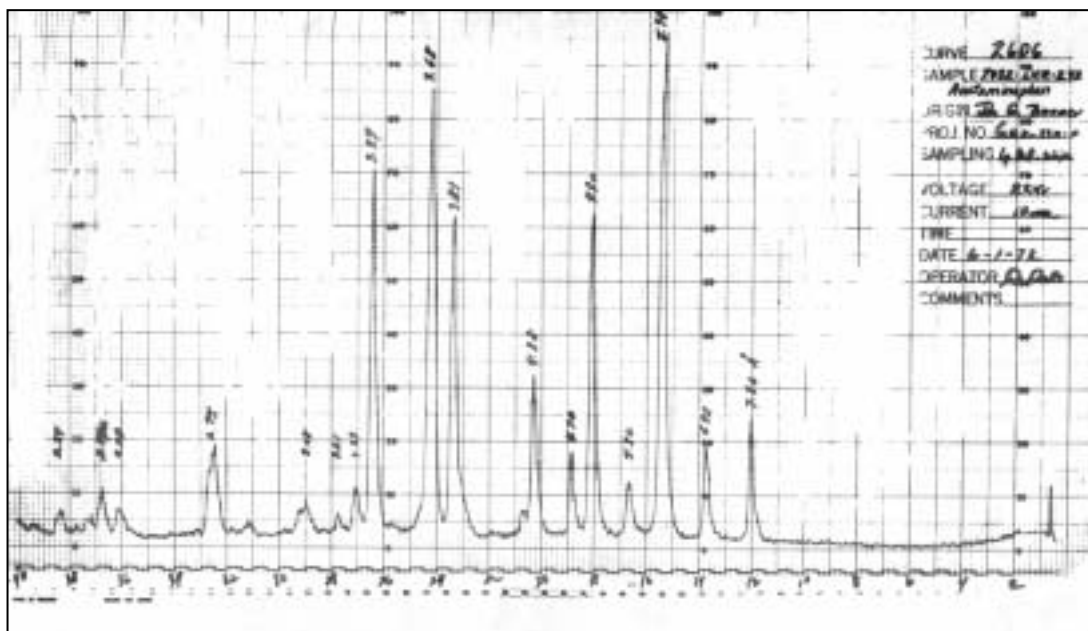


Figura 9: Difracción por RX del paracetamol

El examen de ambos tipos de cristales por calorimetría diferencial de barrido, IR y difracción de rayos X (figura 9), no demostró evidencia de polimorfismo ni de hidratos. Aunque estudios posteriores han planteado la tesis de que sí son polimorfos (37) (ver figuras 10 y 11, comparativas de ambos cristales, para los análisis DSC y difracción de rayos-X) y proponen la utilización de la forma desarrollada por ellos para compresión directa, ya que se han mejorado las características de compresibilidad del paracetamol. Otro estudio demostró que las características de superficie específica y velocidad de disolución del fármaco podría modificarse o controlarse mediante la cantidad de agua de cristalización de la materia prima si durante la cristalización se añadían aditivos (38) (en concreto la p-acetoxiacetanilida que es una impureza de síntesis del paracetamol).

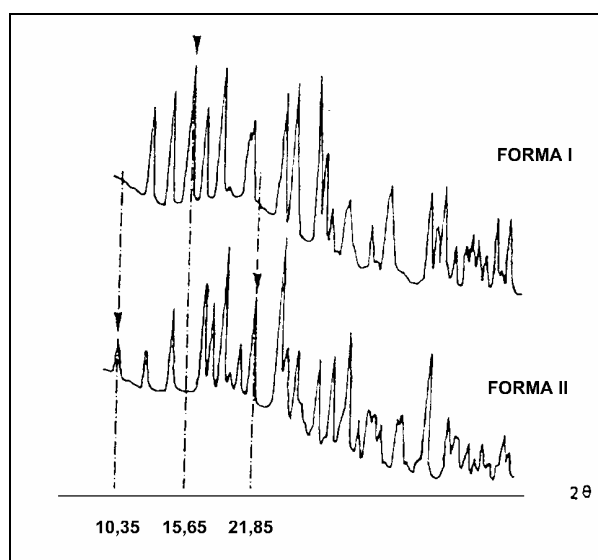


Figura 10: Polimorfos del paracetamol, análisis R-X (37).

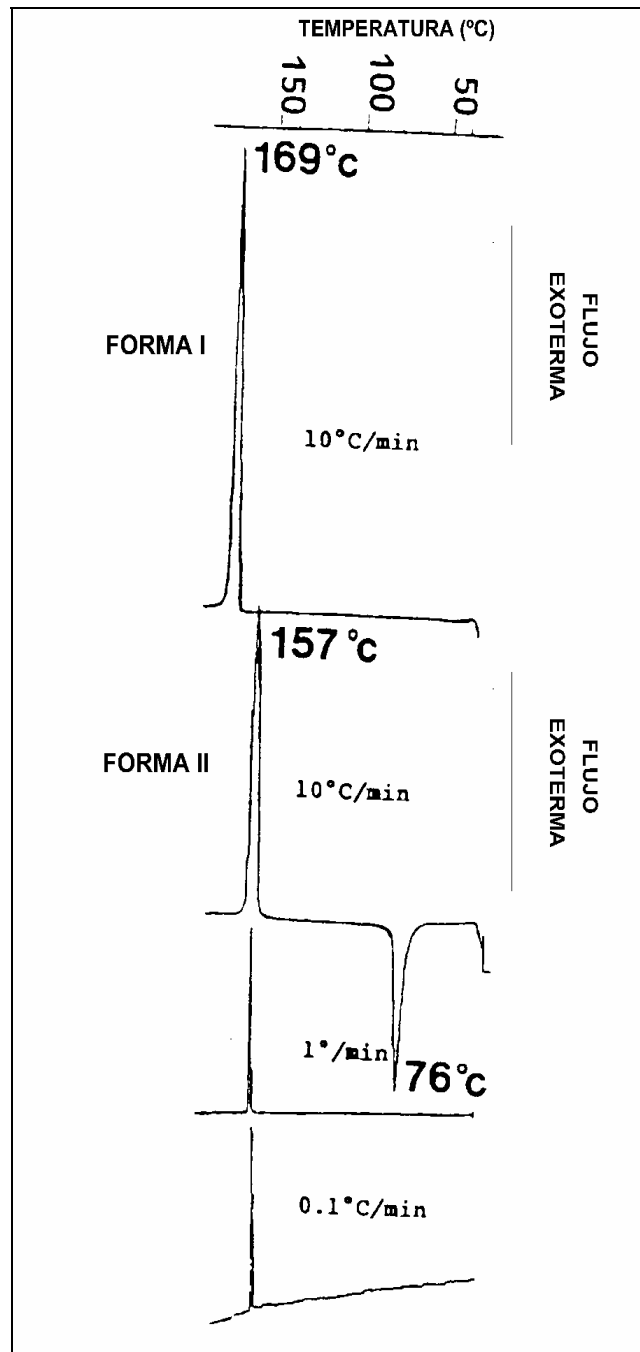


Figura 11: Análisis por DSC del paracetamol (37).

2.2.3.3.2 CARACTERÍSTICAS DEL PARACETAMOL (POLVO) (19)

2.2.3.3.2.1. CARGA ESTÁTICA

Las partículas de paracetamol al fluir por una tolva adquieren carga estática negativa. Esta carga puede reducirse si se adicionan lubricantes o pequeñas cantidades de agua (0,5%).

2.2.3.3.2.2. FLUIDEZ

La densidad aparente de los gránulos de paracetamol disminuye según se incrementa el contenido de agua. Esto representa un aumento en la cohesión interna y causa deterioro en la capacidad de flujo. La esferonización de los gránulos para compresión mejora la velocidad de flujo. La presencia de agua en los gránulos de paracetamol incrementa el ángulo de reposo.

2.2.3.3.2.3. CARACTERÍSTICAS DE COMPRESIÓN

La compresión uniaxial de los cristales de paracetamol da un ciclo de presión típico, produciendo comprimidos laminados y en capas. Los efectos de la humedad y de granulación por vía húmeda mejoran la compresibilidad del paracetamol. Un trabajo reciente comprobó que la compresión con ultrasonidos en la tolva facilita la compresibilidad del paracetamol, incluso más que la adición de aglutinantes (39).

2.2.3.3.2.4. POROSIDAD Y SUPERFICIE (SURFACE AREA)

Se ha demostrado que varían con el contenido en humedad y la presión de compresión.

2.2.3.3.2.5. VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN

La disolución de muestras de paracetamol puro sigue una cinética de orden pseudo-cero a los 5 minutos. Partículas groseras (pasadas por un tamiz de 300 μm de luz de malla) arrojan datos que se ajustan a la cinética de raíz cúbica. Partículas finas (pasadas por un tamiz de 150-125 μm de luz de malla) dan un modelo de disolución de Weibull.

2.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXCIPIENTES

2.3.1 CELULOSA MICROCRISTALINA (AVICEL® PH 101) (40)

El Avicel® PH 101 es una celulosa microcristalina que se obtiene a partir de una α -celulosa despolimerizada de alta pureza microbiológica y química, de peso molecular alrededor de 36000 y con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ donde n es aproximadamente 220.

El número de registro CAS de la celulosa es [9004-34-6].

Está formado por polvos cristalinos, de tipo poroso, de color blanco, inodoro, insípido y dotados de cierta fluidez. Es un producto higroscópico pero estable, insoluble en agua (forma dispersiones), insoluble en ácidos (es resistente) y en la mayoría de disolventes orgánicos (es inerte), ligeramente soluble en soluciones de hidróxido sódico al 5% p/v (presenta hinchamiento).

Su densidad aparente es de 0,32 g/cm³ y su densidad compactada 0,45 g/cm³. El área superficial específica es de 1,18 m²/g. El tamaño medio de partícula es de 50 μ m (en el tamiz 250 μ m queda retenido $\leq 1\%$ y en el tamiz de 63 μ m queda retenido $\leq 30,0\%$).

Es incompatible con oxidantes fuertes. Es un producto higroscópico pero estable y debe almacenarse en zonas de humedad controlada (secas y frescas).

Se puede utilizar como diluyente en comprimidos y cápsulas, también en procesos de compresión vía húmeda o directa. Otras aplicaciones son como lubricante y disgregante en formulación de comprimidos. Su uso está permitido en productos cosméticos y en productos alimentarios.

Se adjunta el certificado de análisis del proveedor (ver anexo).

2.3.2 ALMIDÓN DE MAÍZ (41, 42)

El almidón de maíz es un polisacárido de amilosa y amilopectina, basado en la α -glucosa $(C_6H_{10}O_5)_n$ donde $n=300-1000$. El número de registro CAS es [9005-25-8].

Se presenta como un polvo de color blancuzco, inodoro, insípido, como gránulos esféricos y pequeños u ovoides de tamaño y forma característicos (característica de cada variedad botánica). Es importante destacar que las diferentes variedades botánicas presentan diferentes relaciones amilasa / amilopectina, con lo cual se obtienen diferencias en las propiedades físicas.

Producto muy higroscópico (es su mayor inconveniente) (43), absorbe fácilmente la humedad atmosférica debido a que presenta valores de equilibrio relativamente altos (12-18%). Es prácticamente insoluble en etanol frío (95%) y en agua fría. En agua a $\approx 73^\circ C$ a concentraciones de entre el 5 y el 10% se hincha instantáneamente formando engrudo de almidón.

La densidad aparente del almidón es de $0,462 \text{ g/cm}^3$ y la densidad compactada es de $0,658 \text{ g/cm}^3$. El área superficial específica es de $0,6-0,75 \text{ m}^2/\text{g}$. El tamaño medio de partícula es de $17 \mu\text{m}$ (entre $2-32 \mu\text{m}$).

No presenta incompatibilidades. Presenta una buena estabilidad en ambiente seco y sin precalentar, aunque las pastas y soluciones de almidón son inestables y presentan fácil contaminación por microorganismos. Estos problemas pueden ser más o menos severos en función de la variedad del almidón utilizado. En general se debe conservar en condiciones herméticas y en ambiente seco y frío (44, 40).

El almidón es un excipiente principal dentro de las formulaciones orales como aglutinante, diluyente y disgregante. Como diluyente se utiliza para la preparación de trituraciones estandarizadas de colorantes o fármacos potentes para facilitar las operaciones de elaboración. En comprimidos, se utiliza como aglutinante en la granulación por vía húmeda (engrudo de almidón entre el 5 y el 25% p/p), como disgregante (en concentraciones entre el 3 y el 15% p/p). El engrudo de almidón se usa aplicado sobre la piel como emoliente.

Se adjunta el certificado de análisis del proveedor (ver anexo).

2.3.3 TALCO (45)

El talco es un silicato magnésico purificado e hidratado estable que corresponde a la fórmula $Mg_6(Si_2O_5)_4(OH)_4$ y puede contener pequeñas cantidades de silicato de aluminio y hierro. El número de registro CAS es [14807-96-6].

Es un polvo cristalino muy fino, de color blanco grisáceo, inodoro, impalpable y graso al tacto, se adhiere a la piel, es suave al tacto y libre de arena. Es prácticamente insoluble en ácidos y bases diluidas, en disolventes orgánicos y en agua.

La densidad aparente del talco es de $0,538 \text{ g/cm}^3$ y la densidad compactada es de $0,862 \text{ g/cm}^3$. El área superficial específica es de $12 \text{ m}^2/\text{g}$.

Es incompatible con compuestos de amonio cuaternario. El talco es estable y puede ser esterilizado mediante calor seco a $160 \text{ }^\circ\text{C}$ sin exceder de una hora. También puede ser esterilizado por radiación gamma o por exposición a óxido de etileno. Debe conservarse en contenedores bien cerrados y en un lugar seco y frío.

El talco se usa como lubricante en formulaciones sólidas por vía oral. También se utiliza en preparaciones tópicas como polvo, aunque no debe utilizarse como polvo en guantes quirúrgicos ya que el talco es una materia natural frecuentemente contaminada por microorganismos. Se utiliza por sus propiedades lubricantes en cosméticos y productos alimentarios.

El talco se utiliza principalmente en las formulaciones de comprimidos y cápsulas. Sin embargo, por vía intranasal o intravenosa los productos que contengan talco pueden producir granulomas, especialmente en los pulmones. Es imprescindible el uso del talco libre de asbesto (impureza habitual), ya que éste sí es carcinogénico.

El consumo de talco en grandes cantidades produce efectos laxantes o irritantes de la mucosa.

Se adjunta el certificado de análisis del proveedor (ver anexo).

2.3.4 ESTEARATO MAGNÉSICO (46)

El estearato magnésico es un compuesto de magnesio mezclado con ácidos orgánicos sólidos obtenidos de grasas y consiste principalmente en proporciones variables de estearato magnésico ($C_{32}H_{70}MgO_4$) y palmitato magnésico ($C_{36}H_{66}MgO_4$). El número de registro CAS es [557-04-0].

El estearato magnésico es un polvo fino, blanco, precipitado o molturado, impalpable de baja densidad aparente y presenta un ligero olor y un gusto característico. El polvo es graso al tacto y se adhiere a la piel. Es prácticamente insoluble en etanol (95%), éter y agua, ligeramente soluble en benceno caliente o etanol caliente (95%).

La densidad aparente del estearato de magnesio de $0,143 \text{ g/cm}^3$ y la densidad compactada es de $0,224 \text{ g/cm}^3$. El área superficial específica es de $2,45\text{-}16,0 \text{ m}^2/\text{g}$.

El estearato magnésico es incompatible con ácidos fuertes, bases fuertes y sales de hierro. No se debe mezclar con materiales fuertemente oxidantes. Es estable, se debe guardar en recipientes bien cerrados y en lugares fríos y secos.

Se utiliza principalmente como lubricante en cápsulas y comprimidos entre las concentraciones de 0,25 y 2,0 %. También puede utilizarse en cosmética y en productos alimentarios.

El estearato de magnesio es hidrófobo y su presencia excesiva puede retardar la disolución de los fármacos sólidos y disminuir la dureza de los comprimidos o aumentar la friabilidad. El tiempo de mezclado ha de controlarse ya que también puede provocar aumento de variabilidad del proceso y disminución en la velocidad de disolución. La inhalación de polvo de estearato magnésico es nociva y puede tener graves consecuencias.

Se adjunta el certificado de análisis del proveedor (ver anexo).

2.4. BIBLIOGRAFÍA

- 1** Le Hir A Farmacia Galénica. Barcelona: Masson; 1995. p. 236-237.
- 2** Aiache JM, Aiache S, Renoux R. Introducción al estudio del medicamento. Barcelona: Masson; 1996. p. 191.
- 3** Guyot JC, Tete L, Tak fak S, Delacourte A. Practical interest of the cohesion index for the technological formulations of tablets. 6th International Congress Pharmaceutical Technology APGI; 1992. p. 246-254.
- 4** Joachim J, Kalantzis G, Joachim G, Reynier JP, Piccerelle P, Ruiz JM. Pregelatinized starches in wet granulation. Experimental design and data analysis II. Case of tablets. *STP Pharma Sciences* 1994; 4 (6): 482-486.
- 5** Acetaminophen. AHFS 99 Drugs Information®. Bethesda: American Society of HealthSystem Pharmacists, Inc.; 1999. p. 1826-1834.
- 6** Paracetamol. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. 32^a ed. Londres: Ed The Royal Pharmaceutical Society. 1999 p.72.
- 7** Acetaminophen. The Index Merck. 12^aEd. New York: Ed. Merck & Co. Inc. Rahway; 1996 p.9.
- 8** M^a T Castaño, L Ruiz, J Vidal. Monografías Farmacéuticas. Alicante: Colegio Oficial Farmacéuticos de la provincia de Alicante; 1998; p. 753-755.
- 9** N02 analgésicos no narcóticos. Catálogo de Especialidades Farmacéuticas. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2000. p. 1563-1565.
- 10** Remington. Farmacia. 19^a ed. Vol 2. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1995. p. 2500.
- 11** Flórez J. Farmacología Humana. 3^a ed. Barcelona: Masson; 1997. p. 370-371.
- 12** Nadal A: Farmacovigilancia. Paracetamol (toxicidad hepática). *Offarm* 1996; 15 (11): 95-96.
- 13** Ruiz MD, Bravo JL: Historia del paracetamol. *AINE* 1998; 2: 118-124.
- 14** <http://www.pharmweb.net/pwmirror/pwy/Paracetamol>.
- 15** Cuéllar S. Introducción a la química de los medicamentos. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 1996. p. 205.
- 16** Avendaño C. Introducción a la química farmacéutica. Madrid: Ed. Intermamericana; 1993. p.175-176
- 17** Korolkovas A, Burckhalter JH. Compendio esencial de química farmacéutica. Barcelona: Reverté S.A.; 1979. p.182-185.
- 18** Clarke's Isolation and Identification of drugs. 2^a ed. Londres: The Royal Pharmaceutical Press; 1986. p. 849-850.
- 19** Fairbrother J E. Acetaminophen. *Anal. Profiles Drug Subs* 1974; 3: 1-109.
- 20** Humeida A El-Obeid, Abdullah A. Al-Badr; Acetaminophen. *Anal. Profiles Drug Subs* 1985; 14: 552-590.
- 21** Real Farmacopea Española. 1^a ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 1997. p. 1416.
- 22** Pharmacopée Européenne. 3^a ed. Strasbourg: Editions du Conseil de l'Europe; 1996. p. 753-755.
- 23** USP 24 NF19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2000. p. 17-40.
- 24** AOAC Association of official analytical Chemists. Official methods of analysis. 15^a ed. Vol 1. Arlington: AOAC, 1990. p. 553-556.
- 25** The Japanese Pharmacopoeia. 13^a ed. Tokyo: The Society of Japanese Pharmacopoeia; 1996. p. 183-184.
- 26** Formulario de AEFI. Métodos de análisis y control de medicamentos. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 1988 p. 247-249.
- 27** Del Pozo A. Farmacia Galénica Especial. Tomo I. Barcelona: Romargraf; 1977. p. 97-98.
- 28** Ustun M, Sungur S, Ersoy I. Comparison of HPLC spectrophotometric method for the determination of paracetamol (acetaminophen) and acetylsalicylic acid in tablets. *Pharmazie* 1992; 47 (Jul): 558-559.
- 29** Pharmaceutical Manufacturing encyclopedia. 2^a edición. Park Ridge: Noyes Publications; 1988. p. 11-15.
- 30** Kleemen A, Engel J Pharmaceutical Substances. 3^a edición. New York: Thieme; 1999. p. 1444-1445.
- 31** Mursyidi A. Photostability of paracetamol solution. *Majalah Farmasi Indonesia* 1995; 6(3): 68-74.
- 32** Morelli B. Spectrophotometric determination of paracetamol in pure form in tablets. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* 1989; 7 (5): 577-584.
- 33** Suñé Negre JM, Jurado F, Lizcano J, Salvadó MA, García Celma Mj, Miró ML. Estudio galénico y de estabilidad a tiempo real de distintas especialidades farmacéuticas de comprimidos de paracetamol. *Ciencia Farmacéutica* 1992; 2 (6): 401-410.
- 34** Thomis R, Roets E, Hoogmartens J. Analysis of tablets containing aspirin, acetaminophen and ascorbic acid by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences (J-Pharm-Sci)* 1984; 73 (Dec); 1830-1833.

- 35** Vidal. Vidal@ le dictionnaire. 75^a ed. Paris: Editions du Vidal; 1999. p. 3-4.
- 36** Paracetamol y derivados. Catálogo de Especialidades Farmacéuticas. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2000. p.1589-1592.
- 37** Di Martino P, Guyot-Hermann AM, Conflant P, Drache M, Guyot JC. A new pure paracetamol for direct compression: the orthorhombic form. *International Journal of pharmaceutics* 1996; 128: 1-8.
- 38** Chow AHL, Chow PKK, Wang Zhongshan, Grant DJW. Modification of acetaminophen crystals: influence of growth in aqueous solutions containing p-acetoxyacetanilide on crystals properties. *International Journal of Pharmaceutics* 1985; 24: 239-258.
- 39** Rubinstein MH, Levina M. The effect of ultrasonic vibration on the compaction characteristics of paracetamol. *Pharmaceutical Technology Conference. 11-13, april 2000. Baveno-Shesa (Italy). Vol.2. 83-120*.
- 40** Microcrystalline cellulose. Handbook of Pharmaceutical excipients. American Pharmaceutical Association 3^a ed. London: The Pharmaceutical Press. 2000. p. 102-106.
- 41** Starch. Handbook of Pharmaceutical excipients. American Pharmaceutical Association 3^a ed. London: The Pharmaceutical Press. 2000. p. 522-527.
- 42** Newman A, Vitez I, Kiesnowski C, Mueller R. Starches and starch derivates. En: Encyclopedia of pharmaceutical technology. Editors J Swarbrick, JC Boylan. New York: Marcel Dekker Inc.; 1996; 14: 223-248.
- 43** García MJ, Santos D. Formas orales sólidas (III). En: Monografías Galénicas. Madrid: Laboratorios Glaxo. 1993: 10-15.
- 44** Helman J. Farmacotecnia teórica y práctica. México: CECSA. 1980. p.1710.
- 45** Talc. Handbook of Pharmaceutical excipients. American Pharmaceutical Association 3^a ed. London: The Pharmaceutical Press. 2000. p. 555-557.
- 46** Magnesium stearate. Handbook of Pharmaceutical excipients. American Pharmaceutical Association 3^a ed. London: The Pharmaceutical Press. 2000. p. 305-308.

ANEXOS: CERTIFICADOS DE ANÁLISIS DE LAS MATERIAS PRIMAS

ANEXO: FICHA DE SEGURIDAD DEL PARACETAMOL

Capítulo 3:

DESARROLLO ANALÍTICO: VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DEL PARACETAMOL COMPRIMIDOS

3.1 MÉTODOS ANALÍTICOS DEL PARACETAMOL

Se ha realizado una búsqueda de las metodías analíticas habituales utilizadas para el análisis del paracetamol en medicamentos **(1-3)** y se han clasificado las diferentes metodías según su aplicación para la identificación o para la valoración del paracetamol en formas farmacéuticas, no documentándose las múltiples metodías utilizadas en el análisis clínico del paracetamol.

3.1.1 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PARACETAMOL

3.1.1.1 PUNTO DE FUSIÓN

El paracetamol puede ser identificado por su punto de fusión (el producto purificado presenta un punto de fusión entre 169 y 171°C) en función de los reactivos utilizados o de los eutécticos formados **(2,3)**, aunque el intervalo es ampliado en otras referencias oficiales **(4, 5, 6)**.

3.1.1.2 MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS

REACTIVO	COLORACIÓN	λ DE MEDIDA	REFERENCIA
$K_3Fe(CN)_6$	Azul – Violeta	303 nm	(3)

3.1.1.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

El paracetamol aparece en el espectro entre 400 y 500 Hz (3).

3.1.1.4 MÉTODOS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En la referencia (3) se indican las condiciones particulares de este método, el cual se separa del objetivo del trabajo, por lo que no se detalla.

3.1.1.5 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS Y COLORIMÉTRICOS

REACTIVO	COLORACIÓN	λ DE MEDIDA
Cloruro férrico (2, 7)	Violeta - Azul	-
Reactivo de Nessler (2)	Pardo ¹	-
Reactivo Liebermann's (2)	Violeta	-
Solución etanólica de α -naftol en medio alcalino (8, 9)	Verde	420 nm
Aril acilamidasa y cresol cobre amoniaco (2)	No indicada	615 nm
HCl diluido con agua 4N (2)	No indicada	395 nm
Ácido tricloroacético 5% y solución ortocresol 1% y NH_4OH 4M (2)	No indicada	615 nm
HCl 0.05N, NaClO y solución fenol 2% (2)	Azul	625 nm
Etanol, sol. de NaClO, HCl 0.1N, $NaAsO_2$ 0.4 % y solución fenol 6% (2)	No indicada	625 nm
NaOH 4N, cloruro de hidroxil amonio 2M y $FeCl_3$ 6% (2)	No indicada	520 nm
Oxidación espontánea de mezclas alcalinas de 4-aminofenol y fenol (2)	No indicada	625 nm
HCl 10%, $K_3(CN)_6$ 0.1M, fenol 0.1M y NaOH 5%	No indicada	627 nm
HNO_2 (2)	No indicada	430 nm
2-nitroanilina diazotizada (2)	Roja	520 nm
Ciocalteau-Folin (2)	Azul	660 nm
Metanol-HCl 0.1 M (2)	No indicada	249 nm
Cl_3CCOOH (2)	Azul	620 nm

3.1.2 MÉTODOS DE VALORACIÓN DEL PARACETAMOL MATERIA PRIMA

3.1.2.1 VALORACIÓN QUÍMICA

La Farmacopea Europea y la Real Farmacopea Española (4, 10) indican que se debe valorar con sulfato cérico amónico, hasta coloración amarilla y se aplica la equivalencia de 1 ml de reactivo gastado \cong 7.560 mg

¹ Textualmente en inglés brown, traducido por pardo.

paracetamol.

3.1.2.2 MÉTODOS ULTRAVIOLETA

REACTIVOS	λ DE MEDIDA	REFERENCIA
Agua + Metanol + Eter etílico	264 nm	(3)
Metanol + Agua	244 nm	USP 24(5), RFE(10), F Eur III (4), (11).
Etanol + Ácido clorhídrico diluido	249 nm	BP 1963(2)
Metanol + Ácido clorhídrico diluido	249 nm	Formulario Nacional US XI(2)
0.01N NaOH	257 nm	BP 1968 (2)
0.1 M NaOH	257 nm	BP 1980, 1988 (12-14)
Cloroformo + Etanol (3:1)	249 nm	Formulario Nacional US XII y XIII (2)
n-butanol y NaHCO ₃	250 nm	Formulario Nacional US XII y XIII (2)

3.1.2.1 MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

Reactivo: Tetrabutilamonio hidróxido. Solvente: Dimetil formamida (3).

Método *conductimétrico* para la determinación del paracetamol (15) utilizando como reactivo de valoración una solución acuosa de NaOH, determinando potenciométricamente el punto final de la valoración.

3.1.2.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.1.2.3.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Es un método muy utilizado para la determinación (principalmente identificación) del paracetamol y su impureza (4-cloroacetanilida), existiendo diferentes fases móviles útiles (10). Ver el capítulo 2 de preformulación (4, 5, 10, 12, 13).

3.1.2.3.2 CROMATOGRAFÍA GASEOSA (GC)

Este método se utiliza para identificar (tiempo de retención) y analizar cuantitativamente, en comprimidos, la presencia de paracetamol junto a otros componentes. Ver el capítulo 2 de preformulación (4, 5, 10, 12, 13).

3.1.2.3.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC)

La utilización de este método se ha dirigido para la determinación de acetaminofeno en formulaciones farmacéuticas y en fluidos biológicos. Es el método más utilizado ya que permite determinar y valorar conjuntamente el principio activo y la impureza p-aminofenol (4, 5, 10, 12, 13).

3.1.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE COMBINACIONES DE PARACETAMOL CON OTROS PRINCIPIOS ACTIVOS

3.1.3.1 MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

Referenciado para la determinación de paracetamol combinado con diclofenaco sódico **(16)**.

3.1.3.2 HPLC

La USP 24 **(5)** documenta diferentes técnicas para la determinación de varios principios activos conjuntamente:

- paracetamol y ácido acetilsalicílico
- paracetamol, ácido acetilsalicílico y cafeína
- paracetamol y cafeína
- paracetamol, clorfeniramina, dextrometorfano y fenilpropanolamina

Por otra parte, se han publicado diversos trabajos relacionados para la determinación de:

- acetaminofeno, pseudoefedrina y cafeína **(17)**.
- paracetamol y ácido acetilsalicílico **(8, 18)**.
- paracetamol, fenilpropanolamina, cafeína, glicerilguaiacolato y maleato de clorfeniramina es mediante HPLC junto con diodo array **(19)**.
- paracetamol, ácido acetilsalicílico y ácido ascórbico **(20)**.
- paracetamol, cafeína y propifenazona **(21)**.
- paracetamol, cafeína y ácido acetilsalicílico **(22)**.

3.1.3.3 MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Para la determinación de paracetamol y cafeína **(23)**.

Utilización de métodos *colorimétricos* a través de nitración y subsiguiente quelación para la determinación de

paracetamol y salicilamida (24).

Otro método interesante basado en la función ortogonal del espectro del paracetamol (25), permite su determinación incluso en presencia del p-aminofenol (producto de degradación principal).

3.1.3.4 ESPECTROSCOPIA DE DIODE ARRAY

Para la determinación de paracetamol y fosfato de codeína (26).

3.1.3.5 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Este método junto con una espectrodensitometría se ha utilizado para la determinación de paracetamol, propifenazona y cafeína conjuntamente. Es un método específico, rápido y que presenta una buena reproducibilidad para el control de calidad de los comprimidos (27).

3.1.4 CONCLUSIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

Tras el análisis y valoración técnica de los apartados anteriores sobre los métodos de análisis de paracetamol, y debido a que la aplicación del método es para análisis rutinarios (laboratorio de prácticas,...) y a los resultados de los parámetros de validación (es un método validado), se escogió un método espectrofotométrico UV-VIS por su practicabilidad. Además una referencia encontrada (8), que comparó un método UV-VIS y un método por HPLC para valorar paracetamol, llegó a la conclusión de que los resultados obtenidos con el método espectrofotométrico eran **más rápidos, más precisos y de mayor sensibilidad**, corroborado todo ello por evaluaciones estadísticas que demostraron que no había diferencias significativas entre ambos.

3.2 METODOLOGÍA PARA EL DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Para el desarrollo del método analítico de valoración del principio activo, se tuvo en cuenta la monografía de Acetaminophen materia prima, particularmente el método de valoración de materia prima especificado en la USP24 (5) y la Farmacopea Japonesa (6), al tratarse de un método espectrofotométrico, sencillo y exacto, fácilmente extrapolable al laboratorio de prácticas, frente al propuesto por la Real Farmacopea Española (10), que exige extracciones con disolventes orgánicos y al no disponer del equipo necesario para

llevar a cabo en el laboratorio de prácticas el método por HPLC especificado para el análisis de comprimidos por la USP24. Aunque la especificidad de la técnica de espectrofotometría de absorción ultravioleta - visible no es muy alta, es muy útil en análisis rutinario ya sea cuantitativo (la absorción estará relacionada directamente con la concentración de la sustancia absorbente de la muestra) o cualitativo (como método de identificación adicional basado sobre las longitudes de onda características de la sustancia).

Según la bibliografía consultada, se han publicado dos estudios comparativos entre el análisis por HPLC y UV, para análisis de comprimidos concluyendo uno que ambos métodos presentaban precisiones similares **(18)** y el segundo que no había diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos a un nivel de confianza del 95% **(8)**. Destacan los métodos espectrofotométricos por proporcionar resultados rápidos, precisos y selectivos **(2, 3, 18)**.

Metodología de ensayo:

Pesar exactamente 60 mg de paracetamol problema y disolver con 5 ml de metanol en un matraz de 250 ml y enrasar con agua. Tomar 5 ml, filtrar por papel, lavar el filtro con cantidad suficiente de agua y diluir con agua hasta 100 ml y mezclar. Paralelamente siguiendo exactamente el mismo procedimiento se prepara una disolución en agua de concentración 12 µg/ml, con paracetamol patrón de referencia.

Leer la absorbancia de ambas soluciones en el máximo de absorción (alrededor de 244 nm), usando agua como blanco. Calcular la cantidad en mg, de $C_8H_9NO_2$, mediante la fórmula:

$$5 c (A_U / A_S)$$

en la que;

c: es la concentración en µg/ml del patrón de referencia de paracetamol

A_U : es la absorbancia de solución problema

A_S : es la absorbancia de la solución patrón de referencia

Se plantea como partida el método anterior y otro idéntico con la salvedad de utilizar como medio de disolución solución reguladora fosfato a pH 5,8, tal y como marca la USP 24 para el ensayo de disolución de comprimidos. Para estudiar la bondad de estos métodos analíticos se efectúa como ensayo previo para cada medio una prueba de linealidad con materia prima patrón, tras la cual se procede a estudiar los parámetros de linealidad, exactitud y precisión para muestras de placebo cargadas de materia prima patrón. Se redactan los Procedimientos Normalizados de Trabajo necesarios de los que se adjunta la relación en el anexo 1. Los resultados obtenidos se adjuntan en los apartados siguientes junto con la discusión sobre el

cumplimiento o no de los parámetros de validación.

Una vez comprobada la validez del método (medio disolución agua/metanol y solución reguladora fosfato) para la cuantificación del paracetamol en comprimidos, se intentó optimizar el método, tanto su practicabilidad como su fiabilidad, teniendo como objetivo final la máxima simplificación analítica y desde un punto de vista económico, el mínimo coste de análisis, lo cual se concluyó en:

- Evitar el uso del metanol en el desarrollo analítico, con el ahorro económico que supone teniendo en cuenta que el método se utilizará en el laboratorio de prácticas de Farmacia Galénica III (60-70 veces al año). Además se evitan los riesgos derivados de la peligrosidad inherente al metanol en cuanto disolvente orgánico inflamable y tóxico.
- Evitar el uso de la solución reguladora fosfato, con el ahorro de tiempo y dinero que ello supone, por las razones anteriormente expuestas y desde un punto de vista medioambiental evitar la producción de residuos innecesarios. En la medida de lo posible se aplican los criterios de las normas ISO 14000 (28).

Para ello se extrapolan los métodos anteriores a agua desionizada (teniendo en cuenta que el pH de trabajo debería oscilar entre 5,1 y 6,0²) y se estudian los parámetros de validación. En caso de obtener resultados fiables, precisos y exactos, será el método escogido para el análisis rutinario del paracetamol en comprimidos.

3.3 VALIDACIÓN ANALÍTICA: PARÁMETROS DE VALIDACIÓN ANALÍTICA

Por validación analítica (29-54) se entiende “la obtención de pruebas (adecuadamente documentadas) que demuestren que un método de análisis es lo suficientemente fiable para asegurar que el resultado obtenido corresponde a la realidad”. Las características de fiabilidad son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación; junto a éstas cabe destacar las características de practicabilidad o facilidad de llevar a cabo el método, así como las pruebas de idoneidad. Según la Conferencia Internacional de Armonización ICH (36), los criterios fundamentales de la validación analítica incluyen el cálculo de la precisión, la exactitud, los límites de detección y cuantificación, la selectividad, la linealidad y el intervalo de análisis, aunque no necesariamente son aplicables a todos los casos de análisis y dependerá de si se analiza sólo materias primas, productos

acabados o impurezas (ver tabla de recomendaciones de la ICH, en el apartado 3.3.6 de este mismo capítulo).

Por otra parte, también en el laboratorio analítico, validación, cualificación y calibración son conceptos que se suelen emplear indistintamente por el personal, sin embargo, conceptualmente son diferentes (29):

VALIDAR → comprobar y demostrar que un método o proceso cumple la función prevista

CUALIFICAR → verificar o dotar a un aparato de las cualidades o características para que pueda cumplir su función

CALIBRAR → verificar mediante patrones la cualificación de un aparato.

3.3.1 PRECISIÓN

La precisión de un método analítico es el “grado de acuerdo entre los resultados individuales de un ensayo, cuando éste se realiza repetidamente sobre una muestra homogénea, comenzándolo desde el principio”.

La precisión es una medida de grado de repetibilidad del método analítico, realizado en condiciones normales y refleja el error aleatorio del método. Se expresa como la **desviación típica o coeficiente de variación** (desviación típica relativa), del método repetido un mínimo de 6 veces (suele considerarse suficiente este número).

Los valores aceptables para la precisión dependerán de la concentración del “analito”³, número de repeticiones del ensayo y del propio método. Para ello existen estudios (55, 56) (la mayoría de Horwitz) con recomendaciones sobre la máxima variabilidad permisible según dichos parámetros.

3.3.1.1 REPETIBILIDAD

Precisión del método bajo condiciones idénticas: mismo analista, mismo equipo, mismos reactivos y cortos espacios de tiempo.

Se llama repetibilidad instrumental a la precisión (CV%) que daría una misma muestra analizada repetidas y

² Intervalo de máxima solubilidad del paracetamol.

³ “analito” es un término que no está incluido en el diccionario de la Real Academia Española, aunque se utiliza en la presente memoria al ser un término de amplia utilización en el argot de análisis y control.

consecutivas veces.

Se llama repetibilidad del método a la precisión (CV%) de muestras de concentraciones diferentes, analizadas varias y consecutivamente.

3.3.1.2 PRECISIÓN INTERMEDIA

Precisión de las variaciones dentro de un laboratorio: distintos analistas, distintos equipos o distintos días.

3.3.1.3 REPRODUCIBILIDAD

Precisión en condiciones completamente diferentes de analistas, instrumentación, reactivos, laboratorios y días de análisis.

3.3.2 EXACTITUD

La exactitud de un método analítico es “la capacidad para obtener resultados próximos al verdadero”.

La exactitud es una medida del rigor del método analítico y refleja los posibles errores sistemáticos del método. Se expresa como **el porcentaje de recuperación** de una cantidad de “analito” añadida a la muestra, tanto a niveles superiores como inferiores a la concentración que se espera en la muestra. Para comprobar que el método tiene una exactitud adecuada se aplica la fórmula, derivada de la aplicación del análisis estadístico paramétrico de t de Student:

$$t_{\text{experimental}} = (|100-R| \cdot \sqrt{n}) / s$$

De esta forma en función del porcentaje de recuperación (R), del número de muestras (n) y del coeficiente de variación de los resultados obtenidos se calcula el valor de t experimental. Si el valor es inferior al t tabulado para n-1 grados de libertad y 95% de confianza, se deduce que no hay diferencia significativa entre el “analito” puesto y el recuperado por lo que se deduce que el método es suficientemente exacto.

Para determinar el valor verdadero se extrapola la respuesta obtenida en una recta patrón de referencia y se compara con el teórico que se había pesado.

3.3.3 SELECTIVIDAD

La selectividad es “la capacidad para medir exacta y específicamente”, sin interferencias de impurezas de síntesis, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes que puedan estar presentes en la fórmula. Los estudios de selectividad varían según el tipo de método analítico;

- métodos de identificación: se debe demostrar que el método funciona en presencia de otras sustancias que pueden interferir y de las de composición similar.
- ensayos de pureza: se debe demostrar que el método de evaluación permite una evaluación de las impurezas a analizar.
- determinación cuantitativa de un componente: se debe asegurar que la señal medida con el método analítico procede únicamente del “analito”, sin interferencias de excipientes, productos de degradación y/o impurezas.

La selectividad se expresa como el **grado de error** de los resultados obtenidos en análisis de muestras añadidas de impurezas, frente a muestras sin adición. Para demostrar la selectividad, se comparan las precisiones del análisis de muestras adicionadas de impurezas y otras sin adicionar. Para ello:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|x_a - x_b|}{\sqrt{\left(\frac{s^2}{n_a} + \frac{s^2}{n_b} \right)}}$$

se calcula F_{exp} , dividiendo la variancia de uno de los métodos por la del otro. Si la F_{exp} es inferior al F_{tab} para los grados de libertad establecidos (n_a-1 y n_b-1) y 95% de probabilidad se deduce que no hay diferencias significativas entre las precisiones de ambos métodos. Si no existen diferencias significativas, se calcula la t_{exp} , si la t_{exp} así calculada es inferior a la t_{tab} para $[(n_a-1)+(n_b-1)]$ grados de libertad y 95% de confianza se deduce que no hay diferencia de exactitud entre ambos métodos.

3.3.4 LINEALIDAD E INTERVALO DE ANÁLISIS

Linealidad es “la capacidad de un método analítico para dar resultados directamente proporcionales a la concentración de “analito” de la muestra, dentro de un intervalo determinado”. Se expresa como **la variación alrededor de la pendiente de la línea de regresión lineal o coeficiente de regresión lineal**. Se calcula basándose en la relación matemática (cálculo de regresión lineal) obtenida en base a muestras con concentraciones variables de “analito” a las cuales se les ha aplicado el ajuste matemático de mínimos cuadrados.

Intervalo de análisis es el comprendido entre la concentración más baja y la concentración más alta entre los que se demuestra que el “analito” puede ser determinado con precisión, exactitud y linealidad.

Para calcular la linealidad se preparan muestras de concentraciones crecientes del principio activo, cada una de ellas con un mínimo de dos replicados.

Las muestras se analizan restando escrupulosamente el método a validar. A los resultados (área, lectura de absorbancia, etc.) se les aplica el test de homogeneidad de variancias o test de Cochran.

El Test de Cochran o de homogeneidad de las variancias intragrupo, consiste en calcular ($G_{\text{experimental}}$), que es la relación entre la variancia máxima del grupo elevado al cuadrado respecto a la suma de todas las variancias de los datos al cuadrado. Las variancias de los grupos de datos se obtienen aplicando a los resultados un análisis de la variancia (en este caso se utiliza la opción de Excel). La $G_{\text{experimental}}$ se compara con la $G_{\text{tabulada, n grupos, n replicados}}$. Si la $G_{\text{experimental}} < G_{\text{tabulada}}$, entonces puede considerarse que el factor comparado no influye y existe homogeneidad de variancias entre los grupos de resultados.

$$G_{\text{EXPERIMEN}} = \frac{s_{\text{maxima}}^2}{s_i^2}$$

En caso de obtener que no hay diferencias entre las variancias de los grupos se aplicaría la regresión lineal a los datos para ajustarlos a una recta según el método de mínimos cuadrados. Aunque en caso de que no exista homogeneidad de variancias se suele aplicar el llamado test del factor de respuesta, que debería dar un CV menor del 5%, para considerar suficiente y aplicar el método de mínimos cuadrados para ajustar los datos a una recta de regresión.

El factor de respuesta se calcula dividiendo la respuesta del método analítico por la concentración de la muestra, aunque algunos autores lo calculan al revés, lo cual no influye en el resultado ni en su análisis posterior. Si el intervalo es lineal, los CV% de los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Si el coeficiente de variación de los factores de respuesta es menor de un 5%, se considera que presenta una linealidad suficiente.

Otro método para demostrar la linealidad del método se fundamenta en el estudio de los límites de confianza de la pendiente y en el test de proporcionalidad; el primero se halla en base a la expresión:

$$b \pm t \cdot s_b$$

siendo t el valor de la distribución t Student para $n-2$ grados de libertad y una probabilidad del 95% y s_b la desviación estándar de la pendiente, que se lo proporciona el ANOVA de la regresión (mediante el programa informático Excel).

Otro test estadístico se deduce de la expresión:

$$t_{EXPERIMENTAL} = \frac{|b|}{s_b}$$

Si el valor de **t experimental es mayor que el t de las tablas de t Student, incluso para $p=0,001$, indica que la probabilidad de que la pendiente sea distinta de cero es muy elevada.** También es orientativo comprobar que el intervalo de confianza de la pendiente de la recta calculada no incluye el valor de $b=0$, ya que en caso de que lo incluyera no existiría recta).

Respecto al test de proporcionalidad. El valor de la ordenada en el origen (α) indica el error sistemático del método, de manera que para considerar que existe una proporcionalidad adecuada entre concentración y respuesta del método, el 0 debe encontrarse dentro de los límites de confianza. El caso ideal de proporcionalidad se da cuando el término independiente de la recta de regresión es cero. Los límites de confianza se calculan a partir de la expresión:

$$a \pm t \cdot s_a$$

Siendo t el valor de la distribución de t -Student para $n-2$ grados de libertad con una probabilidad del 95%, donde s_a es la desviación estándar del término independiente. La significación estadística de (α) se puede deducir también de la expresión:

$$t_{EXPERIMENTAL} = \frac{|a|}{s_a}$$

Si el valor de **t experimental es menor que el valor de t de las tablas t -Student, la probabilidad de que (α) sea igual a 0 es muy elevada.** En este caso se comprueba que el cero sí está incluido en el intervalo de confianza del término independiente, ya que interesa que α esté lo más cerca posible del cero, lo cual indicaría que el sesgo es mínimo.

3.3.6 LÍMITES DE ANÁLISIS

La determinación de los límites de detección (L_d) y cuantificación (L_c) es laboriosa, por lo que sólo se

efectúa cuando el nivel inferior del intervalo del método analítico se acerca a los límites de detección o cuantificación, como ocurre en el caso de las impurezas y productos de degradación. Si las concentraciones a determinar son elevadas, se puede sustituir su estudio por la determinación de la precisión y la exactitud a la concentración más baja que presenta el “analito” en la práctica.

El límite de detección es “la concentración más baja de “analito” en una muestra que puede detectarse”, pero no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales definidas. Se expresa como concentración de “analito” en la muestra, en tanto por ciento o partes por millón.

El límite de cuantificación es “la menor concentración o cantidad de “analito” de una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas”. Se expresa como la concentración de “analito” (porcentaje, partes por millón, etc.) en la muestra.

Para calcular estos parámetros, se aplican diferentes métodos y se aplican las mismas fórmulas ajustadas. Si se hacen replicados se multiplican las fórmulas generales por $1/\sqrt{n}$:

(a) determinar la relación señal - ruido de fondo (para métodos instrumentales)

Se prepara una muestra blanco o placebo (con todos los excipientes y sin principio activo) y se compara su respuesta frente a la respuesta de varias muestras de principio activo de concentraciones conocidas próximas a cero.

- se determina el nivel de ruido o respuesta del blanco o placebo (B),
- se analizan las muestras con el blanco adicionado de pequeñas cantidades de principio activo,
- comparativamente, se halla la cantidad de “analito” que coincide con la señal de la muestra 1 y se multiplica por 2 o 3 (aceptado como límite de detección) y por 10 (para el límite de cuantificación).

$$L_D = \frac{3B}{b}$$

$$L_C = \frac{10B}{b}$$

Otro método similar y muy utilizado (52) por su practicidad es similar al anterior, pero en este caso se basa en realizar una recta de calibración con al menos tres puntos de concentración baja repetidos varias veces (entre 3 y 6 veces). Se llevan a cabo todas las analíticas y se determinan las desviaciones estándares para cada proporción ensayada. Con las desviaciones estándares obtenidas para cada proporción se calcula la desviación estándar media. El nivel o señal de ruido se estima por la relación DS_{MEDIA}/b , siendo b la pendiente de la recta.

Se considera el límite de detección la señal de ruido multiplicada por tres y el límite de cuantificación la

señal de ruido multiplicada por 10.

(b) menor cantidad detectable

Se preparan soluciones conteniendo unas cantidades decrecientes de “analito” desde el máximo. El límite de detección se calcula a partir de la dilución en que no se puede distinguir la respuesta del “analito” de la del blanco.

(c) análisis repetido del blanco

Se repite el análisis del blanco (placebo) $n \geq 10$ veces y se calcula su media (\bar{Y}_b) y la desviación estándar de la respuesta de los n blancos (s_b), el valor b corresponde a la pendiente de la recta de calibrado del analito que se calculó para la linealidad. Para los métodos espectrofotométricos donde se utiliza un blanco como corrección de la medida se recomienda utilizar este método. Las fórmulas para su cálculo varían si se trata de métodos cromatográficos:

$$L_D = \frac{\bar{Y}_b + 3s_b}{b}$$

$$L_C = \frac{\bar{Y}_b + 10s_b}{b}$$

o de métodos espectrofotométricos:

$$L_D = \frac{3s_b}{b}$$

$$L_C = \frac{10s_b}{b}$$

(d) estimación del límite de detección mediante el valor de la ordenada en el origen expresado en unidades de concentración

Se confecciona una recta de calibrado para un intervalo de concentraciones bajas (requiere que la recta sea lineal en este intervalo); se admite tomar a , como una estimación del límite de detección. El límite inferior de la respuesta se toma como $3/a$ y el límite de detección expresado en las mismas unidades que las abscisas en la recta de calibración es:

$$\frac{3|a|}{b}$$

e) extrapolación a concentración cero de muestras conteniendo bajas concentraciones de “analito”

A partir de muestras con baja concentración de “analito” se extrapola gráfica o matemáticamente la respuesta para concentración cero, la cual se tomará como estimación de la respuesta de un hipotético blanco. A continuación se calcula la desviación estándar de la respuesta a concentración cero por extrapolación gráfica o bien por cálculo matemático, la cual se tomará como estimación de la desviación estándar de la respuesta de un hipotético blanco. Este método se aplica cuando no se hace blanco de la muestra.

$$L_D = \frac{\bar{Y} + 3s_b}{b}$$

$$L_C = \frac{\bar{Y} + 10s_b}{b}$$

3.3.6 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN: REQUERIMIENTOS

Según la finalidad de los análisis, hay que considerar unos parámetros de validación u otros. Según la Comisión Internacional de Armonización, estos son los que se muestran en el cuadro 3:

TIPO DE ANÁLISIS	IDENTIFICACIÓN	IMPUREZAS		CUANTIFICACIÓN
		CUANTIF	IDENTIF	
EXACTITUD	-	SI	-	SI
REPRODUCIBILIDAD				
REPETIBILIDAD	-	SI	-	SI
PRECISIÓN INTERMEDIA	-	SI (1)	-	SI (1)
ESPECIFICIDAD	SI	SI	SI	SI
LÍMITE DE DETECCIÓN	-	-	SI	-
LÍMITE CUANTIFICACIÓN	-	SI	-	-
LINEALIDAD	-	SI	-	SI
INTERVALO	-	SI	-	SI

(1) Si se comprueba la reproducibilidad, la precisión intermedia no es necesaria.

En el caso del desarrollo experimental de la tesis doctoral, se está ante una valoración analítica de cuantificación de paracetamol en una forma farmacéutica, por lo que los parámetros de validación mínimos a tener en cuenta serán: exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, especificidad, linealidad e intervalo de análisis.

3.4 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE COMPRIMIDOS DE PARACETAMOL

Para la validación del método se han efectuado los ensayos siguientes:

- Controles generales: equipo de análisis, patrones, reactivos y material utilizados. Control de cubeta, control de medio disolución, según la RFE (57).
- Redacción de los PNTs de análisis.
- Linealidad con soluciones patrón de paracetamol (patrón secundario de materia prima).

Se pesan individualmente y con exactitud cantidades crecientes de paracetamol patrón secundario para preparar soluciones con concentraciones entre 70-130%, preparando dos soluciones para cada porcentaje (método de doble pesada). Se preparan 5 puntos para el intervalo (70-85-100-115-130%).

Los x mg pesados con exactitud son llevados a 250 ml en matraz aforado con el medio de disolución que aplique⁴ y de ésta se toman 5 ml que son llevados con exactitud a 100 ml con el medio de disolución de que se trate.

Se leen las absorbancias de las muestras finales frente a blanco de medio de disolución y los datos (concentración y absorbancia) se relacionan estadísticamente en una hoja de cálculo de Microsoft Excel 97 y se le aplica el test de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. Se considera que el método es lineal si el coeficiente de regresión entre las dos variables es $\geq 0,99$ y tras aplicar el ANOVA a la regresión, se comprueba que la pendiente y sus límites de confianza no incluyen el cero (test de sensibilidad) ya que en caso de incluir el cero quiere decir que no habría recta. Para comprobarlo se aplica la fórmula $t_{exp} = |b|/s_b$ siendo $|b|$ el valor de la pendiente y s_b la variabilidad del coeficiente de la pendiente que nos lo proporciona Excel con el ANOVA de la regresión. El mismo resumen nos proporciona la $t_{teórica}$ o $t_{tabulada}$ con lo cual se comparan ambas, si $t_{experimental} < t_{tablas\ 95\%}$ significará que la probabilidad de que b sea diferente de cero es superior al 95-99% (dependiendo del nivel de probabilidad con el que se compare).

De la misma manera se calcula el test de proporcionalidad, para el cual se toma la ordenada en el origen y se calcula el intervalo de confianza, el intervalo debería incluir el cero, para poder decir que el método no presenta sesgo o error. Estadísticamente se calcula la t en base a $t = |a|/s_a$ cuyos valores se obtienen a

⁴ Para el método Agua-metanol sería: 5 ml de metanol y completa con agua a 250 ml. Para solución reguladora, sería diluir a 250 ml con solución reguladora. Para el método Agua será diluir con agua desionizada sin completar el enrase, poner en ultrasonidos durante 10 minutos, dejar atemperar y enrasar hasta 250 ml.

partir del ANOVA de la regresión. Si $t_{exp} < t_{tab}$ significará que es probable que $a=0$ (nivel 95% de confianza).

Otro test estadístico utilizado para demostrar la linealidad de los resultados es a partir del ANOVA de la regresión completo, calcular la $F_{experimental}$ para el error SS_{reg} y comparada con la $F_{tabulada}$, si $F_{experimental} > F_{tabulada}$ significa que existe una pendiente diferente de cero y por lo tanto una recta de ajuste. A continuación se calcula la $F_{experimental}$ para la flata de ajuste SS_{lof} y se compara con la $F_{tabulada}$. Si la $F_{experimental}$ es menor que la $F_{tabulada}$ significará que existe linealidad entre los datos.

➤ Selectividad.

Este ensayo servirá para determinar si los excipientes interfieren en el intervalo de análisis de manera importante, para ello se prepara suficiente placebo con la proporción que llevarán en el principio activo:

Avicel pH 101 100 mg/comprimido

Almidón maíz 90 mg /comprimido

Talco Venecia 00000 8 mg / comprimido

Estearato Mg 2 mg/comprimido

Todos los componentes se mezclan por volteo en un recipiente de plástico adecuado durante 10 minutos. De la mezcla se tomarán las muestras de aproximadamente 200 mg que es la cantidad de excipiente que llevan los comprimidos.

➤ Linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y exactitud para placebo cargado de patrón paracetamol.

En este caso se prepara el placebo cargado de la siguiente manera, se preparan los excipientes necesarios para por ejemplo 30 comprimidos y a continuación se pesa el 70% del paracetamol que les correspondería (entonces se pesaría 1050 mg en vez de 1500 mg para 30 comprimidos) se mezcla todo durante 10 minutos en un excipiente adecuado y de esta muestra se toman las alícuotas (los 2 analistas dos pesadas) para la validación. La muestras se conservan en desecador a temperatura ambiente para que los analistas tomen muestra por duplicado y se complete la validación.

El procedimiento se repite para cada porcentaje de placebo cargado.

Los analistas realizan las determinaciones por duplicado (doble pesada) de estos resultados se calcula la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada para de análisis, es decir se dispone de una medida de repetibilidad dentro de las condiciones previstas. Se considerará repetibilidad del método el intervalo máximo de variabilidad encontrado (debería estar por debajo del 2% de CV).

Para cada porcentaje (incluyendo datos de los dos analistas y los dos días, ocho datos) se calcula la media y la desviación estándar y los coeficientes de variación, con lo cual se obtiene una valoración de la exactitud o recuperación del método analítico para cada nivel estudiado (dada por la media) y una valoración de la reproducibilidad del método analítico para cada nivel estudiado (proporcionada por los coeficientes de variación de los grupos).

Como parámetro de exactitud global se considerará la media de las exactitudes parciales.

El procedimiento se repite para cada una de las metódicas propuestas: agua desionizada adicionada de metanol, solución reguladora de fosfatos y agua desionizada. Al final para el método escogido se calcularán los límites de análisis y la especificidad.

3.4.1 ANÁLISIS EN AGUA/METANOL: RESULTADOS

3.4.1.1.GENERALIDADES

Instrumentación analítica

Espectrofotómetro HELWLETT PACKARD VECTRA 286/12 (8452 A DIODE ARRAY).
SOTWARE: UV-VIS HP 89532A UV-VIS Software Rev 1.00.00

Patrones de referencia

➤ patrones primarios:

nombre: Paracetamol patrón. Riqueza: 99,84%

proveedor: SDM

nº lote: SDM/ PAR/ PAJ/ 95 (31/03/95)

nombre: 4-cloroacetanilida patrón. Riqueza: 97%

proveedor: SDM

nº lote: SDM/ 23121 (03/04/95)

nombre: p-aminofenol patrón. Riqueza: 98%

proveedor: SDM

nº lote: 98473 (03/04/95)

➤ patrones secundarios:

nombre: Paracetamol materia prima. Riqueza: 99,2%

proveedor: Mallinckrodt Chemical Inc.

nº lote: 6375994M349 (caducidad: 10/2000)

Reactivos:

Agua desionizada (SDM, conductividad $<0,2 \mu\text{S}$)

Metanol HPLC JT Baker (fabricante) Lote: 9902640006 Caducidad: 02/2001

Control de la cubeta

Se determina la absorbancia de la cubeta a 240 nm.

1	$-4,4 \cdot 10^{-4}$
2	$+2,3 \cdot 10^{-4}$
3	$-2,9 \cdot 10^{-4}$

La absorbancia que aparece es mínima y en principio no afectará a las lecturas de muestras. En caso de salir absorbancia, se limpia la cubeta llevándola a ebullición con HNO_3 reactivo, se saca del baño y se deja en agua desionizada durante 48 horas. Se adjunta la gráfica de absorbancia obtenida (figura 1):

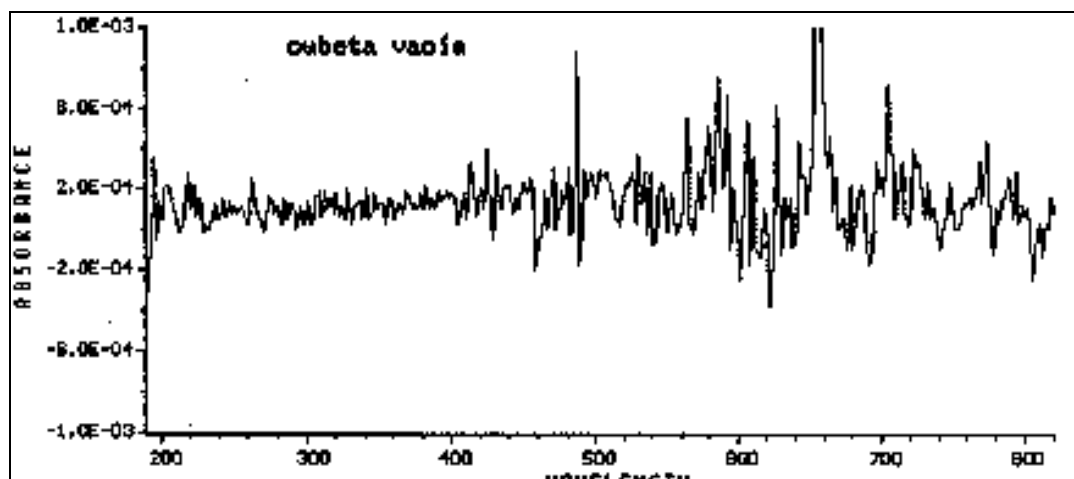


Figura 1: Absorbancia de la cubeta vacía.

Control de los disolventes

Se determina la absorbancia del disolvente (agua - metanol) frente al aire a 240 nm. En esta longitud de onda, la absorbancia será inferior a 0,40 y preferiblemente <0,20.

1	0.04849
2	0.04463
3	0.04562

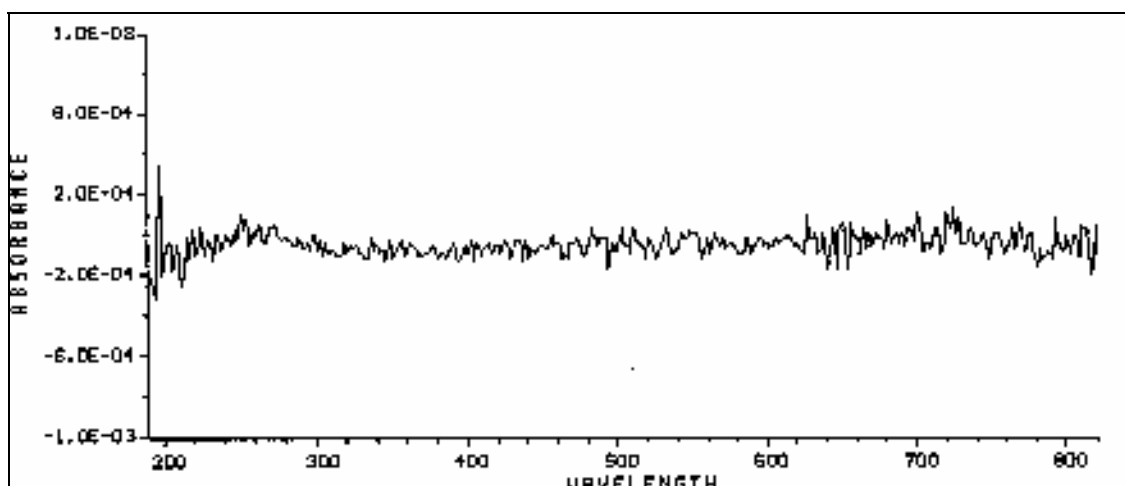


Figura 2: Absorbancia del disolvente (agua - metanol) frente al aire.

Se adjunta el gráfico de absorbancia obtenida (figura 2), donde puede comprobarse que es menor que 0,20 en todo el espectro.

Comprobación de los máximos de absorbancia para el patrón secundario paracetamol

Se adjunta el gráfico de absorbancia obtenida (figura 3), observándose un máximo de absorbancia hacia 244 nm, atribuible al paracetamol.

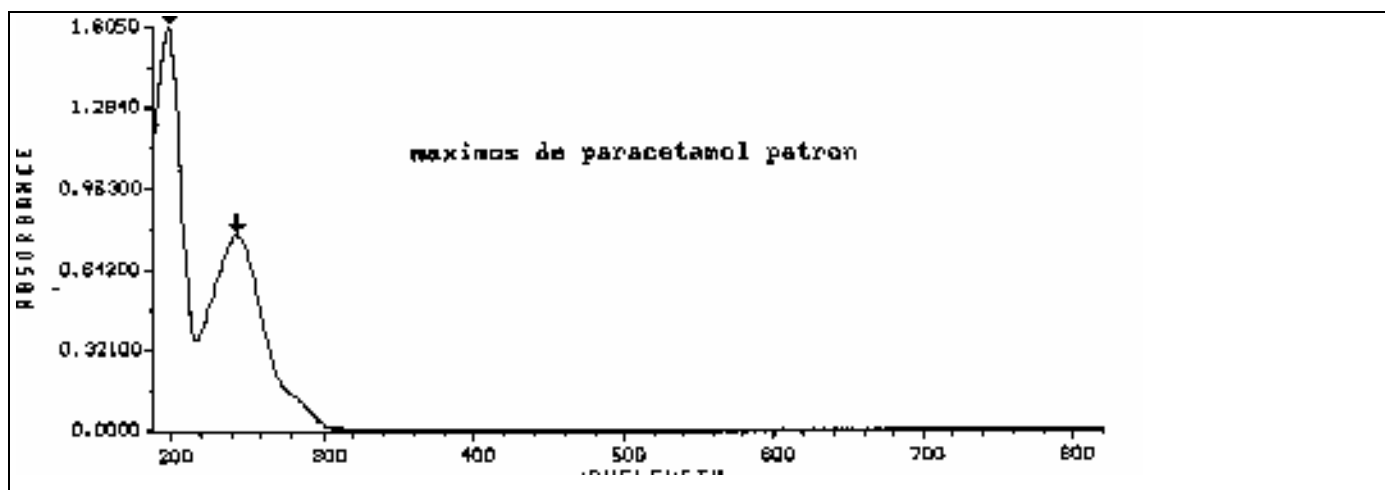


Figura 3: Máximos de absorbancia en agua - metanol del patrón MP Paracetamol.

3.4.1.2 LINEALIDAD CON PATRÓN DE MATERIA PRIMA

La linealidad del método se ha comprobado con 6 soluciones de paracetamol patrón (doble pesada) de distinta concentración, abarcando un intervalo que incluye la concentración teórica de la muestra problema (50-150%).

Los resultados obtenidos son los siguientes (tabla 1):

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	Factor de respuesta
5,642	0,39945	0,070799362
5,984	0,38630	0,064555481
10,100	0,67101	0,066436634
10,001	0,64322	0,064315235
12,102	0,80508	0,066524541
12,325	0,80857	0,065604057
14,900	0,96424	0,064714094
14,871	0,96024	0,064571313
17,523	1,11539	0,063652913
17,475	1,11510	0,063811159
20,100	1,27507	0,063436318
20,125	1,28000	0,063602484

Tabla 1: Resultados Agua-Metanol para MP paracetamol.

A estos datos (concentraciones y absorbancias) se ha aplicado el test estadístico de homogeneidad de variancias de Cochran (tabla 3), obteniéndose una $G_{\text{experimental}}$ de 0,77404, que se compara con la $G_{\text{tablas}} = 0,7808$ para $p=0,05$ de probabilidad, para 6 concentraciones estudiadas y 2 replicados de cada concentración (tabla 2). Dado que el valor experimental de G es inferior al tabulado (tabla 4), puede afirmarse que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración y puede aplicarse la hipótesis de un modelo lineal, estimado por el método de mínimos cuadrados.

A1	A2	A3	A4	A5	A6
0,39945	0,67101	0,80508	0,96424	1,11539	1,27507
0,38630	0,64322	0,80857	0,96024	1,11510	1,28000

Tabla 2: Datos tabulados para el cálculo del Test de Cochran

Análisis de variancia de un factor

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Variancia	
Columna 1	2	0,78575	0,392875	8,6461	E-05
Columna 2	2	1,31422	0,657113333	0,00038623	
Columna 3	2	1,61365	0,806825	6,0901	E-06
Columna 4	2	1,92448	0,96224	8	E-06
Columna 5	2	2,23049	1,115245	4,205	E-08
Columna 6	2	2,55507	1,277535	1,2152	E-05

Tabla 3: Resultados del ANOVA de los datos de la tabla 1.

G experimental	0,77404
G tabulada (95%, 6 concentraciones y 2 replicados)	0,7808

Tabla 4: Resultados de G de Cochran.

El factor de respuesta se calcula dividiendo la concentración (en $\mu\text{g/ml}$) por la absorbancia (tabla 1). Se determina el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los factores de respuesta calculados.

Estadística factores respuesta	
Media	0,065168633
Desviación estándar	0,002058299
CV%	3,158419458

Tabla 5: Estadística de los factores de respuesta para MP paracetamol Agua-Metanol.

El coeficiente de variación presenta un valor menor al establecido como indicador de linealidad ($<5\%$), con lo cual puede afirmarse que existe una relación de linealidad entre ambas variables.

Se determina la ecuación de la recta de calibrado $y = bx + a$, tomando en abscisas las concentraciones (en $\mu\text{g/ml}$) y en ordenadas las correspondientes absorbancias:

$$\text{Absorbancia} = \text{pendiente} * \text{concentración} + \text{ordenada origen}$$

$$y = 0,061698832 x + 0,040085278$$

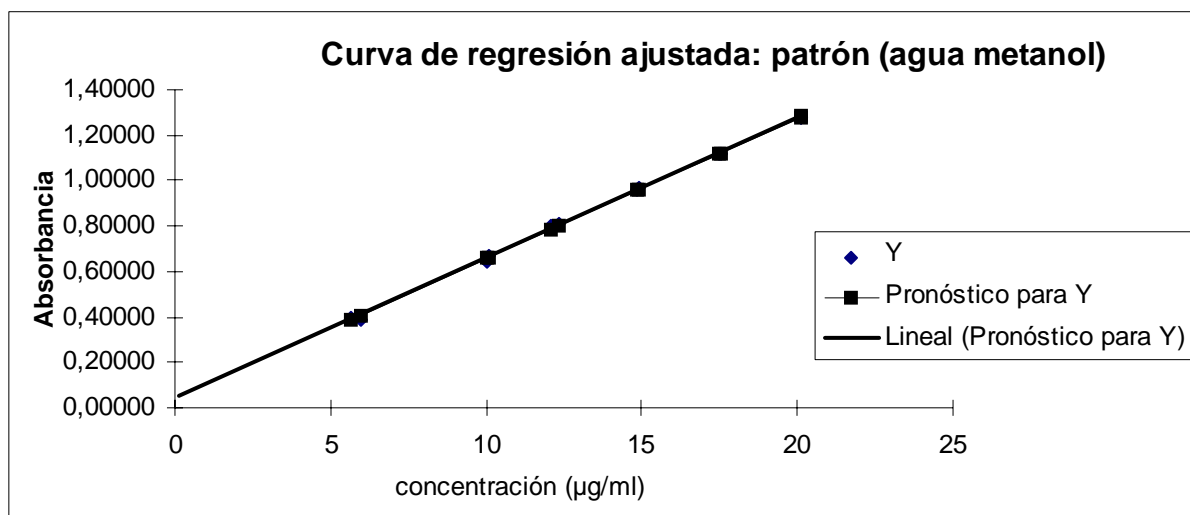


Figura 4: Recta de calibración de MP paracetamol en agua.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple r	0,999309244
Coefficiente de determinación r^2	0,998618965
r^2 ajustado	0,998480861
Error típico	0,011891193
Observaciones	12

Tabla 6: Estadística de la regresión MP Agua-Metanol.

Tanto el valor del coeficiente de correlación (cercano a 1, $r=0,99930$) como el de determinación r^2 , indican una buena linealidad (tabla 6). El coeficiente de determinación da una indicación del grado de aproximación de los puntos a la relación lineal. Por lo tanto, puede afirmarse que esta relación lineal explica en un 99,86% la variancia de la absorbancia.

Para acabar de comprobar la linealidad y estudiar la proporcionalidad, se calculan los límites de confianza de la pendiente (b); $b \pm s_b t$, y de la ordenada en el origen (a); $a \pm s_a t$ (tabla 7).

TEST DE PROPORCIONALIDAD				
	Máximo	Mínimo	Observaciones	Test de t
Límites b	0,063315402	0,06008226	no incluye el cero	85,0349665
Límites a	0,063102005	0,01706855	presenta sesgo	3,8802213
t (GL (n-2)=10, p=0.05%)			2,228	
	Coficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Ordenada origen (a)	0,040085278	0,010330668	3,88022132	0,00305783
Pendiente (b)	0,061698832	0,00072557	85,0349665	1,237 E-15

Tabla 7: Test de proporcionalidad MP Agua-Metanol.

Test de sensibilidad:

Tomando los límites de confianza de la pendiente se comprueba que no incluye el cero, es decir que existe una pendiente y por lo tanto una recta. El test de t:

$$t_{\text{exp}} = |b| / s_b = 85,0349665$$

$t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$ incluso para $p = 0,001$, lo que indica que la probabilidad de que $b \neq 0$ es superior al 99,9%.

Test de proporcionalidad:

Tomando los límites de confianza para la ordenada en el origen y calculando, se observa que estos límites no incluyen el cero por lo que el método presenta un ligero sesgo. El test de t:

$$t_{\text{exp}} = |a| / s_a = 3,88022132$$

Este valor de t es mayor al $t_{\text{tablas}} = 2,228$ (para $p = 0,05$ y $GL = 10$), por lo que la probabilidad de que $a \neq 0$ es muy elevada.

Otro test estadístico de alta significación es aplicar un análisis de la variancia (ANOVA) completo a la recta de regresión:

ANÁLISIS DE VARIANCIA					
	Grados libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión (SSreg)	1	1,02245911	1,02245911	7230,945527	4,96
Falta de ajuste (Sslof)	4	0,00091502	0,00022875	2,750681	4,53
Error puro (SSpe)	6	0,00049898	0,00008316		
Residual (SSr)	10	0,00141400	0,00014140		
Total	11	1,02387311			

Tabla 8: ANOVA MP Agua-Metanol.

Del cual puede concluirse, que dado que $F_{exp} > F_{tablas}$ ($p=0,05$; 1; 10)= 4,96 queda demostrada la existencia de una pendiente $\neq 0$.

Por otra parte, dado que $F_{exp} < F_{tablas}$ ($p=0,05$; 4; 6)= 4,53 queda demostrada la linealidad entre los resultados obtenidos.

3.4.1.3 SELECTIVIDAD

Se ha preparado una muestra problema de placebo en las mismas condiciones en que se tratarían los comprimidos y se ha efectuado un espectro UV completo (figura 5). Se observa que sobre la longitud de onda de absorción del paracetamol, existe una señal de ruido debida a alguno de los excipientes. Se analiza la absorbancia a $\lambda = 244$ nm, para evaluar su interferencia en el análisis del paracetamol.



Figura 5: Absorbancia del placebo en agua metanol.

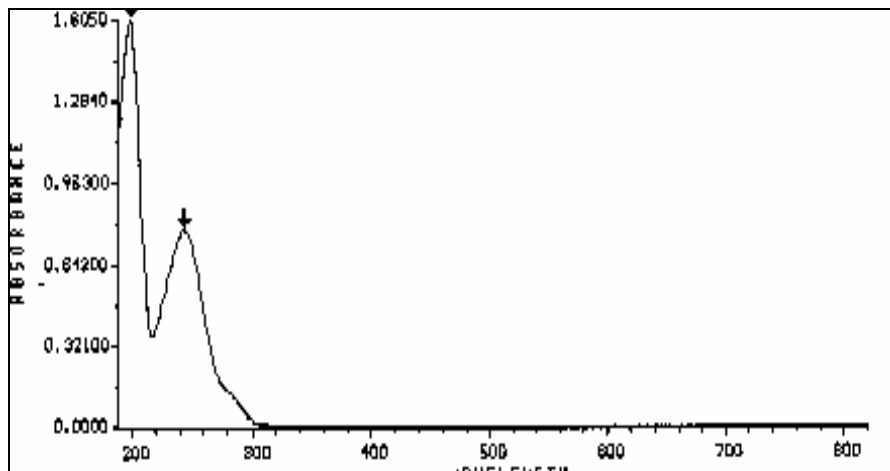
205,0 mg placebo	0,00840
	0,00757
	0,00790
199,3 mg placebo	0,00562
	0,00452
	0,00471

Teniendo en cuenta estas lecturas de absorbancia, pueden considerarse despreciables cuando se valoran los comprimidos, ya que la absorbancia sería $>0,9$, lo cual supondría un error de lectura espectrofotométrica de alrededor del 0,55% por exceso. Sin embargo, cuando se trabaje a bajas absorbancias, el error pasaría a ser

más importante con lo que debería corregirse este exceso por un método adecuado, lectura previa de absorbancia del placebo, o añadir placebo al patrón de paracetamol que se prepara para cada ensayo.

Figura 6: Espectro de absorbancia de placebo cargado con MP patrón de paracetamol.

Se comprueba que el pico correspondiente al principio activo es puro dado que los espectros UV



completos [para muestra placebo (figura 5), patrón paracetamol (figura 3) y placebo cargado de patrón paracetamol (figura 6)] son idénticos y muestran los máximos característicos del paracetamol de referencia.

3.4.1.4 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD) Y EXACTITUD CON PLACEBO CARGADO.

Para realizar este ensayo se ha preparado un placebo con la proporción de excipientes del comprimido y a diferentes alícuotas del mismo se han añadido cantidades conocidas de paracetamol patrón, de manera que las concentraciones de dicho producto expresadas como $\mu\text{g/ml}$, quedan entre 70 y 130% del contenido teórico. Se han efectuado 8 valoraciones de cada una de las concentraciones, en 2 días diferentes y por 2 analistas.

Durante el primer día, tanto el analista A como el analista B han efectuado 2 determinaciones de cada nivel de concentración (tablas 9-12):

ANALISTA 1

%	% REAL	Concentración real ($\mu\text{g/ml}$)	ABSORBANCIA	concentración extrapolada ($\mu\text{g/ml}$)	% RECUPERACIÓN
70	71,2	8,54	0,5668	8,51	99,6
	71,3	8,56	0,5726	8,59	100,4
85	81,9	9,82	0,6610	9,92	101,0
	82,0	9,84	0,6671	10,01	101,7
100	103,3	12,40	0,8247	12,38	99,8
	103,6	12,43	0,8320	12,49	100,4
115	116,7	14,01	0,9568	14,36	102,5
	116,5	13,98	0,9498	14,26	101,9
130	129,9	15,59	1,0452	15,75	101,0
	130,2	15,06	1,0251	15,39	102,2

Tabla 9: Resultados analista 1, día 1.

ANALISTA 2

%	% REAL	Concentración real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
70	68,2	8,18	0,5420	8,14	99,4
	67,5	8,10	0,5213	7,82	96,5
85	83,5	10,02	0,6758	10,14	101,2
	84,3	10,12	0,6781	10,18	100,6
100	100,1	12,02	0,8124	12,19	101,5
	104,1	12,50	0,8457	12,69	101,6
115	116,5	13,98	0,9400	14,11	100,9
	116,8	14,02	0,9325	14,00	99,9
130	132,3	15,88	1,0587	15,99	100,7
	131,6	15,79	1,0555	15,84	100,3

Tabla 10: Resultados analista 2, día 1.

En el segundo día, tanto el analista A como el B efectuaron 2 determinaciones de cada nivel de concentración:

ANALISTA 1

%	% REAL	Concentración real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
70	69,3	8,32	0,5432	8,15	98,0
	70,0	8,40	0,5589	8,39	99,9
85	83,3	10,00	0,6785	10,18	101,8
	86,7	10,40	0,6958	10,44	100,4
100	102,0	12,24	0,8305	12,46	101,8
	101,5	12,18	0,8320	12,49	102,6
115	116,5	13,98	0,9456	14,19	101,5
	116,2	13,94	0,9498	14,26	102,2
130	130,1	15,62	1,0147	15,54	99,5
	130,7	15,68	1,0626	15,95	101,7

Tabla 11: Resultados analista 1, día 2.

ANALISTA 2

%	% REAL	Concentración real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
70	70,0	8,40	0,5568	8,36	99,5
	70,5	8,46	0,5600	8,41	99,4
85	84,9	10,18	0,6748	10,13	99,5
	85,3	10,24	0,6758	10,14	99,1
100	101,1	12,14	0,8025	12,04	99,2
	101,4	12,17	0,8204	12,31	101,2
115	116,7	14,01	0,9422	14,14	101,0
	118,7	14,24	0,9495	14,25	100,1
130	133,3	16,00	1,0599	15,99	99,9
	134,1	16,09	1,0690	16,04	99,7

Tabla 12: Resultados analista 2, día 2.

En el cuadro resumen de la validación (tabla 13) se adjuntan todos los cálculos efectuados:

- la media de los dos resultados y su coeficiente de variación (**repetibilidad del método**), para cada analista, nivel de concentración y día.
- la media (**exactitud o recuperación**), desviación estándar y coeficiente de variación global (**reproducibilidad**) para cada una de las cinco concentraciones.

En la tabla 14, aparece el resumen de los parámetros estudiados.

VALIDACIÓN PARACETAMOL (AGUA -METANOL)

%		DÍA 1	DÍA 2		
70%	ANALISTA 1	99,62	97,99	m	99,1
	M	100,40	99,86		
	M	100,01	98,93		
	CV %	0,55	1,34		
	ANALISTA 2	99,40	99,49		
	M	96,55	99,40		
	M	97,97	99,44	SD	1,23176513
	CV %	2,06	0,06	CV %	1,24308771
85%	ANALISTA 1	101,03	101,84	m	100,5
	M	100,50	100,42		
	M	100,77	101,13		
	CV %	0,37	1,00		
	ANALISTA 2	101,19	99,45		
	M	100,57	99,05		
	M	100,88	99,25	SD	0,90665942
	CV %	0,31	0,20	CV %	0,90209028
100%	ANALISTA 1	99,82	101,83	m	100,7
	M	100,44	100,40		
	M	100,13	101,12		
	CV %	0,44	1,00		
	ANALISTA 2	101,48	99,25		
	M	101,58	101,19		
	M	101,53	100,22	SD	0,91975674
	CV %	0,07	1,37	CV %	0,9129225
115%	ANALISTA 1	102,52	101,49	m	101,2
	m	101,94	102,23		
	M	102,23	101,86		
	CV %	0,40	0,52		
	ANALISTA 2	100,89	100,95		
	M	99,86	100,08		
	M	100,37	100,52	SD	0,97342419
	CV %	0,73	0,62	CV %	0,96146485
130%	ANALISTA 1	101,00	99,52	m	100,6
	M	102,16	101,71		
	M	101,58	100,62		
	CV %	0,81	1,54		
	ANALISTA 2	100,67	99,94		
	M	100,32	99,73		
	M	100,49	99,83	SD	0,94568166
	CV %	0,25	0,15	CV %	0,93975784

Tabla 13: Resultados totales para Placebo Agua-Metanol.

REPETIBILIDAD	CV% entre	2,06	0,06
REPRODUCIBILIDAD	70%	1,24	
CV %	85%	0,90	
(n=8)	100%	0,91	
	115%	0,96	
	130%	0,94	
EXACTITUD	70%	99,09	
RECUPERACIÓN (%)	85%	100,51	
(n=8)	100%	100,75	
	115%	101,24	
	130%	100,63	
EXACTITUD GLOBAL	M	100,44	
(n=5)	SD	0,8073	
	CV %	0,8037	
	t experimental	1,22899265	
	t tablas	2,776	
		P= 0.05 GL= 4	

Tabla 14: Resumen de las estadísticas de validación.

CONCLUSIONES SOBRE LA REPETIBILIDAD

Los coeficientes de variación están comprendidos entre 0,06 % y 2,06%, por lo tanto puede concluirse que el método analítico es repetitivo dado que, en todos los casos, excepto para el analista 2 el día 1 al 70% que obtuvo un alto coeficiente de variación fuera de límites (límite máximo especificado por las normas ICH (2%)). La investigación de los datos primarios no dio indicios de error, con lo cual en caso de ser éste el método se debería verificar este resultado o reducir el intervalo de validación.

CONCLUSIONES SOBRE REPRODUCIBILIDAD

Viene dada por el coeficiente global para cada concentración ensayada los CV% son similares para todos los niveles de concentración ensayados. Puede afirmarse que el método es reproducible (tabla 14).

CONCLUSIONES SOBRE LA EXACTITUD

De los resultados anteriores (tabla 14) se desprende que el intervalo de concentraciones en estudio se encuentra comprendido entre el 99 y 101,24%, por lo que la técnica cumple con el requisito de exactitud, siendo la recuperación media para todo el intervalo en estudio de 100,44 %, la cual es satisfactoria.

Se confirma con un test de t student que no hay diferencias significativas entre las recuperaciones medias para cada nivel de concentración:

$$t_{\text{exp}} = |100 - R| * \sqrt{n} / SD = 1,228$$

$$t_{\text{tab}} (p=0.05 \text{ y } GL= 4) = 2,776$$

$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, lo que significa que ambos valores no son estadísticamente diferentes, es decir no existen diferencias significativas entre la exactitud a nivel bajo (70, 85%), medio (100%) o alto (115, 130%) de concentración del “analito”.

70%	85%	100%	115%	130%
99,6	101,0	99,8	102,5	101,0
100,4	100,5	100,4	101,9	102,2
98,0	101,8	101,8	101,5	99,5
99,9	100,4	100,4	102,2	101,7
99,4	101,2	101,5	100,9	100,7
96,5	100,6	101,6	99,9	100,3
99,5	99,5	99,2	101,0	99,9
99,4	99,1	101,2	100,1	99,7

Tabla 15: Datos tabulados para el cálculo del ANOVA.

Si se aplica un ANOVA de una dirección (cuadro 15) sobre los resultados de recuperación individuales obtenidos para cada nivel, se obtiene una $F_{\text{experimental}} = 5,1855$, frente a la $F_{\text{tablas}} (p=0,05; 4; 35)$ de 2,641, lo que indica que el factor de concentración afecta a la recuperación, lo cual es a priori una dificultad del método, ya que a bajas concentraciones las recuperaciones son menores que a altas concentraciones. Si interesase definitivamente este método sobre los otros dos, debería reducirse el intervalo de validación para comprobar que todos los parámetros de las validación demuestran la validez del método propuesto. Sin embargo, la exactitud del método se considera adecuada ya que todas las recuperaciones están comprendidas en un margen estrecho entre 99-101,2%, en todo el grupo de concentraciones estudiado.

ANÁLISIS DE VARIANCIA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	20,8544945	4	5,213623632	5,185520	0,002181	2,641463936
Dentro de los grupos	35,1896830	35	1,005419516			
Total	56,0441776	39				

Tabla 16: análisis de la variancia del método de análisis agua-metanol.

3.4.1.5 LINEALIDAD PRINCIPIO ACTIVO Y PLACEBO

La linealidad del método para las muestras placebo adicionadas de patrón ha sido comprobada con las 5 concentraciones de paracetamol patrón (doble pesada) adicionadas de placebo, abarcando un intervalo que

incluye la concentración teórica de la muestra problema (70-130%) efectuando 8 replicados de cada concentración.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA	FACTOR DE RESPUESTA
8,54	0,5668	0,06637
8,56	0,5726	0,06689
8,32	0,5432	0,06529
8,40	0,5589	0,06654
8,18	0,5420	0,06623
8,10	0,5213	0,06433
8,40	0,5568	0,06629
8,46	0,5600	0,06623
9,82	0,6610	0,06731
9,84	0,6589	0,06696
10,00	0,6785	0,06785
10,40	0,6958	0,06690
10,02	0,6758	0,06742
10,12	0,6781	0,06701
10,18	0,6748	0,06626
10,24	0,6758	0,06600
12,40	0,8247	0,06650
12,43	0,8320	0,06692
12,24	0,8305	0,06785
12,18	0,8145	0,06689
12,02	0,8124	0,06761
12,50	0,8457	0,06768
12,14	0,8025	0,06613
12,17	0,8204	0,06742
14,01	0,9568	0,06830
13,98	0,9498	0,06792
13,98	0,9456	0,06762
13,94	0,9498	0,06811
13,98	0,9400	0,06722
14,02	0,9325	0,06653
14,01	0,9422	0,06726
14,24	0,9495	0,06668
15,59	1,0452	0,06703
15,06	1,0251	0,06807
15,62	1,0147	0,06498
15,68	1,0626	0,06777
15,88	1,0587	0,06667
15,79	1,0555	0,06684
16,00	1,0599	0,06624
16,09	1,0690	0,06645

Tabla 17: Resultados Placebo en Agua-Metanol.

A estos datos (concentraciones y absorbancias, tabla 18) se ha aplicado el test estadístico de comparación

de variancias de Cochran, obteniéndose una $G_{\text{experimental}}$ de 0,36855, que comparado con la G_{tablas} para $p=0,05$, 5 concentraciones y 8 replicados que es 0,4564, el valor experimental es inferior al tabulado, con lo cual no existen diferencias significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración y puede aplicarse la hipótesis de un modelo lineal, estimado por el método de mínimos cuadrados.

70	85	100	115	130
0,5668	0,6610	0,8247	0,9568	1,0452
0,5726	0,6589	0,8320	0,9498	1,0251
0,5432	0,6785	0,8305	0,9456	1,0147
0,5589	0,6958	0,8145	0,9498	1,0626
0,5420	0,6758	0,8124	0,9400	1,0587
0,5213	0,6781	0,8457	0,9325	1,0555
0,5568	0,6748	0,8025	0,9422	1,0599
0,5600	0,6758	0,8204	0,9495	1,0690

Tabla 18: Absorbancias obtenidas tabuladas para el cálculo del Test de Cochran

Análisis de variancia de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Variancia
70 %	8	4,42166	0,5527075	0,00027075
85 %	8	5,39874	0,67484313	0,00013008
100 %	8	6,58257	0,82282156	0,00018073
115 %	8	7,56609	0,94576125	5,5699E-05
130 %	8	8,39062	1,0488275	0,00037194

Tabla 19: ANOVA de los datos obtenidos Placebo Agua-Metanol.

G experimental	0,36855
G tabulada (95%, 5 concentraciones y 8 replicados)	0,4564

Tabla 20: Resultados de G de Cochran.

El factor de respuesta se calcula dividiendo la concentración (en $\mu\text{g}/\text{ml}$) por la absorbancia. Se determina el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los factores de respuesta calculados.

Estadística factores respuesta	
Media	0,06686
Desviación estándar	0,000853
CV%	1,27654

Tabla 21: Estadística de los factores de respuesta.

El coeficiente de variación presenta un valor menor que el establecido como indicador de linealidad ($<5\%$), con lo cual puede afirmarse que existe una relación de linealidad entre ambas variables (tabla 21).

Se determina la ecuación de la recta de calibrado $y = bx + a$, tomando en abscisas las concentraciones (en

$\mu\text{g/ml}$) y en las ordenadas las correspondientes absorbancias (figura 9):

Absorbancia = pendiente * concentración + ordenada origen

$$y = 0,06777 \cdot x - 0,010237$$

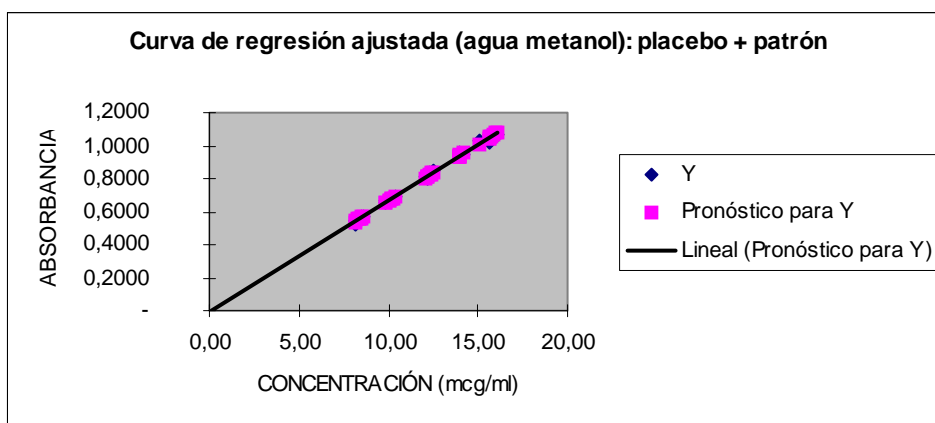


Figura 7: Recta de calibración Placebo + Paracetamol patrón en agua - metanol.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple r	0,99849
Coefficiente de determinación r^2	0,99699
r^2 ajustado	0,99691
Error típico	0,01009
Observaciones	40

Tabla 22: Estadísticas de la regresión Placebo Metanol-Agua.

Tanto el valor del coeficiente de correlación (cercano a 1, $r=0,99849$, tabla 22) como el de determinación r^2 indican una buena linealidad. El coeficiente de determinación da una indicación del grado de aproximación de los puntos a la relación lineal. Por lo tanto, puede afirmarse que esta relación lineal explica en un 99,71% la variancia de la absorbancia.

Para acabar de comprobar la linealidad y estudiar la proporcionalidad, se calculan los límites de confianza de la pendiente (b); $b \pm s_b t$, y de la ordenada en el origen (a); $a \pm s_a t$ (tabla 23).

TEST DE PROPORCIONALIDAD				
	Máximo	Mínimo	Observaciones	Test de t
LÍMITES DE b	0,068993057	0,0665481	No incluye el cero	112,2605454
LIMITES DE a	0,004889072	-0,025365	Incluye el cero	-1,370510322
	t (GL(n-2)=38, P=0.05%)			2,025
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Ordenada en el origen (a)	-0,010237783	0,0074701	-1,370510322	0,178569757
Pendiente (b)	0,067770585	0,0006037	112,2605454	1,55677E-49

Tabla 23: Análisis de los parámetros de la regresión.

Test de sensibilidad:

Tomando los límites de confianza de la pendiente se comprueba que no incluye el cero, es decir que existe una pendiente y por lo tanto una recta. El test de t:

$$t_{\text{exp}} = |b| / s_b = 112,26$$

$t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$ incluso para $p = 0,001$, lo que indica que la probabilidad de que $b \neq 0$ es superior al 99,9%.

Test de proporcionalidad:

Tomando los límites de confianza para la ordenada en el origen y calculando, se observa que estos límites incluyen el cero por lo que el método no presenta sesgo. El test de t:

$$t_{\text{exp}} = |a| / s_a = -1,37$$

Este valor de t es menor que el de $t_{\text{tablas}} = 2,228$ (para $p = 0,05$ y $GL = 10$), por lo que la probabilidad de que $a = 0$ es muy elevada.

Otro test estadístico de alta significación es aplicar un análisis de la variancia (ANOVA) completo a la recta de regresión:

ANOVA DE LA REGRESIÓN					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión (SSreg)	1	1,283959426	1,283959426	12602,43006	4,098168915
Falta de ajuste (SSlof)	3	-0,0102602	-0,003420066	-8,47047589	2,874187999
Error puro (SSpe)	35	0,014131709	0,000403763		
Residuos (SSr)	38	0,003871512	0,000101882		
Total	39	1,287830938			

Tabla 24: Análisis completo de la Regresión Placebo Agua-Metanol.

Del cual puede concluirse, que dado que $F_{exp} > F_{tablas}$ ($p=0,05$; 1; 38) = 4,09 queda demostrada la existencia de una pendiente $\neq 0$.

Por otra parte, dado que $F_{exp} < F_{tablas}$ ($p=0,05$; 3; 35) = 2,874 queda demostrada la linealidad entre los resultados obtenidos.

3.4.1.6 CONCLUSIÓN SOBRE EL MÉTODO AGUA-METANOL

La mayoría de los parámetros de validación cumplen las especificaciones para considerar como validado el método, aunque se han encontrado ciertas dificultades que deberían ser resueltas si éste es el método escogido como método de análisis final. Las dificultades son las siguientes:

- la absorbancia del placebo es importante (provoca un error de aproximadamente un 1% por exceso en las lecturas), lo cual exigirá preparar patrón cargado como patrón cuando se analicen comprimidos por este método.
- la recuperación resulta algo afectada (probabilidad del 2,2%) por el porcentaje de principio activo presente en la muestra (aunque no es importante ya que pasa del 99% para el placebo al 70% a por encima del 100% para el resto).
- Ha habido un “fuera de especificaciones” en la repetibilidad de 1 análisis de los 12 realizados, el correspondiente al analista 2, día 1, placebo cargado al 70%, aunque es casi insignificante CV 2,06% frente a la especificación prevista de 2% CV.

En todo caso las acciones a seguir serían acortar el intervalo de análisis para verificar si la recuperación no resulta afectada.

3.4.2 ANÁLISIS EN SOLUCIÓN REGULADORA: RESULTADOS

3.4.2.1 GENERALIDADES

Instrumentación analítica

Espectrofotómetro HELWLETT PACKARD VECTRA 286/12 (8452 A DIODE ARRAY).
SOFTWARE: UV-VIS HP 89532A UV-VIS Software Rev 1.00.00

Patrones de referencia

➤ patrones primarios:

nombre: Paracetamol patrón. Riqueza: 99,84%

proveedor: SDM

nº lote: SDM/PAR/PAJ/95 (31/03/95)

nombre: 4-cloroacetanilida patrón. Riqueza: 97%

proveedor: SDM

nº lote: SDM/23121 (03/04/95)

nombre: p-aminofenol patrón. Riqueza: 98%

proveedor: SDM

nº lote: 98473 (03/04/95)

➤ patrones secundarios:

nombre: Paracetamol materia prima. Riqueza: 99,2%

proveedor: Mallinckrodt Chemical Inc

lote: 6375994M349 (caducidad 10/2000)

Reactivos:

Agua desionizada (SDM, conductividad <0,2 µS).

Ácido fosfórico 85% Probus Lote: 25587 Caducidad: no aparece.

Hidróxido sódico lentejas para análisis ACS-ISO. Panreac. Lote: 139853270.

Disodiohidrogenofosfato trihidrato Merck Lote: A232099.

Control de la cubeta

Se determina la absorbancia de la cubeta a 240 nm.

1	$-4,0 \cdot 10^{-4}$
2	$+4,1 \cdot 10^{-4}$
3	$-2,3 \cdot 10^{-4}$

La absorbancia que aparece es mínima y en principio no afectará a las lecturas de muestras. En caso de salir

absorbancia, se limpia la cubeta llevándola a ebullición con HNO_3 reactivo, se saca del baño y se deja en agua desionizada durante 48 horas.

Se adjunta la gráfica de absorbancia obtenida (figura 8):

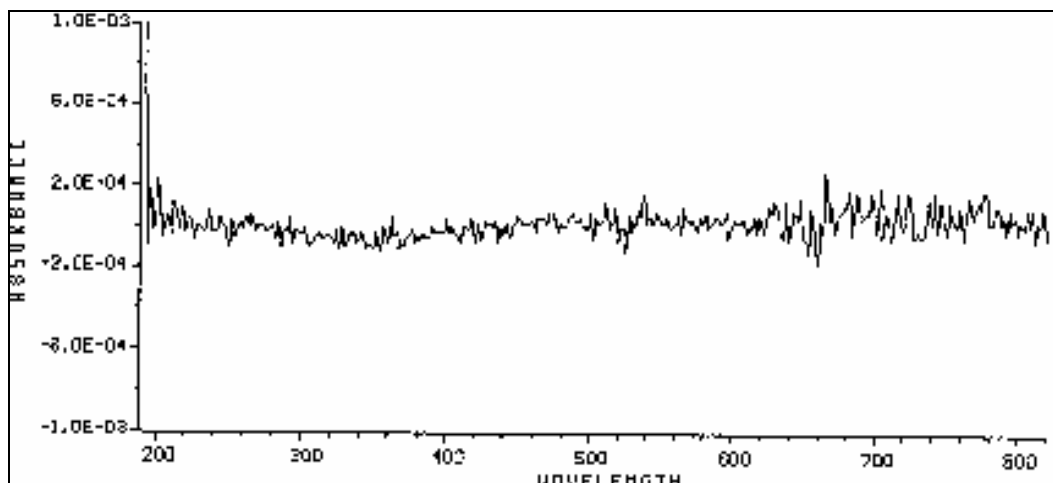


Figura 8: Absorbancia de la cubeta vacía.

Control de los disolventes

Se determina la absorbancia del disolvente solución reguladora fosfato a pH 5,8 a 240 nm frente al aire. En esta longitud de onda, la absorbancia será inferior a 0,40 y preferiblemente <0,20.

1	$+ 5 \cdot 10^{-4}$
2	$-1,5 \cdot 10^{-3}$
3	$+0,1 \cdot 10^{-4}$

Se adjunta el gráfico de absorbancia obtenida (figura 9), donde puede comprobarse que es menor de 0,20 en todo el espectro:

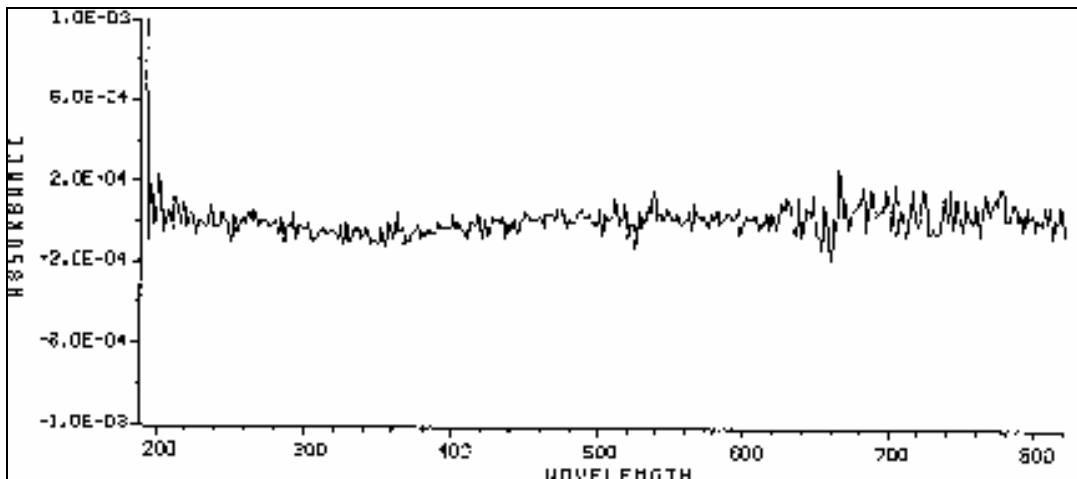


Figura 9: Absorbancia del disolvente (solución reguladora de fosfatos a pH 5,8).

Por otra parte, se comprueba el máximo de absorbancia del paracetamol ($\lambda = 244$ nm) en el medio especificado (figura 10):

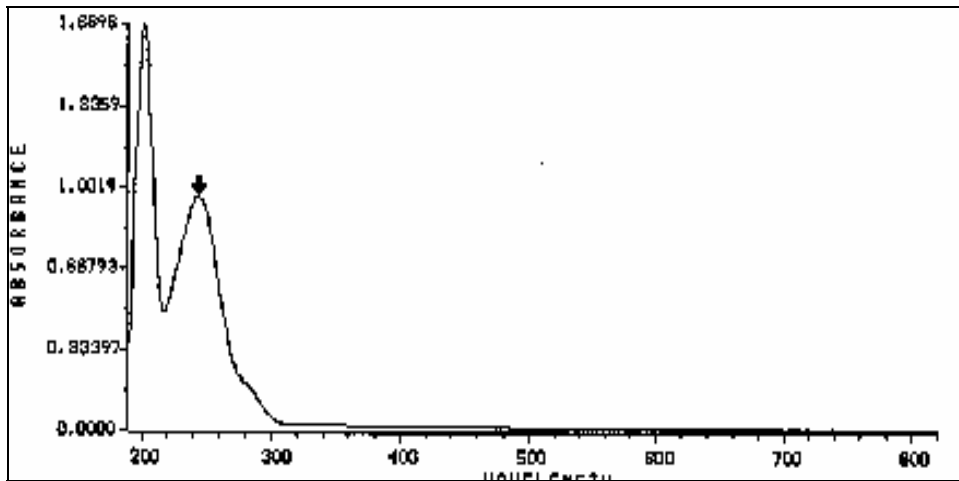


Figura 10: Máximo de absorbancia del paracetamol en solución reguladora de fosfatos pH 5,8.

3.4.2.2 LINEALIDAD CON PATRÓN DE MATERIA PRIMA

La linealidad del método se ha comprobado con 4 soluciones de paracetamol patrón (doble pesada) de distinta concentración, abarcando un intervalo que incluye la concentración teórica de la muestra problema

(60-140%).

Los resultados obtenidos son los siguientes (tabla 25):

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	Factor de respuesta
9,30	0,63271	0,068033
10,01	0,68127	0,068059
12,45	0,82288	0,066095
13,01	0,86549	0,066525
14,63	0,96443	0,065921
15,10	0,99477	0,065879
18,11	1,20250	0,066400
19,97	1,29100	0,064663

Tabla 25: Resultados MP solución reguladora.

A estos datos (concentraciones y absorbancias, tabla 26) se ha aplicado el test estadístico de homogeneidad de variancias de Cochran (tabla 27), obteniéndose una $G_{\text{experimental}}$ de 0,605908 que se compara con la tabulada (G_{tablas}) para una probabilidad de $p=0,05$, para 4 concentraciones ensayadas y 2 replicados de cada concentración, que toma un valor de 0,9065. Como el valor experimental es inferior al tabulado, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración y puede aplicarse la hipótesis de un modelo lineal (estimado por el método de mínimos cuadrados). Por otra parte, también se aplica el test estadístico de los factores de respuesta, que corrobora la existencia de linealidad entre ambos factores.

A1	A2	A3	A4
0,6327	0,8229	0,9644	1,2025
0,6813	0,8655	0,9948	1,2910

Tabla 26: Absorbancias tabuladas para el Test de Cochran.

Análisis de variancia de un factor

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Variancia
Columna 1	2	1,31398	0,65699	0,00117904
Columna 2	2	1,68837	0,844185	0,00090781
Columna 3	2	1,9592	0,9796	0,00046026
Columna 4	2	2,4935	1,24675	0,00391612

Tabla 27: ANOVA de MP en Solución Reguladora.

G experimental	0,605908
G tabulada (95%, 4 concentraciones y 2 replicados)	0,9065

Tabla 28: Resultados de G de Cochran.

El factor de respuesta (tabla 25) se calcula dividiendo la concentración (en µg/ml) por la absorbancia. Se determina el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los factores de respuesta calculados.

Estadística factores respuesta	
Media	0,066446897
Desviación estándar	0,001135679
CV%	1,709152503

Tabla 29: Estadística factores de respuesta MP Solución Reguladora.

El coeficiente de variación presenta un valor menor que el establecido como indicador de linealidad (<5%), con lo cual puede afirmarse que existe una relación de linealidad entre ambas variables (tabla 29).

Se determina la ecuación de la recta de calibrado $y = bx + a$, tomando en abscisas las concentraciones (en µg/ml) y en ordenadas las correspondientes absorbancias (figura 11):

$$\text{Absorbancia} = \text{pendiente} * \text{concentración} + \text{ordenada origen}$$

$$y = 0,062712906 x + 0,049393073$$

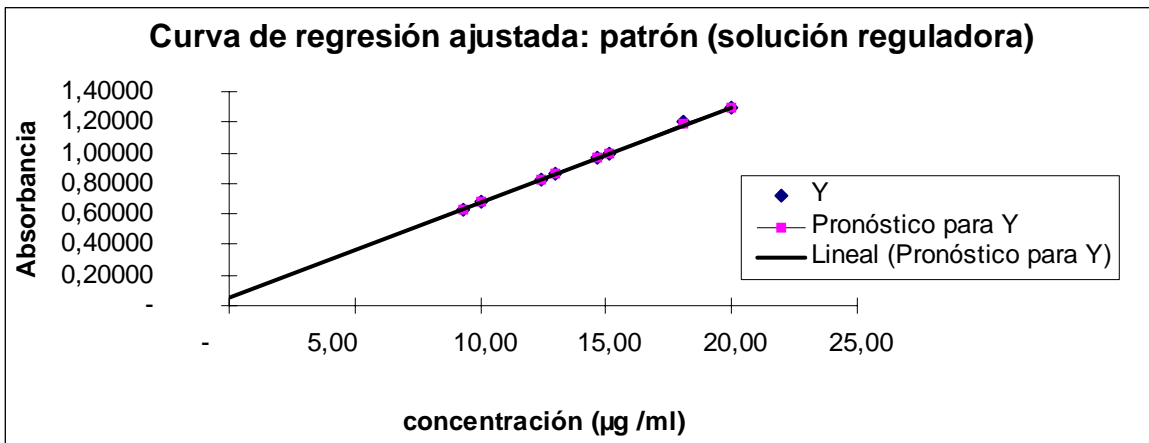


Figura 11: Recta de calibrado de MP paracetamol en solución reguladora de fosfatos a pH 5,8.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple r	0,99935
Coefficiente de determinación r ²	0,99870
r ² ajustado	0,99848
Error típico	0,00904
Observaciones	8

Tabla 30: Estadística de la regresión Mp Solución Reguladora.

Tanto el valor del coeficiente de correlación (cercano a 1, $r=0.99935$) como el de determinación r^2 , indican una buena linealidad (tabla 30). El coeficiente de determinación da una indicación del grado de aproximación de los puntos a la relación lineal. Por lo tanto, puede afirmarse que esta relación lineal explica en un 99,87% la variancia de la absorbancia.

Para acabar de comprobar la linealidad y estudiar la proporcionalidad, se calculan los límites de confianza de la pendiente (b); $b \pm s_b t$, y de la ordenada en el origen (a); $a \pm s_a t$.

TEST DE PROPORCIONALIDAD				
	Máximo	Mínimo	Observaciones	Test de t
Límites b	0,06498	0,060449	no incluye el cero	67,7952220
Límites a	0,08219	-0,071472	incluye el cero	3,68513813
t (GL(n-2)=6, P=0.05%)		2,4470		
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Ordenada en el origen (a)	0,04939	0,013403	3,685138	0,010267820
Pendiente (b)	0,06271	0,000925	67,795222	6,9282 E-10

Tabla 31: Estadísticas de los parámetros de la regresión.

Test de sensibilidad:

Tomando los límites de confianza de la pendiente se comprueba que no incluye el cero, es decir que existe una pendiente y por lo tanto una recta. El test de t:

$$t_{\text{exp}} = |b| / s_b = 67,79522203$$

$t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$ incluso para $p=0,001$, lo que indica que la probabilidad de que $b \neq 0$ es superior al 99,9%.

Test de proporcionalidad:

Tomando los límites de confianza para la ordenada en el origen y calculando, se observa que estos límites no incluyen el cero por lo que el método presenta un ligero sesgo. El Test de t:

$$t_{\text{exp}} = |a| / s_a = 3,685138132$$

Este valor de t es mayor que el tabulado (2,4470) para una probabilidad del 95% y 6 grados de libertad, por lo que la probabilidad de que $a \neq 0$ es muy elevada.

Otro test estadístico de alta significación es aplicar un análisis de la variancia (ANOVA) completo a la recta de regresión:

ANÁLISIS DE LA VARIANCIA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F Experimental	F tablas
Regresión (SSreg)	1	0,375323748	0,375323748	4596,192	5,987
Falta de ajuste (SSlof)	2	-0,005973267	-0,002986634	-1,848	6,944
Error puro (SSpe)	4	0,006463226	0,001615806		
Residual (SSr)	6	0,000489958	8,16597E-05		
Total	7	0,375813706			

Tabla 32: ANOVA MP Solución Reguladora.

Del cual puede concluirse, que dado que $F_{exp} > F_{tablas}$ ($p=0,05$; 1; 6)= 5,987 queda demostrada la existencia de una pendiente $\neq 0$.

Por otra parte, dado que $F_{exp} < F_{tablas}$ ($p=0,05$; 2; 4)= 6,944 queda demostrada la linealidad entre los resultados obtenidos.

3.4.2.3 SELECTIVIDAD

Se ha preparado una muestra problema de placebo en las mismas condiciones que se tratarían los comprimidos y se ha efectuado un espectro UV completo (figura 12). Se observa que sobre la longitud de onda de absorción del paracetamol, existe una señal de ruido debida a los excipientes. Se analiza la absorbancia a $\lambda = 244$ nm, para evaluar su interferencia en el análisis del paracetamol.

200,5 mg placebo	0,0282
	0,0342
	0,0392
195,3 mg placebo	0,0245
	0,0310
	0,0471

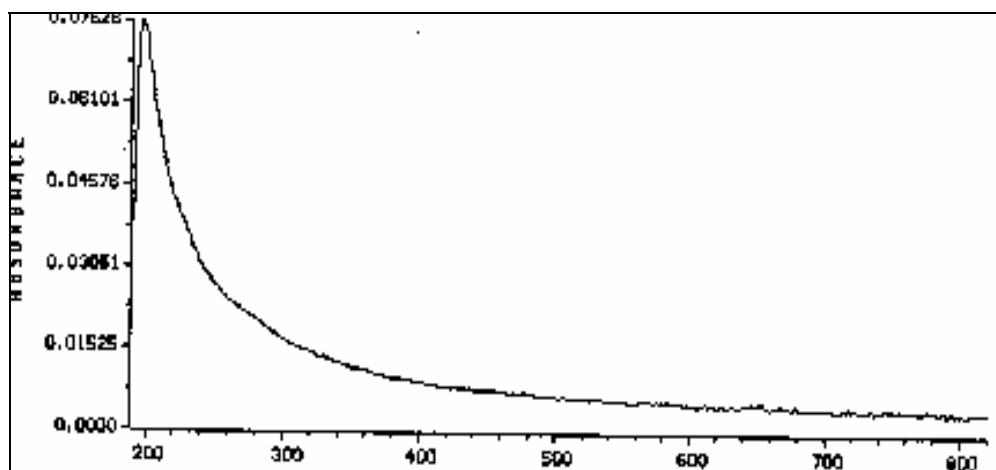


Figura 12: Absorbancia del placebo en solución reguladora de fosfatos a pH 5,8.

Teniendo en cuenta estas lecturas de absorbancia, pueden considerarse despreciables cuando se valoran los comprimidos, ya que la absorbancia esperada sería $>0,9$, lo cual supondría un error de lectura espectrofotométrica de alrededor del 1% por exceso. Sin embargo, cuando se trabaje a bajas absorbancias, el error pasaría a ser más importante con lo que debería corregirse este exceso por un método adecuado, lectura previa de absorbancia del placebo, o añadir placebo al patrón de paracetamol que se prepara para cada ensayo o se extrapolan en la recta patrón con placebo.

Se comprueba que el pico correspondiente al principio activo es puro dado que los espectros UV completos (para muestra placebo 100% (figura 12), patrón paracetamol (figura 10) y placebo cargado de patrón paracetamol (figura 13)) son idénticos y muestran los máximos característicos del paracetamol de referencia.

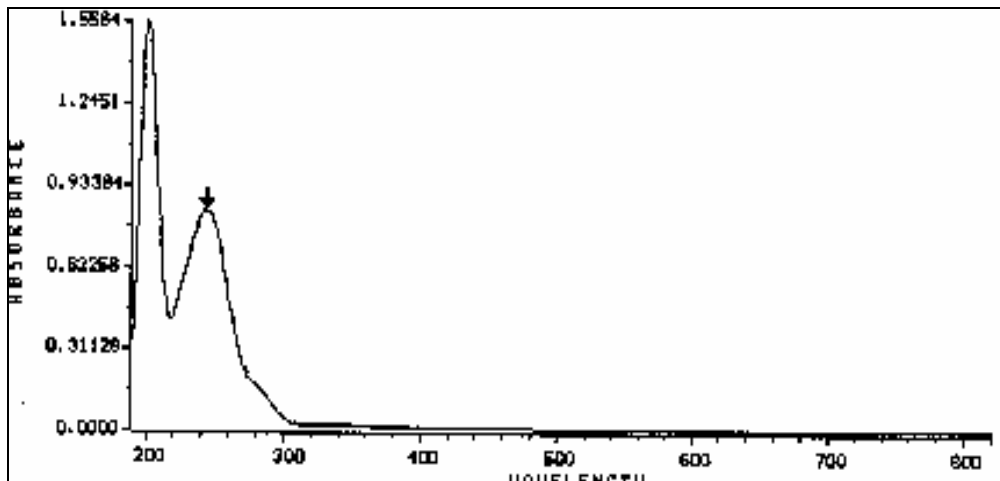


Figura 13: Espectro de absorbancia del placebo cargado con paracetamol en solución reguladora de fosfatos a pH 5,8.

3.4.2.4 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD) Y EXACTITUD CON PLACEBO CARGADO.

Para realizar este ensayo se ha preparado un placebo y a diferentes alícuotas del mismo se han añadido cantidades conocidas de paracetamol patrón, de manera que las concentraciones de dicho producto expresadas como $\mu\text{g/ml}$, quedan entre 70 y 130% del contenido teórico. Se han efectuado 8 valoraciones de cada una de las concentraciones, en 2 días diferentes y por 2 analistas.

Durante el primer día, tanto el analista A como el analista B han efectuado 2 determinaciones de cada nivel de concentración:

ANALISTA 1

%	% REAL	Concentración real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
70	58,3	8,75	0,6047	9,01	103,0
	62,7	9,40	0,6390	9,53	101,3
85	81,3	12,20	0,8147	12,14	99,5
	84,0	12,60	0,8398	12,52	99,4
100	102,0	15,30	1,0075	15,02	98,2
	102,7	15,40	1,0179	15,17	98,5
115	114,7	17,20	1,1591	17,28	100,5
	118,7	17,80	1,1660	17,80	100,0
130	130,0	19,50	1,2688	19,25	98,7
	129,3	19,40	1,2664	18,88	97,3

Tabla 33: Resultados analista 1, día 1.

ANALISTA 2

%	% REAL	Concentración Real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
70	61,3	9,2	0,6139	9,21	100,2
70	64,0	9,6	0,6453	9,69	100,9
85	79,3	11,9	0,7959	11,95	100,4
	85,3	12,8	0,8488	12,74	99,5
100	100,0	15,0	0,9931	14,90	99,4
	100,0	15,0	1,0029	15,05	100,3
115	118,7	17,8	1,1660	17,50	98,3
	115,3	17,3	1,1471	17,22	99,5
130	126,7	19,0	1,2547	18,80	99,0
	132,7	19,9	1,2879	19,33	97,1

Tabla 34: Resultados analista 2, día 1.

En el segundo día, tanto el analista A como el B efectuaron 2 determinaciones de cada nivel de concentración:

ANALISTA 1

%	% REAL	Concentración real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
70	59,3	8,9	0,6077	9,06	101,8
	61,3	9,2	0,6265	9,34	101,5
85	79,3	11,9	0,7959	11,86	99,7
	80,7	12,1	0,8084	12,05	99,6
100	100,0	15,0	1,0021	14,94	99,6
	101,3	15,2	1,0029	14,95	98,4
115	110,7	16,6	1,0998	16,39	98,8
	112,7	16,9	1,1090	16,53	97,8
130	124,7	18,7	1,2840	18,81	100,6
	128,7	19,3	1,2758	19,02	98,5

Tabla 35: Analista 1, día 2.

ANALISTA 2

%	% REAL	Concentración real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
70	64,7	9,7	0,6453	9,69	99,8
	64,0	9,6	0,6516	9,78	101,9
85	83,3	12,5	0,8298	12,45	99,6
	85,3	12,8	0,8564	12,85	100,4
100	105,3	15,8	1,0524	15,80	100,0
	102,7	15,4	1,0154	15,24	99,0
115	113,3	17,0	1,1409	17,12	100,7
	116,0	17,4	1,1534	17,31	99,5
130	128,7	19,3	1,2602	18,94	98,2
	130,0	19,5	1,2854	19,29	98,9

Tabla 36: Resultados analista 2, día 2.

En el cuadro resumen de la validación (tabla 37 y 38) se adjuntan todos los cálculos efectuados:

- la media de los dos resultados y su coeficiente de variación (**repetibilidad**), para cada analista, nivel de concentración y día.
- la media (**exactitud o recuperación**), desviación estándar y coeficiente de variación global (**reproducibilidad**) para cada una de las cinco concentraciones.

VALIDACIÓN PARACETAMOL (SOLUCIÓN REGULADORA)

%		DÍA 1	DÍA 2				
70%	ANALISTA 1	103,02	101,78	m	101,3		
	m	101,34	101,51				
	CV %	1,16	0,19				
	ANALISTA 2	100,16	99,85			SD	1,00850892
	m	100,89	101,88			CV %	0,9312531
	CV %	100,52	100,86				
		0,51	1,42				
85%	ANALISTA 1	99,54	99,69	m	99,8		
	m	99,35	99,59				
	CV %	0,13	0,07				
	ANALISTA 2	100,38	99,64			SD	0,40127898
	m	99,53	100,41			CV %	0,37623368
	CV %	99,96	100,03				
		0,60	0,55				
100%	ANALISTA 1	98,16	99,59	m	99,2		
	m	98,53	98,35				
	CV %	0,27	0,88				
	ANALISTA 2	99,37	99,97			SD	0,79241351
	m	100,35	98,96			CV %	0,74751939
	CV %	99,86	99,47				
		0,70	0,72				
115%	ANALISTA 1	100,45	98,76	m	99,4		
	m	100,00	97,82				
	CV %	100,23	98,29				
	ANALISTA 2	98,32	100,73			SD	0,95792153
	m	99,52	99,49			CV %	1,03039831
	CV %	98,92	100,11				
		0,86	0,87				
130%	ANALISTA 1	98,72	100,57	m	98,5		
	m	97,30	98,54				
	CV %	98,01	99,55				
	ANALISTA 2	98,96	98,15			SD	1,00703518
	m	97,14	98,94			CV %	1,09253427
	CV %	98,05	98,54				
		1,31	0,56				

Tabla 37: Resultados en conjunto Placebo solución reguladora.

REPETIBILIDAD	CV% entre	1,44	0,07
REPRODUCIBILIDA D	70%	0,93	
CV % (n=8)	85%	0,38	
	100%	0,75	
	115%	1,03	
	130%	1,09	
EXACTITUD	70%	101,30	
RECUPERACIÓN	85%	99,77	
(n=8)	100%	99,16	
	115%	99,38	
	130%	98,54	
(n=5)	m	99,63	
	SD	0,9259	
	CV %	0,9293	
	t	0,88903032	
	experimental		
	t tablas	2,776	
			P= 0.05 GL= 4

Tabla 38: Estadística de los resultados Placebo Solución Reguladora.

CONCLUSIONES SOBRE LA REPETIBILIDAD

Los coeficientes de variación están comprendidos entre 0,07 % y 1,44 %, (tablas 37 y 38). por lo tanto puede concluirse que el método analítico es repetitivo dado que, en todos los casos, se obtienen valores por debajo del límite máximo especificado por las normas ICH (2%).

CONCLUSIONES SOBRE LA REPRODUCIBILIDAD

Viene dada por el coeficiente global para cada concentración (tabla 38); los CV% son similares (sobre el 1%) para todos los niveles de concentración ensayados.

CONCLUSIONES SOBRE LA EXACTITUD

De los resultados anteriores (tablas 37 y 38) se desprende que la exactitud en el intervalo de concentraciones que se estudia (70-130%) se encuentra comprendido entre el 98,54 y 101,3%, por lo que la técnica cumple con el requisito de exactitud, siendo la recuperación media para todo el intervalo en estudio del 99,63%, la cual es satisfactoria. Se confirma con una t student, que no hay diferencias significativas entre las recuperaciones medias para cada nivel de concentración:

$$t_{\text{exp}} = |100 - R| * \sqrt{n} / SD = 0,889$$

$$t_{\text{tab}} (p=0.05 \text{ y } GL= 4) = 2,776$$

$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, lo que significa que ambos valores no son estadísticamente diferentes, es decir no existen diferencias significativas entre la exactitud a nivel bajo (70%), medio (100%) o alto (130%) de concentración del “analito”, aunque parece que si las haya ya que el intervalo 85-115% presenta recuperaciones del 99%, mientras que los dos extremos presentan recuperaciones más alejadas.

Si se aplica un ANOVA de una dirección o con un sólo criterio de clasificación sobre los resultados de recuperación individuales obtenidos para cada nivel (tabla 39), el test de F, da una $F_{\text{experimental}} = 10,679$, frente a la $F_{\text{tablas}}(p=0,05; 4; 35)$ de 2,641, lo que indica que el factor de concentración sí afecta a la recuperación (aunque con una probabilidad baja), como se suponía por los datos. Sin embargo, la exactitud del método se considera adecuada ya que todas las recuperaciones están comprendidas en un margen estrecho entre 96-102%, en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

70	85	100	115	130
103,0	99,5	98,2	100,5	98,7
101,3	99,4	98,5	100,0	97,3
101,8	99,7	99,6	98,8	100,6
101,5	99,6	98,4	97,8	98,5
100,2	100,4	99,4	98,3	99,0
100,9	99,5	100,3	99,5	97,1
99,8	99,6	100,0	100,7	98,2
101,9	100,4	99,0	99,5	98,9

Tabla 39: Resultados de recuperación tabulados para el cálculo de ANOVA.

Análisis de variancia de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Variancia
70 %	8	810,4123	101,301537	1,01709024
85 %	8	798,146766	99,7683458	0,16102482
100 %	8	793,274366	99,1592958	0,62791917
115 %	8	795,079867	99,3849834	1,04870132
130 %	8	788,307274	98,5384093	1,15899412

ANÁLISIS DE VARIANCIA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	34,2907325	4	8,57268312	10,6791984	9,1888E-06	2,64146394
Dentro de los grupos	28,0961077	35	0,80274593			
Total	62,3868401	39				

Tabla 40: Resultados del análisis de la variancia.

3.4.2.5 LINEALIDAD

La linealidad del método para las muestras placebo adicionadas de patrón ha sido comprobada con 5 concentraciones de paracetamol patrón (doble pesada) adicionadas de placebo, abarcando un intervalo que incluye la concentración teórica de la muestra problema (70-130%) y obteniendo 8 replicados de cada concentración. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 41:

CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA	FACTOR DE RESPUESTA
8,75	0,6047	0,06911
9,40	0,6390	0,06798
8,90	0,6077	0,06828
9,20	0,6265	0,06810
9,20	0,6139	0,06673
9,60	0,6453	0,06722
9,70	0,6453	0,06653
9,60	0,6516	0,06788
12,20	0,8147	0,06678
12,60	0,8398	0,06665
11,90	0,7959	0,06688
12,10	0,8084	0,06681
11,90	0,7959	0,06688
12,80	0,8488	0,06632
12,50	0,8298	0,06638
12,80	0,8564	0,06690
15,30	1,0075	0,06585
15,40	1,0179	0,06610
15,00	1,0021	0,06681
15,20	1,0029	0,06598
15,00	0,9931	0,06620
15,00	1,0029	0,06686
15,80	1,0524	0,06661
15,40	1,0154	0,06594
17,20	1,1591	0,06739
17,80	1,1660	0,06550
16,60	1,0998	0,06625
16,90	1,1090	0,06562
17,80	1,1660	0,06550
17,30	1,1471	0,06630
17,00	1,1409	0,06711
17,40	1,1534	0,06629
19,50	1,2688	0,06507
19,40	1,2664	0,06528
18,70	1,2840	0,06866
19,30	1,2758	0,06610
19,00	1,2547	0,06604
19,90	1,2879	0,06472
19,30	1,2602	0,06530
19,50	1,2854	0,06592

Tabla 41: Resultados Placebo Solución-Reguladora.

A estos datos (concentraciones y absorbancias, tabla 42) se ha aplicado el test estadístico de homogeneidad de variancias de Cochran, obteniéndose una $G_{\text{experimental}}$ de 0,34119, que comparada con la G_{tablas} para $p=0,05$, 5 concentraciones y 8 replicados que es 0,4564, el valor experimental es inferior al tabulado, con lo cual no existen diferencias significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración y puede aplicarse la hipótesis de un modelo lineal, estimado por el método de mínimos cuadrados.

70	85	100	115	130
0,6047	0,8147	1,0075	1,1591	1,2688
0,6390	0,8398	1,0179	1,1660	1,2664
0,6077	0,7959	1,0021	1,0998	1,2840
0,6265	0,8084	1,0029	1,1090	1,2758
0,6139	0,7959	0,9931	1,1660	1,2547
0,6453	0,8488	1,0029	1,1471	1,2879
0,6453	0,8298	1,0524	1,1409	1,2602
0,6516	0,8564	1,0154	1,1534	1,2854

Tabla 42: Resultados tabulados para Test Cochran.

Análisis de variancia de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Variancia
70 %	8	5,03404588	0,62925574	0,00034605
85 %	8	6,58965374	0,82370672	0,00055117
100 %	8	8,09415525	1,01176941	0,00033154
115 %	8	9,14119133	1,14264892	0,0006381
130 %	8	10,1832186	1,27290233	0,00015196

Tabla 43: análisis de la variancia de la respuesta según el factor concentración.

$G_{\text{experimental}}$	0,34119
G_{tabulada} (95%, 6 concentraciones y 2 replicados)	0,4564

Tabla 44: Resultados de G de Cochran.

El factor de respuesta se calcula dividiendo la concentración (en $\mu\text{g}/\text{ml}$) por la absorbancia (tabla 41). Se determina el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los factores de respuesta calculados.

Estadística factores respuesta	
Media	0,066570438
Desviación estándar	0,000971225
CV%	1,458943764

Tabla 45: Estadística de los factores de respuesta Placebo Solución Reguladora.

El coeficiente de variación presenta un valor menor (tabla 45) que el establecido como indicador de

linealidad (<5%), con lo cual puede afirmarse que existe una relación de linealidad entre ambas variables.

Se determina la ecuación de la recta de calibrado $y = bx + a$, tomando en abscisas las concentraciones (en $\mu\text{g/ml}$) y en las ordenadas las correspondientes absorbancias (figura 14):

$$\text{Absorbancia} = \text{pendiente} \cdot \text{concentración} + \text{ordenada origen}$$

$$y = 0,063378053 \cdot x + 0,0429532$$

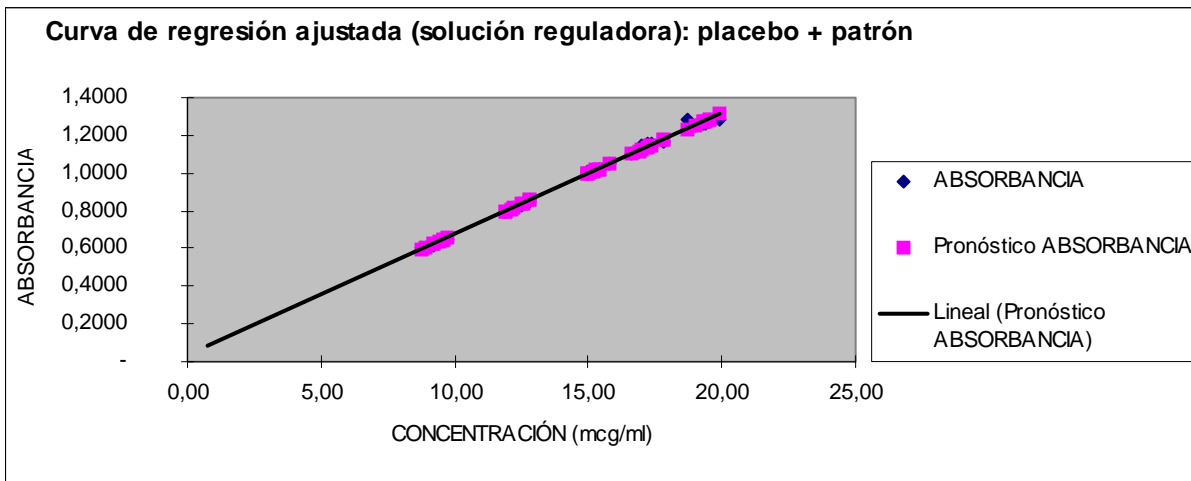


Figura 14: Recta de calibración del placebo cargado de paracetamol en solución reguladora fosfato a pH 5,8.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple (r)	0,998722677
Coefficiente de determinación r^2	0,997446985
r^2 ajustado	0,9973798
Error típico	0,011875626
Observaciones	40

Tabla 46: Estadísticas de la regresión Placebo solución Reguladora.

Tanto el valor del coeficiente de correlación (cercano a 1, $r=0,998722$) como el de coeficiente de determinación r^2 indican una buena linealidad. El coeficiente de determinación da una indicación del grado de aproximación de los puntos a la relación lineal. Por lo tanto, puede afirmarse que esta relación lineal explica el 99,74% de la variancia de la absorbancia.

Para acabar de comprobar la linealidad y estudiar la proporcionalidad, se calculan los límites de confianza

de la pendiente (b); $b \pm s_b t$, y de la ordenada en el origen (a); $a \pm s_a t$.

TEST DE PROPORCIONALIDAD				
	Máximo	Mínimo	Observaciones	Test de t
LÍMITES DE b	0,065256508	0,0631229	no incluye el cero	121,8456442
LIMITES DE a	0,048840903	0,0165762	no incluye el cero	4,105706625
	t (GL(n-2)=38, P=0.05%)			2,025
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Ordenada en el origen (a)	0,03270	0,0079664	4,685138	0,0217820
Pendiente (b)	0,06154	0,0005051	57,795222	5,5982 E-10

Tabla 47: Test de proporcionalidad del recta de calibración Placebo Solución Reguladora.

Test de sensibilidad:

Tomando los límites de confianza de la pendiente se comprueba que no incluye el cero, es decir que existe una pendiente y por lo tanto una recta. El test de t:

$$t_{\text{exp}} = |b| / s_b = 121,8456442$$

$t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$ incluso para $p = 0,001$, lo que indica que la probabilidad de que $b \neq 0$ es superior al 99,9%.

Test de proporcionalidad:

Tomando los límites de confianza para la ordenada en el origen y calculando, se observa que estos límites no incluyen el cero, con lo cual el método presenta un ligero sesgo. El test de t:

$$t_{\text{exp}} = |a| / s_a = 4,105706625$$

Este valor de t es superior al tabulado (para $p = 0.05$ y $GL = 38$), por lo que la probabilidad de que $a \neq 0$ es muy elevada y por otra parte el método presenta un ligero sesgo.

Otro test estadístico de alta significación estadística es aplicar un análisis de la variancia (ANOVA) completo a la recta de regresión:

ANOVA DE LA REGRESIÓN					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	Fexperimental	F tablas
Regresión (SSreg)	1	2,093789499	2,093789499	14846,361	4,098168915
Falta de ajuste (SSlof)	3	-0,00877255	-0,002924184	-7,242324666	2,874187999
Error puro (SSpe)	35	0,014131709	0,000403763		
Residuos (SSr)	38	0,005359158	0,00014103		
Total	39	2,099148658			

Tabla 48: ANOVA de la regresión Placebo Solución Reguladora.

Del cual puede concluirse, que dado que $F_{exp} > F_{tablas}$ ($p=0,05$; 1; 38) = 4,09 queda demostrada la existencia de una pendiente $\neq 0$.

Por otra parte, dado que $F_{exp} < F_{tablas}$ ($p=0,05$; 3; 35) = 2,874 queda demostrada la linealidad entre los resultados obtenidos.

3.4.2.6 CONCLUSIÓN MÉTODO DE ANÁLISIS CON SOLUCIÓN REGULADORA

En esta validación analítica se han comprobado la bondad del método para el intervalo 70-130%, lo única salvedad que aparece es que en el análisis el factor de concentración para la recuperación influye y presenta ligeras diferencias aunque éstas son significativas. Además presenta un ligero sesgo positivo lo cual ya se conocía pues el placebo absorbe en la misma longitud de onda que el paracetamol.

En caso de ser este el método escogido, debería reducirse en el intervalo de análisis y ser utilizado con un patrón adicionado de placebo para corregir el sesgo positivo del análisis.

3.4.3 ANÁLISIS EN AGUA: RESULTADOS

3.4.3.1 GENERALIDADES

Instrumentación analítica

Espectrofotómetro HELWLETT PACKARD VECTRA 286/12 (8452 A DIODE ARRAY).
SOTWARE: UV-VIS HP 89532A UV-VIS Software Rev 1.00.00

Patrones de referencia

➤ patrones primarios:

nombre: Paracetamol patrón. Riqueza: 99,84%

proveedor: SDM

nº lote: No aparece (31/03/95)

nombre: 4-cloroacetanilida patrón. Riqueza: 97%

proveedor: SDM

nº lote: No aparece (03/04/95)

nombre: p-aminofenol patrón. Riqueza: 98%

proveedor: SDM

nº lote: No aparece (03/04/95)

➤ patrones secundarios:

nombre: Paracetamol materia prima. Riqueza: 99,2%

proveedor: Mallinckrodt Chemical Inc.

nº lote: 6375994M349 (caducidad 10/2000)

Reactivos:

Agua desionizada de red (SDM) obtenida por intercambio iónico (conductividad $<0,2 \mu\text{S}$).

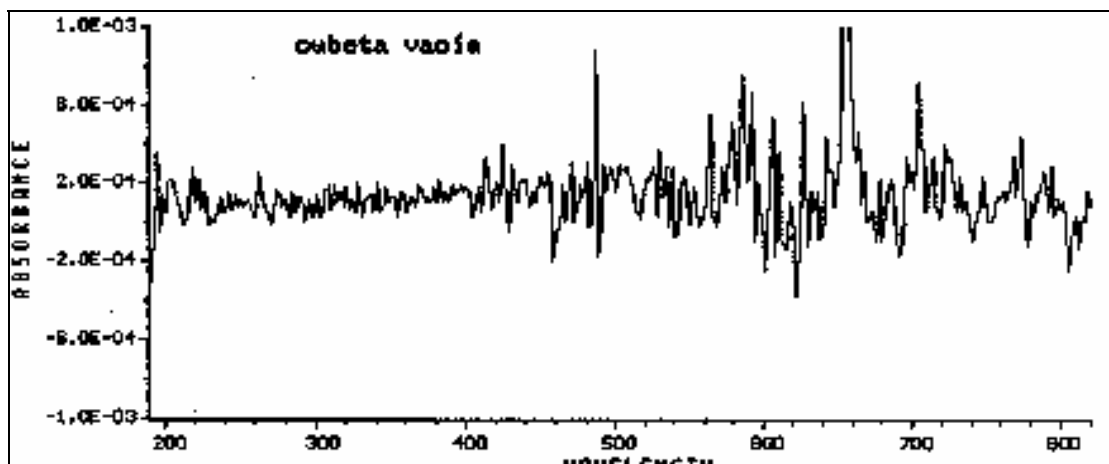
Control de la cubeta

Se determina la absorbancia de la cubeta a 240 nm.

1	$-2,1 \cdot 10^{-4}$
2	$-1,9 \cdot 10^{-4}$
3	$+2,3 \cdot 10^{-4}$

Figura 15: Absorbancia de la cubeta vacía.

La absorbancia que aparece es mínima y en principio no afectará a las lecturas de muestras. En caso de salir absorbancia, se limpia la cubeta llevándola a ebullición con HNO_3 reactivo, se saca del baño y se deja en



agua desionizada durante 48 horas. Se adjunta la gráfica de absorbancia obtenida (figura 15).

Control de los disolventes

Se determina la absorbancia del disolvente agua desionizada frente al aire a 240 nm. En esta longitud de onda, la absorbancia será inferior a 0,40 y preferiblemente <0,20.

1	$-4,6 * 10^{-5}$
2	$+3,4 * 10^{-4}$
3	$+2,4 * 10^{-4}$

Se adjunta el gráfico de absorbancia obtenido (figura 16):

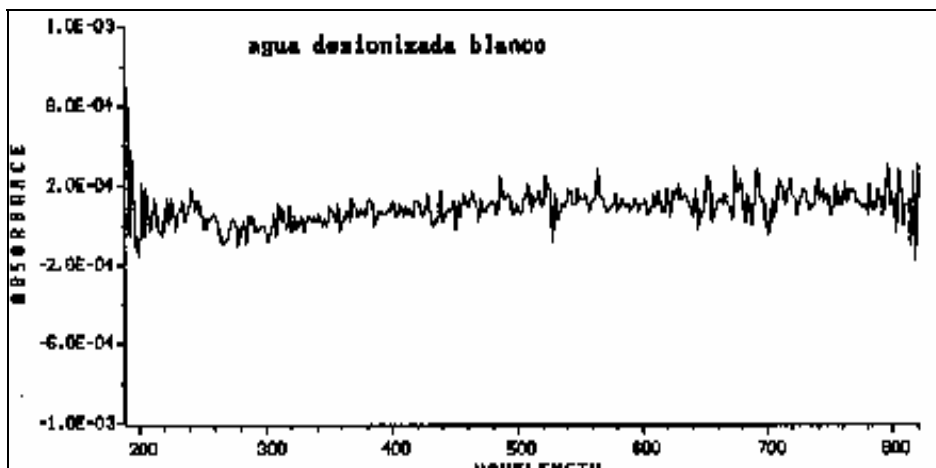
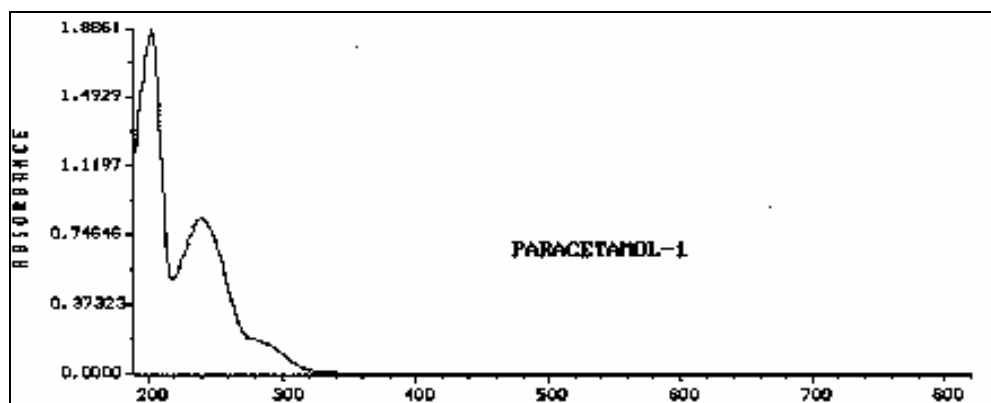


Figura 16: Absorbancia del disolvente (agua desionizada) frente al aire.

Se hace la comprobación del máximo de absorbancia de la materia prima (paracetamol) en agua que coincide con el de Farmacopea (244 nm). Se adjunta el gráfico de absorbancia obtenido (figura 17):

Figura 17: Máximo de absorbancia del patrón paracetamol en agua desionizada.

3.4.3.2 LINEALIDAD CON PATRÓN DE MATERIA PRIMA



La linealidad del método se ha comprobado con 5 soluciones de paracetamol patrón (doble pesada) de distinta concentración, abarcando un intervalo que incluye la concentración teórica de la muestra problema (50-150%).

Los resultados obtenidos son los siguientes (tabla 49):

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	factor de respuesta
7,47	0,5067300	0,067835
7,70	0,5088940	0,066090
10,00	0,6371300	0,063713
10,20	0,6628310	0,064983
15,03	0,9602500	0,063889
15,20	0,9707040	0,063862
20,04	1,2634000	0,063044
20,11	1,2701200	0,063159
22,57	1,4258000	0,063172
22,50	1,4269000	0,063418

Tabla 49: Resultados MP en Agua.

A estos datos (concentraciones y absorbancias, tabla 50) se ha aplicado el test estadístico de homogeneidad de variancias de Cochran, obteniéndose una $G_{\text{experimental}}$ de 0,805863 que se compara con la G_{tablas} de 0,8412 para $p=0,05$, 5 concentraciones y 2 replicados. El valor experimental es inferior al tabulado, con lo cual no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración y puede aplicarse la hipótesis de un modelo lineal, estimado por el método de mínimos

cuadrados. Por otra parte, también se aplica el test estadístico de los factores de respuesta, para averiguar la existencia o no de linealidad entre ambos factores.

50%	75%	100%	125%	150%
0,5067	0,6371	0,9603	1,2634	1,4258
0,5089	0,6628	0,9707	1,2701	1,4269

Tabla 50: Resultados de Absorbancia tabulados para el cálculo de Test de Cochran.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
50%	2	1,015624	0,507812	2,3414E-06
75%	2	1,299961	0,6499805	0,00033027
100%	2	1,930954	0,965477	5,4643E-05
125%	2	2,53352	1,26676	2,2579E-05
150%	2	2,8527	1,42635	6,05E-07

Tabla 51: ANOVA de MP en Agua.

G experimental	0,805863
G tabulada (95%, 5 concentraciones y 2 replicados)	0,8412

Tabla 52: Resultados de G de Cochran.

El factor de respuesta se calcula dividiendo la concentración (en µg/ml) por la absorbancia (tabla 49). Se determina el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los factores de respuesta calculados (tabla 53).

Estadística factores respuesta	
Media	0,06462037
Desviación estándar	0,00160821
CV%	2,48870445

Tabla 53: Estadística factores respuesta MP en Agua.

El coeficiente de variación presenta un valor menor que el establecido como indicador de linealidad (<5%), con lo cual puede afirmarse que existe una relación de linealidad entre ambas variables.

Se determina la ecuación de la recta de calibrado $y = bx + a$, tomando en abscisas las concentraciones (en µg/ml) y en ordenadas las correspondientes absorbancias (figura 18):

$$\text{Absorbancia} = \text{pendiente} * \text{concentración} + \text{ordenada origen}$$

$$y = 0,0615592 x + 0,034840041$$

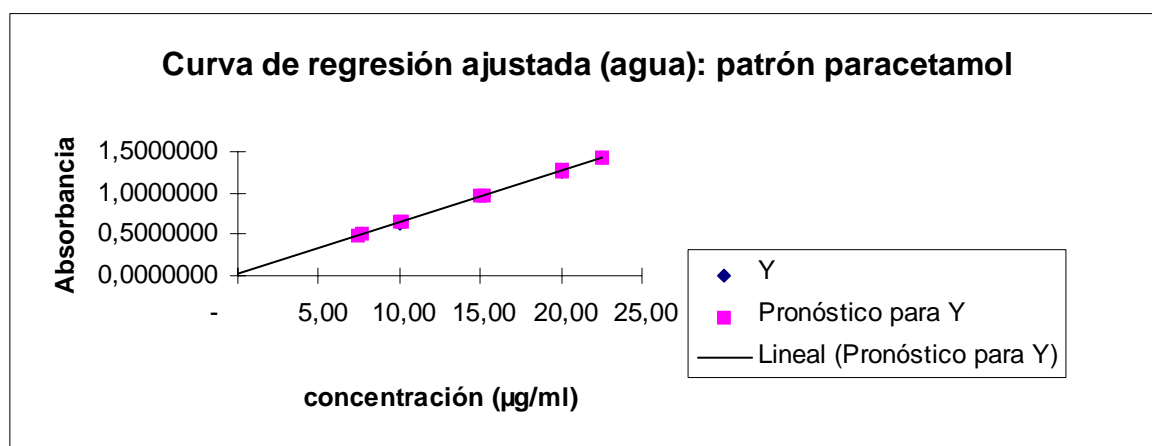


Figura 18: Recta de calibrado del patrón paracetamol en agua.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple r	0,999834141
Coefficiente de determinación r ²	0,999668309
R ² ajustado	0,999626848
Error típico	0,007125855
Observaciones	10

Tabla 54: Estadísticas de la regresión MP en Agua.

Tanto el valor del coeficiente de correlación (cerca de 1, $r=0,99983$, tabla 54) como el de determinación r^2 , indican una buena linealidad. El coeficiente de determinación da una indicación del grado de aproximación de los puntos a la relación lineal. Por lo tanto, puede afirmarse que esta relación lineal explica en un 99,97% la variancia de la absorbancia.

Para acabar de comprobar la linealidad y estudiar la proporcionalidad, se calculan los límites de confianza de la pendiente (b); $b \pm s_b t$, y de la ordenada en el origen (a); $a \pm s_a t$.

TEST DE PROPORCIONALIDAD				
	Máximo	Mínimo	Observaciones	Test de t
Límites b	0,06247	0,060645	no incluye el cero	155,2767394
Límites a	0,04957	0,020105	no incluye el cero	5,4524817
	t (GL(n-2)=8, P=0.05%)		2,306006	
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Ordenada en el origen (a)	0,0348400	0,006389758	5,452481	0,00060692
Pendiente (b)	0,0615592	0,000396448	155,276739	3,3102 E-15

Tabla 55: Test de proporcionalidad de la regresión MP en Agua.

Test de sensibilidad:

Tomando los límites de confianza de la pendiente se comprueba que no incluye el cero, es decir que existe

una pendiente y por lo tanto una recta. El test de t:

$$t_{\text{exp}} = |b| / s_b = 155,2767394$$

$t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$ incluso para $p= 0,001$, lo que indica que la probabilidad de que $b \neq 0$ es superior al 99,9%.

Test de proporcionalidad:

Tomando los límites de confianza para la ordenada en el origen y calculando, se observa que estos límites no incluyen el cero por lo que el método presenta un ligero sesgo. El Test de t:

$$t_{\text{exp}} = |a| / s_a = 5,452481758$$

Este valor de t es mayor de 2,306 (para $p= 0,05$ y $GL=8$), por lo que la probabilidad de que $a \neq 0$ es muy elevada.

Otro test estadístico de alta significación es aplicar un análisis de la variancia (ANOVA) completo a la recta de regresión:

ANÁLISIS DE LA VARIANCIA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F Experimental	F tablas
Regresión (SSreg)	1	1,224297092	1,224297092	24110,865	5,31764499
Falta de ajuste (SSlof)	4	-1,223886653	-0,305971663	-0,9996	6,38823394
Error puro (SSpe)	4	1,224292875	0,306073219		
Residual (SSr)	8	0,000406223	5,07778E-05		
Total	9	1,224703315			

Tabla 56: Análisis de la variancia de la regresión MP en Agua.

Del cual puede concluirse, que dado que $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$ ($p=0,05$; 1; 8)= 5,32 queda demostrada la existencia de una pendiente $\neq 0$.

Por otra parte, dado que $F_{\text{exp}} < F_{\text{tablas}}$ ($p=0,05$; 2; 4)= 6,944 queda demostrada la linealidad entre los resultados obtenidos.

3.4.3.3 SELECTIVIDAD

Se ha preparado una muestra problema de placebo en las mismas condiciones que se tratarían los comprimidos y se ha efectuado un espectro UV completo (figura 19). Se observa que sobre la longitud de onda de absorción del paracetamol, existe una señal de ruido debida a alguno de los excipientes. Se analiza

la absorbancia a $\lambda = 244$ nm, para evaluar su interferencia en el análisis del paracetamol.

200,0 mg placebo	0,01099
	0,01341
	0,01075
183,0 mg placebo	0,00850
	0,00871
	0,00951

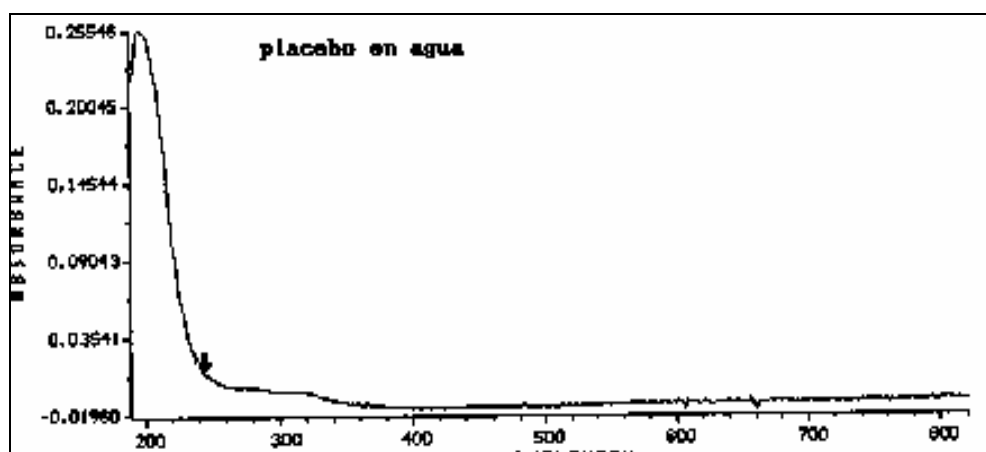


Figura 19: Absorbancia del placebo en agua desionizada.

Teniendo en cuenta estas lecturas de absorbancia, pueden considerarse despreciables cuando se valoran los comprimidos, ya que la absorbancia esperada sería $>0,9$, lo cual supondría un error de lectura espectrofotométrica de alrededor del 0,55% por exceso. Sin embargo, cuando se trabaje a bajas absorbancias, el error pasaría a ser más importante con lo que debería corregirse este exceso por un método adecuado: lectura previa de absorbancia del placebo, o añadir placebo al patrón de paracetamol que se prepara para cada ensayo o extrapolar la absorbancia en una recta adicionada de placebo.

Se comprueba que el pico correspondiente al principio activo es puro dado que los espectros UV completos (para muestra placebo 100% (figura 19), patrón paracetamol (figura 17) y placebo cargado de patrón paracetamol (figura 20)) son idénticos y muestran los máximos característicos del paracetamol de referencia.

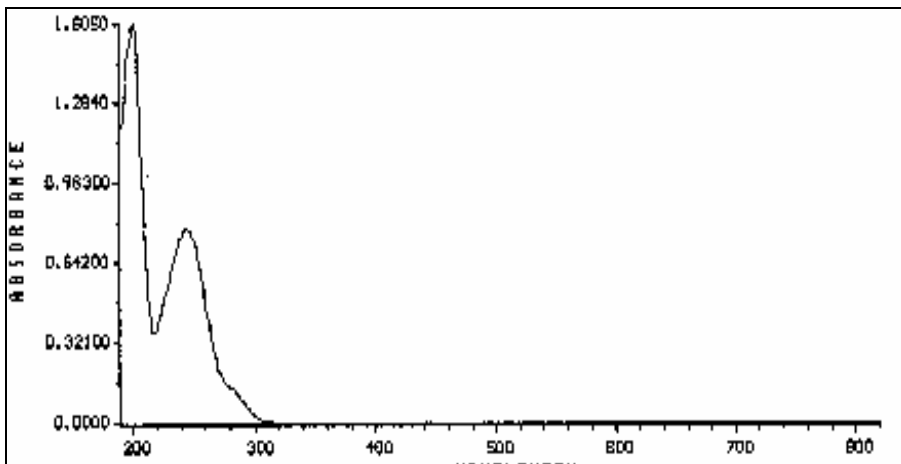


Figura 20: Espectro de absorbancia del placebo cargado con MP paracetamol.

3.4.3.4 PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD) Y EXACTITUD CON PLACEBO CARGADO.

Para realizar este ensayo se ha preparado un placebo y a diferentes alícuotas del mismo se han añadido cantidades conocidas de paracetamol patrón, de manera que las concentraciones de dicho producto expresadas como $\mu\text{g/ml}$, quedan entre 50 y 150% del contenido teórico. Se han efectuado 8 valoraciones de cada una de las concentraciones, en 2 días diferentes y por 2 analistas. Durante el primer día, tanto el analista A como el analista B han efectuado 2 determinaciones de cada nivel de concentración:

ANALISTA 1

%	% REAL	Concentración real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
50	50,5	7,57	0,5090	7,61	100,5
	50,9	7,63	0,5102	7,62	99,9
75	74,7	11,20	0,7540	11,27	100,6
	74,1	11,11	0,7510	11,22	101,0
100	103,7	15,55	1,0350	15,47	99,5
	100,9	15,14	1,0069	15,04	99,4
125	125,7	18,86	1,2436	18,58	98,5
	125,4	18,81	1,2531	18,72	99,5
150	149,9	22,48	1,5104	22,46	99,9
	150,7	22,61	1,5047	22,48	99,4

Tabla 57: Resultados analista 1, día 1.

ANALISTA 2

%	% REAL	concentración real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
50	49,7	7,45	0,4952300	7,43	99,8
	50,8	7,62	0,5124000	7,69	100,9
75	72,7	10,90	0,7169703	10,76	98,7
	74,0	11,10	0,7401200	11,11	100,1
100	97,3	14,60	0,9750300	14,63	100,2
	96,7	14,50	0,9623410	14,44	99,6
125	130,0	19,50	1,2799667	19,21	98,5
	132,7	19,90	1,3214000	19,83	99,7
150	151,0	22,65	1,4985647	22,49	99,3
	151,7	22,75	1,5142510	22,73	99,9

Tabla 58: Resultados analista 2, día 1.

En el segundo día, tanto el analista A como el B efectuaron 2 determinaciones de cada nivel de concentración:

ANALISTA 1

%	% REAL	concentración real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
50	50,9	7,63	0,5301	7,58	99,3
	50,3	7,55	0,5296	7,57	100,3
75	82,0	12,30	0,8546	12,21	99,3
	82,9	12,43	0,8577	12,26	98,6
100	99,5	14,20	1,0020	14,32	100,9
	99,6	14,94	1,0304	14,73	98,6
125	113,5	17,40	1,2010	17,17	98,7
	122,1	18,32	1,2780	18,27	99,7
150	143,5	21,53	1,4752	21,23	98,6
	142,8	21,01	1,4567	20,82	99,1

Tabla 59: Resultados analista 1, día 2.

ANALISTA 2

%	% REAL	concentración real (µg/ml)	ABSORBANCIA	Concentración extrapolada (µg/ml)	% RECUPERACIÓN
50	49,3	7,35	0,4851019	7,28	99,1
	50,1	7,52	0,4978108	7,47	99,4
75	80,0	12	0,7927535	11,90	99,2
	80,7	12,1	0,7985200	11,99	99,0
100	94,7	14,2	0,9282177	13,93	98,1
	95,0	14,25	0,9306807	13,97	98,0
125	126,7	19,01	1,2503412	18,77	98,7
	127,0	19,05	1,2745360	19,13	100,4
150	150,1	22,51	1,4875000	22,54	100,1
	150,5	22,57	1,5061000	22,61	100,2

Tabla 60: Resultados analista 2, día 2.

En el cuadro resumen de la validación (tabla 60 y tabla 61) se adjuntan todos los cálculos efectuados:

- la media de los dos resultados y su coeficiente de variación (**repetibilidad**), para cada analista, nivel de concentración y día.
- la media (**exactitud o recuperación**), desviación estándar y coeficiente de variación global (**reproducibilidad**) para cada una de las cinco concentraciones.

VALIDACIÓN PARACETAMOL (AGUA DESIONIZADA)

%		DÍA 1	DÍA 2		
50%	ANALISTA 1	100,47	99,30	m	99,9
	m	99,92	100,26		
	CV %	100,19	99,78		
	ANALISTA 2	0,39	0,68		
	m	99,77	99,06		
	CV %	100,93	99,36		
75%	ANALISTA 1	100,59	99,30	m	99,6
	m	101,01	98,62		
	CV %	100,80	98,96		
	ANALISTA 2	0,29	0,49		
	m	98,72	99,15		
	CV %	100,08	99,05		
100%	ANALISTA 1	99,46	100,85	m	99,3
	m	99,37	98,58		
	CV %	99,41	99,71		
	ANALISTA 2	0,06	1,62		
	m	100,23	98,11		
	CV %	99,61	98,03		
125%	ANALISTA 1	99,92	98,07	m	99,2
	m	0,44	0,06		
	CV %	98,52	98,65		
	ANALISTA 1	99,54	99,71		
	m	99,03	99,18		
	CV %	0,73	0,75		
150%	ANALISTA 2	98,52	98,72	m	99,6
	m	99,66	100,42		
	CV %	99,09	99,57		
	ANALISTA 1	0,82	1,21		
	m	99,93	98,62		
	CV %	99,44	99,10		
50%	ANALISTA 1	99,69	98,86	m	99,6
	m	0,35	0,34		
	CV %	99,30	100,12		
	ANALISTA 2	99,90	100,16		
	m	99,60	100,14		
	CV %	0,42	0,02		

Tabla 61: Resultados completos validación Placebo en Agua.

REPETIBILIDAD	CV% entre	1,62	0,02
REPRODUCIBILIDAD	50%	0,64	
CV%	75%	0,89	
(n=8)	100%	1,01	
	125%	0,71	
	150%	0,55	
EXACTITUD	50%	99,88	
% RECUPERACIÓN	75%	99,57	
(n=8)	100%	99,28	
	125%	99,22	
	150%	99,57	
EXACTITUD GLOBAL	m	99,50	
(n=5)	SD	0,2658	
	CV %	0,2672	
	t experimental	4,15693372	
	t tablas	2,776	
		P= 0.05 GL= 4	

Tabla 62: Resultados validación Placebo en Agua.

CONCLUSIONES SOBRE LA REPETIBILIDAD

Los coeficientes de variación están comprendidos entre 0,02 y 1,62% (tabla 62) , por lo tanto puede concluirse que el método analítico es repetitivo dado que, en todos los casos, se obtienen valores por debajo del límite máximo especificado por las normas ICH (2%).

CONCLUSIONES SOBRE LA REPRODUCIBILIDAD

Viene dada por el coeficiente global para cada concentración; los CV% son similares para todos los niveles de concentración ensayados (tabla 62).

CONCLUSIONES SOBRE LA EXACTITUD

De los resultados anteriores se desprende que la exactitud en el intervalo de concentraciones que se estudia (50-150%) se encuentra comprendido entre el 99,22 y 99,88%, por lo que la técnica cumple con el requisito de exactitud, siendo la recuperación media para todo el intervalo en estudio del 99,5%, la cual es satisfactoria (tabla 62). Se confirma con una t student, que no hay diferencias significativas entre las recuperaciones medias para cada nivel de concentración:

$$t_{\text{exp}} = |100 - R| * \sqrt{n} / SD = 4,1569$$

$$t_{\text{tab}} (p=0.05 \text{ y } GL= 4) = 2,776$$

$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$, lo que significa que ambos valores no son estadísticamente diferentes, es decir no existen diferencias significativas entre la exactitud a nivel bajo (50%), medio (100%) o alto (150%) de concentración del “analito”.

Si se aplica un ANOVA de una dirección sobre los resultados de recuperación individuales obtenidos para cada nivel, el test de F, da una $F_{\text{experimental}} = 0,9438$ frente a la $F_{\text{tablas}} (p=0,05; 4; 35)$ de 2,641, lo que indica que el factor de concentración no afecta a la recuperación. Y la exactitud del método se considera adecuada ya que todas las recuperaciones están comprendidas en un margen estrecho entre 98-100%, en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

50%	75%	100%	125%	150%
100,46548	100,593759	99,4552404	98,524695	99,9301457
99,9156761	101,005168	99,371948	99,5438995	99,4413643
99,2966657	99,3047678	100,853669	98,6520427	98,6244357
100,255425	98,6207192	98,5751793	99,7051767	99,0960608
99,7707303	98,7249979	100,234586	98,5182133	99,3024058
100,926829	100,076392	99,6124141	99,6629423	99,9007955
99,0599523	99,1538034	98,110163	98,7185809	100,123459
99,3571059	99,0496411	98,0253346	100,417546	100,155483

Tabla 63: Resultados en %recuperación del Placebo en Agua.

ANÁLISIS DE VARIANCIAS

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,26150873	4	0,56537718	0,94386895	0,45023255	2,64146394
Dentro de los grupos	20,9649881	35	0,59899966			
Total	23,2264969	39				

Tabla 64: ANOVA de la tabla 63.

3.4.3.5 LINEALIDAD

La linealidad del método para las muestras placebo adicionadas de patrón ha sido comprobada con 5 concentraciones de paracetamol patrón (doble pesada) adicionadas de placebo, abarcando un intervalo que incluye la concentración teórica de la muestra problema (50-150%) y obteniendo 8 replicados de cada concentración.

Los resultados obtenidos son los siguientes (tabla 65):

CONCENTRAC IÓN	ABSORBANCIA	FACTOR DE RESPUESTA
7,57	0,5090	0,06724
7,63	0,5102	0,06687
7,63	0,5301	0,06947
7,55	0,5296	0,07014
7,45	0,4952	0,06647
7,62	0,5124	0,06724
7,35	0,4851	0,06600
7,52	0,4978	0,06620
11,20	0,7540	0,06732
11,11	0,7510	0,06760
12,30	0,8546	0,06948
12,43	0,8577	0,06900
10,90	0,7170	0,06578
11,10	0,7401	0,06668
12,00	0,7928	0,06606
12,10	0,7985	0,06599
15,55	1,0350	0,06656
15,14	1,0069	0,06650
14,20	1,0020	0,07056
14,94	1,0304	0,06897
14,60	0,9750	0,06678
14,50	0,9623	0,06637
14,20	0,9282	0,06537
14,25	0,9307	0,06531
18,86	1,2436	0,06594
18,81	1,2531	0,06662
17,40	1,2010	0,06902
18,32	1,2780	0,06976
19,50	1,2800	0,06564
19,90	1,3214	0,06640
19,01	1,2503	0,06577
19,05	1,2745	0,06690
22,48	1,5104	0,06719
22,61	1,5047	0,06655
21,53	1,4752	0,06852
21,01	1,4567	0,06933
22,65	1,4986	0,06616
22,75	1,5143	0,06656
22,51	1,4875	0,06608
22,57	1,5061	0,06673

Tabla 65: Resultados Placebo en Agua

A estos datos (concentraciones y absorbancias, tabla 66) se ha aplicado el test estadístico de homogeneidad de variancias de Cochran (tabla 67), obteniéndose una $G_{\text{experimental}}$ de 0,431634 que comparado con la G_{tablas} para $p=0,05$, 5 concentraciones y 8 replicados que es 0,4564, el valor experimental es inferior al tabulado (tabla 68), con lo cual puede afirmarse que no existen diferencias significativas entre las variancias de los diferentes niveles de concentración y puede aplicarse la hipótesis de un modelo lineal, estimado por el

método de mínimos cuadrados.

50%	75%	100%	125%	150%
0,5090	0,7540	1,0350	1,2436	1,5104
0,5102	0,7510	1,0069	1,2531	1,5047
0,5301	0,8546	1,0020	1,2010	1,4752
0,5296	0,8577	1,0304	1,2780	1,4567
0,4952	0,7170	0,9750	1,2800	1,4986
0,5124	0,7401	0,9623	1,3214	1,5143
0,4851	0,7928	0,9282	1,2503	1,4875
0,4978	0,7985	0,9307	1,2745	1,5061

Tabla 66: Resultados en Absorbancia para el cálculo del Test de Cochran.

Análisis de variancia de un factor

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Variancia
50%	8	4,06939601	0,5086745	0,0002524
75%	8	6,26564707	0,78320588	0,00272906
100%	8	7,87053613	0,98381702	0,00172925
125%	8	10,1019105	1,26273882	0,00121941
150%	8	11,9534157	1,49417696	0,0003925

Tabla 67: ANOVA del Placebo en Agua.

G experimental	0,431634
G tabulada	0,4564

Tabla 68: Resultados de la G de Cochran.

Por otra parte, también se aplica el test estadístico de los factores de respuesta, para comprobar la existencia de linealidad entre ambos factores.. El factor de respuesta se ha calculado dividiendo la concentración (en $\mu\text{g/ml}$, tabla 65) por la absorbancia. Se determina el valor medio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los factores de respuesta calculados.

Estadística factores respuesta	
Media	0,0671789
Desviación estándar	0,0013559
CV%	2,136968

Tabla 69: Estadística de los factores de respuesta.

El coeficiente de variación presenta un valor menor que el establecido como indicador de linealidad (<5%), con lo cual puede afirmarse que existe una relación de linealidad entre ambas variables (tabla 69).

Se determina la ecuación de la recta de calibrado $y = bx + a$, tomando en abscisas las concentraciones (en $\mu\text{g/ml}$) y en ordenadas las correspondientes absorbancias (figura 21):

Absorbancia = pendiente * concentración + ordenada origen

$$y = 0,065341402 \cdot x + 0,016331568$$

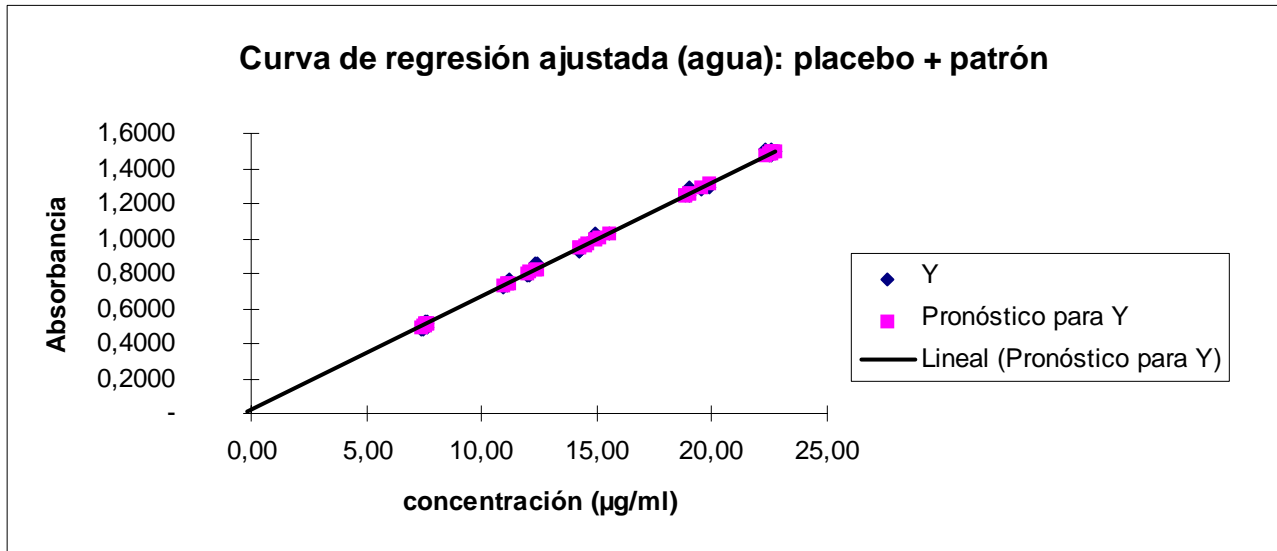


Figura 21: Recta de calibración del placebo cargado con MP paracetamol en agua desionizada.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple r	0,99817084
Coefficiente de determinación r ²	0,996345
r ² ajustado	0,996248
Error típico	0,021615
Observaciones	40

Tabla 70: Estadística de la regresión Placebo en Agua.

Tanto el valor del coeficiente de correlación (cercano a 1, $r = 0,99817$, tabla 70) como el de coeficiente de determinación r^2 indican una buena linealidad. El coeficiente de determinación da una indicación del grado de aproximación de los puntos a la relación lineal. Por lo tanto, puede afirmarse que esta relación lineal explica el 99,63% de la variancia de la absorbancia.

Para acabar de comprobar la linealidad y estudiar la proporcionalidad, se calculan los límites de confianza de la pendiente (b); $b \pm s_b t$, y de la ordenada en el origen (a); $a \pm s_a t$.

TEST DE PROPORCIONALIDAD				
	Máximo	Mínimo	Observaciones	Test de t
LÍMITES DE b	0,068005563	0,0653522	no incluye el cero	101,7781761
LÍMITES DE a	0,027735216	-0,01439	incluye el cero	0,641497932
	t (GL(n-2)=38, P=0.05%)			2,025
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Ordenada en el origen (a)	0,006672453	0,0104014	0,641497932	0,525049978
Pendiente (b)	0,066678905	0,0006551	101,7781761	6,37886E-48

Tabla 71: Test de proporcionalidad de la regresión Placebo en Agua.

Test de sensibilidad:

Tomando los límites de confianza de la pendiente se comprueba que no incluye el cero, es decir que existe una pendiente y por lo tanto una recta. El test de t:

$$t_{\text{exp}} = |b| / s_b = 101,778$$

$t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$ incluso para $p = 0,001$, lo que indica que la probabilidad de que $b \neq 0$ es superior al 99,9%.

Test de proporcionalidad:

Tomando los límites de confianza para la ordenada en el origen y calculando, se observa que estos límites incluyen el cero y el método presenta un ligero sesgo. El test de t:

$$t_{\text{exp}} = |a| / s_a = 0,641497$$

Este valor de t es inferior al tabulado (para $p = 0.05$ y $GL = 38$), por lo que la probabilidad de que $a = 0$ es muy elevada.

Otro test estadístico de alta significación es aplicar un análisis de la variancia (ANOVA) completo a la recta de regresión:

ANOVA DE LA REGRESIÓN					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	Fexperimental	F tablas
Regresión (SSreg)	1	4,84004055	4,840040552	10358,79712	4,098168915
Falta de ajuste (SSlof)	3	-0,02650331	-0,008834436	-6,986360908	2,874187999
Error puro (SSpe)	35	0,04425841	0,001264526		
Residuos (SSr)	38	0,01775511	0,00046724		
Total	39	4,85779566			

Tabla 72: ANOVA de la regresión Placebo en Agua.

Del cual puede concluirse, que dado que $F_{\text{exp}} > F_{\text{tablas}}$ ($p = 0,05$; 1; 38) = 4,09 queda demostrada la existencia

de una pendiente # 0.

Por otra parte, dado que $F_{exp} < F_{tablas}$ ($p=0,05$; 3; 35) = 2,874 queda demostrada la linealidad entre los resultados obtenidos.

3.4.3.6 CONCLUSIÓN MÉTODO ANÁLISIS EN AGUA

Todos los parámetros estudiados demuestran que el método es válido para el análisis del paracetamol en comprimidos. La exactitud o reproducibilidad es adecuada en todo el intervalo analizado. El único problema analítico es la absorbancia de los excipientes que puede ser corregida añadiendo al patrón de referencia la mezcla de excipientes a fin de que se tenga en cuenta.

3.5 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS VALIDADOS

En base a los resultados obtenidos, los tres métodos se han demostrado como válidos y fiables para la determinación del paracetamol como materia prima y en comprimidos. Se resumen los parámetros tabulados, todos ellos similares:

	MATERIA PRIMA		PLACEBO CARGADO DE PRINCIPIO ACTIVO				
	INTERVALO LINEALIDAD	r	INTERVALO LINEALIDAD	r	EXACT. GLOBAL	REPET (CV%)	REPROD AL 100% (CV%)
Agua -Metanol	50-150	0.9993	70-130	0.99858	100.44	2.06-0.06	0.91
Sol. Reguladora	60-140	0.9993	70-130	0.99872	99.63	1.44-0.07	0.75
Agua Desionizada	50-150	0.9998	50-150	0.99817	99.50	1.62-0.02	1.01

Tabla 73: Parámetros de los métodos validados.

Para la materia prima el método de análisis en agua desionizada presenta el intervalo de análisis más amplio de entre los ensayados (50-150%) y el coeficiente de correlación es más alto aunque probablemente las diferencias no serían significativas. No obstante los tres métodos resultan interesantes ya que los parámetros de validación cumplen en todos los casos y las diferencias (si existen no parecen significativas). Para el análisis del placebo cargado, la reproducibilidad de las muestras al 100%, la exactitud son similares con la salvedad de que el intervalo de linealidad es mayor (50-150%) frente a 70-130% del resto, con lo cual parece el más interesante a priori.

Con el fin de concluir si existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos o no, se prepara una

misma muestra homogénea (una de paracetamol materia prima y otra de placebo y paracetamol de concentraciones aproximadas a 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) que se analizan seis veces por los tres métodos. De cada grupo de resultados obtenidos se hace un estudio comparativo entre las tres técnicas mediante un análisis estadístico de ANOVA en una dirección.

3.5.1 ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA

Se prepararon 6 muestras de paracetamol patrón de una concentración aproximada de 12,00 $\mu\text{g}/\text{ml}$, las muestras fueron analizadas en paralelo según los tres métodos, los resultados se muestran en la tabla 74.

SOLUCIÓN	AGUA	AGUA-METANOL	SOL. REGULADORA
1	0,8008	0,8010	0,8032
2	0,8019	0,7961	0,8030
3	0,8057	0,7949	0,8057
4	0,8043	0,7972	0,7980
5	0,8113	0,8082	0,8000
6	0,7994	0,7976	0,7956

Tabla 74: Absorbancias de las 6 soluciones patrón preparadas por los tres métodos.

Para ver si el factor método influye en la respuesta se aplica un análisis de la variancia (ANOVA), ver tabla 75 y tabla 76.

Análisis de variancia de un factor				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Variancia
AGUA	6	4,82323	0,803872333	1,847 E-05
AGUA-METANOL	6	4,79491	0,799151667	2,372 E-05
SOL. REGULADORA	6	4,80539	0,800898333	1,393 E-05

Tabla 75: Análisis de la variancia de los grupos.

ANÁLISIS DE VARIANCIA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6,836 E-05	2	3,41802 E-05	1,827295	0,194890	3,682316
Dentro de los grupos	0,00028058	15	1,87054 E-05			
Total	0,00034894	17				

Tabla 76: Resultados del ANOVA.

Los resultados del ANOVA de una dirección da una $F_{\text{experimental}} = 1,82729$ frente a la $F_{\text{tablas}} (p=0,05)$ de 3,6823, lo que indica que el factor de método analítico no afecta al resultado obtenido y por lo tanto las variancias

entre los métodos son similares. Es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres métodos ensayados.

3.5.2 ANÁLISIS SOBRE PLACEBO CARGADO DE PRINCIPIO ACTIVO

Las muestras analizadas contenían una concentración de 12,00 µg/ml en paracetamol y estaban cargadas con la parte correspondiente de placebo.

SOLUCIÓN PLACEBO	AGUA	AGUA-METANOL	SOL. REGULADORA
1	0,81772	0,82593	0,81876
2	0,82619	0,81955	0,82172
3	0,80797	0,81914	0,81853
4	0,79286	0,81331	0,80093
5	0,81129	0,81458	0,80467
6	0,81254	0,81308	0,80374

Tabla 77: Resultados de absorbancia de las soluciones placebo analizadas por los tres métodos.

Análisis de variancia de un factor

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Variancia
AGUA	6	4,86857	0,8114283	0,0001231
AGUA-METANOL	6	4,90557	0,8175965	2,472 E-05
SOL. REGULADORA	6	4,86835	0,8113916	8,502 E-05

Tabla 78: Análisis de las variancias de los grupos estudiados.

ANÁLISIS DE VARIANCIA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,0001531	2	7,65476E-05	0,98627	0,39589	3,682316
Dentro de los grupos	0,0011641	15	7,76128E-05			
Total	0,0013172	17				

Tabla 79: Parámetros del ANOVA de los grupos estudiados.

Los resultados del ANOVA de una dirección da una $F_{\text{experimental}} = 0,98627$ frente a la $F_{\text{tablas}} (p=0,05)$ de 3,6823, lo que indica que el factor método analítico no afecta al resultado obtenido y por lo tanto las variancias entre los métodos son similares. Es decir, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres métodos ensayados.

Con lo cual y en base a los resultados obtenidos puede considerarse el método de análisis en agua desionizada como válido, por lo que, siendo el más práctico respecto al resto de métodos, es lógico, que se

escoja como el método de análisis a aplicar en las prácticas de Farmacia Galénica III. Para completar la validación analítica del paracetamol en agua se llevan a cabo el estudio de los parámetros de:

- reproducibilidad (misma muestra leída en diferentes espectrofotómetros)
- límite de detección y límite de cuantificación
- selectividad

3.6 REPRODUCIBILIDAD O ROBUSTEZ DEL MÉTODO DE ANÁLISIS EN AGUA DESIONIZADA

La reproducibilidad es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (analista, aparato, día, etc.). Para llevar a cabo el estudio de reproducibilidad se prepararon muestras de paracetamol en concentraciones crecientes correspondientes a un ensayo de linealidad. Las muestras se analizaron en tres equipos espectrofotométricos diferentes⁵ calibrados según el procedimiento general aprobado del SDM (**cal01001.doc**). De cada muestra se realizaron tres réplicas de absorción y se confeccionaron las rectas de calibración de los tres espectrofotómetros siendo los resultados los siguientes:

	ESPECTROF. 1	ESPECTROF. 2	ESPECTROF. 3
Coefficiente correlación	0.999804	0.999739	0.999814
Coefficiente determinación	0.999960	0.999479	0.999628
Factor de respuesta	1.000345	1.001125	0.999365
DS factor de repuesta	0.001035	0.003661	0.001680
CV factor de respuesta (%)	0.103473	0.365780	0.168125

Tabla 80: Resumen de los resultados de robustez.

Se demuestra que las rectas en los tres casos son lineales y proporcionales. A continuación se tabula el resultado medio obtenido para cada espectrofotómetro y se calcula la media, desviación estándar y coeficiente de variación de las tres respuestas:

⁵ Espectrofotómetro nº 1: UNICAM del SDM (sala control galénico, **nº código**), espectrofotómetro nº 2: UNICAM (laboratorios generales de prácticas de la Facultat de Farmacia) y espectrofotómetro nº 3 (HP del SDM de control de calidad, **nº código**).

CONCENTRACIÓN PATRÓN (mg)	ESPECT 1	ESPECT 2	ESPECT 3	A MEDIA	DS	CV (%)
7,5	0,4776667	0,4713333	0,4803633	0,4764544	0,0037848	0,7943727
7,6	0,4883333	0,4800000	0,4907833	0,4863722	0,0046155	0,9489687
9,9	0,6286667	0,6146667	0,6371833	0,6268389	0,0092828	1,4808914
10,1	0,6470000	0,6390000	0,6566033	0,6475344	0,0071965	1,1113633
15,2	0,9700000	0,9480000	0,9750300	0,9643433	0,0117375	1,2171503
15,1	0,9483333	0,9293333	0,9550900	0,9442522	0,0109039	1,1547673
20,0	1,2866667	1,2553333	1,2799667	1,2739889	0,0134721	1,0574712
20,1	1,3080000	1,2713333	1,2866333	1,2886556	0,0150372	1,1668941
22,7	1,4570000	1,4170000	1,4323333	1,4354444	0,0164774	1,1478984
22,8	1,4573333	1,4196667	1,4514000	1,4428000	0,0165361	1,1461125

Tabla 81: Resultados de Absorbancia de los tres espectrofotómetros utilizados.

Se puede observar que todos los coeficientes de variación son inferiores al 5%, luego aceptables para todos los casos (cumple la reproducibilidad). Se adjunta los parámetros de la recta de calibrado calculada y su representación gráfica (figura 22) con los resultados obtenidos.

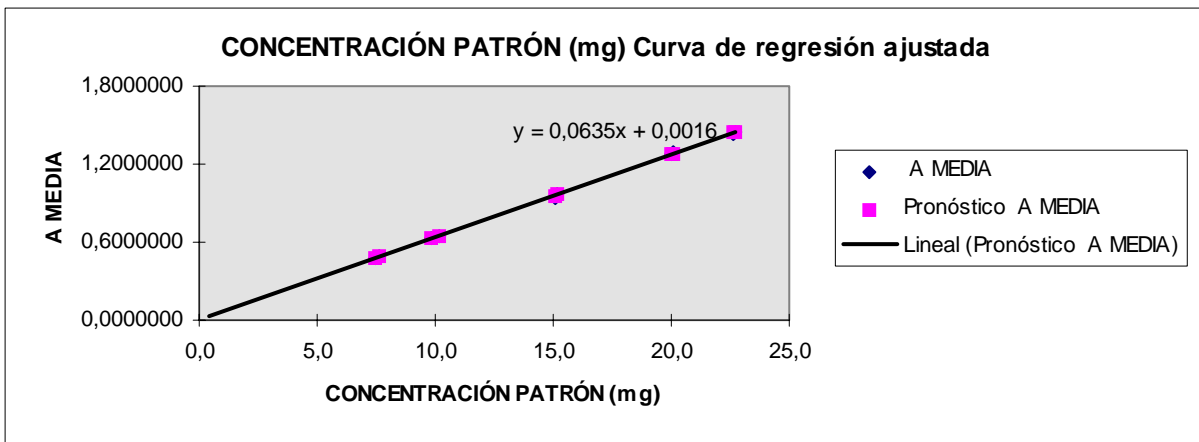


Figura 22: Recta de calibrado obtenida con las lecturas medias de tres espectrofotómetros.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99985104
Coefficiente de determinación r ²	0,99970211
R ² ajustado	0,99966488
Error típico	0,00704464
Observaciones	10

Tabla 82: Estadísticas de la regresión de robustez.

ANÁLISIS DE VARIANCIA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1,3323694	1,3323694	26847,690	2,1534 E-15
Residuos	8	0,0003970	4,9627 E-05		
Total	9	1,3327665			

Tabla 83: Análisis de la variancia del ensayo robustez.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Ordenada en el origen (a)	0,00164361	0,00625118	0,26292727	0,79925127
Pendiente (b)	0,06346739	0,00038734	163,852649	2,1534E-15

Tabla 84: Parámetros del ANOVA.

Por lo tanto, queda demostrada la robustez del método aunque se varíe de espectrofotómetro para determinar la Absorbancia, hecho altamente probable en las prácticas de laboratorio de alumnos.

3.7 LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS EN AGUA DESIONIZADA

El límite de detección es la cantidad o concentración mínima de “analito” a partir de la cual es factible realizar el análisis para dar un resultado significativo. De entre los diferentes métodos existentes para su cálculo se han escogido dos:

- Análisis repetido del blanco de la muestra (entendiéndose como blanco el placebo sin principio activo) y se ha determinado diez veces su absorbancia.
- Recta patrón a baja concentración.

7.1 LÍMITES DE ANÁLISIS SEGÚN EL MÉTODO DE ANÁLISIS REPETIDO DE UN BLANCO (PLACEBO)

De la mezcla placebo disponible, se prepararon 10 soluciones que fueron diluidas por el método en estudio.

solución	MÉTODO DEL BLANCO (ABSORBANCIA)
1	- 0,015000
2	- 0,011000
3	- 0,015000
4	- 0,011000
5	0,003500
6	0,003700
7	- 0,004400
8	0,005200
9	- 0,003500
10	- 0,004300

Tabla 85: Absorbancias leídas de los blancos.

Se halla el valor medio y la desviación estándar de los datos:

Estadística	
Media	-0,0052
Desviación estándar	0,0077
CV%	-147,6909

Tabla 86: Estadística básica de las lecturas de los blancos.

Al tratarse de un método espectrofotométrico, se hace corrección frente al blanco, con lo cual se aplican las fórmulas indicadas en el apartado 3.3.5 c) de este mismo capítulo:

	un replicado (ppm)	tres replicados (ppm)
LIMITE DE DETECCIÓN	0,18258	0,10541
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	0,60859	0,35137

Tabla 87: Límites de análisis por el método del blanco.

Para su cálculo se utiliza la pendiente de la recta de calibrado calculada para un intervalo amplio que incluya concentraciones muy bajas del “analito”(ver a continuación). Además no debe aplicarse ningún factor de corrección al cálculo ya que el ajuste de la recta de calibrado es bueno ($r= 0.99987$) y la desviación estándar del blanco (0,0077) es mayor que la desviación estándar de los términos de la recta (0,004586104 y 0,000805979), con lo cual puede asumirse que la mayor fuente de error se debe a la desviación estándar del blanco.

En el caso de hacer las lecturas por triplicado, puede observarse que los límites de detección y cuantificación disminuirían ostensiblemente, de aquí el interés en análisis de llevar a cabo los ensayos por duplicado (como mínimo).

Un resultado negativo de detección de paracetamol debe darse como “inferior a 0.1825 $\mu\text{g/ml}$ ” y uno

positivo solo podrá expresarse en su valor numérico si es superior a 0,60859 ppm. En caso de que los análisis se realicen por triplicado los límites se hacen menores.

3.7.2 LÍMITES DE ANÁLISIS POR RECTA A BAJAS CONCENTRACIONES

Por otra parte se ha calculado una recta de calibrado con paracetamol patrón que abarca concentraciones bajas de paracetamol desde la concentración 0,34 ppm hasta 13,66 ppm. Cada muestra se analiza tres veces y se calcula la desviación estándar de los 3 análisis. Todas las desviaciones estándares calculadas son promediadas para obtener la desviación estándar del método analítico. La desviación estándar media se divide por la pendiente de la recta de calibración para obtener una estimación del ruido asociado al método analítico. Este valor de ruido analítico multiplicado por 3 será una estimación aceptable del límite de detección y multiplicado por 10 será una estimación del límite de cuantificación.

La recta ajustada es la siguiente y sus parámetros de ajuste demuestran la calidad del ajuste.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	ABSORB 1	ABSORB 2	ABSORB 3	ABSORB. MEDIA	SD muestra	Factor de respuesta
0,3415	0,0489	0,0479	0,0487	0,0485	0,0005	0,141972
0,6830	0,0928	0,0940	0,0938	0,0936	0,0007	0,136979
1,3660	0,1786	0,1783	0,1780	0,1783	0,0003	0,130517
2,0490	0,2633	0,2623	0,2625	0,2627	0,0005	0,128189
2,7320	0,3724	0,3711	0,3710	0,3715	0,0008	0,135991
3,4150	0,4385	0,4396	0,4422	0,4401	0,0019	0,128871
6,8300	0,8797	0,8816	0,8790	0,8801	0,0013	0,128856
13,6600	1,7206	1,7227	1,7218	1,7217	0,0011	0,126040

Tabla 88: Lecturas de las soluciones patrón en cada espectrofotómetro estudiado

SD media	0.008844	NIVEL DE RUIDO = 0.00740
Pendiente	0.1257075	
LÍMITE DE DETECCIÓN		0.02111 ppm
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN		0.07035 ppm

Tabla 89: Cálculo de límites de análisis.

Estadísticas de la regresión		
Coefficiente de correlación múltiple		0,99987669
Coefficiente de determinación r^2		0,99975341
r^2 ajustado		0,99971231
Error típico		0,00947838
Observaciones		8
	Coefficientes	Error típico
Intersección	0,011229912	0,004586104
Pendiente	0,125707551	0,000805979

Tabla 90: Estadística de la regresión.

Se obtiene la recta de calibrado:

$$y = 0,125707551 x + 0,011229912$$

siendo x = concentración de paracetamol en $\mu\text{g/ml}$ en la muestra, mientras que y = absorbancia de la muestra.

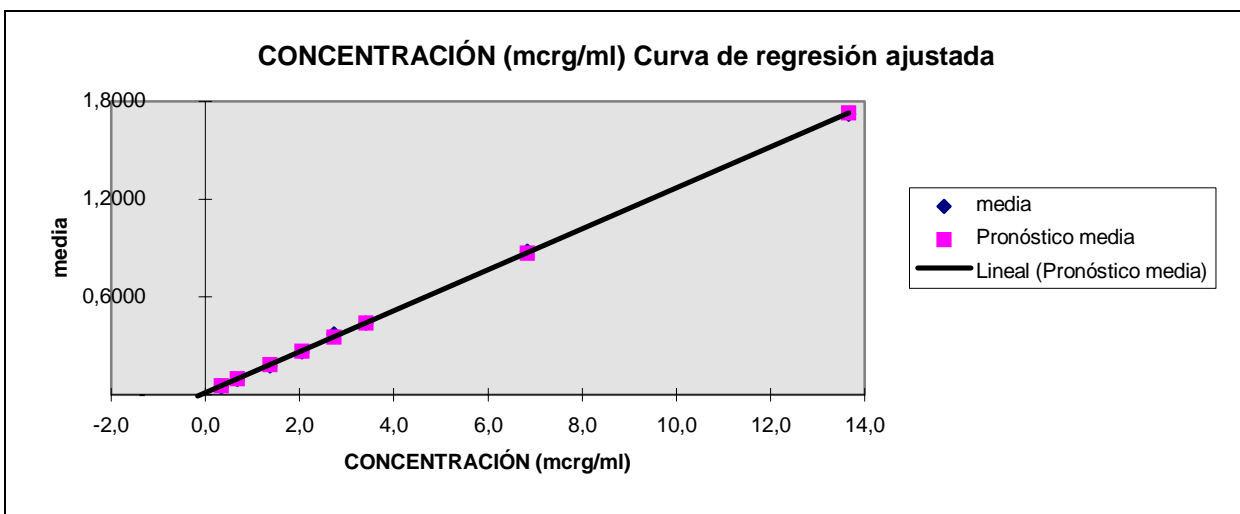


Figura 23: Recta de calibrado para determinar el límite de detección del método espectrofotométrico de análisis

Ambos métodos arrojan unos límites de análisis bajos (menos de 1 ppm) lo cual significa que el método de análisis es muy sensible y es capaz de detectar señal aunque haya poco principio activo en la muestra.

3.8 SELECTIVIDAD O ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

En el caso que nos compete la selectividad del método espectrofotométrico UV de análisis está comprometida ya que tanto la impureza 4-cloroacetanilida (figura 24), como el p-aminofenol (figura 25) absorben en esta zona del espectro.

Con lo cual la propia definición de este parámetro, la no interferencia de impurezas o productos de degradación o compuestos relacionados o excipientes en la muestra. La determinación de la selectividad se realiza por comparación de los resultados analíticos de un patrón de referencia con los de un patrón conteniendo todas las sustancias anteriores que potencialmente pudieran estar presentes. Respecto al

análisis de las MP, este método no es suficiente puesto que la monografía obliga a determinar y cuantificar las impurezas, con lo cual si el test de impurezas no pasa, el resultado de contenido no importa puesto que la MP será rechazada por no cumplir las especificaciones.

Respecto al análisis de comprimidos la USP24 no requiere que se realice análisis de impurezas en el comprimidos. Para comprobar que realmente no influirán en los resultados del análisis se han analizado y comparado los siguientes muestras:

Placebo (recién preparado, figura 19) → Placebo (envejecido dos años, figura 26). Puede comprobarse que no se han encontrado señales o un incremento importante de la absorbancia.

Placebo + patrón (figura 20) → Patrón (figura 17). No hay modificación del espectro ni superposición de picos, etc.

Placebo + patrón (figura 20) → Producto en estabilidad de 2 años (figura 27). Tampoco en este caso aparecen señales que indiquen problemas de degradación o similar.

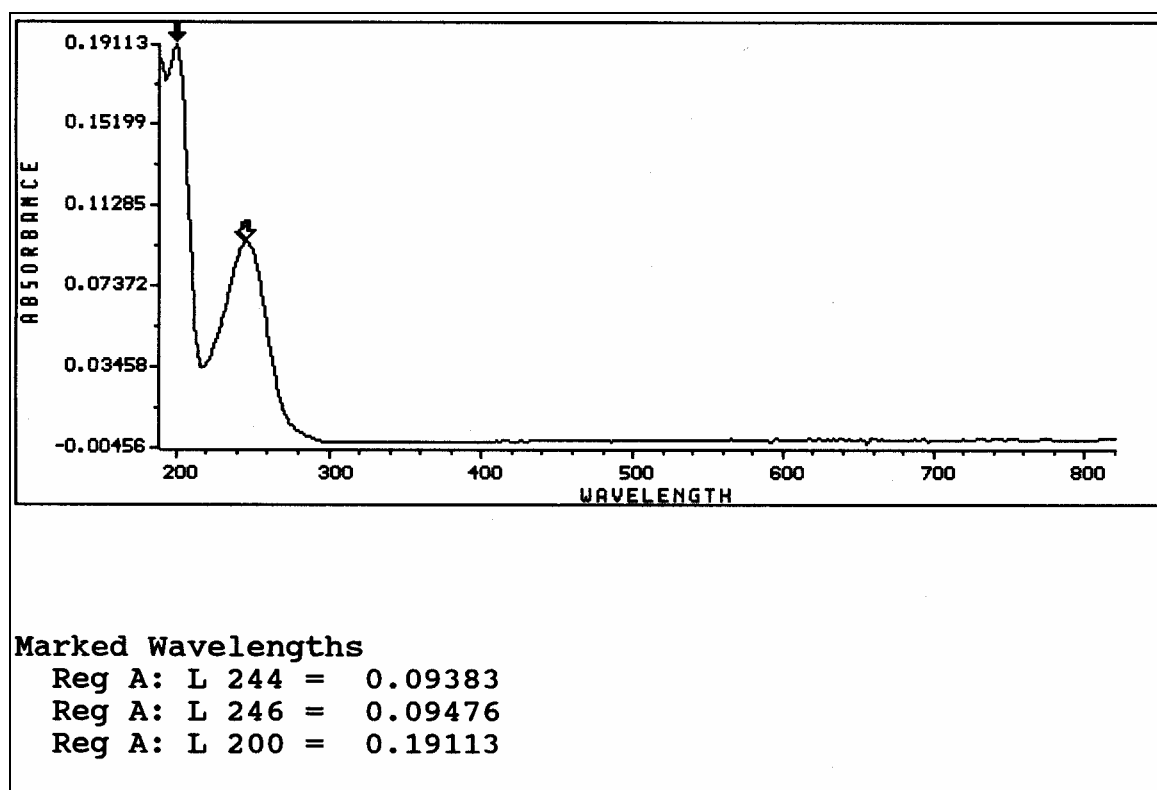


Figura 24: Espectro de absorción de la impureza 4-cloroacetanilida al 0,001% en metanol.

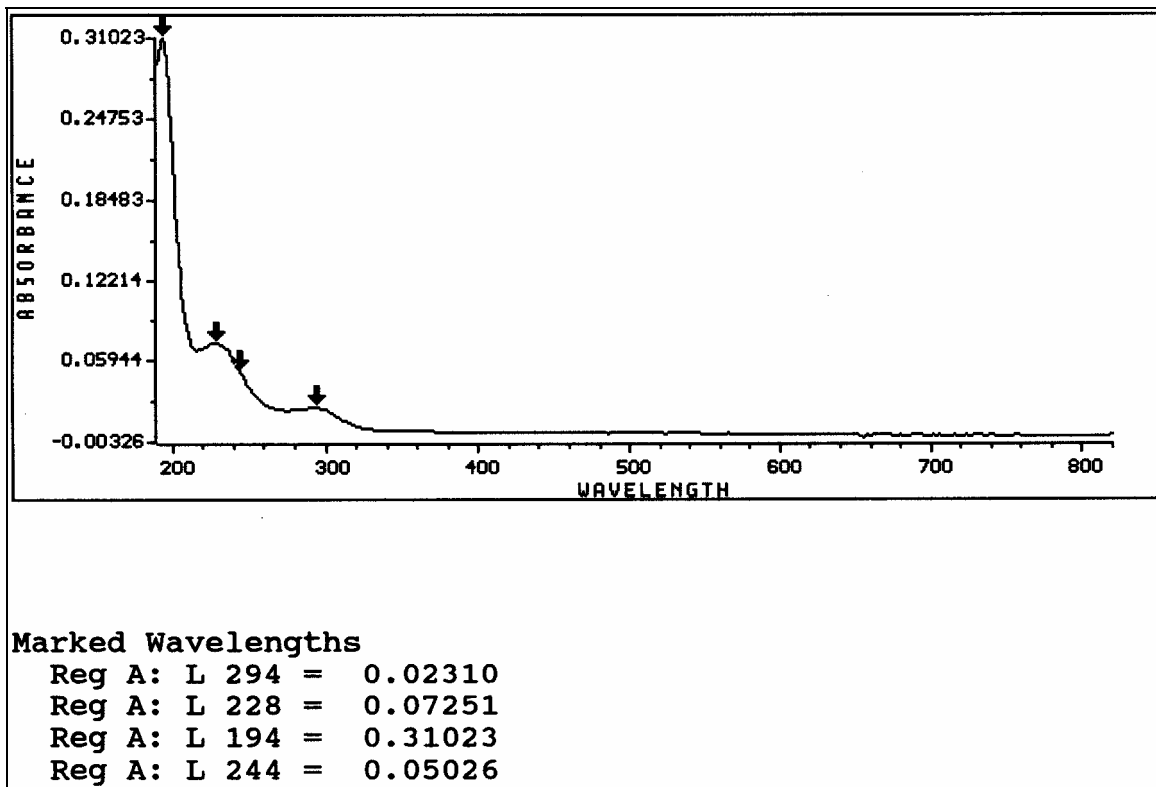


Figura 25: Espectro de absorción de la impureza p-aminofenol al 0,001% en agua - metanol.

Por otra parte, para comprobar la selectividad del método del análisis en los comprimidos también se había analizado las muestras:

placebo (figura 19)

placebo envejecido (figura 26)

comparación de un placebo cargado de patrón y patrón (figura 20 y figura 17, respectivamente)

comparación de un medicamento degradado (próximo a la fecha de caducidad, figura 27)

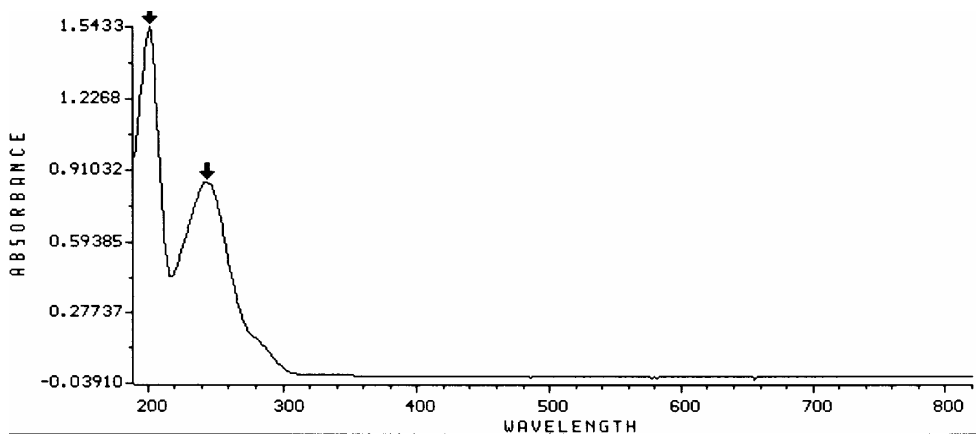


Figura 26: Espectro de absorbancia de un placebo envejecido (2 años)

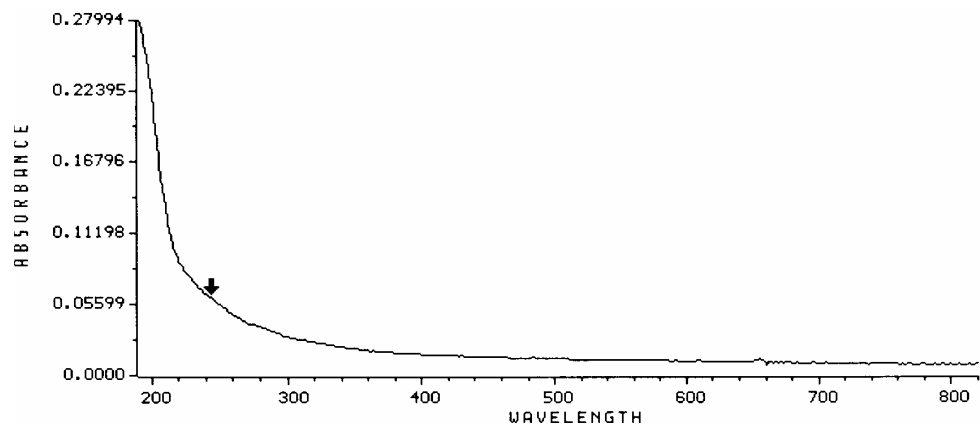


Figura 27: Espectro de absorción de un comprimido caducado (2 años)

3.9 BIBLIOGRAFÍA

- 1** Base de datos en cd-rom: IPA 1979-2000
- 2** Fairbrother J. Acetaminophen. *Analytical Profiles of Drug Substances* 1974; 3: 40-72.
- 3** Humeida A El Obeid, Abdullah A Al Badr. Acetaminophen. *Analytical Profiles of Drug Substances* 1985; 14: 567-585.
- 4** Farmacopea Europea. Addendum 1999 p.737-738.
- 5** Acetaminophen. USP 24 The United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2000 p.17-18
- 6** Acetaminophen. The official Monograph JP XIII. The society of Japanese Pharmacopeia. 1996: 183-184.
- 7** Clarke's Isolation and identification of drugs. 2ª ed. Londres: The Royal Pharmaceutical Press; 1986. p. 849-850.
- 8** Ustun M, Sungur S, Ersoy I. Comparison of HPLC spectrophotometric method for the determination of paracetamol (acetaminophen) and acetylsalicylic acid in tablets. *Pharmazie* 1992; 47 (Jul): 558-559.
- 9** Del Pozo A. Farmacía Galénica Especial. Tomo I. Barcelona: Romargraf; 1977. p. 97-98.
- 10** Paracetamol. Real Farmacopea Española. 1ª ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. 1997. p. 1416-1417.
- 11** Formulario AEFI. Métodos de análisis y control de medicamentos. Madrid: Consejo General Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1988; 247-249.
- 12** British Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1980; 2: 800.
- 13** British Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, 1988; 2: 980.
- 14** Suñé Negre JM, Jurado F, Lizcano J, Salvadó MA, García Celma MJ, Miró ML. Estudio galénico y de estabilidad a tiempo real de distintas especialidades farmacéuticas de comprimidos de paracetamol. *Ciencia Farmacéutica* 1992; 2 (6): 401-410.
- 15** El Fataty HM, Aboul Enein HY, Lotfi EA. Conductimetric determination of acetaminophen. *Can J Pharm Sci* 1980; 15 (Jan): 19-20.
- 16** Parimoo P, Bharathi A, Babu RJ, Gupta CN, Sudha Rao S. Simultaneous and selective determination of diclofenac sodium and paracetamol in tablet preparations by titrimetry. *East Pharm* 1997; 40 (Apr): 111-112.
- 17** Jin JZ. HPLC determination of three main components in Paragesic tablets. *Chin J Pharm Anal Yaowu Fenxi Zazhi* 1997;17(Jan): 25-27.
- 18** Atay O, Dincol F. Quantitative determination of aspirin and paracetamol in tablets. *Farm Bilimler Derg* 1995; 20(1): 13-19.
- 19** Indrayanto G; Sunarto A; Adriani Y. Simultaneous assay of phenylpropanolamine hydrochloride, caffeine, paracetamol, glycerylguaiacolate and chlorpheniramine maleate in Silabat tablets using HPLC with diode array detection. *J Pharm Biomed Anal* 1985; 13(12); 1555-1559.
- 20** Thomis R; Roets E; Hoogmartens J. Analysis of tablets containing aspirin, acetaminophen and ascorbic acid by high performance liquid chromatography. *J Pharm Sci* 1984; 73(Dec); 1830-1833.
- 21** Mamolo MG; Vio L; Maurich V. Simultaneous quantitation of paracetamol, caffeine and propyphenazone by high pressure liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 1985; 3(2); 157-164.
- 22** Mamolo MG; Vio L; Maurich V. High pressure liquid chromatographic analysis of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid in tablets. Salicylic acid quantitation. *Farmaco Ed Prat* 1985; 40(Apr); 111-123.
- 23** Dogan HN. Simultaneous spectrophotometric determination of acetaminophen and caffeine in tablets by absorbance ratio technique. *Il Farmaco* 1996; 51(Feb): 145-146.
- 24** Belal SF; Elsayed MAH; Elwalily A; Abdine H. Spectrophotometric determination of acetaminophen and salicylamide through nitrosation and subsequent chelation. *Analyst*; 1979; 104(Oct); 919-927.
- 25** Hassan SM, Shaaban AM. Application of orthogogonal functions to spectrophotometric analysis: a stability indicating method for determination of acetaminophen. *J. Pharm. Belg* 1983; 38 (5): 258-260.
- 26** Ueda H; Pereira Rosario R; Riley CM; Perrin JH. Diode array spectroscopy in pharmaceutical analysis: determination of acetaminophen/codeine phosphate tablets. *J Pharm Biomed Anal* 1979; 7(3); 309-320
- 27** Tomankova H; Vasatova M. TLC (HPTLC) spectrodensitometry in pharmaceutical analysis. Part 2. TLC spectrodensitometric simultaneous determination of propyphenazone, paracetamol and caffeine in the preparation in progress Valetol tablets. *Cesk Farm* 1988; 37(7); 291-294
- 28** Sistema de Gestión Mediambiental. ISO 14000.
- 29** Castro M, Gascón S, Pujol M, Sans JM, Vicente L. Validación de métodos analíticos. Barcelona: Monografías de AEFI; 1989.
- 30** Beneítez C. Good manufacturing practices. La gestión farmacéutica en la fabricación de medicamentos, consejos prácticos. Madrid. CSIF. 1996.
- 31** Salazar R, Validación Industrial. Su aplicación a la industria farmacéutica y afines. Barcelona: Romargraf 1999.
- 32** Caporal Gautier J, Nivet JM. Guide de validation analytique: Report SFTP. Methodologie et exemples *STP Pharma Practiques* 1992; 2 (4): 227-239.

- 33** Nuñez JL, Ballesteros P, Lastres JL. Validación de un método espectrofotométrico para la determinación analítica de clorhidrato de diltiazem. *Industria Farmacéutica* 1996; XI (1): 41-45.
- 34** La Validación de la teoría a la práctica. X Encuentro de AEFI. Toledo, 5-7 octubre 1989.
- 35** Validation of compendial methods. General Chapter <1225>. USP 24. The United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2000 p. 2149-2152.
- 36** International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: methodology. 1996.
- 37** Díaz A. Cromatografía Líquida de alta eficacia HPLC. Curso IQS. Barcelona. 30 junio-1 julio 1998.
- 38** Caturla MC, Azcona MT, Sans JM. Validación de análisis de fármacos. Curso de Formación Farmacéutica Superior. Les Heures. Barcelona. 28 de abril de 1998.
- 39** López JR. Estadística aplicada a la validación de métodos analíticos. 4ª Conferencia-Coloquio sobre Estadística Aplicada a la Industria farmacéutica. Comisión de Estadística Farmacéutica AEFI. Barcelona. 3 mayo 1995.
- 40** Roman E. Validación de métodos analíticos en el entorno de control de calidad. *Industria Farmacéutica* 1993; septiembre-octubre: 137-142.
- 41** Shah VP, Midha K, Dighe S, McGilveray II, Skelly J, Yacoobi A et al. Analytical Methods Validations: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1992; 81 (3): 309-312.
- 42** Pateelnick L. Analytical methods validation. En: Berry IR y Nash R, editores. Pharmaceutical Process Validation. New York: Marcel Dekker; 1993. p.411-428.
- 43** Gardner JA, Coleman S, Farrow SG. Why worry about your analytical methods?. *Analytical Proceedings* 1993; 30 (april):183-185.
- 44** Garcés J, Mariné J, Codony R. Evaluación y control de calidad de los métodos de análisis químico. IV Parámetros que caracterizan al método analítico: criterios de fiabilidad (exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad). *Ciencia e Industria Farmacéutica* 1988; 7:182-189.
- 45** Garcés J, Mariné J, Codony R. Evaluación y control de calidad de los métodos de análisis químico. V Comparación de métodos analíticos. *Ciencia e Industria Farmacéutica* 1988; 7:373-379.
- 46** Garcés J, Mariné J, Codony R. Evaluación y control de calidad de los métodos de análisis químico. VI Control de calidad intralaboratorio. Parte A: control del proceso analítico, control de los técnicos, control de los materiales. *Ciencia e Industria Farmacéutica* 1989; 8: 23-29.
- 47** Garcés J, Mariné J, Codony R. Evaluación y control de calidad de los métodos de análisis químico. VI Control de calidad intralaboratorio. Parte A: control de materiales (agua, reactivos y patrones). *Ciencia e Industria Farmacéutica* 1989; 8: 60-68.
- 48** Garcés J, Mariné J, Codony R. Evaluación y control de calidad de los métodos de análisis químico. VII Control de calidad interlaboratorio: determinación de la repetibilidad y reproducibilidad por ensayos interlaboratorios (primera parte). *Ciencia e Industria Farmacéutica* 1989; 8: 137-142.
- 49** Garcés J, Mariné J, Codony R. Evaluación y control de calidad de los métodos de análisis químico. VII Control de calidad interlaboratorio: determinación de la repetibilidad y reproducibilidad por ensayos interlaboratorios (segunda parte). *Ciencia e Industria Farmacéutica* 1989; 8: 191-202.
- 50** Garcés J, Mariné J, Codony R. Evaluación y control de calidad de los métodos de análisis químico. VIII Control de calidad interlaboratorios: Estudios de colaboración según la AOAC. Consideraciones finales sobre los estudios en colaboración. Parte A: Estudios en colaboración según la AOAC (primera parte). *Ciencia e Industria Farmacéutica* 1989; 8: 249-254.
- 51** Garcés J, Mariné J, Codony R. Evaluación y control de calidad de los métodos de análisis químico. VIII Control de calidad interlaboratorios: Estudios de colaboración según la AOAC. Consideraciones finales sobre los estudios en colaboración. Parte A: Estudios en colaboración según la AOAC (segunda parte). *Ciencia e Industria Farmacéutica* 1989; 8: 255-260.
- 52** Paul LW. USP Perspectives on analytical methods validations. *Pharmaceutical Technology*; 1991 march: 130-141.
- 53** Guidelines for collaborative study procedure. AOAC official methods of analysis. New York: AOAC ed. 1990: 673-684.
- 54** Brittain H. Validation of Analytical Methodology. *Journal of Validation Technology*; 1996 :275-280.
- 55** Horwitz W. Evaluation of analytical methods used for regulations of foods and drugs. *Anal. Chem.* 1982; 54 (1): 67 A-76 A.
- 56** Horwitz W. Evaluation of analytical methods used for regulations. *Assoc. Off. Chem.* 1982; 65 (3): 525-530.
- 57** Real Farmacopea Española. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 1997. p.29-30.