

División de Ciencias biológicas y de la Salud  
Departamento de Sistemas Biológicos  
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

**Informe final de actividades del servicio social**

Desarrollo de métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de mezclas de cafeína y AINEs (paracetamol) en tabletas.

Alumno: Esteban Rodriguez Gallegos

Matricula: 2153062207

Asesores:

M. en C. José Raúl Medina López

M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña

Lugar de realización:

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos, Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicios (UIDIS), Laboratorio de Farmacocinética y Farmacodinamia.

Fecha de inicio: 30 de Mayo 2019

Fecha de término: 30 de Noviembre 2019

MAYO 2020

# INDICE

INTRODUCCIÓN .....	3
MARCO TEÓRICO.....	4
AINES:.....	4
PARACETAMOL:.....	4
CAFEINA:.....	5
CROMATOGRAFIA:.....	6
HPLC:.....	7
TIPOS DE HPLC:.....	7
PROCESO CROMATOGRÁFICO:.....	9
OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
General:.....	10
Específicos:.....	10
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	11
PRODUCTOS:.....	11
MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS:.....	11
MÉTODOS:.....	12
Condiciones:.....	12
Desarrollo del método cromatográfico:.....	12
Curva de calibración:.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Método de tratamiento de tabletas de Saridon® (stock): ..	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Validación del método cromatográfico:.....	13
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	14
Desarrollo del método cromatográfico:.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Curva de calibración:.....	16
Validación del método cromatográfico:.....	18
OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS:.....	27
CONCLUSIONES:.....	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

## INTRODUCCIÓN

El paracetamol es un medicamento con actividad analgésica y antipirética. A diferencia del grupo de los derivados del ácido arilpropionico el paracetamol no tiene ningún efecto antiinflamatorio (Diariofarma, 2017). La cafeína es una sustancia amarga que se encuentra naturalmente en más de 60 plantas. También existe la cafeína sintética que se añade a algunos medicamentos, alimentos y bebidas. Se utiliza frecuentemente en combinación con algunos analgésicos, y en medicamentos de venta libre (MedlinePlus, 2019).

El paracetamol solo no es una terapia efectiva para la migraña aguda; sin embargo, la combinación de éste con cafeína y/o aspirina, constituye la primera línea de tratamiento siendo muy efectiva. En trabajos como el de (Núñez Guzmán, 2017) se han evaluado formulaciones que contienen paracetamol solo y paracetamol en combinación con cafeína para determinar su bioequivalencia, y se observa que la formulación combinada tiene una absorción más rápida que el paracetamol solo, lo que deriva en un efecto analgésico en un periodo de tiempo más corto, lo que representa una ventaja en el manejo del dolor agudo.

El desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos en los medicamentos es fundamental para la industria farmacéutica puesto que esto permite conocer y estar al tanto de los posibles errores de producción evaluar la calidad de materia prima para la fabricación de medicamentos, vigilar el diseño y producción del medicamento y por lo tanto su calidad antes de su venta y disposición al público una vez que el medicamento está disponible para el público en general, mantenerla dentro del espacio de calidad establecido.

Una de las líneas de investigación del laboratorio N-102 de Farmacocinética y Farmacodinamia del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco, comprende el desarrollo de métodos que permitan dar un seguimiento a la calidad biofarmacéutica de medicamentos en venta en el mercado nacional. En este trabajo se desarrolló y validó un método cromatográfico para la cuantificación de AINEs en combinación (paracetamol y cafeína R.A.). Se aplicó al producto referencia de la combinación tabletas de venta libre : Saridon® de la marca Bayer.

## MARCO TEÓRICO

### AINES:

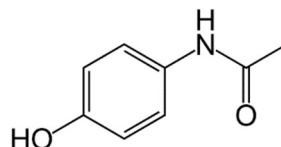
Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son un grupo de fármacos, que reducen los síntomas de inflamación, dolor y fiebre. Los antiinflamatorios naturales segregados en el organismo son derivados de los corticoides que tienen un origen esteroideo de potente acción antiinflamatoria. En oposición a los corticoides, el termino no esteroideo es aplicable para los AINEs por considerar su estructura química no esteroidea lo que disminuye la cantidad de efectos secundarios (Buer, 2014).

Estos medicamentos, por su mecanismo de acción, pueden producir efectos no deseables en el organismo. Uno de los órganos diana donde pueden asentar estos efectos adversos es en el aparato digestivo, éstos se relacionan con la irritación directa o indirecta del tracto gastrointestinal. La mayoría de las veces es leve y no da síntomas, pero pueden ser muy graves. Su incidencia se estima en hasta el 10 % de los usuarios, cifra que asciende aún más en los ancianos. Este efecto adverso depende de la inhibición de las prostaglandinas, unas moléculas que juegan un papel importante en la protección de la mucosa gástrica, pues limitan la secreción ácida gástrica y estimulan la formación de mucus. Los AINE además de producir lesión local, reducen el flujo sanguíneo y dificultan el funcionamiento de las defensas en la mucosa del tubo digestivo. Los efectos secundarios gastrointestinales más frecuentes son: esofagitis, úlceras, gastroduodenitis, lesiones tóxicas y diarreas ( Pérez Aisa, 2012).

### Paracetamol:

Fórmula molecular:  $C_8H_9NO_2$ .

Peso molecular: 151.165 g/mol.



*Figura 1. Estructura química del paracetamol (Moronta, 2020).*

También conocido como acetaminofén, el paracetamol es un fármaco con propiedades analgésicas y antipiréticas utilizado principalmente para tratar la fiebre y el dolor leve y moderado (Drugs.com, 2019).

Es un fármaco analgésico y antipirético, que, aunque pertenece al grupo de los AINE no presenta actividad antiinflamatoria ya que no inhibe a la ciclooxigenasa (COX) en lugares con altas concentraciones de peróxido (los sitios de inflamación). Si bien sus efectos analgésicos se deben en parte al bloqueo de las enzimas COX, principalmente a nivel central, presenta otras acciones a nivel del sistema nervioso central que no están totalmente caracterizadas, sin embargo, estas serían independientes de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. El

efecto analgésico vinculado al bloqueo de la COX se produce por un bloqueo a la isoforma COX3, que aumentaría el umbral del dolor. Al mismo tiempo, estimula la actividad de las vías serotoninérgicas descendentes que bloquean la transmisión de las señales nociceptivas a la medula espinal procedentes de tejidos periféricos. Su acción antitérmica está relacionada con la inhibición de la síntesis de PGE1 en el hipotálamo (Amigo, Dominguez , & López , 2015).

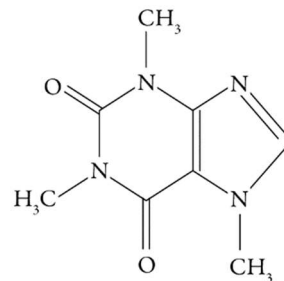
A menudo se comercializa en medicamentos en los cuales es combinado con otros principios activos como en los antitusígenos o en medicamentos para el alivio del dolor con opiáceos donde el paracetamol se utiliza para el alivio del dolor muy grave como el dolor oncológico o tras una operación (Davies, Maher, & Hancock, 2008).

Es normalmente seguro siempre que se respeten las dosis recomendadas, además puede continuar utilizándose en aquellos pacientes con enfermedades hepáticas en dosis bajas y es seguro durante el embarazo y la lactancia materna. Sin embargo, puede producir reacciones cutáneas graves o shock anafiláctico y a dosis elevadas puede provocar insuficiencia hepática, además, una sobredosis del medicamento puede llegar a acabar con la vida del paciente (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), 2017).

### **Cafeína:**

Fórmula molecular:  $C_8H_{10}N_4O_2$ .

Peso molecular: 194.194 g/mol.



*Figura 2. Estructura química de la cafeína (Sanabria, Martínez, & Baena, 2017).*

La cafeína es un alcaloide del grupo de las metilxantinas cuyos metabolitos incluyen los compuestos teofilina y teobromina, sólido cristalino, blanco y de sabor amargo que actúa como una droga psicoactiva, estimulante del sistema nervioso central, por su acción antagonista no selectiva de los receptores de adenosina (Fisone, Bogkvist, & Usiello, 2004). Es un estimulante del sistema nervioso central que produce un efecto temporal de restauración del nivel de alerta y eliminación de la somnolencia (Fisone, Bogkvist, & Usiello, 2004).

Bloquea los receptores de adenosina, incrementando a su vez la actividad de los neurotransmisores como acetilcolina, adrenalina, noradrenalina, dopamina y glutamato. La absorción de la cafeína administrada por vía oral es rápida y

completa, requiere de aproximadamente una hora para alcanzar la concentración máxima en plasma (DrugBank, 2020).

Es también un efectivo coadyuvante analgésico, potencializa el efecto analgésico del paracetamol que, administrado solo, requiere una dosis 40 % mayor para alcanzar el efecto analgésico, comparado con la dosis requerida si se administra con cafeína. Ésta actúa como un psicoestimulante leve, reestableciendo el estado de alerta y el rendimiento de los pacientes que sufren fatiga (Syed, Kamimori, Kelly, & Eddington, 2005).

La cafeína también puede aumentar la absorción de paracetamol, ácido acetilsalicílico y ergotamina aumentando de este modo su biodisponibilidad. Por otro lado, la cafeína puede aumentar las concentraciones de teofilina y clozapina por interaccionar en su proceso de eliminación.

### **CROMATOGRAFIA:**

La cromatografía es un método físico de separación de mezclas complejas, que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva. La cromatografía puede cumplir dos funciones básicas que no se excluyen mutuamente:

1. Separar los componentes de la mezcla, para obtenerlos más puros y que puedan ser usados posteriormente.
2. Medir la proporción de los componentes de una mezcla con finalidad analítica. Las cantidades de material empleado suelen ser pequeñas (Sharapin, 2000).

Las técnicas cromatográficas se pueden dividir según como esté dispuesta la fase estacionaria:

1. Cromatografía plana: donde la fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son:
  - 1.1. Cromatografía en papel.
  - 1.2. Cromatografía en capa fina.
2. Cromatografía en columna: donde la fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el fluido empleado como fase móvil se divide:
  - 2.1. Cromatografía de líquidos.
  - 2.2. Cromatografía de gases.
  - 2.3. Cromatografía de fluidos supercríticos (Rodríguez Miranda, 1991).

Dentro de la cromatografía líquida, destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés, *High Performance Liquid Chromatography*), que es la técnica cromatográfica más empleada en la actualidad, generalmente en su modalidad de "fase reversa", en donde la fase estacionaria tiene carácter no polar y la fase móvil es de carácter polar (como

agua o mezclas con elevada proporción de la misma o de otros disolventes polares como el metanol).

### **HPLC:**

En la HPLC (o CLAR) el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones físicas con la fase estacionaria a medida que avanzan por la columna. El nivel de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. A su vez, el tiempo que tarda un compuesto en ser eluído de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. El uso de presión en este tipo de cromatografía incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión mejorando la resolución de la cromatografía.

### **TIPOS DE HPLC:**

#### **Cromatografía de fase normal:**

Fue el primer tipo de sistema HPLC utilizado en el campo de la química, se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es de polaridad alta. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto, la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar aumenta el tiempo de retención ( Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

#### **Cromatografía de fase reversa:**

La HPLC de fase inversa consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes en este tipo de cromatografía es la sílica tratada con  $RMe_2SiCl$ , donde la R es una cadena alquil tal como  $C_{18}H_{37}$  o  $C_8H_{17}$ . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos ( Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

#### **Cromatografía de exclusión molecular:**

También conocida como cromatografía por filtración en gel, la cromatografía de exclusión molecular separa las partículas de la muestra en función de su tamaño.

Se trata de una cromatografía de baja resolución de forma que se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación. También es útil para la determinación de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas purificadas. Es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso molecular, o más precisamente según su radio de Stokes. En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. Las columnas se empaquetan con pequeñas partículas esféricas formadas por esos polímeros entrecruzados, en consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas no podrán ingresar a los mismos, mientras que otras pasan libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo que determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta ( Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

### **Cromatografía de intercambio iónico:**

En este tipo de cromatografía la retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria. Los iones de la misma carga son excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna. Algunos tipos de intercambiadores iónicos son: resinas de poliestireno, intercambiadores iónicos de celulosa y dextranos, silica porosa o vidrio de tamaño de poro controlado. En general los intercambiadores iónicos favorecen la unión de iones de elevada carga y radio pequeño. Un incremento en la concentración del contraión reduce el tiempo de retención, mientras que un incremento en el pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio catiónico, al mismo tiempo una disminución del pH reduce el tiempo de retención en las cromatografías de intercambio aniónico (Weiss, 2004).

### **Cromatografía de bioafinidad:**

Este tipo de cromatografía se basa en la capacidad de las sustancias biológicamente activas de formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de estos complejos involucra la participación de fuerzas moleculares como las interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrogeno entre las partículas de la muestra y la fase estacionaria ( Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

### **Cromatografía líquida de alta eficacia en condiciones desnaturizantes (DHPLC):**

Es un método que se emplea para el rastreo de mutaciones que permite detectar la presencia de variaciones en el ADN, aunque no se determinan específicamente cuales. En este caso, se utiliza la técnica cromatográfica para la detección de heterodúplex de ADN, en lugar de utilizar un gel para correr las moléculas de ácidos nucleicos.



El procedimiento consiste en desnaturalizar una muestra que contenga tanto el ADN problema como un ADN control, que no es más que el mismo ADN problema, pero en su versión silvestre o normal. Luego se renaturaliza de manera que las cadenas de ADN que vuelvan a unirse con sus respectivas complementarias no presentaran diferencia con el estado original (Castro, Martins, & et all, 2004).

### **PROCESO CROMATOGRÁFICO:**

En función de la composición de la fase móvil a la columna, la elución de moléculas puede ser de dos tipos:

#### **Isocrático:**

Los compuestos eluyen usando una fase móvil de composición constante durante toda la cromatografía. Todos los compuestos acaban migrando a través de la columna hasta el final. Sin embargo, cada uno migra con una velocidad diferente resultando en una relación de elución más rápida o lenta. Este tipo de elución es bastante simple y barata, pero la resolución de algunos compuestos es cuestionable y el eluido puede no ser obtenido en un plazo de tiempo adecuado (Hernández Pérez, 2005).

#### **Gradiente:**

Los diferentes compuestos son eluidos modificando gradualmente la composición de la fase móvil durante el transcurso de la corrida cromatográfica aumentando gradualmente la fuerza de elución (aumentando la fuerza iónica, modificando la polaridad, etc.). El resultado de la elución es un acortamiento de los tiempos de retención, este factor disminuye conforme aumenta la variación de flujo del gradiente, por lo que el compuesto eluye. Este gradiente puede darse de forma lineal, escalonada o linealmente escalonada (Hernández Pérez, 2005).

Un gradiente en cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto, el gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. Por ejemplo: utilizando un gradiente agua/acetonitrilo, los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo ( Universidad Nacional Autónoma de México, 2007).

## **OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **General:**

Desarrollar los métodos analíticos cromatográficos para la determinación de cafeína en combinación con paracetamol.

### **Específicos:**

- Realizar pruebas para la selección de las fases necesarias para la adecuada separación de la combinación farmacéutica.
- Validar los sistemas cromatográficos en cuanto a linealidad y precisión.
- Establecer los tratamientos de muestra adecuados para la recuperación de los analitos desde la forma farmacéutica.
- Validar los métodos analíticos propuestos en cuanto a: linealidad, exactitud y precisión, de acuerdo con parámetros aceptables para análisis farmacéutico.

## **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **PRODUCTOS:**

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el medicamento de referencia de la combinación Saridon® (500/50 mg). Este medicamento de libre venta y de alto consumo.

Desde el punto de vista analítico, se toma en cuenta la diferencia en las concentraciones de los principios activos 10:1 paracetamol:cafeína ya que representan un primer problema en su cuantificación.

### **MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS:**

- Matraces volumétricos de 5, 10, 25, 100 y 500 mL.
- Micropipetas Eppendorf de 20-200  $\mu$ L y 100-1000  $\mu$ L.
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL.
- Viales para inyección de 50  $\mu$ L
- Embudos de plástico.
- Espátulas de acero inoxidable.
- Metanol R.A.
- Metanol HPLC.
- Acetonitrilo HPLC.
- Agua destilada.
- Agua HPLC.
- Std. Paracetamol Sigma Aldrich.
- Std Cafeína Sigma Aldrich.
- Balanza analítica.
- Membranas de nitrocelulosa Milipore® de 0.45 y 0.20  $\mu$ m.
- Papel filtro.
- Cromatógrafo Varian ProStar.
- Columna Allsphere 50x4.6 mm de 5  $\mu$ m.

## **MÉTODOS:**

### **Condiciones cromatográficas:**

- a. Se prepararon soluciones estándar con diferentes disolventes, con la finalidad de establecer cuál era el adecuado para la correcta disolución de los fármacos.
- b. Una vez determinado el disolvente adecuado, se estableció la fase estacionaria y se identificaron los tiempos de retención de cada uno de los fármacos.
- c. Como último paso se desarrolló el gradiente en la corrida cromatográfica.

Para el desarrollo del método analítico cromatográfico se utilizaron dos cromatógrafos Varían ProStar; uno equipado con una bomba ternaria modelo 230, un detector de arreglo de diodos a 270 nm modelo 330 y un inyector manual Rheodyne 7725 (para la identificación de los tiempos de retención de los fármacos y el desarrollo de la corrida y gradiente); y otro equipado con una bomba ternaria modelo 240, un detector de UV de longitud de onda variable a 270 nm modelo 325 y un autosampler modelo 410 (para la validación del método analítico).

Se utilizaron diferentes columnas con distintas longitudes, pero mismo tamaño de partícula, 5 micrómetros. Al mismo tiempo se utilizaron tres diferentes disolventes: Agua, Metanol (MeOH) y Acetonitrilo (ACN), las concentraciones en las que fueron utilizados fueron ajustadas hasta obtener la fase móvil y el gradiente adecuado para la correcta separación, tiempo de retención y simetría de picos.

La velocidad de flujo y volumen de inyección fueron constantes: 1 mL/min de velocidad de flujo y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L.

- d. Se establecieron las condiciones para el tratamiento de las tabletas Saridon®.

### **Desarrollo y Validación del sistema cromatográfico:**

Se prepararon soluciones estándar de la combinación farmacéutica: cafeína-paracetamol, tomando en cuenta la diferencia en las concentraciones de los principios activos 10:1 paracetamol:cafeína que está presente en las tabletas a utilizar.

Con las soluciones estándar se realizaron curvas de calibración por triplicado para los dos analitos, evaluando los parámetros de linealidad, precisión en cada nivel de concentración y la variabilidad para el factor respuesta de cafeína y paracetamol.

Las pruebas para la determinación de linealidad y precisión (para validar el sistema) se realizaron mediante el análisis de 5 niveles de concentración por triplicado (curva de calibración). Se empleó la regresión simple para la obtención de los datos a analizar; R, R<sup>2</sup>, A, y B, para el 95% de confianza. Los criterios de aceptación son los siguientes: R $\geq$ 0.99, R<sup>2</sup>  $\geq$ 0.98, la prueba de hipótesis nula de la

ordenada en el origen  $A=0$  y de la pendiente  $B \neq 0$  se determinó a partir del ANOVA de la regresión, tomando en cuenta la probabilidad asociada al valor de la ordenada y la pendiente:  $p < 0.05$ , el CV del factor respuesta debe ser  $\leq 3 \%$

Para la determinación de la precisión y la variabilidad del factor respuesta el criterio de aceptación es:  $CV \leq 3 \%$ .

#### **Desarrollo y Validación del método analítico:**

Estas pruebas se realizan con las tabletas de Saridon® siendo tratadas con el procedimiento establecido anteriormente una vez desarrollado el sistema cromatográfico.

**Linealidad:** se prepararon soluciones de muestra a cinco niveles de concentración (intervalo de 80 a 120 %) por triplicado para evaluar estadísticamente la regresión lineal del método. Con los datos obtenidos se graficaron: la respuesta de la medición contra la concentración del analito, se realizó un análisis de varianza a la regresión lineal, se calculó el coeficiente de regresión con todos los datos (de las tres curvas independientes). Criterios de aceptación: la varianza debe ser constante para todas las concentraciones, el ANOVA de la regresión lineal debe demostrar el paso del intercepto por cero por el análisis de t y que la desviación no es significativa con respecto a la regresión ( $p$ ). El coeficiente de correlación ( $R$ ) debe encontrarse entre 0.98 y 1.00. El coeficiente de correlación cuadrado ( $R^2$ ) debe ser mayor de 0.995.

**Exactitud:** se analizaron las tabletas a tres concentraciones específicas (90, 100 y 110%) por el método a validar y se comparó el resultado obtenido con el valor verdadero declarado (obtenido de una curva de calibración de estándares). El criterio de aceptación es: 98-102 % de recuperación, un  $CV \leq 2 \%$  y analizando su intervalo de confianza (IC).

**Precisión (repetibilidad):** se analizaron 6 muestras independientes a la concentración declarada como 100% analizando su factor respuesta. El criterio de aceptación es de  $CV \leq 2\%$ .

## RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### Condiciones cromatográficas:

- a. Se prepararon disoluciones de cafeína y paracetamol para verificar la correcta disolución de ambos analitos para su estudio cromatográfico. Las disoluciones se encuentran detalladas en la Tabla 1.

Este procedimiento se realizó en el cromatógrafo Varían ProStar de inyección manual.

Tabla 1. Preparación de muestras para verificar solubilidad de fármacos.

Disolución	Cant. De fármaco (mg)	Disolvente	Vol. disolvente (mL)	Tiempo de sonicación (Min.)
1	10	Agua	10	0
2	10	MeOH	10	0
3	10	Agua	10	10
4	10	MeOH	10	10
5	10	Agua	10	15
6	10	MeOH	10	15

**Nota:** estas disoluciones se hicieron para cafeína y paracetamol de manera simultánea.

Después de realizar todas las disoluciones, se concluyó que el MeOH es el mejor disolvente para ambos fármacos, y el mejor tiempo de sonicación es de 15 minutos. Estas condiciones permiten la completa disolución de ambos fármacos, lo que mejora por ende la resolución de estos.

De esta forma la preparación de soluciones stock quedo de la siguiente manera:

Se disuelven 10 mg del fármaco en 10 mL de MeOH, y se sonifican por 15 min.

- b. Fase estacionaria y tiempos de retención.

Este procedimiento se realizó en el cromatógrafo Varían ProStar de inyección manual.

Esto se realizó tomando en cuenta el desarrollo de las disoluciones del paso anterior como un stock, es decir, realizando disoluciones de paracetamol y cafeína (por separado) con una concentración de 1mg/mL (1000µg/mL), y realizando una dilución para obtener una concentración de 100 µg/mL para el paracetamol y 10 µg/mL para la cafeína, (tomando en cuenta la diferencia en las concentraciones de los principios activos presente en las tabletas a utilizar).

Una vez establecidas las concentraciones de las muestras a analizar se estableció que la fase estacionaria seria; Agua:MeOH 80:20. Esta fase fue utilizada para diluir todas las muestras que fueron analizadas.

Utilizando las muestras individuales tanto de cafeína como de paracetamol se desarrolló la corrida cromatográfica descrita en la Tabla 2. para identificar los

tiempos de retención de cada fármaco. A una velocidad de flujo de 1 mL/min. y 20  $\mu$ L de inyección.

Tabla 2. Concentraciones de fases móviles de los fármacos y tiempos de retención.

<b>Fármaco</b>	<b>Cafeína</b>			<b>Paracetamol</b>		
<b>Disolvente</b>	Agua	MeOH	ACN	Agua	MeOH	ACN
<b>% utilizado</b>	80	20	0	80	20	0
<b>T. de retención</b>	5.45			2.31		

c. Desarrollo de la corrida cromatográfica con gradiente.

Esto se realizó en el cromatógrafo Varían ProStar con Autosampler.

Primero se prepararon soluciones stock de los fármacos, posteriormente se realizó una curva de calibración para determinar las mejores condiciones de la corrida cromatográfica tomando en cuenta las resoluciones de los picos de las muestras de forma continua, también para tomar en cuenta el tiempo de estabilización de la fase móvil para que no hubiese interferencia entre las mismas muestras.

Se utilizaron diferentes columnas cromatográficas, con la que se obtuvieron mejores resultados y se trabajó de forma definida fue una columna Allsphere ods-2 de 50x5.6 mm y tamaño de partícula de 5 micras.

La preparación de las muestras para la curva de calibración se realizó como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación de las muestras para la curva de calibración.

<b>mL stock Parac.</b>	<b>mL stock Caf.</b>	<b>Aforar con cf MeOH:agua (20:80) mL</b>	<b>Conc. Parac. <math>\mu</math>g/mL</b>	<b>Conc. Caf. <math>\mu</math>g/mL</b>
0.5	0.05	5	100	10
0.625	0.0625	5	125	12.5
0.75	0.075	5	150	15
0.875	0.0875	5	175	17.5
1	0.1	5	200	20

Dadas las propiedades fisicoquímicas de los analitos, el proceso cromatográfico desarrollado que logró las características adecuadas para ambos compuestos en cuanto a retención y simetría de pico fue un sistema de gradiente.

Éste inicia con una fase móvil MeOH:agua (20:80), que se mantiene durante 3 minutos, se incrementa gradualmente el acetonitrilo, al minuto 4, ACN:MeOH:agua (20:15:65), al minuto 5 ACN:MeOH:agua (40:10:50), al minuto 6 ACN:MeOH:agua (60:5:35) donde permanece 3 minutos y regresa gradualmente a la fase original dando tiempo a su estabilización, para la siguiente corrida analítica. En el Gráfico

1 se presenta con detalle el proceso de gradiente desarrollado, en la Figura 3 el cromatograma típico obtenido para los dos analitos en estas condiciones cromatográficas.

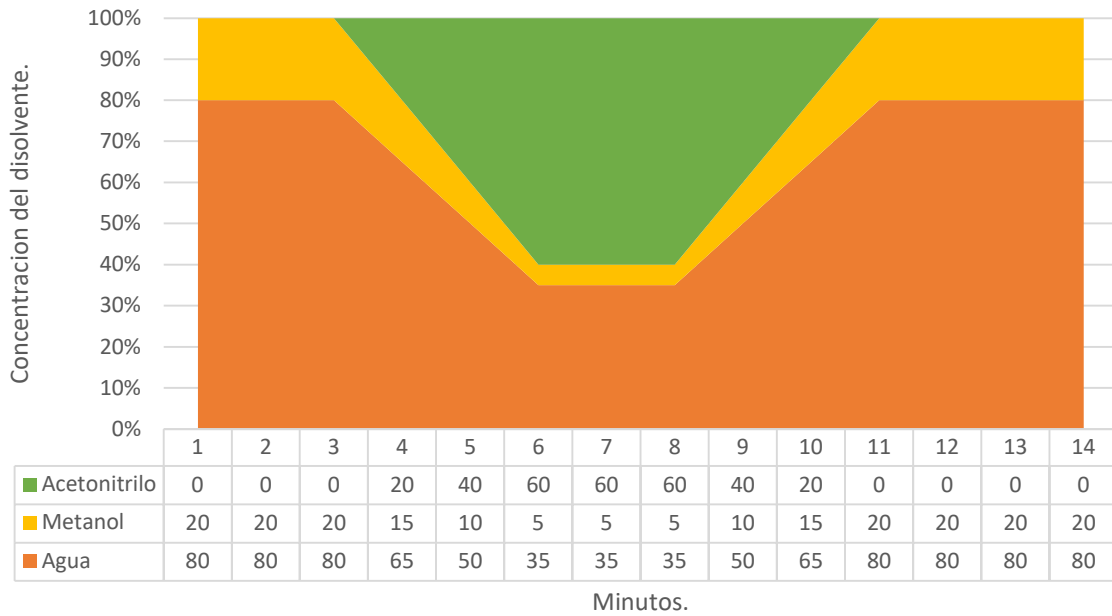


Gráfico 1. Gradiente desarrollado

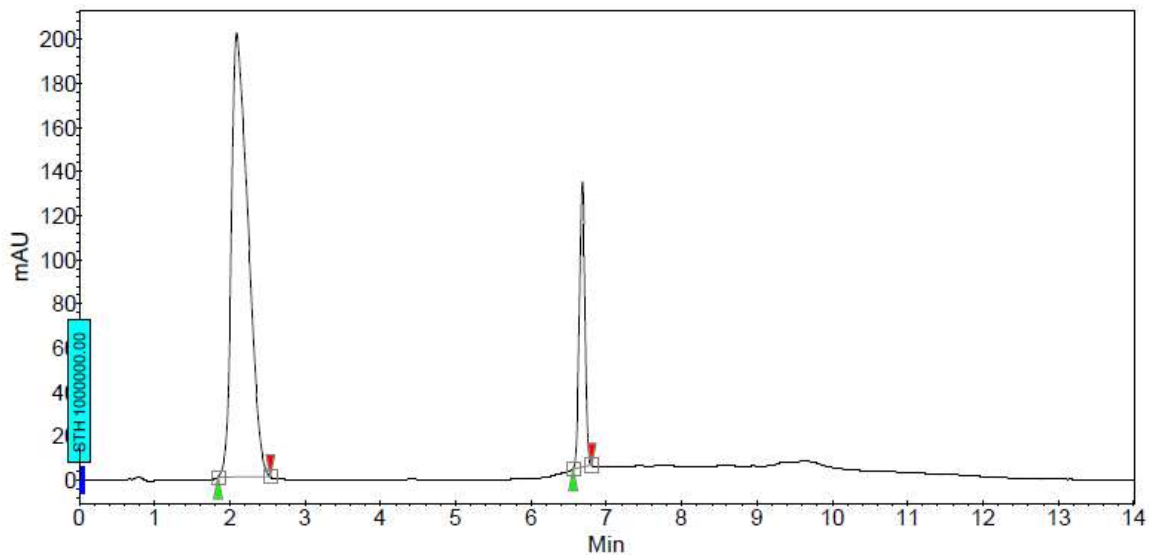


Figura 3. Cromatograma típico obtenido. De izquierda a derecha; 1er pico: Paracetamol, 2.32 min, Área (mAU.Sec): 2639.9. 2do pico: Cafeína, 6.76 min, Área (mAU.Sec): 406.7.



En la Tabla 4 Se muestran los resultados obtenidos de la primera curva de calibración realizada; las concentraciones teóricas y las experimentales, el área bajo la curva (ABC), pendiente (A), intercepto (B), R y R<sup>2</sup> (tanto de paracetamol como de cafeína). En la Figura 3 se muestra un cromatograma típico obtenido de uno de los puntos de la curva de calibración (en este caso de la concentración numero 3).

Tabla 4. Datos de la primera curva de calibración.

Conc. teórica parac. (µg/mL)	Conc. teórica caf. (µg/mL)	Conc. exper. parac. (µg/mL)	Conc. exper. caf. (µg/mL)	ABC parac. (mAU.Sec)	ABC caf. (mAU.Sec)
100	10	97	10.5	1124	388.5
125	12.5	121.25	13.13	1402.1	517.8
150	15	145.5	15.75	1861.1	677.6
175	17.5	169.75	18.38	2433.1	773.8
200	20	194	21	2838.2	995.6
			A	-743.94	-211.51
			B	18.38	56
			R	0.994	0.992
			R <sup>2</sup>	0.985	0.980

En los Gráficos 2 y 3 se muestran las representaciones gráficas (de paracetamol y cafeína respectivamente) de la regresión lineal de la curva de calibración junto con su R<sup>2</sup> y la ecuación de la recta que rige dicha regresión.

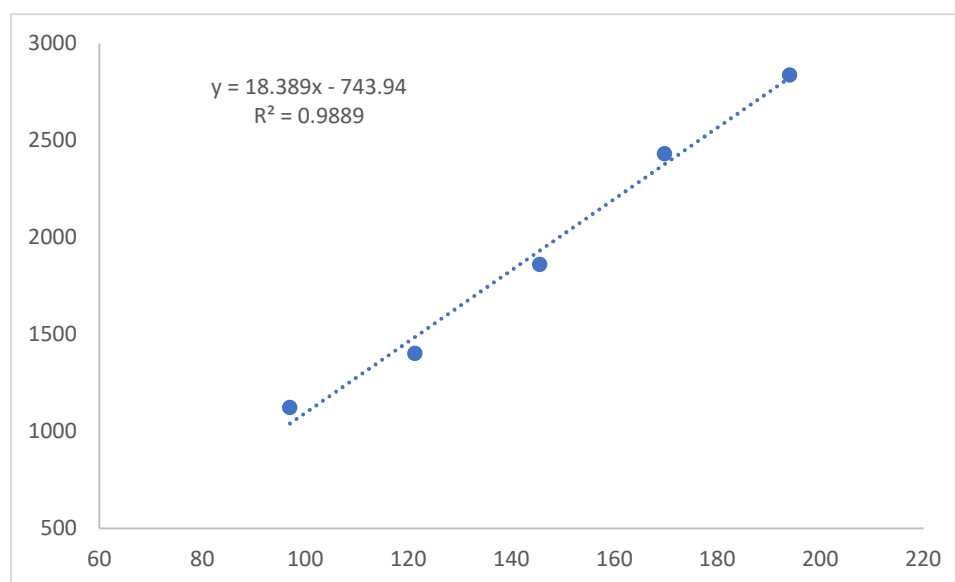


Gráfico 2. Representación gráfica de la regresión lineal de la curva de calibración de paracetamol.

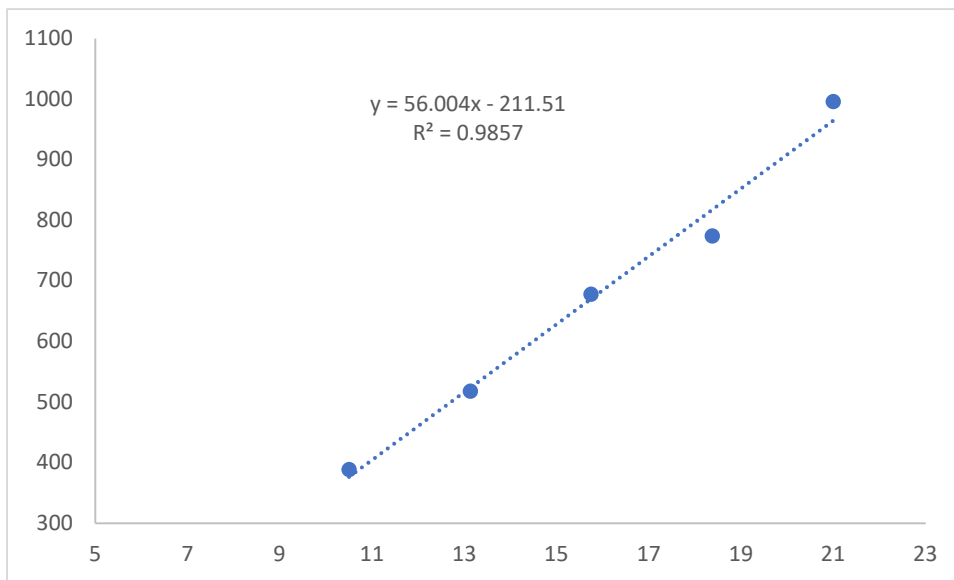


Gráfico 3. Representación gráfica de la regresión lineal de la curva de calibración de cafeína.

#### d. Tratamiento de tabletas:

Para los procedimientos en los que se utilizaban tabletas comerciales se estableció un método general para obtener muestras de la combinación farmacéutica de las mismas; pesar 10 tabletas de un mismo lote, calcular el peso promedio, pulverizarlas y tomar el polvo equivalente al peso promedio de una tableta.

Una vez pesado el polvo este se depositó en un matraz volumétrico de 100 mL y se le agregó la cantidad suficiente de MeOH para llegar a  $\frac{3}{4}$  de la capacidad total del volumen, se agitó y se sonicó durante 15 minutos, una vez sonicado se afora el matraz con mas MeOH y se vuelve a agitar hasta homogeneizar la disolución, una vez homogeneizada ésta se filtra por gravedad con papel filtro y un embudo de vidrio para así eliminar los excipientes de las tabletas que no se pudieron disolver. El procedimiento se detalla en la Tabla 5. La disolución final obtenida tuvo una concentración de 5mg/mL de paracetamol y 0.5 mg/mL de cafeína.

Tabla 5. Tratamiento general para muestras de tabletas comerciales.

Polvo mg.	MeOH mL	Sonicación min.	Vol. final mL
Equivalente a una tableta.	$\frac{3}{4}$ del volumen total del matraz.	15	Cantidad suficiente para 100 mL

Todas las muestras para analizar deben pasar por este tratamiento independientemente de la dilución que se le haga al final para obtener alguna concentración en específico.

## Desarrollo y Validación del sistema cromatográfico:

Una vez conocidos los tiempos de retención, el gradiente de concentración a utilizar y la forma adecuada de preparar las disoluciones de los analitos a utilizar se preparan las soluciones estándar de la combinación farmacéutica.

Ya que fue establecida la curva de calibración, esta se analizó por triplicado para poder verificar su linealidad y precisión. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

Los datos mostrados en la Tabla 6. muestran los resultados obtenidos después de realizar por triplicado la curva de calibración del Std Cafeína Sigma Aldrich. En la Tabla 7. Se observan los datos reales utilizados para la representación gráfica de la linealidad del sistema de cafeína.

Tomando en cuenta los criterios de aceptación; la R obtenida es de: 0.993,  $R^2$ : 0.9875, A: -296.06, B: 64.51, CV de factor respuesta: 6.8%. lo cual nos indica que nuestro sistema es lineal pero no preciso.

Tabla 6. Triplicado de curvas para determinación de linealidad y precisión del sistema, Cafeína.

Conc. µg/mL	1	2	3	prom	Sd	%CV
12	497.4	429.2	463.4	463.333	34.100	7.360
13.5	585.6	574.2	552.3	570.700	16.924	2.965
15	677.6	678.8	653.8	670.067	14.100	2.104
16.5	780.5	786.4	731.6	766.167	30.081	3.926
18	845.5	898.8	868.2	870.833	26.747	3.071
A	58.24	75.25	55.01			
B	213.78	477.92	202.56			
R	0.998	0.998	0.9964			
$R^2$	0.9961	0.9962	0.9928			
p	0.007	0.0014	0.0166			
F crítica	0.000102	9.94E-05	0.00025			
F calc.	772.06	786.97	415.58			

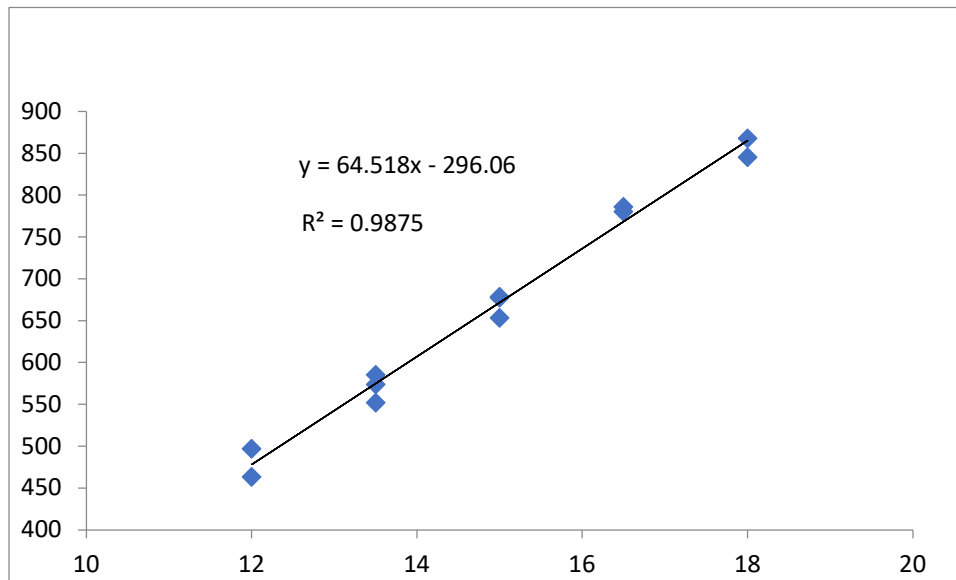


Gráfico 5. Representación gráfica de la regresión lineal del sistema para cafeína.

Tabla 7. Datos reales utilizados para la regresión lineal de la linealidad del sistema de cafeína.

Conc	ABC	FR
12	497.4	41.45
12	463.4	38.6166667
13.5	585.6	43.3777778
13.5	574.2	42.5333333
13.5	552.3	40.9111111
15	677.6	45.1733333
15	678.8	45.2533333
15	653.8	43.5866667
16.5	780.5	47.3030303
16.5	786.4	47.6606061
18	845.5	46.9722222
18	868.2	48.2333333
<b>Factor respuesta</b>	Prom=	44.2559512
	DE=	3.02954863
	%CV=	6.84551693

Por otro lado, como se observa en las Tablas 8 y 9, paracetamol tiene un comportamiento mas estable con respecto a la cafeína ya que para este analito se pudieron utilizar todos los datos obtenidos de la fase experimental puesto que ninguno interfería con la linealidad del sistema.

Tomando en cuenta los criterios de aceptación; la R obtenida es de: 0.991, R<sup>2</sup>: 0.9823, A: 275.77, B: 18.47, CV de factor respuesta: 2.3 %. lo cual nos indica que nuestro sistema es lineal y preciso en el caso del paracetamol.

Tabla 8. Triplicado de curvas para determinación de linealidad y precisión del sistema, Paracetamol.

Conc. µg/mL	1	2	3	prom	Sd	%CV
120	2493.1	2577.2	2488.1	2519.467	50.061	1.987
135	2859.1	2718.9	2727.5	2768.500	78.580	2.838
150	3088.3	3056.7	2996.1	3047.033	46.854	1.538
165	3376.4	3303.8	3285.6	3321.933	48.039	1.446
180	3719	3587.3	3578.9	3628.400	78.574	2.166
<b>A</b>	19.4	17.02	11.64			
<b>B</b>	138.08	443.68	1325.72			
<b>R</b>	0.9976	0.9944	0.9976			
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9952	0.9888	0.9952			
<b>p</b>	0.0333	0.007	0.0003			
<b>F crítica</b>	0.00014	0.000501	0.00014			
<b>F calc.</b>	623.44	265.94	623.44			

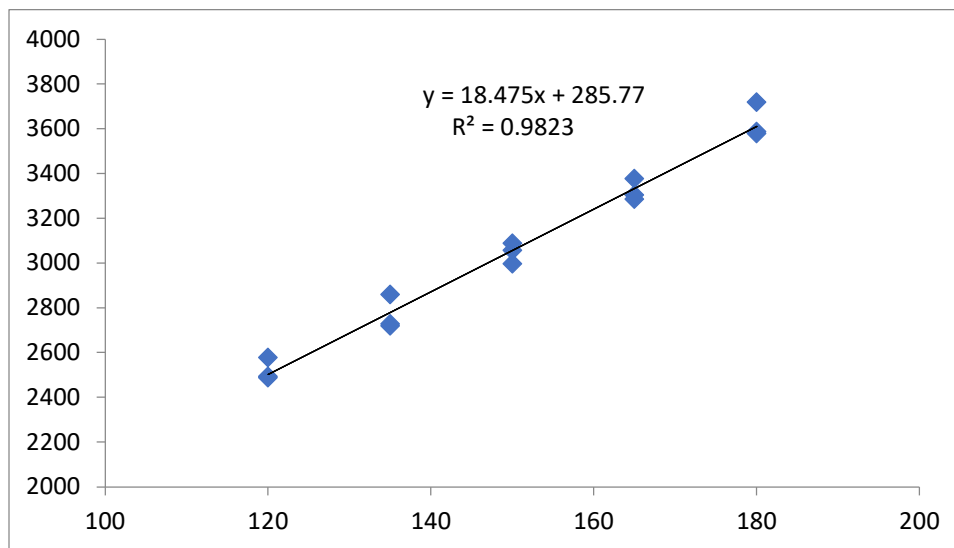


Gráfico 6. Representación gráfica de la regresión lineal del sistema para paracetamol.

Tabla 9. Datos reales utilizados para la regresión lineal de la linealidad del sistema de paracetamol.

<b>Conc</b>	<b>ABC</b>	<b>FR</b>
<b>120</b>	2493.1	20.7758333
<b>120</b>	2577.2	21.4766667
<b>120</b>	2488.1	20.7341667
<b>135</b>	2859.1	21.1785185
<b>135</b>	2718.9	20.14
<b>135</b>	2727.5	20.2037037
<b>150</b>	3088.3	20.5886667
<b>150</b>	3056.7	20.378
<b>150</b>	2996.1	19.974
<b>165</b>	3376.4	20.4630303
<b>165</b>	3303.8	20.0230303
<b>165</b>	3285.6	19.9127273
<b>180</b>	3719	20.6611111
<b>180</b>	3587.3	19.9294444
<b>180</b>	3578.9	19.8827778
<b>Factor respuesta</b>	Prom	20.4214451
	DE	0.48370913
	%CV	2.36863318

## Desarrollo y Validación del método analítico:

### Linealidad:

Tabla 10. Datos obtenidos de las muestras de saridon analizadas para calcular.

%	ABC caf.	ABC parac.	Conc. real Caf.	Conc. real parac.	Mg. Añadidos caf,	Mg. Añadidos parac.	Corr por cont. Caf.	Corr por cont. Parac.
<b>80</b>	540.7	2199.1	14.14	126.89	12.5	120	14.125	111.6
<b>80</b>	575.1	2202.1	14.62	127.02	12.5	120	14.125	111.6
<b>80</b>	561.1	2200.6	14.43	126.96	12.5	120	14.125	111.6
		CV	1.68	0.05				
<b>90</b>	672.6	2430.7	15.99	136.8	13.5	135	15.255	125.55
<b>90</b>	697.1	2402.1	16.34	135.6	13.5	135	15.255	125.55
<b>90</b>	681.7	2416	16.12	136.1	13.5	135	15.255	125.55
		CV	1.1	0.44				
<b>100</b>	724.1	2659.7	16.71	146.65	15	150	16.95	139.5
<b>100</b>	750.6	2714.9	17.09	149.02	15	150	16.95	139.5
<b>100</b>	736	2687.2	16.88	147.83	15	150	16.95	139.5
		CV	1.13	0.8				
<b>110</b>	784.7	2982.1	17.56	160.48	16.5	165	18.645	153.45
<b>110</b>	818.4	2965.7	18.04	159.77	16.5	165	18.645	153.45
<b>110</b>	804.8	2974.2	17.85	160.14	16.5	165	18.645	153.45
		CV	1.36	0.22				
<b>120</b>	857.5	3193.3	18.59	169.54	18	180	20.34	167.4
<b>120</b>	862.4	3270.1	18.65	172.83	18	180	20.34	167.4
<b>120</b>	854.2	3231.8	18.54	171.19	18	180	20.34	167.4
		CV	0.3	0.96				

En la Tabla 10. Se muestran los datos obtenidos al analizar las muestras de las tabletas de saridon, a partir de estos datos se realizaron los cálculos estadísticos necesarios para calcular la linealidad del método para el análisis de cafeína.

Como se observa en el gráfico 6. Y de acuerdo con los criterios de aceptación;  $R:0.977$ , y  $R^2:0.9558$ . Lo que demuestra que el método desarrollado no es lineal para cafeína.

Por otro lado, en el gráfico 7. Se observan los resultados del cálculo de linealidad del método para paracetamol;  $R: 0.997$ , y  $R^2:0.9954$ . Esto demuestra que el método desarrollado es lineal para el paracetamol.

Tabla 11. porcentaje de recuperación y diferencia absoluta calculados para cafeína.

Conc.	Mg recup	Mg añad	%exac	diferencia absoluta	% de diferencia abs
14.14	47.1332	45.2	104.277	1.9332	4.2771
14.62	48.7332	45.2	107.817	3.5332	7.8170
14.43	48.0999	45.2	106.415	2.8999	6.4158
15.99	53.2999	50.84	104.838	2.4599	4.8386
16.34	54.4666	50.84	107.133	3.6266	7.1333
16.12	53.7332	50.84	105.690	2.8932	5.6909
16.71	55.6999	56.5	98.5839	0.8000	1.4160
17.09	56.9666	56.5	100.825	0.4666	0.8258
16.88	56.2666	56.5	99.5869	0.2333	0.4130
17.56	58.5332	62.15	94.1806	3.6167	5.8193
18.04	60.1332	62.15	96.7550	2.0167	3.2449
17.85	59.4999	62.15	95.7360	2.6500	4.2639
18.59	61.8	67.8	91.15	6	8.8495
18.65	62.17	67.8	91.7	5.63	8.3038
18.54	61.8	67.8	91.15	6	8.8495
		prom	99.7227627		
		DE	6.0772559		
		%CV	6.09415117		

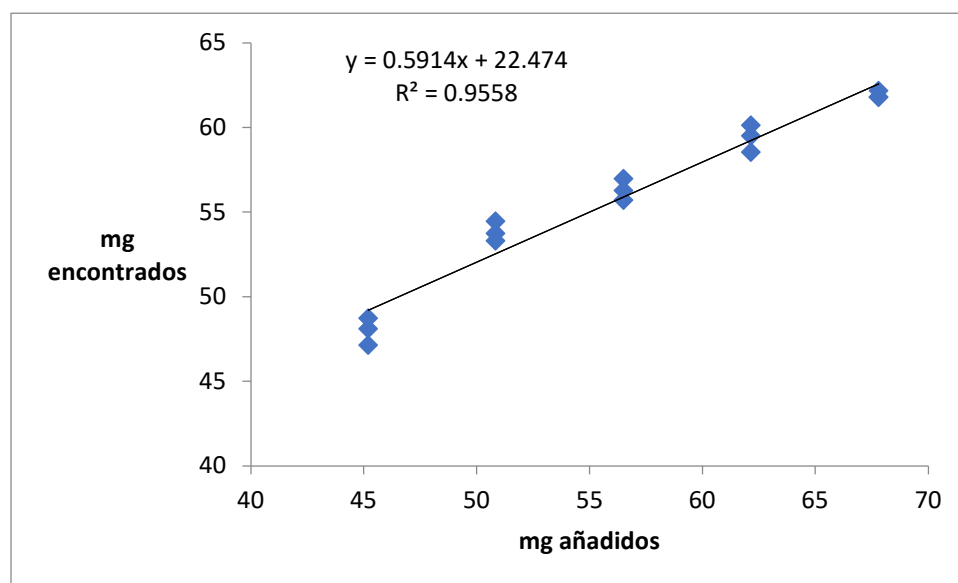


Gráfico 7. Linealidad del método cafeína.



Tabla 12. porcentaje de recuperación y diferencia absoluta calculados para paracetamol.

	mg recob.	mgañad	%exac corr	dif abs	% de diferencia
<b>126.89</b>	422.966	371.935	113.720	23.036	5.760
<b>127.02</b>	423.399	371.935	113.836	23.469	5.868
<b>126.96</b>	423.199	371.935	113.783	23.269	5.818
<b>136.8</b>	455.999	418.48	108.965	6.024	1.338
<b>135.6</b>	451.999	418.48	108.009	2.024	0.449
<b>136.1</b>	453.666	418.48	108.408	3.691	0.820
<b>146.65</b>	488.832	465	105.125	11.167	2.233
<b>149.02</b>	496.732	465	106.824	3.267	0.653
<b>147.83</b>	492.766	465	105.971	7.233	1.446
<b>160.48</b>	534.932	511.48	104.585	15.047	2.735
<b>159.77</b>	532.566	511.48	104.122	17.413	3.166
<b>160.14</b>	533.799	511.48	104.363	16.180	2.942
<b>169.54</b>	565.132	557.94	101.289	34.807	5.801
<b>172.83</b>	576.099	557.94	103.254	23.840	3.973
<b>171.19</b>	570.632	557.94	102.274	29.307	4.885
		Prom	106.9		
		DE	4.1		
		%CV	3.8		

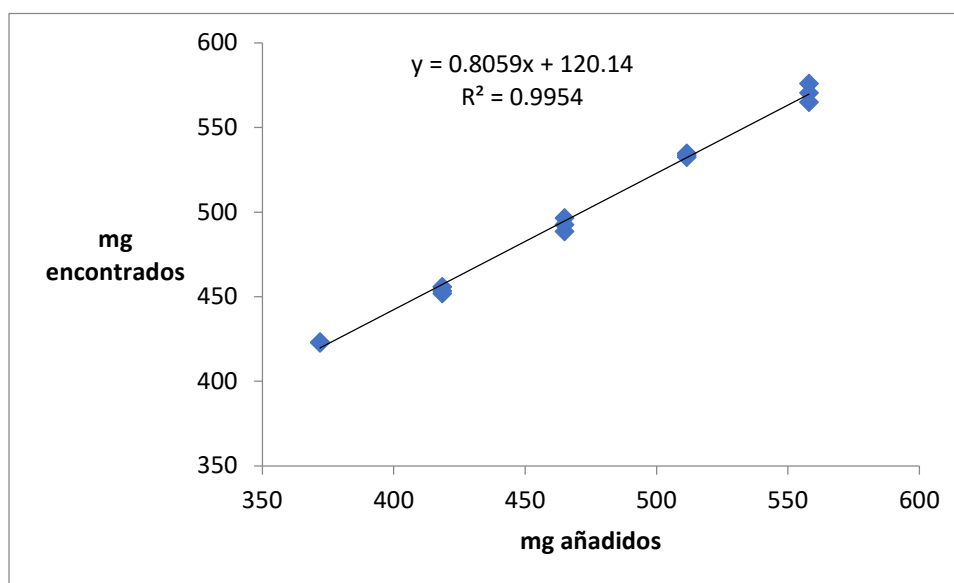


Gráfico 8. Linealidad del método paracetamol.

### Exactitud:

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 13. Y tomando en cuenta los criterios de aceptación se tiene; un porcentaje de recuperación del 95 al 101 %, CV: 3.8 %, y un intervalo de confianza (IC) de  $98.76 \pm 1.943$ .

Tabla 13. Resultados estadísticos calculados para la exactitud con cafeína.

Conc.	Conc. encontrada	Mg recuperados	Mg añadidos	%exactitud	diferencia absoluta	% de diferencia absoluta
15.255	16.12	53.733	50.84	105.6	2.8	5.6
16.95	16.71	55.699	56.5	98.5	0.8	1.4
16.95	17.09	56.966	56.5	100.8	0.4	0.8
16.95	16.88	56.266	56.5	99.5	0.2	0.4
18.645	17.56	58.533	62.15	94.1	3.6	5.8
18.645	18.04	60.133	62.15	96.7	2	3.2
18.645	17.85	59.499	62.15	95.7	2.6	4.2
			prom	98.7		3.1
			Desv. Est.	3.8		
			%CV	3.8		

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 14. Y tomando en cuenta los criterios de aceptación se tiene; un porcentaje de recuperación del 97.7 al 99.65 %, CV: 1.7 %, y un intervalo de confianza (IC) de  $98.82 \pm 1.14$ .

Tabla 14. Resultados estadísticos calculados para la exactitud con paracetamol.

Conc.	Conc. encontrada	Mg recuperados	Mg añadidos	%exactitud	diferencia absoluta	% de diferencia absoluta
152.55	136.8	456.000	449.975	101.339	6.025	1.339
152.55	135.6	452.000	449.975	100.450	2.025	0.450
152.55	136.1	453.666	449.975	100.820	3.691	0.820
169.5	146.65	488.833	500.000	97.767	11.167	2.233
169.5	149.02	496.733	500.000	99.347	3.267	0.653
169.5	147.83	492.766	500.000	98.553	7.234	1.447
186.45	160.48	534.933	549.980	97.264	15.047	2.736
186.45	159.77	532.566	549.980	96.834	17.414	3.166
18.6.45	160.14	533.799	549.980	97.058	16.181	2.942
			prom	98.8		
			Desv. Est.	1.7		
			%CV	1.7		

### **Repetibilidad:**

En la Tabla 15. se observan los resultados estadísticos del análisis de las muestras para la repetibilidad del método. Observando los resultados obtenidos y tomando en cuenta los criterios de aceptación, se tiene que al tener un CV de 1.9 % para cafeína; y 2.02 % para paracetamol, se concluye que el método es repetible para cafeína pero no para paracetamol.

*Tabla 15. Resultados estadísticos calculados para la repetibilidad del método para cafeína y paracetamol.*

<b>ABC caf.</b>	<b>ABC parac.</b>	<b>Conc. real caf.</b>	<b>Conc. real parac.</b>	<b>Recobro de mg. caf</b>	<b>Recobro de mg. parac.</b>
747	2835.6	16.53	139	55.1(110.2%)	463.35(92.7%)
793.9	2892.4	17.33	141.93	57.78(115.6%)	473.1(94.62%)
789.2	2907.6	17.25	142.71	57.51((115.56%)	475.71(95.14%)
756.4	2820.5	16.69	138.22	55.64(111.28%)	460.75(92.15%)
773.5	2838.9	16.98	139.17	56.61((113.22%)	463.91(92.78%)
780.1	2754.1	17.09	134.80	56.99((113.98%)	449.35(89.90%)
			CV	(113.3%) 1.9%	(92.88%) 2.02%

### **OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS:**

El objetivo general se cumplió al desarrollarse el método analítico cromatográfico para la determinación de cafeína en combinación con el AINE paracetamol.

Los objetivos específicos también se cumplieron ya que se realizaron las pruebas para la selección de las fases necesarias para la separación de la combinación farmacéutica (establecer los tiempos de retención de cada fármaco).

Se validó el sistema cromatográfico al demostrar que es lineal y preciso.

Se establecieron los tratamientos de muestra más favorables para la recuperación de los analitos desde las formas farmacéuticas (tabletas Saridon®).

Se validaron los métodos analíticos propuestos al demostrar que son: lineales, exactos y precisos, con forma a los parámetros aceptables para análisis farmacéutico.

## **CONCLUSIONES:**

El método cromatográfico permite separar e identificar de manera sencilla, exacta y precisa el paracetamol y la cafeína a partir de tabletas comerciales sin un paso previo de extracción o algún otro tratamiento adicional a la disolución del polvo de la tableta. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos, el método analítico no pasa los criterios para el análisis de la cafeína.

Esto se puede deber por la relación de concentraciones que hay entre los principios activos, debido a que la cafeína se encuentra en una proporción 10 veces inferior.

Mientras que el método para el paracetamol resulta preciso y relativamente exacto, sin embargo, es completamente necesario realizar más pruebas y análisis para corroborar que los criterios del sistema y del método son los más adecuados.

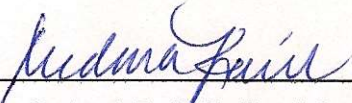
Sin dudas se debe continuar experimentando para poder obtener resultados completamente favorables.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pérez Aisa, Á. (Septiembre de 2012). Efectos secundarios de los antiinflamatorios no esteroides. Málaga, Marbellaa, España.
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2007). Técnicas Cromatográficas. Ciudad de México, México.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (Febrero de 2017). *AEMPS*. Obtenido de [www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es)
- Amigo, C., Dominguez , V., & López , M. (2015). *Paracetamol: restricciones de uso a nivel mundial y situación en Uruguay*. Uruguay: Departamento de Farmacología y Terapéutica - Facultad de Medicina - Universidad de la República.
- Buer, J. (2014). Origins and impact of the term NSAID. *Inflammopharmacology*, 263-267.
- Castro, R. M., Martins, R. V., & et all. (2004). High capacity and low cost detection of prion protein gene varian alleles by denaturing HPLC. *Journal of Neuroscience Methods*, 139:263-269.
- Davies, R. A., Maher, C. G., & Hancock, M. J. (2008). A systematic review of paracetamol for non-specific low back pain. *Eur Spine J*, 1423-1430.
- Diariofarma. (02 de 05 de 2017). *DIARIOFARMA*. Obtenido de <https://www.diariofarma.com/2017/05/02/paracetamol-cuando-debemos-tomarlo>
- DrugBank. (20 de Marzo de 2020). *DRUGBANK*. Obtenido de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00201>
- Drugs.com. (1 de Febrero de 2019). *Drugs.com Know more. Be sure*. Obtenido de [Drugs.com Know more. Be sure.:](https://www.drugs.com/monograph/acetaminophen.html) <https://www.drugs.com/monograph/acetaminophen.html>
- Fisone, G., Bogkvist, A., & Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 857-872.
- Hernández Pérez, J. M. (2005). Cromatografía líquida de alta eficacia. *Educación continuada en el laboratorio clinico*, 49-62.
- ICH Expert Working Group. (Noviembre de 2005). Validation of analytical procedures. *ICH Harmonised tripartite guideline*. International conference on harmonisation of technical requirments for registration of pharmaceuticals for human use.
- MedlinePlus. (20 de Diciembre de 2019). *MedlinePlus*. Obtenido de <https://medlineplus.gov/spanish/caffeine.html>

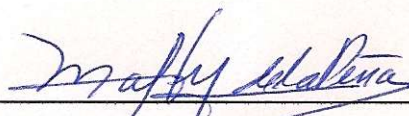
- Moronta, F. (20 de Marzo de 2020). *felixmoronta* . Obtenido de <http://felixmoronta.pro/sembrar-acetaminofen/>
- Núñez Guzmán, N. A. (2017). *Tesis. Estudio de bioequivalencia y evaluación farmacocinética de tabletas de Paracetamol vs. Paracetamol más Cafeína en voluntarios sanos mexicanos*. Ciudad de México.: CONACYT.
- Rodriguez Miranda, J. D. (1991). Cap. 8: Cromatografía. En *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. (pág. 179). Reverté.
- Sanabria, L. M., Martínez, J. A., & Baena, Y. (2017). Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas.*, 202-219.
- Sharapin, N. (2000). La cromatografía. En N. Sharapin, *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (págs. 159-190). Convenio Andrés Bello.
- Syed, S., Kamimori, G., Kelly, W., & Eddington, N. (2005). Multiple dose pharmacokinetics of caffeine administered in chewing gum to normal healthy volunteers. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 403-409.
- Weiss, J. (2004). *Handbook of Ion Chromatography*. Wiley-VCH.

**Vo. Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos**



---

M. en C. José Raúl Medina López



---

M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña

División de Ciencias biológicas y de la Salud  
Departamento de Sistemas Biológicos  
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

**Informe final de actividades del servicio social**

Desarrollo de métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de mezclas de cafeína y AINEs (paracetamol) en tabletas.

Alumno: Esteban Rodriguez Gallegos  
Matricula: 2153062207  
Dirección: U.H. Ignacio Chávez No.72, Granjas Coapa  
Teléfono: 5513875044  
Asesores:

M. en C. José Raúl Medina López

M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña

Lugar de realización:

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos, Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicios (UIDIS), Laboratorio de Farmacocinética y Farmacodinamia.

Fecha de inicio: 30 de Mayo 2019

Fecha de término: 30 de Noviembre 2019

MAYO 2020



## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

El paracetamol es un medicamento con actividad analgésica y antipirética. A diferencia del grupo de los derivados del ácido arilpropionico el paracetamol no tiene ningún efecto antiinflamatorio (Diariofarma, 2017). La cafeína es una sustancia amarga que se encuentra naturalmente en más de 60 plantas. También existe la cafeína sintética que se añade a algunos medicamentos, alimentos y bebidas. Se utiliza frecuentemente en combinación con algunos analgésicos, y en medicamentos de venta libre (MedlinePlus, 2019).

El paracetamol solo no es una terapia efectiva para la migraña aguda; sin embargo, la combinación de éste con cafeína y/o aspirina, constituye la primera línea de tratamiento siendo muy efectiva. En otros trabajos como el de (Núñez Guzmán, 2017) se han realizado evaluaciones de formulaciones que contienen paracetamol solo y paracetamol en combinación con cafeína para determinar su bioequivalencia, donde se observa que la formulación combinada tiene una absorción más rápida que el paracetamol solo lo que deriva en un efecto analgésico en un periodo de tiempo más corto, esto presenta una ventaja en el manejo del dolor agudo.

El desarrollo de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos en los medicamentos es de suma importancia para la industria farmacéutica puesto que esto permite conocer y estar al tanto de los posibles errores de producción o incluso de calidad de materia prima para la fabricación de medicamentos, mejorando por obiedad la calidad del medicamento antes de salga a la venta y, una vez que el medicamento está disponible para el público en general, mantenerla e incluso, mejorarla aún más.

Una de las líneas de investigación del laboratorio N-102 de Farmacocinética y Farmacodinamia del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco, comprende el desarrollo de métodos que permitan dar un seguimiento a la calidad biofarmacéutica de medicamentos en venta en el mercado nacional. En este trabajo se desarrolló un método cromatográfico para la cuantificación de AINEs en combinación (paracetamol y cafeína R.A.). Se compararon los resultados de los fármacos antes mencionados con tabletas ya a la venta (Saridon® de la marca Bayer) para su validación.

## OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### General:

Desarrollar los métodos analíticos cromatográficos para la determinación de cafeína en combinación con paracetamol.

### Específicos:

- Realizar pruebas para la selección de las fases necesarias para la adecuada separación de la combinación farmacéutica.
- Validar los sistemas cromatográficos en cuanto a linealidad y precisión.
- Establecer los tratamientos de muestra adecuados para la recuperación de los analitos desde la forma farmacéutica.
- Validar los métodos analíticos propuestos en cuanto a: linealidad, exactitud y precisión, de acuerdo con parámetros aceptables para análisis farmacéutico.

## CONCLUSIONES:

El método cromatográfico permite separar e identificar de manera sencilla, exacta y precisa el paracetamol y la cafeína a partir de tabletas comerciales sin un paso previo de extracción o algún otro tratamiento adicional a la disolución del polvo de la tableta.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Pérez Aisa, Á. (Septiembre de 2012). Efectos secundarios de los antiinflamatorios no esteroides. Málaga, Marbellaa, España.

Universidad Nacional Autónoma de México. (2007). Técnicas Cromatográficas. Ciudad de México, México.

Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). (Febrero de 2017). AEMPS. Obtenido de [www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es)

Amigo, C., Dominguez , V., & López , M. (2015). *Paracetamol: restricciones de uso a nivel mundial y situación en Uruguay*. Uruguay: Departamento de Farmacología y Terapéutica - Facultad de Medicina - Universidad de la República.

Buer, J. (2014). Origins and impact of the term NSAID. *Inflammopharmacology*, 263-267.

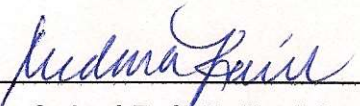
Castro, R. M., Martins, R. V., & et all. (2004). High capacity and low cost detection of prion protein gene varian alleles by denaturing HPLC. *Journal of Neuroscience Methods*, 139:263-269.

- Davies, R. A., Maher, C. G., & Hancock, M. J. (2008). A systematic review of paracetamol for non-specific low back pain. *Eur Spine J*, 1423-1430.
- Diariofarma. (02 de 05 de 2017). *DIARIOFARMA*. Obtenido de <https://www.diariofarma.com/2017/05/02/paracetamol-cuando-debemos-tomarlo>
- DrugBank. (20 de Marzo de 2020). *DRUGBANK*. Obtenido de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00201>
- Drugs.com. (1 de Febrero de 2019). *Drugs.com Know more. Be sure*. Obtenido de Drugs.com Know more. Be sure.: <https://www.drugs.com/monograph/acetaminophen.html>
- Fisone, G., Bogkvist, A., & Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 857-872.
- Hernández Pérez, J. M. (2005). Cromatografía líquida de alta eficacia. *Educación continuada en el laboratorio clínico*, 49-62.
- ICH Expert Working Group. (Noviembre de 2005). Validation of analytical procedures. *ICH Harmonised tripartite guideline*. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.
- MedlinePlus. (20 de Diciembre de 2019). *MedlinePlus*. Obtenido de <https://medlineplus.gov/spanish/caffeine.html>
- Moronta, F. (20 de Marzo de 2020). *felixmoronta* . Obtenido de <http://felixmoronta.pro/sembrar-acetaminofen/>
- Núñez Guzmán, N. A. (2017). *Tesis. Estudio de bioequivalencia y evaluación farmacocinética de tabletas de Paracetamol vs. Paracetamol más Cafeína en voluntarios sanos mexicanos*. Ciudad de México.: CONACYT.
- Rodriguez Miranda, J. D. (1991). Cap. 8: Cromatografía. En *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. (pág. 179). Reverté.
- Sanabria, L. M., Martínez, J. A., & Baena, Y. (2017). Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas.*, 202-219.
- Sharapin, N. (2000). La cromatografía. En N. Sharapin, *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (págs. 159-190). Convenio Andrés Bello.

Syed, S., Kamimori, G., Kelly, W., & Eddington, N. (2005). Multiple dose pharmacokinetics of caffeine administered in chewing gum to normal healthy volunteers. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 403-409.

Weiss, J. (2004). *Handbook of Ion Chromatography*. Wiley-VCH.

**Vo. Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos**

  
M. en C. José Raúl Medina López

  
M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña