

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

PROYECTO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE QUÍMICA”

TEMA:

Método ultrarrápido para la cuantificación de conservantes (metil y propil parabeno) en la forma farmacéutica jarabe

AUTOR:

FRANKLIN JESUS MEZA CALDERÓN

Guayaquil - Ecuador

2022

RESUMEN

Los parabenos son uno de los conservantes más utilizados en todo el mundo ya que inhiben el crecimiento de microorganismos, permitiendo prolongar la vida útil de cosméticos y productos farmacéuticos. Se los emplea solos o, para mayor eficacia, en forma de mezcla siendo el metil, etil, propil y butil parabeno los más comercializados. La determinación de conservantes en formulaciones farmacéuticas constituye uno de los parámetros más relevantes en el proceso de control de calidad de medicamentos, es por esto, que en este trabajo se desarrolló un método ultrarrápido y sencillo para la determinación de metil y propil parabeno mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC). La metodología propuesta se validó bajo el diseño de un protocolo de calidad completo logrando los objetivos planteados de exactitud, selectividad, precisión y linealidad en el rango de trabajo de 43 a 101 ug/mL para metil parabeno y de 5 a 11 ug/mL para propil parabeno; un límite de cuantificación de 1,60 ug/mL y 0,24 ug/mL respectivamente, una exactitud entre 99 y 102%, y precisión inferior al 2% en ambos casos. Se demostró la robustez del método al comprobar la obtención de resultados reproducibles al modificar las variables analíticas más importantes del método, estableciendo de forma consistente y con evidencia científico-experimental un método para la identificación y cuantificación de los conservantes estudiados presentes en la forma farmacéutica de jarabe.

Palabras claves: metil parabeno, propil parabeno, jarabe, validación, UHPLC.

ABSTRACT

Parabens are one of the most widely used preservatives in the world for their capacity to inhibit the growth of microorganisms, used to prolong the shelf life of cosmetics and pharmaceuticals. Parabens are used alone or, for greater efficiency, in the form of a mixture, being methyl, ethyl, propyl and butyl parabens the most commercialized. The determination of preservatives in pharmaceutical formulations is one of the most relevant parameters in the drug quality control process, which is why, in this work, an ultra-fast, simple method was developed using Ultra-high resolution liquid chromatography (UHPLC). The proposed technique was validated with a quality protocol design achieving the objectives for accuracy, selectivity, precision, and linearity in the working range from 43 to 101 ug/mL for methyl paraben and from 5 to 11 ug/mL for propyl paraben and; a quantification limit of 1.60 ug/mL and 0.24 ug/mL, respectively, an accuracy of between 99 and 102% and a precision less than 2% in both cases. Verifying the obtaining of reproducible results by modifying the most important analytical variables of the method, the robustness was demonstrated; establishing a method for the identification and quantification of the studied preservatives present in the pharmaceutical form of syrup

Key words: Methyl paraben, propyl paraben, syrup, validation, UHPLC.

DEDICATORIA

Dedico este esfuerzo a mis padres y todas las personas que me apoyaron en el transcurso de mi vida profesional conquistando así un nuevo nivel de estudio esperando no defraudarlos en el futuro.

Jesús Meza

AGRADECIMIENTO

Doy gracias primeramente a Dios por guiarme en esta etapa de mi vida, a mis padres que con su apoyo incondicional pude llegar donde estoy ahora.

A mis compañeros de aula que de una u otra forma contribuyeron a este logro.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral y su planta docente los cuales admiro mucho por su conocimiento y calidad humana.

A la compañía farmacéutica Acromax S.A. por ser mi segundo hogar y permitirme utilizar sus recursos e instalaciones para la realización de este trabajo.

A todos mis amigos y colegas que me incentivaron a seguir adelante ayudándome a no rendirme jamás para culminar y alcanzar este nuevo logro.

Jesús Meza

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Franklin Meza', written over a light blue circular stamp or watermark.

Franklin Jesús Meza Calderón

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



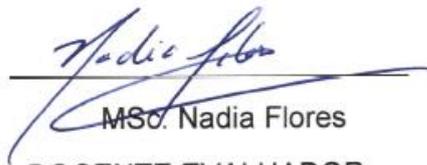
PhD. Joel Vielma

PRESIDENTE



PhD. Tatiana Zamora

TUTOR



MSc. Nadia Flores

DOCENTE EVALUADOR

ABREVIATURAS O SIGLAS

USP: Farmacopea de Estados Unidos

BP: Farmacopea Británica

VOC: Método voltamperométrico de onda cuadrada

MEPS: Micro extracción por adsorbente empaquetado

UHPLC o UPLC: Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento

BPM: Buenas prácticas de manufactura

PEG: Polietilenglicol

UE: Unión Europea

pH: Potencial de hidrógeno

DMDM hidantoína: 1,3-bis(hidroximetil)-5,5-dimetilimidazolidina-2,4-diona

MI: 2-metil-3-isotiazolinona

CMI: 5-cloro-2-metil-3-iso-tiazolinona

OI: 2-benzisotiazolinona (BzI) y 2-octil-3-isotiazolinona

DEA: Dietanolamina

TEA: Trietanolamina

MEA: Monoetanolamina

C12-C22: Bromuro y el Cloruro de trimetilamonio

FDA: Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

MIC: Concentración inhibitoria mínima

SC: Subcutánea

HPLC-UV: Cromatografía líquida de alta definición – Detección ultravioleta

LC-MS/MS: Cromatografía líquida con Detección de Doble Masas

MP: Metilparabeno

PP: Propilparabeno

LC-UV: Cromatografía líquida con detección ultravioleta

U-PLS/RBL: Mínimos cuadrados parciales desplegados/bi linealización residual

LOQ: Límite de cuantificación

MeP: Metil parabeno

EtP: Etil parabeno

PrP: Propil parabeno

BuP: Butil parabeno

isoBuP: Isobutil parabeno

MEPS: Jeringas para cromatografía

RDSE: Microextracción por sorción con disco rotatorio

ESI: Ionización por electropulverización

TOF/MS: Espectrometría de masas de tiempo de vuelo

BPA: Bisfenol A

BPB: Azul de bromofenol

BPF: Bisfenol F

BPS: Bisfenol S

BPAF: Bisfenol AF

ULOQ: Límite superior de cuantificación

S/N: Señal-ruido

SM-FTN: Aguja de flujo continuo

PDA: Detector de arreglo de fotodiodos

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	15
1. INTRODUCCIÓN	15
CAPÍTULO 2	17
2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.4.1 Conservantes antimicrobianos	19
2.5.1 Propiedades Fisicoquímicas y Metabolismo.....	22
2.5.2 Actividad Antimicrobiana	22
2.5.3 Metilparabeno.....	23
2.5.4 Propilparabeno	24
2.7.1 Estabilidad Farmacéutica	28
2.8.1 Proceso de validación de un método analítico	29
2.8.2 Categorías de la validación	30
2.9.1 Linealidad del intervalo.....	30
2.9.2 Selectividad	31
2.9.3 Límite de detección	31
2.9.4 Límite de cuantificación	31
2.9.5 Exactitud.....	32
2.9.6 Precisión.....	32
2.9.7 Curva de calibración, linealidad y sensibilidad	32
2.9.8 Robustez	33
2.9.9 Aptitud del sistema	33
CAPÍTULO 3	34
3. METODOLOGÍA.....	34
3.1.1 Reactivos.....	34
3.1.2 Equipos	35
3.2.1 Condiciones cromatográficas	35
3.2.2 Preparación de Buffer TFA pH 2,50	36
3.2.3 Preparación de las Soluciones de Trabajo	36
3.2.4 Preparación de la solución estándar madre de 0,18mg/mL Metil Parabeno 36	
3.2.5 Preparación de la solución estándar madre de 0,08mg/mL Propil Parabeno 36	

3.2.6	Preparación de la solución estándar de mezcla de patrones (0,072mg/mL de Metil Parabeno y 0,008mg/mL de Propil Parabeno).....	36
3.2.7	Preparación de solución muestra (0,072mg/mL de Metil Parabeno y 0,008mg/mL de Propil Parabeno)	36
3.2.8	Procedimiento	36
3.2.9	Cálculos de concentración	37
CAPÍTULO 4		43
4.	RESULTADOS	43
4.1.	Método desarrollado.....	43
4.2.	Método Validado	47
4.2.1	Tiempo Muerto	47
4.2.2	Aptitud del Sistema y Repetibilidad Instrumental	47
4.2.3	Pureza de pico	48
4.2.4	Selectividad / especificidad	49
4.2.5	Reacciones Inducidas	50
4.2.6	Límite de Detección (LOD)	51
4.2.7	Límite de Cuantificación (LOQ)	51
4.2.8	Linealidad del Sistema	52
4.2.9	Linealidad de Método	55
4.2.10	Exactitud del Método	59
4.2.11	Repetibilidad del método.....	61
4.2.12	Precisión Intermedia.....	62
4.2.13	Robustez	63
4.2.14	Ensayo de Retención de Filtro	65
CAPÍTULO 5		68
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
A.	ANEXOS	69
6.	REFERENCIAS.....	72

LISTADO DE FIGURAS

Figura 4.1.1 Cromatograma obtenido de la Prueba 1	43
Figura 4.1.2 Cromatograma obtenido de la Prueba 2	44
Figura 4.1.3 Cromatograma obtenido de la Prueba 3	44
Figura 4.1.4 Cromatograma obtenido de la Prueba 4	45
Figura 4.1.5 Cromatograma obtenido de la Prueba 5	46
Figura 4.2.1 Validación de Parabenos en Termax Jarabe – Tiempo muerto Uracilo	47
Figura 4.2.2 Cromatograma Aptitud del Sistema	48
Figura 4.2.3 Regresión Lineal del Metil Parabeno	53
Figura 4.2.4 Regresión Lineal del Propil Parabeno	54
Figura 4.2.5 Regresión Lineal del Método de Metil Parabeno.....	56
Figura 4.2.6 Regresión Lineal del Método de Propil Parabeno	58

LISTADO DE TABLAS

TABLA 2.1 Clasificación química y funciones de los excipientes farmacéuticos.....	18
TABLA 2.2 Usos del Metilparabeno en preparaciones farmacéuticas	23
TABLA 2.3 Usos del Propilparabeno en preparaciones farmacéuticas	24
TABLA 2.4 Comparación de metodologías analíticas para la determinación de Parabenos (metilparabeno y propilparabeno) en diversas matrices	25
TABLA 2.5 Categorías de prueba	30
TABLA 3.1 Composición por mililitro del Jarabe Acetaminofén	34
TABLA 3.2 Tabla de Gradiente	35
TABLA 3.3 Concentración de curva de calibración de metilparabeno y propilparabeno	38
TABLA 3.4 Características de desempeño de los parámetros ensayados.....	38
TABLA 4.1.1 Condiciones cromatográficas de la Prueba 1.....	43
TABLA 4.1.2 Condiciones cromatográficas de la Prueba 2.....	43
TABLA 4.1.3 Condiciones cromatográficas de la Prueba 3.....	44
TABLA 4.1.4 Condiciones cromatográficas de la Prueba 4.....	45
Tabla 4.1.5 Gradiente de Prueba 4	45
Tabla 4.1.6 Gradiente de Prueba 5	46
Tabla 4.2.1Tiempo muerto de Uracilo	47
Tabla 4.2.2 Aptitud del sistema y repetibilidad de metil y propil parabeno	48
Tabla 4.2.3 Pureza de pico de metil y propilparabeno	49
Tabla 4.2.4 Tabla de Selectividad Antes y Después de Estufa	50
Tabla 4.2.5 Pruebas de reacciones inducidas.....	50
Tabla 4.2.6 Límite de detección y cuantificación.....	52
Tabla 4.2.7 Linealidad del Metil Parabeno	52
Tabla 4.2.8 Test de Linealidad y Normalidad del Metil Parabeno	53
Tabla 4.2.9 Linealidad del Propil Parabeno.....	54
Tabla 4.2.10 Linealidad y Normalidad del Propil Parabeno.....	55
Tabla 4.2.11 Linealidad del método de Metil Parabeno	56
Tabla 4.2.12 Linealidad y Varianzas del Método de Metil Parabeno.....	57
Tabla 4.2.13 Linealidad del método de Propil Parabeno.....	58
Tabla 4.2.14 Linealidad y Varianzas del Método de Propil Parabeno	59
Tabla 4.2.15 Recuperación del Metil Parabeno	60

Tabla 4.2.16 Test de varianzas y evaluación de medias del Metil Parabeno	60
Tabla 4.2.17 Recuperación del Propil Parabeno	60
Tabla 4.2.18 Test de varianzas y evaluación de medias del Propil Parabeno	61
Tabla 4.2.19 Recuperación de metil y propil parabenos	61
Tabla 4.2.20 Prueba intralaboratorio del Metil Parabeno	62
Tabla 4.2.21 Análisis de precisión intermedia del Metil parabeno.....	62
Tabla 4.2.22 Prueba intralaboratorio del Propil Parabeno.....	63
Tabla 4.2.23 Análisis de precisión intermedia del Propil parabeno	63
Tabla 4.2.24 Robustez del Metil parabeno.....	63
Tabla 4.2.25 Diseño Factorial - Plackett Burman 4 Factores del Metil parabeno.....	64
Tabla 4.2.26 Porcentaje de recuperación del Metil parabeno	64
Tabla 4.2.27 Evaluación de la robustez del Metil parabeno	64
Tabla 4.2.28 Robustez del Metil parabeno.....	64
Tabla 4.2.29 Diseño Factorial - Plackett Burman 4 Factores del Propil parabeno ...	64
Tabla 4.2.30 Porcentaje de recuperación del Propil parabeno.....	65
Tabla 4.2.31 Evaluación de la robustez del Propil parabeno	65
Tabla 4.2.32 Ensayo de retención de filtro del metil parabeno.....	66
Tabla 4.2.33 Ensayo de retención de filtro del propil parabeno	67

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A.1 Cromatogramas de selectividad antes de estufa – Metil y Propil Parabeno MP + Placebo a 254nm	69
Anexo A.2 Cromatogramas de selectividad después de estufa – Metil y Propil Parabeno MP + Placebo a 254nm	69
Anexo A.3 Cromatograma de reacciones inducidas - Metil y Propil Parabeno MP + Placebo Termólisis a 254nm	69
Anexo A.4 Cromatograma de reacciones inducidas - Metil y Propil Parabeno MP + Placebo Hidrolisis Básica a 254nm	70
Anexo A.5 Cromatograma de reacciones inducidas - Metil y Propil Parabeno MP + Placebo Hidrolisis Acida a 254nm	70
Anexo A.6 Cromatograma de reacciones inducidas - Metil y Propil Parabeno MP + Placebo Oxidación a 254nm	70
Anexo A.7 Cromatograma de reacciones inducidas - Metil y Propil Parabeno MP + Placebo Fotosensibilidad a 254nm	71
Anexo A.8 Límite de detección (LOD)	71
Anexo A.9 Límite de cuantificación (LOQ)	71

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Los parabenos pertenecen a una familia de conservantes muy utilizados, sobre todo en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria. Se utilizan solos o, para mayor eficacia, en forma de mezcla; comúnmente cuatro ésteres: metil, etil, propil y butil parabenos. Los parabenos inhiben el crecimiento de microorganismos y se utilizan para prolongar la vida útil de cosméticos y productos farmacéuticos. Son uno de los conservantes más utilizados en todo el mundo. Sin embargo, han sido objeto de una campaña de desprestigio mediático desde 2005, aunque varios estudios no han logrado probar formalmente su supuesta responsabilidad en la aparición de algunos tipos de cáncer [1]. Los parabenos son bien conocidos por tener propiedades sensibilizantes débiles y por su ausencia de toxicidad mientras que los nuevos productos de sustitución, no tan conocidos, pueden dar lugar a nuevos casos de alergia de contacto.

La determinación de conservantes en formulaciones farmacéuticas constituye uno de los parámetros más relevantes en el proceso de control de calidad de medicamentos, al respecto la farmacopea americana (USP) en el capítulo 341 sobre agentes antimicrobianos establece un método de cromatografía líquida para metil y propil parabeno donde utiliza metanol y una solución reguladora de fosfato como fase móvil y es leído a una longitud de onda de 272 nm. La revista cubana de Farmacia de la Habana propone la validación de un método analítico para la determinación cuantitativa de parabenos en el gel de hidróxido de aluminio mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, con columna RP18 (25 x 0,4 cm) y detector UV-Visible a 254 nm con demostrada especificidad, linealidad, precisión, exactitud, y adecuación cromatográfica.

Por tanto, el presente trabajo de investigación propone el desarrollo de un método más rápida y confiable al utilizar cromatografía UHPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography) para la cuantificación de metil y propil parabenos en la forma farmacéutica de jarabe elaborado a nivel farmacéutico.

1.2 Descripción del problema

En la actualidad los métodos de ensayo se enfocan más en la cuantificación de los principios activos sin prestar la debida atención a los excipientes que lo engloban debido a que su única función es de proteger y conducir al activo hasta su sitio de acción farmacológica.

Los métodos de ensayo que se usan para identificarlos y cuantificarlos van desde el punto de vista microbiológico hasta el fisicoquímico. La USP también recomienda hacerlo mediante ensayos microbiológicos al sistema conservante valorando su actividad antimicrobiana; pero es necesario considerar que dicho efecto antimicrobiano dependerá de la concentración en la que se encuentre el conservante.

Los parabenos son conservantes que deben estar en cierta cantidad en la formulación para que cumplan una acción antimicrobiana requiriendo ser analizados con métodos convencionales como el cromatográfico, siendo este un método mucho más sensible y versátil.

Por otra parte, la farmacopea británica (BP) describe un método para la determinación cuantitativa de parabenos que consiste en una hidrólisis básica de estas moléculas seguido de una valoración potenciométrica del hidróxido de sodio residual; sin embargo, dicho método no es específico para la cuantificación de metil y propil parabenos.

Los parabenos se encuentran siempre en cantidades muy pequeñas en las formulaciones farmacéuticas, de ahí la necesidad de un método lo suficientemente sensible, selectivo y confiable para poder identificarlos y cuantificarlos con precisión y exactitud, siendo este un reto analítico en menor tiempo posible.

1.3 Objetivos

Objetivo General:

Establecer un método analítico validado por cromatografía líquida para la identificación y cuantificación de los conservantes presentes en la forma farmacéutica jarabe.

Objetivos específicos:

- Desarrollar un método analítico por cromatografía líquida UPLC que cumpla con especificaciones de validación según las normativas vigentes.
- Diseñar un protocolo de validación que permita la medir la eficiencia del método para los fines previstos.
- Implementar el método validado en base a los resultados y documentación técnica desarrollada.

1.4 Hipótesis

El establecimiento de un método para conservantes por cromatografía líquida de ultra alta resolución dará una mayor robustez a los resultados en base al cumplimiento de parámetros de calidad emitidos por el laboratorio conociendo la cantidad presente en cada formulación para una toma de decisiones más veraz.

1.5 Alcance

El presente trabajo aplica para la identificación y cuantificación de metil y propil parabeno en la forma farmacéutica de jarabe elaborado a nivel farmacéutico en todo laboratorio de calidad que cumpla con la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).

Al término de este proyecto se dispondrá de un método validado para la identificación y cuantificación de conservantes por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) cumpliendo con todos los parámetros de precisión y exactitud del método, así como su confiabilidad al momento de emitir resultados reproducibles.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Excipientes en la Industria Farmacéutica

Los productos farmacéuticos a menudo contienen agentes que tienen una variedad de propósitos, incluida la mejora de la apariencia, la biodisponibilidad, la estabilidad y la palatabilidad del producto [2]. Los excipientes (sustancias añadidas para conferir una consistencia o forma adecuada al fármaco, como el vehículo, los conservantes o los estabilizantes) suelen constituir la mayor parte de la masa o el volumen de los productos farmacéuticos orales y parenterales. Estos adyuvantes farmacéuticos normalmente se consideran inertes y no se suman a la acción prevista de los ingredientes terapéuticamente activos ni la afectan [3].

2.2 Tipos de Excipientes

En términos generales, los excipientes representan la mayor parte del peso o volumen de un medicamento. En un mercado farmacéutico mundial valorado en unos 215.000 millones de libras esterlinas, el de los excipientes asciende a unos 1.500 millones de libras esterlinas, de los cuales el 42 % se encuentra en Norteamérica, el 33 % en Europa y el 25 % en el resto del mundo. En 1999, todo esto correspondió a 600 mil toneladas de materiales, la mayor parte para la industria alimenticia, cosmética y química y sólo una pequeña parte para la industria farmacéutica. Los excipientes son de origen diverso: animal (por ejemplo, lactosa, gelatina, ácido esteárico), vegetal (por ejemplo, almidones, azúcares, celulosa, alginatos), mineral (por ejemplo, fosfato de calcio, sílice) y de síntesis (por ejemplo, PEG, polisorbatos, povidona, etc.) y a menudo carecen de un nombre comercial [4]. Su origen y uso no suelen garantizar la calidad exigida por la industria farmacéutica, por lo que deben someterse a controles analíticos más exhaustivos. Para llevar a cabo las numerosas funciones requeridas, ahora están disponibles nuevas clases de excipientes, derivados de materiales antiguos y nuevos, solos o en combinación, adaptados a la fabricación de formas de dosificación farmacéuticas de alto rendimiento. Visto desde este ángulo, los excipientes ya no pueden ser considerados simplemente soportes inertes de los principios activos, sino componentes funcionales esenciales de una formulación farmacéutica moderna. También hay que tener en cuenta que la relación entre su peso y el de los principios activos suele ser muy alta en una formulación, y como para provocar una posible acción debido a su masa. Al igual que los fármacos, también tienen su propia actividad termodinámica que, aunque generalmente bajo, puede contribuir a reacciones que conducen a la degradación o a interacciones entre el fármaco y el excipiente. En la tabla 2.1 se enumeran los excipientes según su clase y la función química que puede contribuir a su reactividad [5].

Actualmente, se considera que en la industria farmacéutica se utilizan más de mil materiales diferentes para cumplir con sus diversos requerimientos como diluyentes, agentes de carga, desintegrantes, lubricantes, colorantes, edulcorantes, etc. Estos compuestos son químicamente heterogéneos que van desde moléculas simples (agua) hasta mezclas complejas de sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas que, desde el punto de vista normativo, pueden subdividirse en tres categorías. En la

primera categoría (excipientes aprobados) encontramos los compuestos originarios de la industria alimentaria (generalmente reconocidos como seguros) o que han estado presentes en productos farmacéuticos durante mucho tiempo. La categoría intermedia (excipientes esencialmente nuevos) comprende los compuestos obtenidos mediante la modificación estructural de los excipientes ya aprobados o los ya utilizados en la industria alimentaria o cosmética. La tercera categoría cubre nuevos compuestos, nunca utilizados en el campo farmacéutico, sin embargo, crecimiento rápido debido al interés actual en las formulaciones de liberación modificada y por los requisitos de las modernas máquinas de compresión/comprimidos de alta productividad.

TABLA 2.1 Clasificación química y funciones de los excipientes farmacéuticos

<i>Clasificación química</i>	<i>Función</i>
agua, alcoholes	vehículo
ésteres, éteres, ácidos carboxílicos	precisión y exactitud de la dosis
glicéridos y ceras	estabilidad
carbohidratos (mono, di y polisacáridos)	manufacturación
hidrocarburos y derivados halógenos	tolerabilidad
polímeros (naturales y sintéticos)	desagregación
minerales	disolución
proteína	liberación controlada
varios: conservantes, colorantes, edulcorantes, tensioactivos, etc.	absorción

Fuente: [5].

2.3 Conservantes

La mayoría de las formulaciones cosméticas y ciertas formulaciones farmacéuticas, como los jarabes, debido a su composición orgánica y alto contenido de agua, son productos fácilmente degradables por los microorganismos. La contaminación microbiana en los cosméticos y medicamentos representa un riesgo importante para la salud del consumidor, ya que, en estas condiciones, los productos contaminados pueden provocar irritación o infección, especialmente cuando se aplican sobre la piel lesionada, los ojos o los bebés [6]. Prueba de ello son los brotes reportados de infección microbiana, tanto en personas hospitalizadas como en los hogares de los consumidores, causados por cosméticos y medicamentos contaminados. Para prevenir el crecimiento microbiano, los conservantes son sustancias que se agregan con frecuencia con el propósito principal de inhibir el desarrollo de microorganismos (función antimicrobiana). Sin embargo, también se pueden añadir para preservarlos contra el daño y la degradación causados por la exposición al oxígeno (función antioxidante) o a la luz ultravioleta (función fotoprotectora) [7].

Al ser productos biológicamente activos, los conservantes pueden actuar como agentes tóxicos, irritantes o sensibilizantes. Por lo tanto, la seguridad de estos productos químicos siempre se cuestiona. La evidencia científica de los posibles efectos nocivos que algunos conservantes podrían tener sobre la salud de los

consumidores ha hecho que aumenten las restricciones por parte de diversas normativas internacionales. Por ejemplo, la familia más extendida de conservantes, los parabenos, ha sido revisada una y otra vez en el Reglamento de la UE, y el uso de algunos de ellos (por ejemplo, isopropil-, isobutil-, fenil-, bencil- y pentilparabeno) ha sido prohibido en productos cosméticos.

En la actualidad, la percepción pública negativa sobre los conservantes tradicionales, incluso los incluidos en las listas positivas de las diferentes normativas, ha cambiado sustancialmente la forma en que los formuladores de productos farmacéuticos están conservando sus productos. Cada vez son más los fabricantes que deciden no incluir conservantes tradicionales, que están en el punto de mira, alegando que sus productos están “libres” de un químico potencialmente tóxico. De hecho, ya se ha observado la inclusión del término 'sin parabenos' o 'sin conservantes' en la etiqueta de varios productos cosméticos, ya que es visto como una característica positiva por parte de los consumidores [8].

2.4 Tipos de sistemas conservantes

2.4.1 Conservantes antimicrobianos

Son sustancias agregadas a las formas farmacéuticas no estériles para protegerlas del desarrollo microbiano o de microorganismos que se introducen sin ser advertidos durante el proceso de fabricación o después de este.

La mayoría de los productos dermofarmacéuticos, cosméticos, fórmulas magistrales, etc., que contienen agua en su formulación tienen que estar debidamente conservados. Los conservantes se incorporan principalmente a los productos para evitar su deterioro y prolongar su vida comercial, así como para proteger al consumidor de la posibilidad de infección frente a algún determinado microorganismo patógeno. Además, si el producto pierde el componente estético, esto puede implicar una pérdida de sus beneficios y de la imagen comercial de la empresa fabricante.

La amplia variedad de estos ingredientes de tipo antimicrobiano se puede organizar en diferentes categorías químicas, según la estructura molecular y los grupos funcionales más característicos.

Conservantes de ácido orgánico y sus sales

Estos son ingredientes dependientes del pH, ya que muestran actividad solo en forma ácida. aunque normalmente se añaden a las formulaciones como sales para facilitar la incorporación. Sin embargo, la sal en sí misma no muestra actividad antimicrobiana hasta que se baja el pH para liberar la forma de ácido libre.

Algunos ácidos orgánicos típicos utilizados como conservantes son el ácido benzoico y su sal benzoato de sodio, ácido dehidroacético y dehidroacetato de sodio, ácido fórmico, ácido propiónico y sus sales, ácido sórbico y sorbato de potasio, ácido salicílico y ácido undecilénico [7].

Alcoholes y Derivados

Conservantes con grupos hidroxilo (–OH) también puede tener propiedades ácidas, aunque en menor medida que los conservantes de ácidos orgánicos. En este grupo de conservantes se incluyen compuestos como el alcohol bencílico, el isopropilmetilfenol, el fenoxietanol, el fenoxiisopropanol y el o-fenilfenol y su sal sódica. Son especialmente relevantes los ésteres alquílicos del ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB, también conocidos como parabenos). Los más comunes son los ésteres metílico, etílico, propílico, isopropílico, butílico, isobutil y bencílico, aunque las formas iso y bencílico están actualmente prohibidas por el Reglamento de Cosméticos de la UE. Estos compuestos exhiben propiedades antifúngicas y actividad contra bacterias gramnegativas. La actividad antimicrobiana de estos químicos aumenta a medida que aumenta el número de carbonos de la cadena alquílica, mientras que, por el contrario, su solubilidad en agua disminuye en forma paralela. Por lo tanto, la forma en que se incorporan a la formulación es particularmente crítica, ya que solo son activos en la fase acuosa y dependen del pH (los valores altos de pH conducen a la disociación del parabeno). Por esta razón, los parabenos a veces se incorporan en sus formas de sal de sodio y potasio [4].

Liberadores de formaldehído, metilenglicol y formaldehído

El formaldehído es un gas anhidro que puede reaccionar fácilmente con el agua y producir metilenglicol. La solución comercial de formaldehído en agua (es decir, metilenglicol) se conoce comúnmente como formalina. Por lo tanto, el formaldehído o su forma de metilenglicol se agrega con frecuencia a los productos cosméticos a base de agua, como champú, acondicionador, gel de ducha, jabón líquido para manos y baño de burbujas. Muestran actividad contra bacterias, pero también son activos contra hongos. Este grupo también incluye muchos conservantes que contienen grupos n-metilol en su estructura química, que en disolventes polares pueden actuar como donantes o liberadores de formaldehído. Los más frecuentes en productos cosméticos son la imidazolidinil urea, la diazolidinil urea, el hidroximetilglicinato de sodio, el bencilhemiformal, el DMDM hidantoína y el Quaternium-15. De acuerdo con el Reglamento de la UE, todos los productos terminados que contengan formaldehído o sustancias que liberen formaldehído deben etiquetarse con la advertencia "contiene formaldehído" cuando la concentración de formaldehído en el producto terminado supere el 0,05% [9].

Isotiazolinonas

Los biocidas de tipo isotiazolinona son un grupo de conservantes eficaces que se utilizan en una amplia variedad de aplicaciones y productos industriales o domésticos de base acuosa [9]. Estos compuestos son derivados heterocíclicos de 2H-isotiazolin-3-ona con un resto de azufre activo capaz de oxidar residuos que contienen tiol, ofreciendo así una poderosa actividad de conservación contra un amplio espectro de hongos y bacterias. Las isotiazolinonas como 2-metil-3-isotiazolinona (MI) y 5-cloro-2-metil-3-iso-tiazolinona (CMI) son los ingredientes activos de una mezcla 3:1 CMI/MI que se vende comercialmente con el nombre de Kathon CG. El uso de MI y CMI ha aumentado drásticamente, e incluso ganó presencia en concentraciones mucho más altas junto con 1,2-benzisotiazolinona (Bzl) y 2-octil-3-isotiazolinona (OI) en agentes

de limpieza y otros productos domésticos e industriales. (revestimientos a base de agua, pinturas, adhesivos, conservantes de madera, etc.).

Conservantes halogenados

Los conservantes halogenados exhiben una actividad más fuerte, particularmente contra los hongos. Este grupo incluye compuestos como 5-bromo-5-nitro-1,3 dioxano (bronidox) y 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (bronopol). Estos pueden descomponerse, liberando agentes nitrosantes que pueden reaccionar con aminas alifáticas como dietanolamina (DEA), trietanolamina (TEA) y monoetanolamina (MEA), que comúnmente se agregan a los champús y otros productos de higiene personal. Esta categoría también comprende otros conservantes halogenados como 2-cloro-acetamida, p-cloro-m-cresol, clorobutanol, cloroxilenol, clorfenesina, alcohol diclorobencílico, yodopropinil butilcarbamato y metildibromo glutaronitrilo. A pesar de su potente actividad antimicrobiana, muchos de estos compuestos son poco solubles en agua, lo que dificulta su incorporación en la matriz cosmética. Por otro lado, el triclosán, el triclocarban y el Climbazol son conservantes clorados que se emplean como principios activos para matar específicamente microorganismos. El bromuro y el cloruro de trimetilamonio (C12-C22) se usan con frecuencia en niveles altos en productos para el lavado y acondicionamiento del cabello debido a sus propiedades antiestáticas y suavizantes. Estas sustancias contienen nitrógeno cargado positivamente, exhibiendo una fuerte actividad antimicrobiana a un pH alto.

Otros conservantes

Otros compuestos que también se utilizan como conservantes son la hexamidina, la dibromohexamidina, la dibromopropamidina, la clorohexidina y el cloruro de cetilpiridinio, entre otros.

2.5 Parabenos

El efecto antimicrobiano de los parabenos y su utilidad potencial como conservantes fueron informados por primera vez en 1924 por Sabalitschka. Su uso ha aumentado constantemente; ahora se encuentran entre los biocidas más comunes presentes en cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos. Este estado favorecido se ha logrado debido a la toxicidad mínima documentada, el bajo costo, la inercia química y la aceptación casi mundial (aunque ese estado está siendo cuestionado actualmente) [1]. Los químicos cosméticos utilizan parabenos en sus formulaciones porque no tienen olor ni sabor perceptibles, tienen un pH neutro y no se decoloran ni endurecen. entre sí u otros biocidas.

El metilparabeno y el propilparabeno son, con diferencia, los más utilizados, generalmente en concentraciones del 0,4 % o menos y con frecuencia mucho más bajas. Los parabenos se evalúan como no mutagénicos. riesgo de infección. Cuanto más limpio sea el proceso de fabricación y el sitio, menos conservación se requiere. Los microbios especialmente problemáticos son los grampositivos *Staphylococcus aureus* y los gramnegativos *Escherichia coli*. La conservación del producto es una necesidad absoluta. A pesar de la equivocada aprensión y el temor público de que los conservantes no sean aptos para el consumo humano o “no naturales”, los parabenos

han sido clasificados como generalmente considerados seguros por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) [10].

2.5.1 Propiedades Físicoquímicas y Metabolismo

Los parabenos son ésteres homólogos del ácido representan un ácido carboxílico aromático que contiene un grupo carboxilo unido directamente a un anillo de benceno; un grupo hidroxilo está presente en la posición 4 con radicales alquilo variables como cadena lateral. Los parabenos en general son estables y no volátiles; se absorbe a través del tracto gastrointestinal y, hasta cierto punto, por vía percutánea; top-hidroxibenzoicoácido hidrolizado; y conjugado con excreción urinaria rápida [11]. No hay pruebas sólidas de acumulación en los tejidos u órganos corporales, aunque se han notificado niveles detectables en tejidos y órganos de duración indeterminada. Un estudio ha demostrado que los parabenos interactúan débilmente

con la albúmina sérica humana, lo que sugiere que están presentes hasta cierto punto en forma libre en el plasma y disponibles para alcanzar o, en teoría, incluso acumularse en los órganos y tejidos internos. Sin embargo, no se ha demostrado que los parabenos sean cancerígenos o citotóxicos [12]. Los parabenos son blancos, inodoros y cristalinos y exhiben una solubilidad en agua adecuada para lograr actividad conservante. Se observa un aumento de la solubilidad en disolventes orgánicos y aceites al aumentar la longitud de la cadena de alquilo (el mismo aumento de la longitud de la cadena disminuye la solubilidad en agua y, por lo tanto, la actividad de conservación deseada) [13].

Se utilizan en cosméticos, productos farmacéuticos y alimentos, pero se produce un sabor metálico fuerte e indeseable en concentraciones superiores al 0,08 %, lo que (junto con el deseo comprensible de minimizar la exposición sistémica) da como resultado una concentración limitada utilizada en los alimentos [14]. Son biodegradadas por una serie de enzimas inespecíficas en la naturaleza, un hecho que sugeriría un beneficio ambiental potencial en su uso [15].

2.5.2 Actividad Antimicrobiana

El mecanismo biocida del parabeno, en general, y del propilparabeno, en particular, puede estar relacionado con la falla mitocondrial dependiente de la inducción de la transición de la permeabilidad de la membrana acompañada de la despolarización mitocondrial y el agotamiento del trifosfato de adenosina celular a través del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa [16].

En la raíz de la actividad antimicrobiana está la interrupción de los procesos de transporte de membrana, aunque algunos investigadores han identificado la inhibición de la síntesis de ADN y ARN; la acción sobre enzimas clave como la adenosinatrifosfatasas y las fosfotransferasas [17]. A nivel macroscópico, el mecanismo de acción antibacteriana de los parabenos está vinculado a la membrana con la interrupción de la bicapa lipídica, lo que interfiere con los procesos de transporte de la membrana bacteriana y tal vez provocando la fuga de constituyentes intracelulares [18].

La familia de los parabenos tiene una excelente cobertura contra hongos y bacterias grampositivas. La evidencia de actividad antimicrobiana para los parabenos de uso

común muestra una amplia inhibición de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*, con una mayor inhibición de especies estafilocócicas, particularmente *Staphylococcus aureus* [19]. Se ha estudiado la potencia de los conservantes cosméticos, y las determinaciones de la concentración inhibitoria mínima (MIC) revelan que los parabenos son biocidas menos potentes en comparación con otros agentes comunes, como lo demuestran las concentraciones de MIC mucho más altas [20]. La actividad antimicrobiana también difiere en un grado significativo entre los parabenos. Dentro de un género bacteriano, los niveles de MIC pueden variar mucho; tal es el caso de las especies de *Salmonella*. Las combinaciones de parabenos se encuentran a menudo en las formulaciones finales, dependiendo de los diferenciales de solubilidad, la vida útil deseada y el espectro de actividad. Existe evidencia de una eficacia antimicrobiana mejorada con el uso de concentraciones más bajas de parabenos múltiples. La actividad biocida del parabeno aumenta con la longitud de la cadena de alquilo del hidrocarburo, mientras que la solubilidad simultáneamente disminuye drásticamente [21].

2.5.3 Metilparabeno

Es ampliamente utilizado como un conservante antimicrobiano en cosméticos, productos alimenticios, y formulaciones farmacéuticas. Se puede utilizar ya sea sólo o en combinación con otros parabenos. Es eficaz en un amplio intervalo de pH y tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana, aunque es más eficaz contra levaduras y mohos [22]. Aumenta la actividad antimicrobiana a medida que la longitud de cadena del resto alquilo se aumenta, disminuyendo su solubilidad acuosa; por lo tanto, se utiliza una mezcla de parabenos para proporcionar una conservación eficaz. La eficacia de conservación también se mejora por la adición de propilenglicol (2-5%), o mediante su combinación con otros agentes antimicrobianos. La baja solubilidad de los parabenos, (en particular la sal de sodio), eleva el pH de las formulaciones débilmente tamponadas. Metilparabeno (0,18%), junto con propilparabeno (0,02%) se ha utilizado para la conservación de diversas formulaciones farmacéuticas parenterales [23]. En la tabla 2.2 se recogen los usos del metilparabeno en diferentes preparaciones farmacéuticas y los rangos de concentraciones en las que se aplica.

TABLA 2.2 Usos del Metilparabeno en preparaciones farmacéuticas

Usos	Concentración (%)
IM, IV, inyecciones SC	0,065 – 0,25
Soluciones Inhalatorias	0,025 – 0,07
Inyecciones Intradérmica	0,10
Soluciones nasales	0,033
Preparaciones Oftálmicas	0,015 – 0,2
Soluciones orales y suspensiones	0,015 – 0,2
Preparaciones rectales	0,1 – 0,18
Preparaciones tópicas	0,02 – 0,3
Preparaciones vaginales	0,1 – 0,18

Fuente: [20].

2.5.4 Propilparabeno

Este compuesto se presenta como un polvo blanco o cristales incoloros pequeños; sin olor o con olor débil, ligeramente soluble en agua (se disuelve 1 gramo en 2 litros); soluble en aceites; ligeramente soluble en agua hirviendo; soluble en alcohol [24].

Como preservativo de preparados farmacéuticos se utiliza en concentraciones desde 0,05 % hasta 0,25%. Para la conservación de cosméticos que contienen grasas y aceites vegetales y animales, preservativo en alimentos, bebidas y productos cárnicos se usa en una dosificación de 0,1 % máximo; su forma de aplicación suele disolverse en agua caliente y luego incorporarse en el preparado, pero si la fórmula no contiene agua se puede disolver en alcohol, glicerina y aceites o grasas fundidas. En la tabla 2.3 se recogen los usos del propilparabeno en diferentes preparaciones farmacéuticas y los rangos de concentraciones en las que se aplica [25].

TABLA 2.3 Usos del Propilparabeno en preparaciones farmacéuticas

<i>Usos</i>	<i>Concentración (%)</i>
IM, IV, inyecciones SC,	0,005 – 0,2
Soluciones Inhalatorias	0,015
Inyecciones Intradérmica	0,02 – 0,26
Soluciones nasales	0,017
Preparaciones Oftálmicas	0,005 – 0,01
Soluciones orales y suspensiones	0,01– 0,02
Preparaciones rectales	0,02 – 0,01
Preparaciones tópicas	0,01 – 0,6
Preparaciones vaginales	0,02 – 0,1

Fuente: [20].

2.6 Metodología analítica para la determinación de parabenos.

La química analítica y, en particular, la ciencia de la separación de moléculas con fines analíticos juega un papel fundamental en todas las fases del desarrollo de fármacos, alimentos, bebidas y productos cosméticos. Por lo que hoy en día la identificación de los parabenos en diferentes tipos de matrices es de gran importancia en la búsqueda de controlar las dosis, los efectos secundarios y las reacciones adversas a largo plazo por su presencia en las diversas formulaciones [26, 27]; destacándose la aplicación de técnicas como espectrofotometría, electroquímica e incluso cromatografía. En la tabla 2.4 se realiza una comparación de metodologías analíticas para la determinación de estos parabenos en distintas muestras de interés, identificando que la cromatografía líquida de alta resolución es la más usada en la determinación de estos compuestos; evidenciándose el desarrollo de metodologías mediante nuevas tecnologías de cromatografía líquida de ultra definición.

TABLA 2.4 Comparación de metodologías analíticas para la determinación de Parabenos (metilparabeno y propilparabeno) en diversas matrices

<i>Matriz</i>	<i>Analitos</i>	<i>Método</i>	<i>Condiciones del método</i>	<i>Resultado</i>	<i>Fuente</i>
Tabletas efervescentes de cloruro de potasio	Determinación simultánea de la mezcla de parabenos y sus productos de degradación	HPLC-UV	<p>Columna: C18 (2,7 µm, 4,6 x 150 mm) Tipo de elución: Gradiente Composición fase móvil: Acido ortofosfórico 0,1 % en agua como disolvente A y agua, acetonitrilo y ácido ortofosfórico (100:900:1, v/v) como disolvente B. Flujo: 0,8 ml/min Temperatura de columna: 35°C. Volumen de inyección: 10 µL Longitud de onda: 254 nm.</p>	Separación óptima entre los picos de ácido p-hidroxibenzoico, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno en presencia de productos de degradación especificados y no especificados en la determinación del fármaco. Los coeficientes de correlación para todos los picos fueron >0,9999. Los resultados de los demás parámetros de validación se encontraron dentro de los límites.	[28]
Ensayo cutáneo in vitro de antitranspirantes en suero de 24 mujeres de 20 a 30 años de edad	Exposición a metilparabeno (MP) y propilparabeno (PP)	LC-MS/MS Determinación de niveles de MP y PP en suero en el rango de 10–100 µg/L	<p>Columna: C18 (150 x 4,6 mm; 5,0 µm) y precolumna (10 x 4 mm; 5 µm) Tipo de ionización: Electro pulverización en modo negativo Temperatura fuente de iones: 400 °C. Caudal gas de secado: 15 L/min Presión gas de colisión: Helio a 10 psi Tipo de elución: Isocrático Composición fase móvil: acetonitrilo-agua (75: 25, v/v) Flujo: 0,8 ml/min Temperatura de columna: 32°C. Volumen de inyección: 20 µL Tiempo de ejecución: 8 min</p>	Usando estos dos métodos, se evaluaron 20 antitranspirantes comerciales y solo tres mostraron MP y PP en la formulación. En este ensayo, tanto MP como PP impregnaron la piel; sin embargo, no hubo correlación entre el uso de antitranspirantes y la concentración sérica de parabenos en los voluntarios.	[29]
		LC-UV Determinación de niveles de MP y PP en antitranspirantes en el rango de 2 a 26 mg/L	<p>Columna: C8 (150 x 4,6 mm; 5,0 µm) Tipo de elución: Isocrático Composición fase móvil: agua y acetonitrilo (60:40, v/v) Flujo: 1,0 ml/min Temperatura de columna: 35°C. Volumen de inyección: 20 µL Tiempo de ejecución: 8 min Longitud de onda: 254 nm.</p>		

<i>Matriz</i>	<i>Analitos</i>	<i>Método</i>	<i>Condiciones del método</i>	<i>Resultado</i>	<i>Fuente</i>
Edulcorantes	Determinación simultánea de parabenos de metilo, etilo, propilo y butilo	VOC U-PLS/RBL Rango de 0,78–4,48 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Celda: Electroquímica 20 mL Sistema de electrodos: Referencia (Ag/AgCl en 3,0 mol L ⁻¹ KCl), Auxiliar (alambre de platino) y Trabajo (carbón vítreo (GCE) de aproximadamente 3,0 mm). Periodo de agitación: 10 s en circuito abierto Tiempo de reposo: 5 s Amplitud de pulso (a): 30 mV Incremento de potencial (ΔE_i): 5 mV Frecuencia (f): 30 s ⁻¹ Ventana de potencial (ΔE_w): de 0.8 a 1.20 V. Valores de frecuencia para U-PLS/RBL: 5 a 35 s ⁻¹ (con un incremento de 5 s ⁻¹)	Se obtuvieron resultados satisfactorios e imparciales con una respuesta lineal en el rango de 0,78–4,48 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y recuperaciones de 82,64 % a 121,77 %. Hasta donde saben los autores, aún no se ha informado en la literatura de un método voltamperométrico que determine simultáneamente cuatro parabenos en muestras complejas como edulcorantes sin ningún tratamiento previo.	[30]
Categorías de productos alimenticios listos para el consumo	Parabenos seleccionados: Metil (MeP), etil (EtP), propil (PrP), butil (BuP) e isobutilparabeno (isoBuP)	HPLC-PDA Rangos de: 0,025–500 Ig/g (MeP, EtP), 0,05–500 Ig/g (PrP) 0,125–1250 Ig/g (IsoBuP, BuP)	Columna: SymmetryC 18, 3,5 μm (4,6 75 mm) Tipo de elución: Isocrático Composición fase móvil: metanol/agua en la proporción 57:43, v/v Flujo: 1,0 ml/min Temperatura de columna: 35°C. Volumen de inyección: 10 μL Separación: 0,4 ml/min Tiempo de ejecución: 8 min Longitud de onda: 256 nm.	Las curvas de calibración basadas en matriz fueron lineales en el rango de 0,025–500 Ig/g (MeP, EtP), 0,05–500 Ig/g (PrP) y 0,125–1250 Ig/g (IsoBuP, BuP) con LOQ 0,025 Ig/g para MeP, EtP, 0,05 Ig/g para PrP, 0,125 Ig/g para BuP e isoBuP. El mayor contenido de parabenos se encontró en cereales y condimentos. Además, se calculó la ingesta diaria estimada de parabenos entre los adultos sauditas y se encontró que tenía un promedio de 2000 Ig/kgbw/día.	[31]
15 productos cosméticos para el cabello	Análisis cuantitativo de parabenos	HPLC-UV MEPS Rango de 0,05 a 4 g/mL	Columna: C18 (3,5 m ² , 1 \times 150 mm) Tipo de elución: Gradiente Composición fase móvil: A y B de agua y acetonitrilo. 15% B a 0–2.0min; 15–35 % B de 2,0–2,5 min; 35–70 % B de 2,5–20,0 min; 70–97 % B de 20,0–20,5 min; 97% B de 20.5–23.0 min. Flujo: 0,25 ml/min Temperatura de columna: 35°C. Volumen de inyección: 10 μL Tiempo de ejecución: 8 min Longitud de onda: 254 nm.	En condiciones óptimas, los arreglos de la línea para el análisis de PB en muestras cosméticas fueron de 0,05 a 4 g/mL con una precisión excelente. Los límites de detección (LOD) de PB en muestras cosméticas fueron de 2 a 5 ng/mL, y la recuperación de extracción osciló entre 89 y 105 %. Al comparar los cromatogramas de la muestra de champú diluido antes y después de MEPS, se mostraron los beneficios del enfoque desarrollado.	[32]

Matriz	Analitos	Método	Condiciones del método	Resultado	Fuente
formulación extemporánea de lisinopril	Indicador de estabilidad para lisinopril, producto de degradación de lisinopril (DKP), metilparabeno y propilparabeno	HPLC-UV	<p>Columna: C8 (250 mm × 4,6 mm d.i., 5 m); C8 (150 mm × 4,6 mm d.i., 5 m) y RP-8 (200 mm × 4,6 mm de d.i., 10 m)</p> <p>Composición fase móvil: Las fases móviles contenían composiciones variables de monohidrato dibásico de fosfato de potasio y acetonitrilo.</p> <p>Flujo: 1,00 ml/min</p> <p>Longitud de onda: 215 nm</p>	Sensibilidad con un límite de detección de 0,0075 g/ml (0,03 % de la concentración del método de lisinopril). Los elementos de validación mostraron que el método tiene una especificidad, recuperación, linealidad, estabilidad de la solución y precisión del método aceptables. Robustez aceptable indica que el método de ensayo no se ve afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas.	[33]
Agua	Identificar y cuantificar cuatro parabenos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y n-butilparabeno)	RDSE – UHPLC -ESI UHPLC - TOF/MS	<p>Columna: C18 (2,1 mm × 75 mm, 2,7 μm)</p> <p>Tipo de elución: Gradiente binario</p> <p>Composición fase móvil: (A) agua/acetato de amonio (5 mM) pH 6,5 y (B) metanol. 0-1 min, 0-90% B; 1-2 min, 90-95% B; 2-3 min, 95-100% B; 3-4 min, 100% B.</p> <p>Flujo: 0,3 ml/min</p> <p>Temperatura de columna: 20°C.</p> <p>Volumen de inyección: 10 μL</p> <p>Fuente de ionización: Electro pulverización doble sonda negativo</p> <p>Condiciones de la fuente: salida del capilar -100 V, voltaje del capilar 6000 V, caudal de gas 10 L min⁻¹.</p> <p>Temperatura del gas de secado: 300°C</p> <p>Presión del nebulizador: 80 psi.</p> <p>Rangos de espectros de masas: 100 a 1200 m/z</p>	Los límites de detección y precisión (%DER) fueron inferiores a 0,018 μg L ⁻¹ e inferiores a 9,7% para todos los parabenos, respectivamente, siendo mejores que trabajos similares. Se estudió el efecto matriz y las recuperaciones absolutas en muestras de agua corriente y aguas residuales, observándose supresiones de las señales para todos los analitos, y recuperaciones absolutas en torno al 60%. Esta metodología se aplicó al análisis de dos muestras de aguas residuales (puntuales y compuestas) ubicadas en Santiago de Chile.	[34]
Plasma humano	Análogos de bisfenol A (BPA) más relevantes (BPB, BPF, BPS y BPAF) y parabenos (propil, etil, butil y metilparabeno)	LC-MS/MS Cuadrupolo con trampa de iones lineales	<p>Columna: C18 (150 mm × 2:0 mm DI, tamaño de partícula de 5 μm) y precolumna C18 (4 mm de DI × 2:0 mm de longitud)</p> <p>Tipo de ionización: ionización negativa para bisfenoles y parabenos</p> <p>Temperatura fuente de iones: 400 °C.</p> <p>Caudal gas de secado: 15 L/min</p> <p>Gas nebulizador: Nitrógeno</p> <p>Tipo de elución: Gradiente a temperatura ambiente</p> <p>Composición fase móvil: acetato de amonio 2 mM (pH 6,7) bomba A y metanol en bomba B. 20 % de B, aumento de 98 % B a 6,00 min y constante hasta 9,00 min. 20 % de B a los 9,01 min y constante hasta 11,00 min.</p> <p>Flujo: 0,35 ml/min</p> <p>Temperatura de columna: 40°C.</p> <p>Volumen de inyección: 2 μL</p> <p>Tiempo de ejecución: 11 min</p>	El método se utilizó para analizar muestras de 150 voluntarios sanos de Malasia. No se detectó BPB en ninguno; sin embargo, el 99,3% fueron positivos para BPF. El 24% y 10,7% fueron positivos para BPAF y BPS, respectivamente. Un alto porcentaje fueron negativos para propilparabeno, etilparabeno, butilparabeno y metilparabeno (56%, 68%, 86,7% y 83,3%). Estos resultados sugieren que las personas en Malasia están expuestas a diferentes análogos de BPA y parabenos. Buena especificidad y selectividad, blancos no mostraron valores de área superiores al 15% del RT del analito. No hubo interferencia del RT del estándar externo.	[35]

2.7 Importancia de regulación de conservantes en preparaciones farmacéuticas

2.7.1 Estabilidad Farmacéutica

La estabilidad del componente activo en el producto final es un factor de gran importancia para el formulador. En general, las drogas son menos estables en medios acuosos que en el estado sólido; por lo tanto, es importante estabilizar y preservar en particular las soluciones, las suspensiones que contengan agua.

Los principales criterios que deben considerarse en la selección de un conservador son los siguientes:

- Su efectividad frente a un amplio espectro de microorganismos, estabilidad durante toda su vida útil, atóxico, no sensibilidad y compatibilidad con los componentes presentes en la forma farmacéutica.
- Barato y esencialmente desprovisto de sabor y olor.
- El sitio de uso: es decir, externo, interno u oftálmico.
- El pH del líquido, dado que este factor puede afectar la ionización y la estabilidad del conservador.
- El solvente, puesto que este factor afecta la solubilidad del conservador.
- La participación en la fase oleosa de una emulsión, lo que reduce la concentración en la fase acuosa en la que tiene lugar la acción conservadora.
- La adsorción en la fase sólida, de una suspensión, lo que reduce la concentración en la fase acuosa.
- Variables de procesamiento y envasado, como calor, orden de agregado de otros componentes, mezclado o materiales del envase.
- Tipo de forma farmacéutica, por ejemplo; solución, o suspensión.

El término estabilidad con respecto a formas farmacéuticas de medicamentos, se refiere a la integridad física y química de la unidad de dosificación de mantener la protección contra la contaminación microbiológica. La vida útil de la forma farmacéutica es el lapso desde la preparación inicial hasta la fecha de caducidad especificada. Las especificaciones de la monografía en cuanto a identidad, contenido, calidad y pureza se aplican a lo largo de toda la vida útil del producto.

Los parámetros de estabilidad de la forma farmacéutica de un medicamento pueden estar influenciados por condiciones ambientales de almacenamiento (temperatura, luz, aire y humedad), así como también por los componentes del envase.[36]

La estabilidad de las formas farmacéuticas fabricadas debe ser demostrada por el fabricante, utilizando métodos apropiados para ese fin. Las pruebas de la monografía podrían utilizarse para las pruebas de estabilidad si estas fueran indicadoras de estabilidad (es decir, si diferencian con exactitud entre las moléculas intactas del fármaco y sus productos de degradación). Las consideraciones de estabilidad deben incluir no solo los requisitos farmacopeicos específicos, sino también los cambios en la apariencia física del producto que advertirían a los usuarios si la integridad continuada del producto es cuestionable [37].

2.8 Validación

La validación de métodos es el proceso de garantizar que un procedimiento de prueba se desempeñe dentro de los estándares aceptables de confiabilidad, exactitud y precisión para su propósito previsto. Aunque la validación es requerida por ley y es

necesaria para todos los métodos regulatorios, la ejecución real de las actividades de validación está abierta a interpretación y las prácticas difieren mucho entre las organizaciones.

Un plan maestro de validación, aunque no es absolutamente necesario en un entorno experimental de laboratorio, es muy útil para la presentación de datos de descubrimiento posteriores y debe aclarar los objetivos, procedimientos y protocolos generales y priorizar los pasos de validación. Debe incluir una descripción del equipo que se utilizará con parámetros específicos como el rango dinámico de medición de la señal, los volúmenes de muestras que se medirán, etc. Aunque no todos los procedimientos de validación de laboratorio requieren todos estos principios, todos deben tenerse en cuenta al planificar el proceso de validación. Estos son: especificidad, linealidad, robustez, rango, límite de detección, límite de cuantificación, robustez, selectividad y sostenibilidad.

2.8.1 Proceso de validación de un método analítico

Cuando se desarrolla un método bioanalítico, es importante demostrar que es exacto y reproducible en el rango requerido de concentraciones para el analito en una matriz biológica particular.

Para el desarrollo y la validación de métodos de separación cromatográfica bioanalítica, existen recomendaciones de varias organizaciones nacionales e internacionales para garantizar que los datos proporcionados para aplicaciones clínicas y de marketing se adquieran de manera uniforme. Sin embargo, no existe una guía final única para la validación de métodos. Es importante comprender que el grado o extensión de los estudios necesarios para la validación del método depende del propósito de la validación [38].

Por lo tanto, el primer paso en la validación del método es definir el objetivo del método. Un método cuantitativo (monitoreo del paciente, potencia del producto final, nivel de impurezas y contaminantes) puede requerir más pasos de validación que un método cualitativo para la identidad de los componentes.

Se requiere una validación completa del método cuando se desarrolla un nuevo método o cuando se agregan analitos adicionales a un ensayo ya existente. La validación parcial es una modificación a un método ya aceptado cuando no se necesita una validación completa. Los cambios de método que se incluirían en esta categoría son la transferencia de un método entre laboratorios, el uso de hardware o software nuevo para la adquisición de datos, los cambios en las matrices bioanalíticas, la demostración del analito en presencia de metabolitos específicos, la demostración del analito en presencia de tratamientos concomitantes o contaminantes adicionales, un cambio en los parámetros del método analítico y un cambio en el procesamiento de las muestras o el uso de matrices raras. La validación cruzada compara los resultados obtenidos con dos métodos analíticos diferentes y es necesaria cuando los datos del mismo estudio se analizan con dos o más métodos [39].

El establecimiento de un método validado se basa en los parámetros de exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. Las pautas de

varias agencias reguladoras nacionales e internacionales están en general de acuerdo sobre los requisitos para estos parámetros. Para los métodos proteómicos, el número de analitos es enorme y el trabajo con todos los analitos puede resultar poco práctico; por lo tanto, se puede usar una pequeña cantidad de analitos (por ejemplo, 10) en un rango de pesos moleculares e hidrofobicidad para establecer y validar el método. Una vez que se establece y valida un método, se debe preparar una descripción detallada del método en la forma de un protocolo operativo estándar.

2.8.2 Categorías de la validación

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación [37].

Para cada categoría, se requiere diferente información analítica. En la tabla 2.5 se indican los parámetros que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

TABLA 2.5 Categorías de prueba

<i>Categoría de prueba</i>	<i>Categoría I</i>	<i>Categoría II</i>	<i>Categoría III</i>	<i>Categoría IV</i>	
	Cuantificación de componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.	Determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados.	Determinación de características de desempeño (disolución, liberación de fármacos, etc.)	Pruebas de identificación	
<i>Parámetro de Desempeño</i>	<i>Principio(s) activo(s)</i>	<i>Impurezas</i>		<i>Disolución y Desempeño físico</i>	<i>Identificación</i>
		<i>Cuantitativos</i>	<i>Pruebas de límite</i>		
Selectividad / Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Límite de Detección	No	No	Si	*	No
Límite de Cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Intervalo	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Exactitud / Veracidad	Si	Si	*	*	No

Fuente: [37].

2.9 Características del desempeño analítico

2.9.1 Linealidad del intervalo

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. En esta sección, la "linealidad" se refiere a la linealidad

de la relación entre la concentración y la medida de valoración. En algunos casos, para lograr la linealidad, puede ser necesario transformar la concentración y/o la medida, donde en algunos casos, los factores de corrección usados en el análisis de regresión pueden cambiar. Las transformaciones posibles pueden incluir el logaritmo, la raíz cuadrada, o el recíproco, aunque otras transformaciones son aceptables. Si no se puede lograr la linealidad, se puede utilizar un modelo no lineal. El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de concentración en función de la respuesta, ya sea lineal o no lineal [39].

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento analítico.

2.9.2 Selectividad

Los documentos de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) definen especificidad a la capacidad de valorar de manera indiscutible el analito en presencia de aquellas sustancias previsible dentro de la matriz, tales como contaminantes, productos de degradación y componentes propios de la misma. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios. La IUPAC y AOAC optan por el término “selectividad,” utilizando el término “especificidad” para aquellos procedimientos totalmente selectivos, tales como:

- Pruebas de identificación: Garantizan la identidad del analito.
- Pruebas de pureza: Garantizan que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de un analito (por ejemplo, prueba de sustancias relacionadas, límite de metales pesados o impurezas orgánicas volátiles).
- Valoraciones: Proporcionan un resultado exacto, que permite una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra.

2.9.3 Límite de detección

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite; se refiere a la cantidad mínima de analito capaz de ser detectado en una muestra, sin necesidad de ser cuantificado, en las condiciones experimentales indicadas siendo expresado comúnmente como concentración del analito en la muestra (porcentaje, partes por billón, entre otras). Estas pruebas demuestran que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado [38].

2.9.4 Límite de cuantificación

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con Precisión y Exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas; aplicado comúnmente en aquellas valoraciones cuantitativas en donde el analito se encuentra en baja concentración en la matriz a ser analizada. Algunos de estos analitos pueden ser: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en

productos farmacéuticos terminados. Este límite, se expresa habitualmente como concentración del analito en la muestra (porcentaje, partes por billón, entre otras).

2.9.5 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero; esta debe establecerse en todo su intervalo. En los documentos ICH se define a la exactitud como la ausencia de sesgo, mientras que para el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM) y en los documentos de la Organización Internacional de Normalización (ISO), la “exactitud” combina los conceptos de ausencia de sesgo (nombrada mediante el término “veracidad”) y precisión [39].

2.9.6 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación. En este contexto, la reproducibilidad se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios, como por ejemplo en un estudio en colaboración. La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo, en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período corto por el mismo analista con el mismo equipo [40].

2.9.7 Curva de calibración, linealidad y sensibilidad

La curva de calibración define la relación entre la respuesta del detector y la concentración del analito en la matriz de la muestra. Para múltiples analitos, se genera una curva de calibración de muestra para cada analito. Para ajustar la curva estándar, se usa el algoritmo más simple que describe la relación concentración/respuesta. Por lo tanto, el algoritmo puede ser lineal o no lineal, pero debe minimizar el error relativo porcentual. La curva de calibración debe constar de cinco a ocho puntos que cubran todo el rango de concentraciones esperadas del analito en las muestras de prueba, es decir, de 0 a 200% del contenido teórico. La concentración más baja debe ser el LLOQ y la concentración más alta debe ser el límite superior de cuantificación (ULOQ). Si los resultados del analito de la muestra caen fuera del rango de LLOQ o ULOQ, la muestra se debe diluir en la matriz y se debe preparar una nueva curva estándar en la matriz.

El LLOQ es la concentración más baja que se puede definir con exactitud y precisión. Para definir el LLOQ se deben utilizar al menos cinco muestras independientes de los estándares y determinar el CV o intervalo de confianza. Las condiciones para definir el LLOQ incluyen una respuesta de al menos cinco veces la respuesta en blanco y una precisión máxima de 80-120 % y una precisión del 20 %. Para los métodos cromatográficos, el LLOQ se basa en la relación señal-ruido (S/N). La señal y el ruido de línea base se definen como la altura del pico del analito (señal) y la amplitud entre

el punto más alto y el más bajo del ruido de línea base en el área. alrededor del pico del analito. Por lo general, se requiere que el S/N para LLOQ sea 10. El LLOQ no es el límite de detección, que es la concentración más baja que el método puede diferenciar de manera confiable del ruido de fondo.

2.9.8 Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico.

2.9.9 Aptitud del sistema

Si las mediciones son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, éstas deben controlarse adecuadamente o debe incluirse una advertencia en el procedimiento. Una consecuencia de la evaluación de la tolerancia y la Robustez debería ser que se establezca una serie de parámetros de aptitud del sistema para asegurar que la validez del procedimiento analítico se mantiene cada vez que se usa. Variaciones típicas son la estabilidad de soluciones analíticas, diferentes equipos y diferentes analistas. En la cromatografía de líquidos, las variaciones habituales son el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. En el caso de cromatografía de gases, son variaciones típicas los diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo.

Las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Los parámetros de prueba de la aptitud del sistema que deben establecerse para un procedimiento específico dependen del tipo de procedimiento que se está evaluando.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

El presente proyecto de investigación es de carácter experimental cuantitativo integrando la investigación teórica con la práctica mediante la comprobación de la hipótesis en base a evidencias obtenidas de la observación, reuniendo así varios procesos y técnicas de investigación científica, y habiéndose ejecutado bajo la modalidad experimental. La investigación cualitativa y cuantitativa permitió analizar estadísticamente los resultados.

El estudio se desarrolló en el Departamento de Validación de Laboratorios Acromax S.A. de Guayaquil, Ecuador. La muestra analizada corresponde a un producto manufacturado dentro de la compañía, tratándose de 500mL de un micro lote de jarabe de Acetaminofén de dosis 150mg/5mL, cuya composición por cada mililitro se detalla en la tabla 3.1.

TABLA 3.1 Composición por mililitro del Jarabe Acetaminofén

<i>Acetaminofén 150mg/5mL Jarabe</i>		
Componentes	UM	mg
<i>Principio Activo</i>		
Acetaminofén	mg	32
<i>Excipientes</i>		
Fosfato de Sodio Dibásico Anh USP	mg	-
Ácido Citrico Anhidro USP	mg	-
Glicerina 99.5% USP-BP	mg	-
Metil Parabeno NF	mg	1,8
Propil Parabeno NF-BP	mg	0,2
Sorbitol Líquido 70% NF	mg	-
Polietilenglicol 600 NF(Carbowax)	mg	-
Sacarina Sodica Polvo USP	mg	-
Saborizante a Uva 3MF48990	mg	-
Allura Red FD&C #40 FD&C CI 16035	mg	-
Colorante Azul # 1 FD & C CI 42090	mg	-
Agua Purificada C.S.P.	mL	1

Nota: Por protección de propiedad intelectual se reserva la información de cantidades completas en la formula cuali-cuantitativa.

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

Para el desarrollo del método analítico y validación se empleó: Metanol grado HPLC, Acetonitrilo grado HPLC, y Ácido Trifluoroacético marca Sigma Aldrich; Hidróxido de amonio marca Merck y Agua tipo 1 obtenida de una unidad de purificación Milli-Q Type 1 Ultrapure Water Systems.

Los estándares de trabajo utilizados son: Metil Parabeno 99,93% de Sigma – Aldrich y Propil Parabeno 99,80% de USP, en ambos casos como patrones certificados.

3.1.2 Equipos

Balanza Mettler Toledo, Microbalanza Sartorius, Desgasificador Kendall, Potenciómetro Mettler Toledo, Agitador Lineal, Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficacia UPLC #2 y #3, Waters Acquity HClass con la siguiente configuración:

- Módulo 1: Bomba cuaternaria con sistema de desgasificación integrado.
- Módulo 2: Inyector automático el sistema está compuesto por un administrador de muestras con capacidad para 2 platos de 48 viales pudiéndose ampliar con un automuestreador con capacidad de 10 platos dando un total de 12 platos para análisis de 576 muestras, adicionalmente el sistema cuenta con una aguja de flujo continuo (SM-FTN).
- Módulo 3: Detector matriz de fotodiodos (PDA) con longitud de onda variable, permitiendo el funcionamiento simultáneo en 2D y 3D en el software Empower™. Longitudes de onda de 190 a 500 nm y hasta 2,0 AU sin sacrificar la linealidad. desviación de 1,3% a 2,0 AU y desviación de 5,0% a 2,8 AU.

3.2 TÉCNICAS Y MÉTODOS

3.2.1 Condiciones cromatográficas

- ✓ **Diluyente de muestra:** Agua tipo 1 : Metanol (50:50)
- ✓ **Fase Móvil:** Acetonitrilo : Buffer TFA 0,1% (v/v) pH 2,50
- ✓ **Modo:** Gradiente (Ver tabla 3.2)

TABLA 3.2 Tabla de Gradiente

<i>Tiempo</i>	<i>Flujo ml/min</i>	<i>Acetonitrilo</i>	<i>Buffer Ácido Trifluoracético 0,1%(v/v) pH 2,50</i>	<i>Curva</i>
Inicio	1,000	38	62	Inicio
4	1,000	38	62	6
6	1,000	48	52	6
9	1,000	48	52	6
11	1,000	38	62	6
13	1,000	38	62	6

- ✓ **Flujo:** 1,000 mL /min.
- ✓ **Temperatura de columna:** 30°C ± 3°C
- ✓ **Temperatura del sample:** 20°C ± 5°C
- ✓ **Detector:** Longitud de onda a 254nm con ancho de banda 1,2nm.
- ✓ **Velocidad de Muestreo:** 10 puntos/sec

✓ **Volumen de Inyección:** 2,0 μ L

✓ **Tiempo de análisis:** 13 min

3.2.2 Preparación de Buffer TFA pH 2,50

Se colocó 900mL de Agua tipo 1 en un recipiente, se añadió 1,0mL de ácido trifluoroacético, se agitó y ajustó a pH 2,50 con Hidróxido de Amonio concentrado, se mezcló y llevó a volumen de 1000mL con Agua tipo 1.

3.2.3 Preparación de las Soluciones de Trabajo

Se llegó a una concentración aproximada de 0,072mg/mL de Estándar de Metil Parabeno, 0,008mg/mL de Estándar de Propil Parabeno, 0,072mg/L de Metil Parabeno en Muestra de Termax Jarabe y 0,008mg/L de Propil Parabeno en Muestra de Termax Jarabe. Se filtraron las muestras y Estándar a través de Filtros de Polivinildenedifloride (PVDF) de 0,22 μ m.

3.2.4 Preparación de la solución estándar madre de 0,18mg/mL Metil Parabeno

Se pesó aproximadamente 3,6mg de Estándar de Metil Parabeno y se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 20mL, se disolvió con 5mL de diluyente y se sonicó por 1 minuto aproximadamente hasta disolución, se llevó a volumen con diluyente y se mezcló.

3.2.5 Preparación de la solución estándar madre de 0,08mg/mL Propil Parabeno

Se pesó aproximadamente 1,6mg de Estándar de Propil Parabeno y transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 20mL, se disolvió con 5mL de diluyente y se sonicó por 1 minuto aproximadamente hasta disolución, se llevó a volumen con diluyente y se mezcló.

3.2.6 Preparación de la solución estándar de mezcla de patrones (0,072mg/mL de Metil Parabeno y 0,008mg/mL de Propil Parabeno)

Se tomó una alícuota de cada solución madre: 8mL de Estándar Madre de Metil Parabeno y 2mL de Estándar Madre de Propil Parabeno. Se llevó a un matraz volumétrico de 20mL, se llevó a volumen con diluyente y se mezcló. Esta solución se utiliza tanto para aptitud del sistema como para la evaluación de los ensayos de validación

3.2.7 Preparación de solución muestra (0,072mg/mL de Metil Parabeno y 0,008mg/mL de Propil Parabeno)

Se midió por triplicado un volumen de 2mL de Jarabe equivalente a (3,6mg de Metil Parabeno y 0,4mg de Propil Parabeno) a continuación se llevó a un matraz volumétrico de 50mL y se llevó a volumen con el diluyente y se mezcló.

3.2.8 Procedimiento

Las diferentes soluciones estándar y de muestra fueron filtradas mediante filtros PVDF 0,22 μ m, descartando los 5 primeros mililitros, luego se procedió a inyectar volúmenes de 2,0 μ L del estándar y de la muestra por separado. Se procedió a registrar en los cromatogramas las áreas de los picos, tiempos de retención correspondientes de Metil Parabeno y Propil Parabeno, platos teóricos, desviación estándar y tailing.

3.2.9 Cálculos de concentración

Metil Parabeno

$$X = \left(\frac{r_u}{r_s}\right) \times (C_s) \times \left(\frac{P_s}{100}\right) \times \left(\frac{FD}{PA}\right) \times 100$$

Dónde:

- X** = Porcentaje de Metil Parabeno (%)
- ru** = Respuesta del Pico de Metil Parabeno de la Solución Muestra
- rs** = Respuesta del Pico de Metil Parabeno de la Solución Estándar
- Cs** = Concentración de Metil Parabeno en la solución estándar (mg/mL)
- Ps** = Potencia del Estándar (%)
- FD** = Factor de Dilución de la muestra
- PA** = Cada 2mL de Jarabe contiene 3,6mg de Metil Parabeno.

Propil Parabeno

$$X = \left(\frac{r_u}{r_s}\right) \times (C_s) \times \left(\frac{P_s}{100}\right) \times \left(\frac{FD}{PA}\right) \times 100$$

Dónde:

- X** = Porcentaje de Propil Parabeno (%)
- ru** = Respuesta del Pico de Propil Parabeno de la Solución Muestra
- rs** = Respuesta del Pico de Propil Parabeno de la Solución Estándar
- Cs** = Concentración de Propil Parabeno en la solución estándar (mg/mL)
- Ps** = Potencia del Estándar (%)
- FD** = Factor de Dilución de la muestra
- PA** = Cada 2mL de Jarabe contiene 0,4mg de Propil Parabeno.

3.3 Criterio de aceptación

Los criterios de aceptación para verificación del presente estudio se corresponden con lo indicado por la AOAC en sus directrices para la validación en un solo laboratorio de métodos químicos para suplementos dietéticos y productos botánicos, los cuales se detallan en la tabla 3.4., destacando la importancia en la evaluación de recuperación y precisión.

3.4 Adquisición y Procesamiento de Datos

La información obtenida durante el método cromatográfico fue procesada mediante el software Empower 3.

3.5 Programa y Objetivos de validación

El programa de validación y los objetivos de validación se basaron en los criterios de la USP-NF en su capítulo 1225 Validación de procedimientos Farmacopeicos. Para la constatación de la idoneidad del método propuesto y demostrar que cumple con los requerimientos establecidos, se realizó un programa de validación con los objetivos de validación según directrices de la USP-NF en su capítulo 1225.

Las curvas de calibrado se trabajaron en un rango de cinco niveles diferentes para cada parabeno, los cuales fueron desde el 60% hasta el 140%, siendo los equivalentes en concentración (mg/mL) las detalladas en la tabla 3.3.

TABLA 3.3 Concentración de curva de calibración de metilparabeno y propilparabeno

<i>Parabeno</i>	<i>Concentración en mg/mL</i>				
	60%	80%	100%	120%	140%
Metilparabeno	0,043	0,058	0,072	0,087	0,101
Propilparabeno	0,005	0,006	0,008	0,010	0,011

3.6 Características de desempeño del método de análisis

Las características de desempeño para los siguientes parámetros: adecuación y aptitud del sistema, pureza de pico, especificidad, reacciones inducidas, límite de detección y cuantificación, linealidad del sistema y método, exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, robustez y retención de filtro se describen en la tabla 3.4.

TABLA 3.4 Características de desempeño de los parámetros ensayados

<i>Parámetro</i>	<i>Característica de desempeño</i>
Adecuación del sistema (Tiempo Muerto)	<ol style="list-style-type: none">Descripción: Tiempo que tarda en eluir un soluto que no interacciona con la fase estacionaria.Procedimiento: Inyección por triplicado de una muestra de Uracilo en las condiciones establecidas por la metodología analítica. Determinación del tiempo de retención promedio, el cual nos sirve para calcular el factor de capacidad k'Criterio de Aceptación: Factor de capacidad no menor de 2 y no mayor de 20 con respecto al pico principal.
Aptitud del Sistema	<ol style="list-style-type: none">Descripción: Conjunto de ensayos que permite comprobar en el momento de utilización del método que el sistema es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método.Procedimiento: Preparar soluciones estándar stock y a partir de estas preparar las diluciones necesarias para obtener una solución a una concentración de 0,072 mg/mL de Metil parabeno y 0,008 mg/mL de Propil parabeno correspondiente al 100% de concentración. Realizar 6 inyecciones en el sistema cromatográfico.Criterio de Aceptación: Se recomienda una eficiencia de mínimo 1700 platos teóricos, una desviación estándar relativa (RSD%) para inyecciones repetidas no mayor a 2,0% para los picos de Metil y Propil parabeno con un Factor de asimetría no mayor de 2,0%.
Pureza de Pico	<ol style="list-style-type: none">Descripción: Se demostrará que la señal del pico principal (analito de interés) es espectralmente puro, lo cual indica que el pico cromatográfico del analito es atribuible sólo a una especie química.Procedimiento: Inyección de una solución estándar y muestra al 100% y leer en PDA de 190nm a 400 nm según lo amerite el analista.Criterio de Aceptación: El ángulo de pureza será menor al límite/umbral de pureza.

Parámetro	Característica de desempeño																				
Especificidad	<p>1. Descripción: Se demostrará que el método es capaz de discriminar sin interferencias entre el analito, sustancia de composición similar y otros productos que puedan estar presentes en la muestra como impurezas.</p> <p>2. Procedimiento: Analizar el placebo solo (matriz), estándar y muestra más placebo a una concentración de 0,072 mg/mL de Metil parabeno y 0,008 mg/mL de Propil parabeno correspondiente al 100% de concentración. Si es requerido, analizar también la solución diluyente, impurezas conocidas, la fase móvil. Analizar las muestras mínimo por duplicado. Analizar las muestras antes y después de estufa. Se someten las muestras a condiciones extremas para verificar su estabilidad y/o degradación. Condiciones: Temperatura: 45°C ± 2°C Tiempo 72 horas Para determinar el porcentaje de impurezas no identificadas aplicar la siguiente formula:</p> $I = \frac{A_i}{A_t} * 100$ <p><i>I:</i> % individual de impurezas de interés, expresado en área/área <i>A_i:</i> Área de la impureza de interés en el cromatograma de la solución muestra <i>A_t:</i> Área promedio del cromatograma de la solución muestra Para determinar el % total de impurezas aplicar la fórmula:</p> $T = \sum(I)$ <p>3. Criterio de Aceptación: Identidad del pico: Ausencia de coelución, pureza de pico (El ángulo de pureza será menor al límite/umbral de pureza). % individual de impurezas: No más de 1,0% área/área % total de impurezas: No más de 2,0% área/área</p>																				
Reacciones Inducidas	<p>1. Descripción: Se someten las muestras a condiciones de estrés para generar degradantes potenciales.</p> <p>2. Procedimiento: Analizar el estándar, placebo solo y muestra más placebo de acuerdo con el método analítico. Someter el estándar, placebo y la muestra a condiciones de estrés:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Condiciones</th> <th>Temperatura (°C)</th> <th>Reactivo</th> <th>Cantidad</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Hidrólisis</td> <td>80</td> <td>H₂O</td> <td>2mL</td> </tr> <tr> <td>Hidrólisis Ácida</td> <td>80</td> <td>HCl 1N</td> <td>2mL</td> </tr> <tr> <td>Hidrólisis Básica</td> <td>80</td> <td>NaOH 1N</td> <td>2mL</td> </tr> <tr> <td>Oxidación</td> <td>80</td> <td>H₂O₂ 3%</td> <td>2mL</td> </tr> </tbody> </table> <p>Adicional a este procedimiento se somete el estándar, placebo y muestra a radiación ultravioleta por un periodo de 8H.</p> <p>3. Criterio de Aceptación: Identidad del pico: Ausencia de coelución, pureza de pico (El ángulo de pureza será menor al límite/umbral de pureza). % individual de impurezas: No más de 1,0% área/área % total de impurezas: No más de 2,0% área/área</p>	Condiciones	Temperatura (°C)	Reactivo	Cantidad	Hidrólisis	80	H ₂ O	2mL	Hidrólisis Ácida	80	HCl 1N	2mL	Hidrólisis Básica	80	NaOH 1N	2mL	Oxidación	80	H ₂ O ₂ 3%	2mL
Condiciones	Temperatura (°C)	Reactivo	Cantidad																		
Hidrólisis	80	H ₂ O	2mL																		
Hidrólisis Ácida	80	HCl 1N	2mL																		
Hidrólisis Básica	80	NaOH 1N	2mL																		
Oxidación	80	H ₂ O ₂ 3%	2mL																		
Límite de Detección (LOD)	<p>1. Descripción: Es un parámetro de prueba límite. Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas.</p> <p>2. Procedimiento: De manera estadística calcular el límite de detección (LOD) a partir de la linealidad del sistema de acuerdo con la siguiente fórmula:</p> $LOD = 3,3 * \frac{Desviación\ St\ Residual}{Pendiente}$ <p>3. Criterio de Aceptación: n/a</p>																				

Parámetro	Característica de desempeño
Límite de Cuantificación (LOQ)	<p>1. Descripción: Es un parámetro para ensayos cuantitativos de bajos niveles de compuestos en matrices de muestras, tales como impurezas en muestras activas o productos de degradación en productos terminados. Es la concentración de muestra en un analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones experimentales establecidas.</p> <p>2. Procedimiento: De manera estadística calcular el límite de cuantificación (LOQ) a partir de la linealidad del sistema de acuerdo con la siguiente fórmula:</p> $LOQ = 10 * \frac{Desviación\ St\ Residual}{Pendiente}$ <p>3. Criterio de Aceptación: Coeficiente de Variación no mayor al 10%</p>
Linealidad del sistema	<p>1. Descripción: La linealidad evalúa la capacidad del procedimiento analítico de obtener una respuesta que es directamente proporcional a la concentración del analito dentro de un rango determinado.</p> <p>2. Procedimiento: Preparar un mínimo de cinco (5) concentraciones de estándar dentro del rango establecido, de acuerdo con la categoría del método. Analizar cada concentración por triplicado y por alícuotas a partir de una solución madre. Los intervalos recomendados para realizar la curva de linealidad son de 60%-80%-100%-120%-140%.</p> <p>3. Criterio de Aceptación:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Gráfico de la curva de calibración visualmente lineal. ✓ Valor del Intercepto, de la pendiente, coeficiente de Correlación, coeficiente de Determinación cercanos a la unidad. ✓ Ecuación de la recta de regresión que matemáticamente exprese una recta. ✓ Calcular el promedio de los factores de respuesta (f) y determinar su desviación estándar relativa. Valores superiores al 5,0% indica una posible falta de linealidad.
Linealidad del método	<p>1. Descripción: Permite demostrar que el procedimiento analítico proporciona linealidad aceptable cuando se aplica a muestras que contienen matriz enriquecida con principio activo.</p> <p>2. Procedimiento: Preparar un mínimo de cinco (5) concentraciones de muestras (Principio activo + Placebo) dentro del rango establecido, de acuerdo con la categoría del método. Analizar cada concentración por triplicado y en pesadas independientes. Los intervalos recomendados para realizar la curva de linealidad son de 60%-80%-100%-120%-140%.</p> <p>3. Criterio de Aceptación:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Gráfico de la curva de calibración visualmente lineal. ✓ Valor del Intercepto, de la pendiente, coeficiente de Correlación, coeficiente de Determinación cercanos a la unidad. ✓ Ecuación de la recta de regresión que matemáticamente exprese una recta. ✓ Calcular el promedio de los factores de respuesta (f) y determinar su desviación estándar relativa. Valores superiores al 5,0% indica una posible falta de linealidad.
Exactitud del método	<p>1. Descripción: La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado como valor verdadero o valor de referencia y el valor experimental encontrado.</p> <p>2. Procedimiento: Preparar tres (3) niveles de concentración de muestra cubriendo el intervalo especificado del método, estos niveles deben prepararse por triplicado y deben inyectarse o ser leídos por duplicado en forma creciente. Preparar muestras (Principio activo + Placebo) en concentraciones dentro del rango especificado (60%, 100%, 140%). Realizar lecturas de absorbancia y áreas de picos cromatográficos. Calcular el porcentaje de recuperación de cada concentración de los resultados obtenidos y realizar el test de Cochran.</p> <p>3. Criterio de Aceptación: Test de Cochran experimental debe ser menor al de Tabla y la recuperación dentro de especificación; para metil parabeno en concentración de 0,18% un límite de recuperación de 95 a 105% y para propil parabeno en concentración de 0,02% un límite de recuperación de 90 a 107% [40].</p>

<p align="center">Precisión Intermedia del método</p>	<ol style="list-style-type: none"> Descripción: Se divide en repetibilidad del método y precisión intermedia donde la repetibilidad se la obtiene del cálculo del RSD% de los 3 niveles de exactitud. La precisión intermedia estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes. Esta prueba requiere realizarla en 2 días diferentes con la participación de 2 analistas (Analista A y Analista B), en dos equipos. Procedimiento: Preparar dos soluciones estándar stock y a partir de estas preparar las diluciones necesarias para obtener concentraciones de estándar correspondiente al 100% de concentración. Preparar muestras (Principio activo + Placebo) al 100%. Realizar lecturas de áreas de picos cromatográficos. Criterio de Aceptación: Calcular el promedio de los resultados obtenidos en porcentaje de lo declarado, realizando el estudio estadístico de desviación estándar relativa (RSD%), debiendo cumplir con las siguientes especificaciones: metil parabeno en concentración de 0,18% una desviación estándar relativa de 3,7% y para propil parabeno en concentración de 0,02% una desviación estándar relativa de 5,3%; Repetibilidad del método Metil parabeno RSD% 1,94; Propil parabeno RSD% 3,88 [40]. 										
<p align="center">Robustez</p>	<ol style="list-style-type: none"> Descripción: Capacidad de un método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros. Procedimiento: Identificar de 4 factores que puedan tener un efecto significativo en el desempeño del método y variar ligeramente cada uno ellos utilizando un diseño factorial. <ul style="list-style-type: none"> ✓ Preparar un Estándar al 100% de la concentración. ✓ Analizar la muestra por triplicado con cada serie de variaciones. ✓ Calcular el % de recuperación y desviación estándar relativa de las diferentes variaciones. ✓ Determinar si el método es robusto frente a las variaciones establecidas de: <table border="1" data-bbox="395 1048 1465 1249"> <thead> <tr> <th>Variables</th> <th>Valoración de conservantes</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Temperatura de la columna (°C)</td> <td align="center">✓</td> </tr> <tr> <td>Flujo (mL/min)</td> <td align="center">✓</td> </tr> <tr> <td>Volumen de Inyección (uL)</td> <td align="center">✓</td> </tr> <tr> <td>Fase Móvil</td> <td align="center">✓</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Aplicar el diseño factorial de Plackett-Burman. ✓ Calcular el efecto factor (E_x) mediante: $E_x = \frac{\sum y(+)}{n/2} - \frac{\sum y(-)}{n/2}$ ✓ Indicar los factores que más influyen en el resultado final. Criterio de Aceptación: n/a 	Variables	Valoración de conservantes	Temperatura de la columna (°C)	✓	Flujo (mL/min)	✓	Volumen de Inyección (uL)	✓	Fase Móvil	✓
Variables	Valoración de conservantes										
Temperatura de la columna (°C)	✓										
Flujo (mL/min)	✓										
Volumen de Inyección (uL)	✓										
Fase Móvil	✓										
<p align="center">Retención de Filtro</p>	<ol style="list-style-type: none"> Descripción: El estudio de retención de filtro es una comparación de soluciones filtradas y sin filtrar durante la validación del método, para determinar si el filtro que se utiliza retiene algún compuesto activo o contribuye con algún componente desconocido en el análisis. Procedimiento: Preparar una solución muestra (principio activo + placebo) y Estándar al 100%. Filtrar una porción de la solución muestra y estándar en un Filtro (A) y Filtro (B) sin saturarlo y comparar sus áreas con las obtenidas a partir de la solución muestra y estándar centrifugadas durante 20 minutos a 3000 rpm. Criterio de Aceptación: Las soluciones filtradas se consideran aceptables, si la diferencia entre el área de la muestra y estándar filtrada y el área de la muestra y estándar centrifugada no varía más de 1,5% (absoluto). Ver criterio de aceptación del parámetro de exactitud del método. 										

3.7 DISEÑO ESTADÍSTICO DE LA VALIDACIÓN

El estudio estadístico se realizó mediante el análisis de regresión simple con la finalidad de obtener, a través de la aplicación de la curva de calibrado, la ecuación lineal que establece la relación entre las variables de concentración y señal. Frente al valor de intercepto y pendiente de la recta se ha podido establecer la relación de las áreas entre los analitos de las disoluciones patrón y los analitos en muestra. En complemento, mediante aplicación del programa de Excel se ha ejecutado el análisis de Test de Student con un intervalo de confianza de 95%. El parámetro de exactitud fue analizado mediante Test de Cochran, además de Test de Student con un nivel de significancia del 5%, determinándose el coeficiente de correlación e intervalos de predicción en el proceso de validación. Mientras que, la evaluación de los ensayos de robustez del método se midió mediante el diseño factorial de Plackett-Burman. Los resultados de porcentajes de recuperación para cada nivel y los datos de precisión por repetibilidad y reproducibilidad fueron evaluados a partir de un análisis de varianza de un factor mediante la aplicación del programa de Excel.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

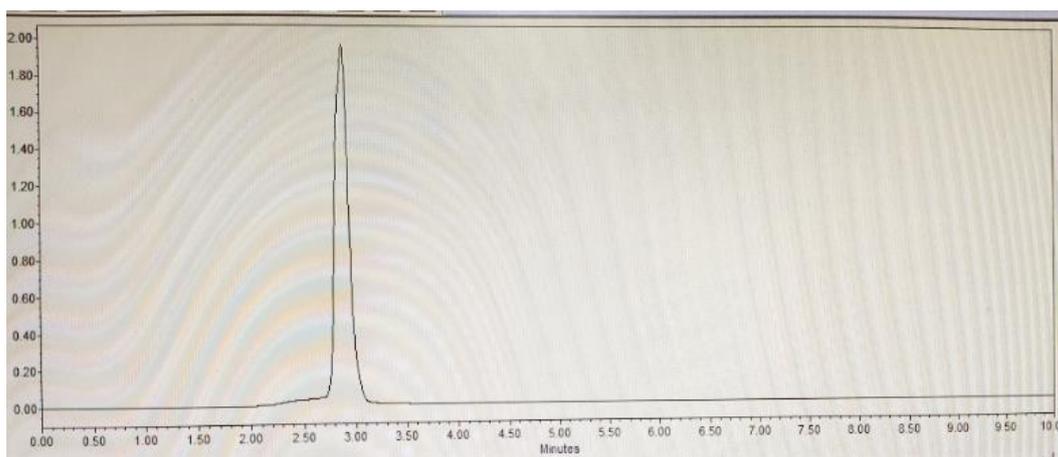
4.1. Método desarrollado

Durante la prueba 1 cuyas condiciones del método se pueden ver en la tabla 4.1.1, se obtuvo un pico del metilparabeno con factor de asimetría superior al 2%, un factor de capacidad fuera de especificación y el pico del propilparabeno sin eluir, tal como se muestra en la figura 4.1.1.

TABLA 4.1.1 Condiciones cromatográficas de la Prueba 1

Columna	Phenomenex Luna C18 5um 4,6x150mm
Volumen de Inyección	3uL
Fase Móvil	Buffer pH 4,5 - 2mL Ácido Acético - 1g Acido 1-Pentan Sulfonato - Acetonitrilo 38% - Buffer 62%
Modo Cromatográfico	Isocrático
Flujo	0,800 mL/min

Figura 4.1.1 Cromatograma obtenido de la Prueba 1

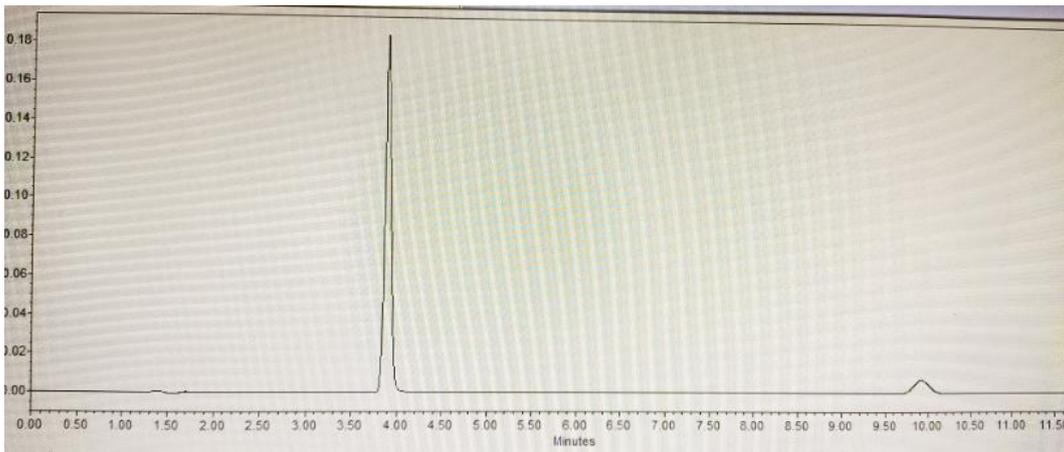


Durante la prueba 2 cuyas condiciones del método se pueden ver en la tabla 4.1.2, se obtuvieron picos de metil y propil parabeno presentes con un factor de asimetría y platos teóricos dentro de especificación, pero con un factor de capacidad menor a 2, adicionalmente se evidencia que el pico del metil parabeno no es puro; tal como se puede observar en la figura 4.1.2.

TABLA 4.1.2 Condiciones cromatográficas de la Prueba 2

Columna	Thermo Synchronis C18 5um 4,6x150mm
Volumen de Inyección	2uL
Fase Móvil	Buffer pH 2,5 - 1mL Ácido Trifluoracético - Acetonitrilo 40% - Buffer 60%
Modo Cromatográfico	Isocrático
Flujo	1,000 mL/min

Figura 4.1.2 Cromatograma obtenido de la Prueba 2

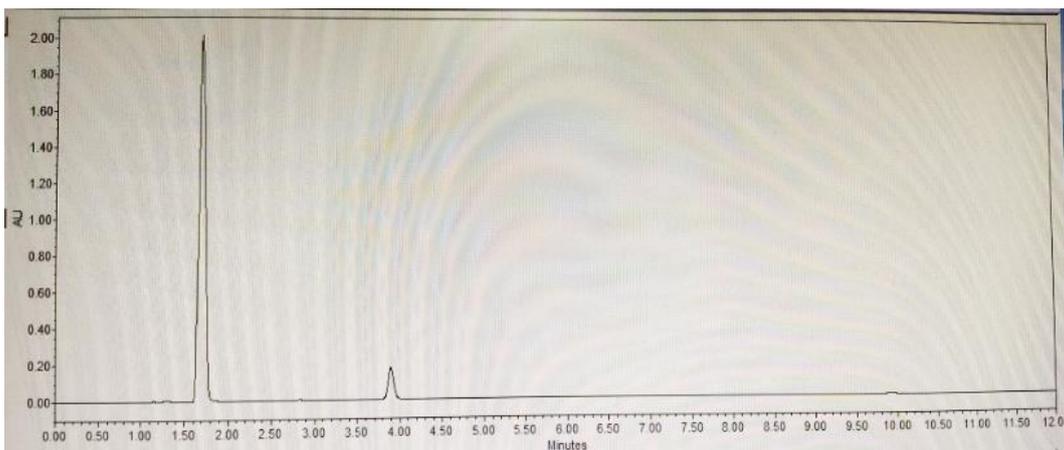


Durante la prueba 3 cuyas condiciones del método se pueden ver en la tabla 4.1.3, se obtuvieron picos de metil y propil parabeno presentes con un factor de asimetría y platos teóricos dentro de especificación, pero con un factor de capacidad menor a 2, adicionalmente se evidencia que el pico del metil parabeno no es puro; tal como se puede observar en la figura 4.1.3.

TABLA 4.1.3 Condiciones cromatográficas de la Prueba 3

Columna	Phenomenex Luna C8 5um 4,0x150mm
Volumen de Inyección	3uL
Fase Móvil	Buffer pH 2,5 - 1mL Ácido Trifluoracético - Acetonitrilo 40% - Buffer 60%
Modo Cromatográfico	Isocratico
Flujo	1,000 mL/min

Figura 4.1.3 Cromatograma obtenido de la Prueba 3



Durante la prueba 4 cuyas condiciones del método se pueden ver en la tabla 4.1.4, se obtuvieron picos de metil y propil parabeno presentes con un factor de asimetría, platos teóricos y factor de capacidad dentro de especificación, adicionalmente ambos picos son puros; tal como se puede observar en la figura 4.1.4.

TABLA 4.1.4 Condiciones cromatográficas de la Prueba 4

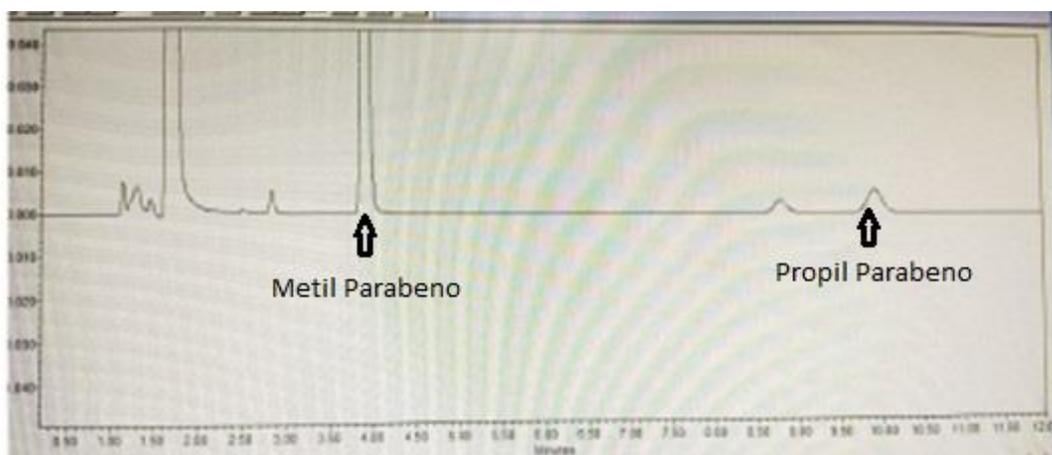
Columna	Waters Symmetry Shield RP18 5um 4,6x150mm
Volumen de Inyección	2uL
Fase Móvil	Buffer pH 2,5 - 1mL Ácido Trifluoracético
Modo Cromatográfico	Gradiente
Flujo	1,000 mL/min

El esquema en gradiente utilizado se muestra en la Ilustración tabla 4.1.5.

Tabla 4.1.5 Gradiente de Prueba 4

Tiempo	Flujo ml/min	Acetonitrilo	Buffer Ácido Trifluoracético 0,1%(v/v) pH 2,50	Curva
Inicio	1,000	32	68	Inicio
4	1,000	32	68	6
6	1,000	50	50	6
8	1,000	50	50	6
10	1,000	32	68	6
12	1,000	32	68	6

Figura 4.1.4 Cromatograma obtenido de la Prueba 4

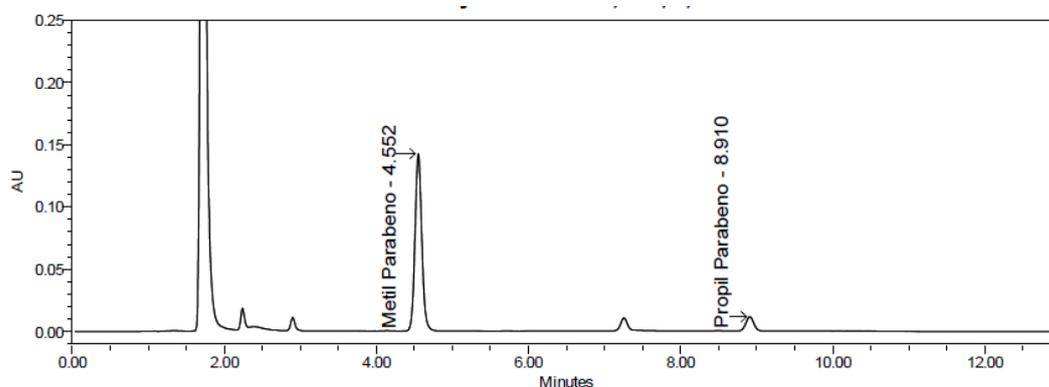


Para poder tener una mejor resolución de los picos obtenidos del resultado de la prueba 4, se procedió a optimizar el gradiente utilizado, tal como se muestra en la tabla 4.1.6, utilizando las mismas condiciones cromatográficas descritas en la tabla 4.1.5. prueba 5, que se puede evidenciar en la figura 4.1.5.

Tabla 4.1.6 Gradiente de Prueba 5

Tiempo	Flujo ml/min	Acetonitrilo	Buffer Ácido Trifluoroacético 0,1%(v/v) pH 2,50	Curva
Inicio	1,000	38	62	Inicio
4	1,000	38	62	6
6	1,000	48	52	6
9	1,000	48	52	6
11	1,000	38	62	6
13	1,000	38	62	6

Figura 4.1.5 Cromatograma obtenido de la Prueba 5



De esta manera y conforme a los diferentes ensayos de optimización para el desarrollo analítico y habiendo identificado las variables a considerar para obtener un método robusto dentro de especificaciones que cumplan con la idoneidad del sistema se ha podido establecer las fases estacionaria y móvil adecuadas para la separación de los picos cromatográficos de los analitos de interés, siendo estas: Symmetry Shield RP18 5um 4,6x150mm y una elución en gradiente con una mezcla de Acetonitrilo y Buffer Trifluoroacético a pH 2,50. En base a las condiciones seleccionadas se procedió a la ejecución del plan de validación para estudiar y demostrar el funcionamiento del método desarrollado que ha permitido el análisis de cada especie química espectralmente puras y sin coelución de pico.

4.2. Método Validado

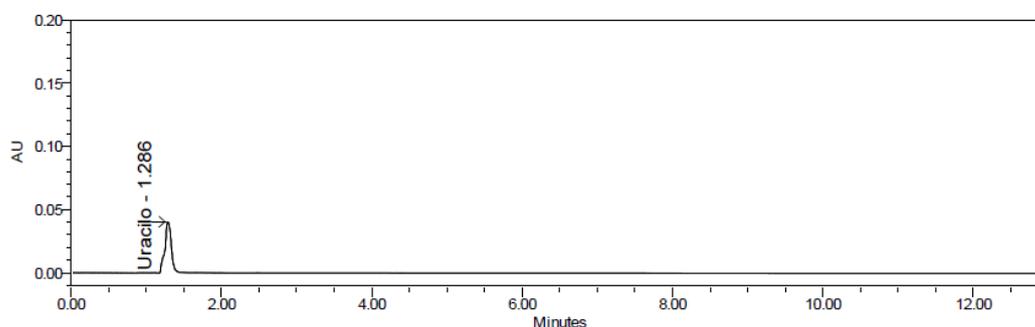
4.2.1 Tiempo Muerto

Considerando que las pruebas de Aptitud del Sistema se usan para verificar que el sistema cromatográfico sea favorable para el análisis que se pretende efectuar como requisito previo a la realización de la validación del método analítico, se ha podido comprobar que el equipo, sistemas electrónicos, operaciones analíticas y muestras analizadas cumplen con los parámetros establecidos de tiempo muerto y su precisión satisfactoria para el uracilo, como analito externo de referencia empleado por ser una especie no retenida en el sistema cromatográfico dentro del método desarrollado. En la siguiente tabla y figura 4.2.1 se evidencian los resultados alcanzados, denotando un coeficiente de variación adecuado.

Tabla 4.2.1 Tiempo muerto de Uracilo

<i>Uracilo</i>	
Inyección	Tiempo de Retención (RT) – (min)
1	1,286
2	1,287
3	1,286
Promedio	1,286

Figura 4.2.1 Validación de Parabenos en Termax Jarabe – Tiempo muerto Uracilo



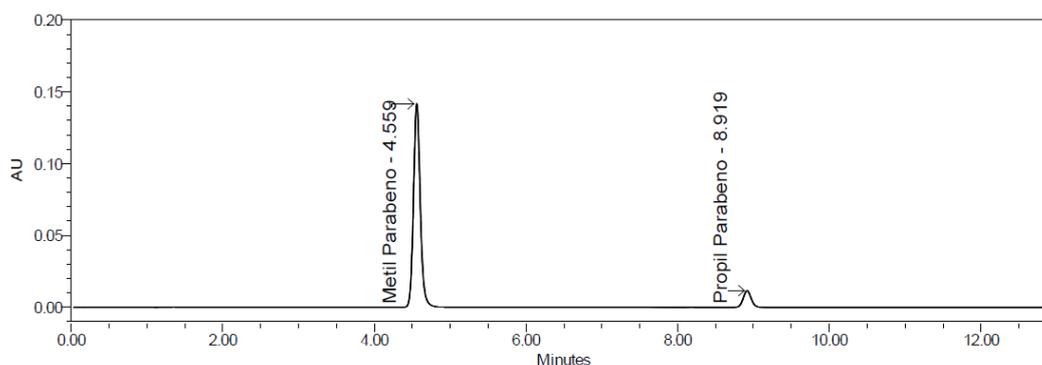
4.2.2 Aptitud del Sistema y Repetibilidad Instrumental

El estudio de aptitud del sistema instrumental se ejecutó en base al análisis de los tiempos de retención y áreas de pico de los parabenos para determinar la precisión, la simetría de pico y el número de platos teóricos; obteniéndose valores satisfactorios en todos los casos, lo cual demuestra la eficacia de la separación cromatográfica y las adecuadas formas de pico (figura 4.2.2) pudiendo ello garantizar la adecuada exactitud del método. La tabla 4.2.2 evidencia un coeficiente de variación inferior a 0.09 % en ambos casos, y un valor de Tailing por debajo de 1,2% conforme a los criterios de aceptación.

Tabla 4.2.2 Aptitud del sistema y repetibilidad de metil y propil parabeno

Inyección	Metil Parabeno	Propil Parabeno
1	878599,826	84976,880
2	878181,935	84965,036
3	879358,079	84956,970
4	878214,209	84784,640
5	878874,898	84871,980
6	878783,173	84941,920
Mean	878668,687	84916,238
SD	442,518	74,369
RSD%	0,050	0,088
USP Plate Count	13079,935	34562,234
USP Tailing	1,135	1,067
K-Prime	2,545	5,934
Retention Time	4,559	8,917

Figura 4.2.2 Cromatograma Aptitud del Sistema



4.2.3 Pureza de pico

Los ensayos de pureza de pico han permitido evaluar la detección de metil parabeno y propil parabeno sin incidencia de interferentes. Tal como se observa en la tabla 4.2.3 los resultados obtenidos son concordantes para ambos analitos en las muestras sometidas a procesos de temperatura y reacciones de diferente carácter; demostrando estabilidad, tanto en la concentración como en el tiempo de retención, que cumple con la ausencia de coelución con un ángulo de pureza menor al límite máximo (límite de pureza) en todos los casos, y además el placebo no exhibe picos característicos que interfieran en la identificación y cuantificación de los activos en cuestión.

Tabla 4.2.3 Pureza de pico de metil y propilparabeno

Parámetros	Variable	Metil Parabeno	Propil Parabeno
Selectividad Antes de Estufa	Ángulo de Pureza	0,030	0,305
	Límite de Pureza	0,228	0,508
	Criterio	Pico Puro	Pico Puro
Selectividad Después de Estufa	Ángulo de Pureza	0,031	0,287
	Límite de Pureza	0,227	0,486
	Criterio	Pico Puro	Pico Puro
Reacción Inducida Acidez	Ángulo de Pureza	0,030	0,293
	Límite de Pureza	0,228	0,503
	Criterio	Pico Puro	Pico Puro
Reacción Inducida Alcalinidad	Ángulo de Pureza	0,034	0,366
	Límite de Pureza	0,230	0,580
	Criterio	Pico Puro	Pico Puro
Reacción Inducida Oxidación	Ángulo de Pureza	0,035	0,318
	Límite de Pureza	0,228	0,513
	Criterio	Pico Puro	Pico Puro
Reacción Inducida Termólisis	Ángulo de Pureza	0,033	0,308
	Límite de Pureza	0,229	0,523
	Criterio	Pico Puro	Pico Puro
Reacción Inducida Fotosensibilidad	Ángulo de Pureza	0,032	0,321
	Límite de Pureza	0,228	0,524
	Criterio	Pico Puro	Pico Puro

4.2.4 Selectividad / especificidad

Este parámetro se correlacionó con el estudio de pureza, considerando que la evaluación de selectividad y especificidad es fundamental para comprobar que la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito de interés en las muestras de ensayo, sin ningún tipo de interferencias de otras sustancias relacionadas con él, como impurezas, incidencia de placebo, solventes, fase móvil empleadas en el análisis.

En tal sentido, se evidenció que la señal del pico principal (analito de interés) es espectralmente puro, lo cual indica que el pico cromatográfico del analito es atribuible sólo a una especie química descartándose que no existe interferencias entre el analito, sustancia de composición similar y otros productos que puedan estar presentes en la muestra como impurezas.

En la tabla 4.2.4. se presentan los niveles de concentración ensayados con el cumplimiento de la selectividad antes y después del tratamiento en estufa de las muestras evaluadas respectivamente. Y a modo de ejemplo en los anexos del presente trabajo se incluyen los cromatogramas que permiten demostrar dicho proceso (Anexo A.1 y A.2).

✓ **Selectividad Antes y después de Estufa**

Tabla 4.2.4 Tabla de Selectividad Antes y Después de Estufa

	Ensayo	Concentración Teórica /mg/mL	Especificación	Resultado
				Cumple/ No Cumple
Placebo	1	No hay activos solo excipientes	No presentó pico	Cumple
	2	No hay activos solo excipientes		
	3	No hay activos solo excipientes		
MP Metil Parabeno MP Propil Parabeno	1	0,072mg/mL Metil Parabeno 0,008mg/mL Propil Parabeno	Presencia del pico de interés sin interferencia	Cumple
	2	0,072mg/mL Metil Parabeno; 0,008mg/mL Propil Parabeno		
	3	0,072mg/mL Metil Parabeno; 0,008mg/mL Propil Parabeno		
MP Metil Parabeno MP Propil Parabeno + Placebo	1	0,072mg/mL Metil Parabeno; 0,008mg/mL Propil Parabeno		
	2	0,072mg/mL Metil Parabeno; 0,008mg/mL Propil Parabeno		
	3	0,072mg/mL Metil Parabeno; 0,008mg/mL Propil Parabeno		

4.2.5 Reacciones Inducidas

El estudio de reacciones inducidas permitió verificar la selectividad del método y estabilidad de los activos en las muestras sometidas a reacciones de termólisis, reacción acida, básicas, agente oxidante y de fotosensibilidad. A continuación en la tabla 4.2.5 se expresa las condiciones de las pruebas realizadas.

Tabla 4.2.5 Pruebas de reacciones inducidas

Prueba	Solución	Condiciones
Termólisis	Agua 1mL	80 °C / 100 rpm / 15 min
Hidrólisis Alcalina	NaOH 1N, 1mL	80 °C / 100 rpm / 15 min
Hidrólisis Acida	HCl 1N, 1mL	80 °C / 100 rpm / 15 min
Oxidación	H ₂ O ₂ 3%, 2mL	80 °C / 100 rpm / 15 min
Fotosensibilidad	Luz UV	Exposición a UV por 8 horas.

Tanto el placebo, principio activo y principio activo más placebo sufrieron condiciones de estrés, destacándose el siguiente análisis para cada caso:

- *Termólisis*: No se observan picos desconocidos, no se crea interferencias que afecten la identificación y cuantificación del analito principal.
- *Hidrolisis Ácida*: No se observan picos desconocidos, no se crea interferencias que afecten la identificación y cuantificación del analito principal.
- *Hidrólisis Alcalina*: Se observan picos desconocidos, los cuales no crean interferencias que afecten la identificación y cuantificación del analito principal adicional se observa una disminución en el área de los analitos.

- *Reacción de Oxidación:* No se observan picos desconocidos, no se crea interferencias que afecten la identificación y cuantificación del analito principal.
- *Fotosensibilidad:* Se observan picos desconocidos, los cuales no crean interferencias que afecten la identificación y cuantificación del analito principal adicional se observa una disminución en el área de los analitos.

Cabe resaltar que las pruebas de reacciones inducidas son ensayos que se realizan con la finalidad de identificar productos de degradación que puedan aparecer durante la vida útil del producto, ya que dichas señales no se encuentran en condiciones rutinarias bien sea de almacenamiento o de metódica analítica. Los cromatogramas más relevantes que demuestran el proceso se encuentran en el apartado de anexos que van del A.3 hasta el A.7.

4.2.6 Límite de Detección (LOD)

La relevancia de este parámetro identifica límite a la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas puesto que es independiente de la reproducibilidad del resultado.

Este límite de detección se estableció de manera estadística a partir de la linealidad del sistema, considerando la desviación estándar de la linealidad según lo referenciado por la guía de validación, obteniéndose un dato teórico el cual fue comprobado experimentalmente. Se demostró así que, la señal obtenida por el método corresponde a 3,3 veces la señal del ruido verificándose que dicha señal no corresponde al blanco y, el método es capaz de detectar la presencia del analito a una concentración equivalente de 0,514 ug/mL para Metil Parabeno y 0,079 ug/mL para Propil Parabeno mismos que se evidencian en su cromatograma Anexo A.8.

4.2.7 Límite de Cuantificación (LOQ)

En cuanto al límite de cuantificación, siendo un parámetro para ensayos cuantitativos de bajos niveles de compuestos en matrices de muestras, tales como impurezas en muestras activas o productos de degradación en productos terminados, representa la concentración de muestra en un analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptable proporcionando una señal 10 veces superior al ruido, bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación calculado a partir de la linealidad del sistema fue de 1,558 ug/mL para Metil Parabeno y 0,240 ug/mL para Propil Parabeno, los cuales se comprobaron experimentalmente, demostrándose que la señal obtenida corresponde a 10 veces la señal del ruido, y obteniéndose respuestas que arrojaron un RSD% del 0,441 % para Metil Parabeno y 1,424% para Propil Parabeno. Estos valores se corresponden con lo especificado por guías de validación, tal como se evidencia en la tabla 4.2.6. Adicionalmente en el Anexo A.9 se incluyen los respectivos cromatogramas.

Tabla 4.2.6 Límite de detección y cuantificación

Conservante	Metil parabeno		Propil parabeno	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Ecuación de la Recta	$y = 12302169,591x - 3676,390$	$y = 12302169,591x - 3676,390$	$y = 10666549,374x - 802,239$	$y = 10666549,374x - 802,239$
Límite	0,514µg/mL	1,558µg/mL	0,079µg/mL	0,240µg/mL
1	5533,330	16944,890	960,379	2147,000
2	5539,920	17116,020	551,525	2144,150
3	5588,445	17110,880	880,583	2148,220
4	5407,445	16968,540	556,539	2125,900
5	5879,060	17099,410	623,410	2068,410
6	5539,920	17039,730	773,779	2129,735
Promedio	5581,353	17046,578	724,369	2127,236
SD	157,901	75,134	173,655	30,284
RSD%	2,829	0,441	23,973	1,424

4.2.8 Linealidad del Sistema

Las respuestas obtenidas en el estudio de linealidad del sistema, tanto para metil parabeno como propil parabeno, proceden de la preparación de una solución madre de cada principio activo donde por medio de diluciones se evaluó la respuesta del analito en 5 diferentes niveles de concentración comprendidos entre el 60% y 140% de la concentración indicada en la técnica analítica y ensayadas por triplicado, obteniendo valores proporcionales tal como se muestra en la tabla 4.2.7 y 4.2.9.

Tabla 4.2.7 Linealidad del Metil Parabeno

Replicas	Nivel (%)	Conc. real (mg/mL)	Áreas Obtenidas	Factor Respuesta (f) y/x
1	60,00	0,043	525602,160	12173489,450
2		0,043	527295,862	12212717,339
3		0,043	525276,884	12165955,721
1	80,00	0,058	708049,356	12299356,518
2		0,058	707816,458	12295310,902
3		0,058	706848,191	12278491,367
1	100,00	0,072	878783,173	12212106,351
2		0,072	880094,623	12230331,059
3		0,072	880734,292	12239220,289
1	120,00	0,086	1058741,006	12260738,744
2		0,086	1058602,034	12259129,380
3		0,086	1058638,434	12259550,910
1	140,00	0,101	1234684,044	12255628,928
2		0,101	1235359,699	12262335,565
3		0,101	1237302,540	12281620,449
			Promedio	12245732,198
			SD	40309,14415
			RSD%	0,329

Existen varios procedimientos para verificar la linealidad, siendo el factor de respuesta una de los más importantes, el cual consiste en una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado al dividir la respuesta versus la concentración. Los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente, por lo que un coeficiente de variación superiores al 5% es indicativo de una posible falta de linealidad. Dentro de este ensayo, el valor obtenido de RSD% es de 0,329 para metil parabeno, y de 0,612 para propil parabeno, cumpliendo con el criterio de aceptación.

En la figura 4.2.3 y 4.2.4 respectivamente, se observa la curva de regresión lineal del metil parabeno y propil parabeno, donde de manera visual podemos notar en ambos casos que no hay valores aberrantes y que la relación entre variables arroja una pendiente de inclinación negativa y un coeficiente de correlación de 0,9999.

Figura 4.2.3 Regresión Lineal del Metil Parabeno

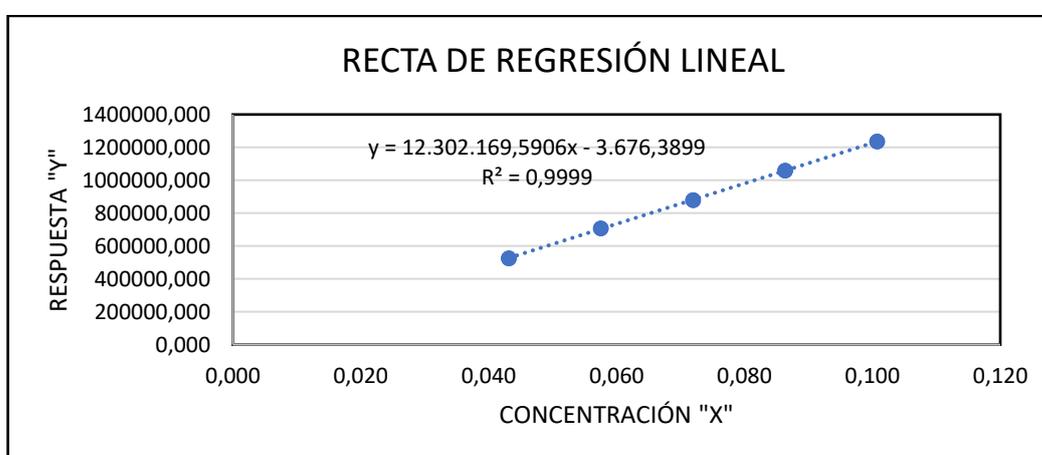


Tabla 4.2.8 Test de Linealidad y Normalidad del Metil Parabeno

Parámetro	Límite de aceptación	Resultado	Conclusión
Recta de Regresión:			
<i>Coeficiente de Correlación r</i>	> 0,990	1,000	Cumple
<i>Coeficiente de Determinación r²</i>	> 0,980	1,000	Cumple
<i>t de student para "r"</i>	t exp > t tabla	234,167 > 3,182	Cumple
Test de Linealidad			
<i>Desviación estándar relativa</i>	< 5,0%	0,329	Cumple
Homogeneidad de Varianzas			
<i>Test de Cochran</i>	Gexp < G tabla	0,560 < 0,684	Cumple
ANOVA / Test de Fisher F1			
<i>Test de Fisher</i>	Fexp > F tabla	237614,694 > 2,503	Cumple

En la tabla 4.2.8 podemos corroborar la veracidad de los resultados al obtener coeficientes de correlación y determinación de 1,000 lo que nos expresa que existe una relación lineal. Para el correspondiente análisis estadístico se aplicó el parámetro de t-student para coeficiente de correlación (r), el cual evalúa si r es significativamente distinto de 1. Se obtuvo un t experimental de 234,167 mayor al de la tabla con un valor de 3,182; lo cual corrobora el valor del coeficiente de correlación. A su vez, se comprobó la homogeneidad de varianzas usando el test de Cochran al obtener un G experimental de 0,560 menor al de la tabla de 0,684; para luego dar paso a el análisis

de varianza (ANOVA). Este análisis tiene como objetivo investigar si las variaciones entre los diferentes niveles entre grupos tienen un efecto medible sobre una variable dependiente, para lo cual se usó ANOVA de un factor donde la variable independiente es la concentración y la variable dependiente es la respuesta (Área); se evaluaron las variaciones entre los diferentes niveles de concentración, se realizó el análisis de residuales, y mediante el valor estadístico de Fisher se obtuvo un F experimental de 237614,694 siendo este mayor al F crítico de 2,503. De esta manera se ha podido demostrar finalmente la linealidad del sistema para metil parabeno.

Tabla 4.2.9 Linealidad del Propil Parabeno

Replica	Nivel (%)	Conc. real (mg/mL)	Áreas Obtenidas	Factor Respuesta (f) y/x
1	60,00	0,005	50435,380	10455103,721
2		0,005	50209,470	10408273,252
3		0,005	50368,150	10441167,142
1	80,00	0,006	68152,010	10595772,699
2		0,006	68278,490	10615436,878
3		0,006	68186,150	10601080,535
1	100,00	0,008	84941,920	10564915,423
2		0,008	84913,471	10561376,990
3		0,008	85029,260	10575778,607
1	120,00	0,010	102057,125	10578043,295
2		0,010	102279,530	10601095,186
3		0,010	102142,300	10586871,535
1	140,00	0,011	119077,135	10578966,704
2		0,011	119152,150	10585631,133
3		0,011	119130,970	10583749,475
			Promedio	10555550,838
			SD	64631,54152
			RSD%	0,612

Figura 4.2.4 Regresión Lineal del Propil Parabeno

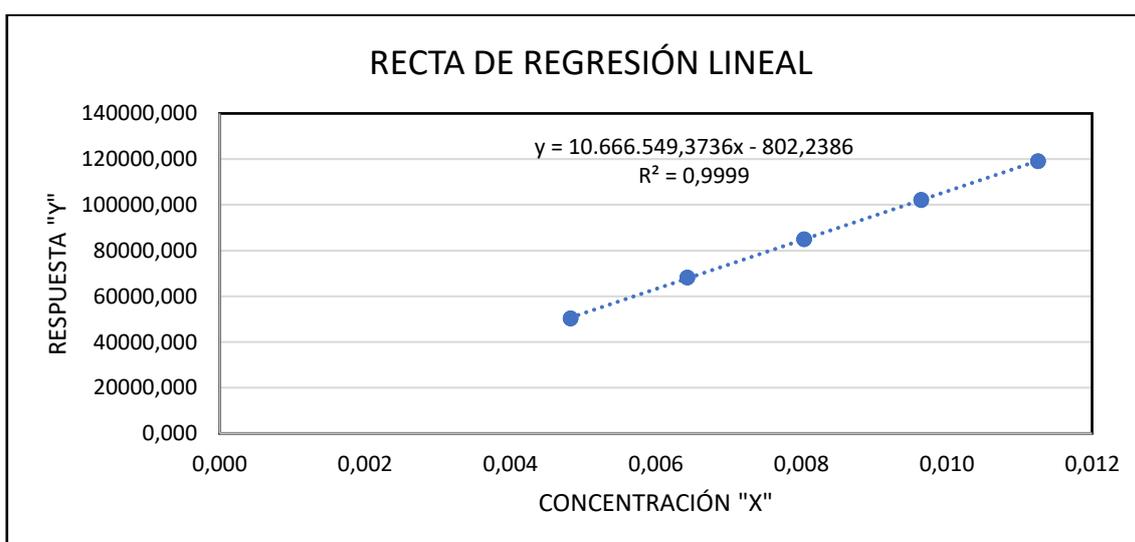


Tabla 4.2.10 Linealidad y Normalidad del Propil Parabeno

<i>Parámetro</i>	<i>Límite de aceptación</i>	<i>Resultado</i>	<i>Conclusión</i>
Recta de Regresión:			
<i>Coefficiente de Correlación r</i>	> 0,990	1,000	Cumple
<i>Coefficiente de Determinación r²</i>	> 0,980	1,000	Cumple
<i>t de student para "r"</i>	t exp > t tabla	169,829 > 3,182	Cumple
Test de Linealidad			
<i>Desviación estándar relativa</i>	< 5,0%	0,612	Cumple
Homogeneidad de Varianzas			
<i>Test de Cochran</i>	Gexp < G tabla	0,653 < 0,684	Cumple
ANOVA / Test de Fisher F1			
<i>Test de Fisher</i>	Fexp > F tabla	124981,340 > 2,503	Cumple

En la tabla 4.2.10 podemos corroborar la veracidad de los resultados al obtener coeficientes de correlación y determinación de 1,000 lo que nos expresa que existe una relación lineal. Se aplicó un análisis estadístico de t-student para coeficiente de correlación (r), el cuál evalúa si r es significativamente distinto de 1. Se obtuvo un t experimental de 169,829 mayor al de la tabla con un valor de 3,182; lo cual corrobora el valor del coeficiente de correlación. A su vez, se comprobó la homogeneidad de varianzas usando el test de Cochran al obtener un G experimental de 0,653 menor al de la tabla de 0,684; para luego dar paso a el análisis de varianza (ANOVA). Este análisis tiene como objetivo investigar si las variaciones entre los diferentes niveles entre grupos tienen un efecto medible sobre una variable dependiente, para lo cual se usó ANOVA de un factor donde la variable independiente es la concentración y la variable dependiente es la respuesta (Área); se analizaron las variaciones entre los diferentes niveles de concentración, se realizó el análisis de residuales para finalmente, mediante el estadístico de Fisher comprobar que el F experimental de 124981,340 es mayor al F crítico de 2,503. De esta manera se pudo demostrar la linealidad del sistema del propil parabeno.

4.2.9 Linealidad de Método

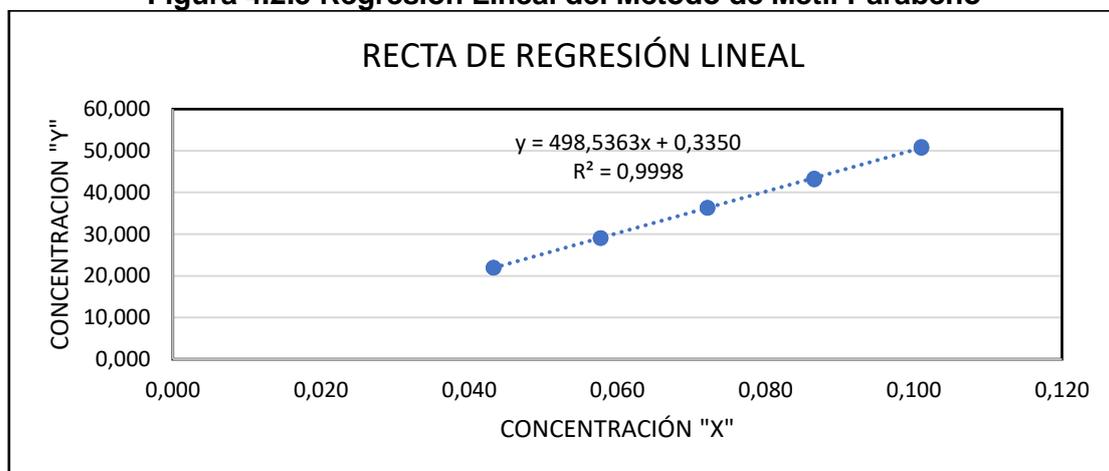
De la misma manera que se ha ejecutado el estudio de linealidad del sistema se llevó a cabo estudio de linealidad del método, en este caso a partir de muestras placebo más los analitos metil y propil parabeno respectivamente.

Las respuestas obtenidas en el estudio de linealidad del método para metil y propil parabeno vienen de la preparación de soluciones muestra compuestas por placebo más principio activo donde por medio de diluciones se evaluó su respuesta en 5 diferentes niveles de concentraciones por triplicado obteniendo valores proporcionales tal como se muestra en la tabla 4.2.11, y 4.2.13. Dentro de este ensayo, la linealidad fue igualmente satisfactoria para ambos analitos en placebo, con valor obtenido de RSD% de 0,525 en metil parabeno y de 0,540 en propil parabeno.

Tabla 4.2.11 Linealidad del método de Metil Parabeno

REPLICAS	Nivel (%)	Conc. real (mg/mL)	Áreas Obtenidas	Recuperación (%)	Factor Respuesta (f) y/x
1	60,00	0,043	536447,022	101,292	12393656,363
2		0,043	537975,024	101,580	12428958,137
3		0,043	537999,643	101,585	12429526,915
1	80,00	0,058	712467,720	100,896	12345226,643
2		0,058	711024,199	100,691	12320214,150
3		0,058	711907,230	100,817	12335514,798
1	100,00	0,072	890496,291	100,886	12344001,816
2		0,072	889369,595	100,758	12328383,629
3		0,072	887877,151	100,589	12307695,467
1	120,00	0,087	1059023,122	99,982	12233424,845
2		0,087	1062620,667	100,322	12274982,291
3		0,087	1055312,184	99,632	12190557,527
1	140,00	0,101	1244300,249	100,692	12320292,378
2		0,101	1240813,447	100,410	12285768,219
3		0,101	1246838,486	100,898	12345424,433
				Promedio	12325575,174
				SD	64695,695
				RSD%	0,525

Figura 4.2.5 Regresión Lineal del Método de Metil Parabeno



Dentro de la figura 4.2.5 se observa la curva de regresión lineal del metil parabeno donde de manera visual podemos notar que no hay valores aberrantes y que la relación entre la concentración vs la respuesta arroja una pendiente de inclinación positiva y un coeficiente de correlación de 0,9999. Mientras que, dentro de la figura 4.2.6 se observa la curva de regresión lineal del propil parabeno donde de manera visual podemos notar que no hay valores aberrantes y que la relación entre la concentración vs la respuesta arroja una pendiente de inclinación negativa y un coeficiente de correlación de 0,9997

Tabla 4.2.12 Linealidad y Varianzas del Método de Metil Parabeno

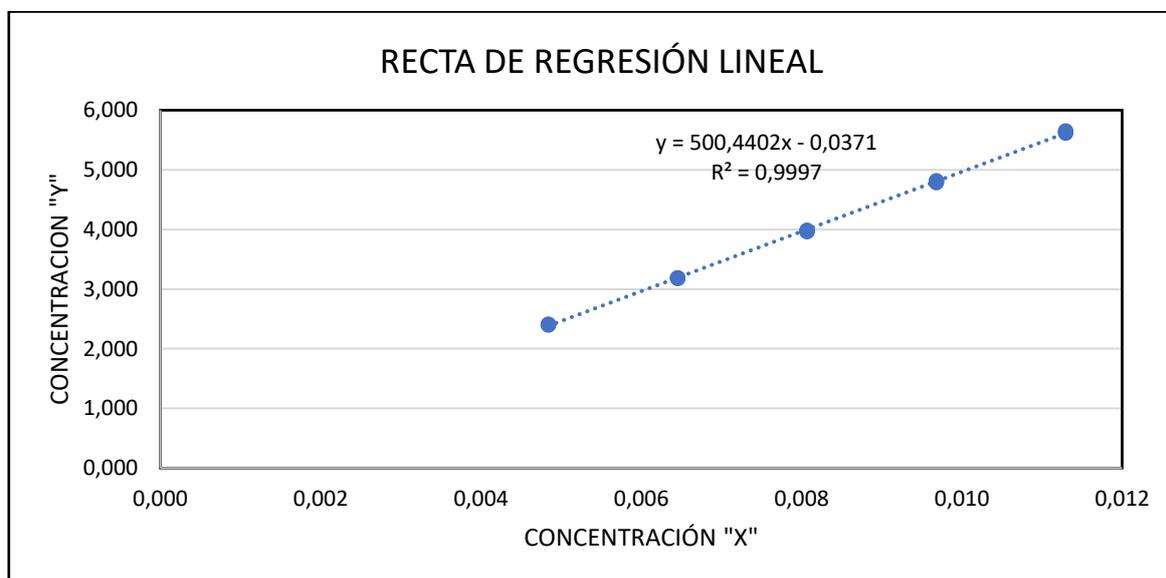
<i>Parámetro</i>	<i>Límite de aceptación</i>	<i>Resultado</i>	<i>Conclusión</i>
Recta de Regresión:			
<i>Coefficiente de Correlación r</i>	> 0,990	1,000	Cumple
<i>Coefficiente de Determinación r²</i>	> 0,980	1,000	Cumple
<i>t de student para "r"</i>	t exp > t tabla	123,064 > 3,182	Cumple
Test de Linealidad			
<i>Desviación estándar relativa</i>	< 5,0%	0,525	Cumple
Homogeneidad de Varianzas			
<i>Test de Cochran</i>	<i>G_{exp} < G tabla</i>	0,496 < 0,684	Cumple
ANOVA / Test de Fisher F1			
<i>Test de Fisher</i>	<i>F_{exp} > F tabla</i>	65626,868 > 2,503	Cumple

En la tabla 4.2.12 se puede corroborar la veracidad de los resultados al obtener coeficientes de correlación y determinación de 1,000 lo que expresa que existe una relación lineal. Se aplicó un análisis estadístico de t-student para coeficiente de correlación (r), el cuál evalúa si r es significativamente distinto de 1. Se obtuvo un t experimental de 123,064 mayor al de la tabla con un valor de 3,182; lo cual comprueba el valor del coeficiente de correlación. A su vez, se comprobó la homogeneidad de varianzas usando el test de Cochran al obtener un G experimental de 0,496 menor al de la tabla de 0,684. Así también, con el propósito de investigar si las variaciones entre los diferentes niveles entre grupos tienen un efecto medible sobre una variable dependiente, se usó ANOVA de un factor donde la variable independiente es la concentración y la variable dependiente es la respuesta (Área); se analizaron las variaciones entre los diferentes niveles de concentración, se realizó el análisis de residuales, y mediante el estadístico de Fisher fue factible comprobar que el F experimental de 65626,868 es mayor al F crítico de 2,503. De esta manera se termina de demostrar la linealidad del método del metil parabeno. Adicional a la linealidad se pudo evaluar la recuperación de cada nivel al compararlo frente a un estándar obteniendo valores dentro de especificación lo que nos demuestra que no existe un efecto matriz que pueda interferir en la recuperación del metil parabeno en las soluciones muestra.

Tabla 4.2.13 Linealidad del método de Propil Parabeno

REPLICAS	Nivel (%)	Conc, real (mg/mL)	Áreas Obtenidas	Recuperación (%)	Factor Respuesta (f) y/x
1	60,00	0,005	51303,210	99,566	10599836,777
2		0,005	51088,560	99,149	10555487,603
3		0,005	51274,750	99,510	10593956,612
1	80,00	0,006	67958,470	98,907	10529666,873
2		0,006	67726,465	98,569	10493719,399
3		0,006	67795,770	98,670	10504457,701
1	100,00	0,008	84945,140	98,897	10528648,984
2		0,008	84465,655	98,339	10469218,518
3		0,008	84430,080	98,297	10464809,122
1	120,00	0,010	102189,640	99,141	10554600,289
2		0,010	102572,385	99,512	10594131,894
3		0,010	101945,945	98,904	10529430,386
1	140,00	0,011	120034,001	99,814	10626239,465
2		0,011	119605,891	99,458	10588340,209
3		0,011	120389,100	100,109	10657675,283
				Promedio	10552681,274
				SD	57009,082
				RSD%	0,540

Figura 4.2.6 Regresión Lineal del Método de Propil Parabeno



En la tabla 4.2.14 podemos corroborar la veracidad de los resultados al obtener coeficientes de correlación y determinación de 1,000 lo que nos expresa que existe una relación lineal. Se aplicó un análisis estadístico de t-student para coeficiente de correlación (r), el cuál evalúa si r es significativamente distinto de 1. Se obtuvo un t experimental de 94,782 mayor al t tabla con un valor de 3,182; lo cual corrobora el valor del coeficiente de correlación.

Tabla 4.2.14 Linealidad y Varianzas del Método de Propil Parabeno

Parámetro	Límite de aceptación	Resultado	Conclusión
Recta de Regresión:			
<i>Coeficiente de Correlación r</i>	> 0,990	1,000	Cumple
<i>Coeficiente de Determinación r²</i>	> 0,980	1,000	Cumple
<i>t de student para "r"</i>	t exp > t tabla	94,782 > 3,182	Cumple
Test de Linealidad			
<i>Desviación estándar relativa</i>	< 5,0%	0,540	Cumple
Homogeneidad de Varianzas			
<i>Test de Cochran</i>	<i>G_{exp} < G tabla</i>	0,285 < 0,684	Cumple
ANOVA / Test de Fisher F1			
<i>Test de Fisher</i>	<i>F_{exp} > F tabla</i>	38929,449 > 2,503	Cumple

A su vez, se comprobó la homogeneidad de varianzas usando el test de Cochran al obtener un G experimental de 0,285 menor al G tabla de 0,684; para luego dar paso a el análisis de varianza (ANOVA). Este análisis tiene como objetivo investigar si las variaciones entre los diferentes niveles entre grupos tienen un efecto medible sobre una variable dependiente, para lo cual se usó ANOVA de un factor donde la variable independiente es la concentración y la variable dependiente es la respuesta (Área); se analizaron las variaciones entre los diferentes niveles de concentración, se realizó el análisis de residuales para finalmente, mediante el estadístico de Fisher comprobar que el F experimental de 38929,449 es mayor al F crítico de 2,503. De esta manera se termina de demostrar la linealidad del método del propil parabeno. Adicional a la linealidad se pudo evaluar la recuperación de cada nivel al compararlo frente a un estándar obteniendo valores dentro de especificación lo que nos demuestra que no existe un efecto matriz que pueda interferir en la recuperación del propil parabeno en las soluciones muestra.

4.2.10 Exactitud del Método

La exactitud del método expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero, valor nominal, teórico o un valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente.

Para demostrar la exactitud del método se prepararon 3 concentraciones de solución muestra de 60%, 100% y 140% de la concentración indicada en la técnica analítica. Estas soluciones se prepararon por triplicado en cada nivel de concentración a partir de pesos individuales de solución muestra de metil y propil parabeno más placebo y fueron comparadas con una solución estándar de metil y propil parabeno. Los resultados obtenidos de cada ensayo se muestran en la tabla 4.2.15 para el metil parabeno y 4.2.17 para el propil parabeno, donde se puede evidenciar los porcentajes de recuperación que van desde el 98,298 al 101,585%.

Tabla 4.2.15 Recuperación del Metil Parabeno

Niveles	Replicas	Conc, real (mg/mL)	Áreas Obtenidas	mg Hallados	% Recuperación	% Recuperación Promedio	Sesgo-Bias% (b)
60%	1	0,043	536447,022	21,922	101,292	101,486	1,486
	2	0,043	537975,024	21,984	101,580		
	3	0,043	537999,643	21,985	101,585		
100%	1	0,072	890496,291	36,390	100,886	100,744	0,744
	2	0,072	889369,595	36,343	100,758		
	3	0,072	887877,151	36,283	100,589		
140%	1	0,101	1244300,249	50,847	100,692	100,667	0,667
	2	0,101	1240813,447	50,705	100,410		
	3	0,101	1246838,486	50,951	100,898		
Promedio					100,966	100,966	0,966
SD					0,425	0,452	
RSD%					0,421	0,448	

Tabla 4.2.16 Test de varianzas y evaluación de medias del Metil Parabeno

Parámetro	Límite de aceptación	Resultado	Conclusión
Test de Igualdad de Varianzas			
Test de Cochran	$G_{exp} < G_{critico}$	0,543 < 0,871	Cumple
Evaluación de Medias			
Sesgo-Bias (b)	$\pm 5\%$	0,965	Cumple
Test de Student	$t_{exp} < t_{critico}$	0,711 < 2,306	Cumple

Para demostrar la exactitud de ambos métodos, se obtuvo el sesgo – Bias de cada ensayo, tal como se puede ver en las tablas 4.2.16 para metil parabeno y 4.2.18 para propil parabeno.

Tabla 4.2.17 Recuperación del Propil Parabeno

Niveles	Replicas	Conc, real (mg/mL)	Áreas Obtenidas	mg Hallados	% Recuperación	% Recuperación Promedio	Sesgo-Bias% (b)
60%	1	0,005	51303,210	2,409	99,566	99,409	-0,591
	2	0,005	51088,560	2,399	99,149		
	3	0,005	51274,750	2,408	99,511		
100%	1	0,008	84945,140	3,990	98,897	98,511	-1,489
	2	0,008	84465,655	3,967	98,339		
	3	0,008	84430,080	3,965	98,298		
140%	1	0,011	120034,001	5,637	99,814	99,794	-0,206
	2	0,011	119605,891	5,617	99,458		
	3	0,011	120389,100	5,654	100,109		
Promedio					99,238	99,238	-0,762
SD					0,626	0,658	
RSD%					0,631	0,663	

Tabla 4.2.18 Test de varianzas y evaluación de medias del Propil Parabeno

<i>Parámetro</i>	<i>Límite de aceptación</i>	<i>Resultado</i>	<i>Conclusión</i>
Test de Igualdad de Varianzas			
<i>Test de Cochran</i>	$G_{exp} < G_{critico}$	0,416 < 0,871	Cumple
Evaluación de Medias			
<i>Sesgo-Bias (b)</i>	$\pm 5\%$	-0,765	Cumple
<i>Test de Student</i>	$t_{exp} < t_{critico}$	0,388 < 2,306	Cumple

La exactitud del método se ve influenciada por la matriz de la muestra, la preparación y extracción de la concentración de analito por lo que en este caso tenemos un método que minimiza tales interferencias y se pudo corroborar sabiendo que el sesgo – Bias debe ser $\pm 5\%$ y según el análisis estadístico Test de Cochran el G experimental debe ser menor al G crítico. De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos evidenciar que el sesgo para metil parabeno es de 0,965 y para propil parabeno es de -0,765; valores dentro de lo especificado. De igual manera, en ambos casos se puede evidenciar un G experimental menor que G crítico lo cual nos demuestra que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes y que la concentración no influye en la variabilidad de los resultados. A su vez, se puede evidenciar que no existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100% de acuerdo con el Test de Student, al ser t experimental mayor al t crítico en ambos métodos. De esta manera queda demostrada la exactitud del método para metil y propil parabeno.

Precisión del Método

Este estudio comprendió la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí; por tanto, demuestra el grado de dispersión de los resultados analíticos respecto a su valor medio. Para lo cual se ensayó respectivamente la repetibilidad del método y su precisión intermedia, para ambos compuestos activos.

4.2.11 Repetibilidad del método

Tabla 4.2.19 Recuperación de metil y propil parabenos

REPLICAS	Nivel (%)	% Recuperación (Metil Parabeno)	% Recuperación (Propil Parabeno)
1	60,00	101,292	99,566
2		101,580	99,149
3		101,585	99,511
1	100,00	100,886	98,897
2		100,758	98,339
3		100,589	98,298
1	140,00	100,692	99,814
2		100,410	99,458
3		100,898	100,109
	Promedio	100,966	99,238
	SD	0,425	0,626
	RSD%	0,421	0,631

La evaluación de la repetibilidad del método se realizó en una serie de análisis sobre 3 niveles de concentración en las mismas condiciones operativas en un mismo laboratorio.

Según el coeficiente de variación obtenido del ensayo, este parámetro está dentro de lo especificado con un valor experimental de 1,94% para metil parabeno y de 3,88% para propil parabeno; por tanto, se demuestra que no existe diferencia significativa en las respuestas de los niveles evaluados.

4.2.12 Precisión Intermedia

La precisión intermedia del método evaluó las variaciones internas del laboratorio (analista, día, instrumento) en la ejecución del análisis. En este caso, los ensayos comprendieron un periodo de 2 días con equipos y analistas diferentes para verificar la incidencia de dichas condiciones en el método aplicado.

De acuerdo con el coeficiente de variación obtenido en el ensayo de precisión intermedia, los resultados demuestran que existe precisión del método con un RSD% 0,652 (Metil Parabeno) y RSD%1,308% (Propil parabeno), encontrándose en ambos casos encontrarse dentro de especificación.

De esta manera se ha considerado un RSD% máximo permitido de $\leq 3,7\%$, y un valor de recuperación fue 95-105% para metil parabeno; y un RSD% máximo permitido de $\leq 5,3\%$ y un valor de recuperación 90-107% para propil parabeno. Los resultados completos, tanto de la repetibilidad del método como de la precisión intermedia, no excedieron de los valores de RSD% permitidos, como se muestra en la tabla 4.2.21 para metil parabeno y 4.2.23 para propil parabeno.

Tabla 4.2.20 Prueba intralaboratorio del Metil Parabeno

	DÍA 1		DÍA 2		DÍA 1		DÍA 2	
	Equipo # 1				Equipo # 2			
	Área Replicados	% Recuperación						
ANALISTA A	884299,947	99,995	879452,500	99,532	914467,224	100,663	919120,922	99,353
	885436,662		884374,038		917876,253		918789,891	
	888040,914		879839,824		915329,912		914493,761	
ANALISTA B	887540,714	100,070	881223,642	99,619	921394,710	99,032	922175,473	100,942
	889790,684		882099,997		919864,789		919816,309	
	897821,305		885389,239		919273,565		920159,387	

Tabla 4.2.21 Análisis de precisión intermedia del Metil parabeno

Parámetro	Límite de aceptación	Resultado	Conclusión
Repetibilidad del Método			
<i>Desviación estándar relativa (RSD%)</i>	1,94	0,421	Cumple
Precisión Intermedia			
<i>% Recuperación</i>	95 – 105	99,901	Cumple
<i>Desviación estándar relativa (RSD%)</i>	3,7	0,652	Cumple

Tabla 4.2.22 Prueba intralaboratorio del Propil Parabeno

	DÍA 1		DÍA 2		DÍA 1		DÍA 2	
	Equipo # 1				Equipo # 2			
	Área Replicados	% Recuperación						
ANALISTA A	84761,990	99,560	84400,346	99,114	85737,885	100,144	85946,556	98,403
	84584,160		84761,085		85645,111		85883,810	
	84779,230		84416,960		85016,550		85948,400	
ANALISTA B	85158,100	99,439	84446,140	100,564	85739,150	97,732	86074,750	101,939
	85333,180		84562,090		86217,221		86464,860	
	85813,190		85040,305		86230,250		86534,000	

Tabla 4.2.23 Análisis de precisión intermedia del Propil parabeno

Parámetro	Límite de aceptación	Resultado	Conclusión
Repetibilidad del Método			
Desviación estándar relativa (RSD%)	3,88	0,631	Cumple
Precisión Intermedia			
% Recuperación	90 – 107	99,612	Cumple
Desviación estándar relativa (RSD%)	5,3	1,308	Cumple

4.2.13 Robustez

La robustez es uno de los parámetros que se exigen durante el desarrollo del protocolo de validación e indica la susceptibilidad del método analítico a variaciones menores razonables y brinda una indicación de su confiabilidad.

Se identificaron 4 factores que podrían tener un efecto significativo en el desempeño del método y se propusieron máximos y mínimos al variar ligeramente cada uno ellos utilizando un diseño factorial. Se prepararon estándar y muestra al 100% de la concentración para luego calcular el porcentaje de recuperación y desviación estándar relativa de las diferentes variaciones.

Tabla 4.2.24 Robustez del Metil parabeno

N°	Condiciones variables	Técnica	Cambio Realizado	
			Nivel Alto (+)	Nivel bajo (-)
1	Temperatura de la columna (°C)	30	35	25
2	Flujo (mL/min)	1	1,2	0,8
3	pH Fase Movil	2,5	3	2
4	Temperatura del Sample (°C)	20	25	15

Mediante este ensayo se determinó que la metodología analítica es robusta a cambios de Flujo, temperatura de columna, pH de la fase móvil y temperatura del auto muestreador variables que fueron evaluadas mediante un diseño factorial fraccionado 2⁴-4 sería 1/16 ava parte del diseño completo donde se puede evaluar hasta 7 variables en 8 corridas o experimentos.

Tabla 4.2.25 Diseño Factorial - Plackett Burman 4 Factores del Metil parabeno

Corrida	A	B	C	D
1	+	-	-	+
2	+	+	-	-
3	+	+	+	-
4	-	+	+	+
5	+	-	+	+
6	-	+	-	+
7	-	-	+	-
8	-	-	-	-

Tabla 4.2.26 Porcentaje de recuperación del Metil parabeno

N° Replicas / Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8
1	100,014	99,819	99,498	100,272	100,067	99,970	99,560	99,258
2	100,174	99,918	99,298	100,273	100,230	99,944	99,267	99,217
3	100,061	100,005	99,787	100,236	100,179	99,863	99,824	99,335
% Recuperación Promedio	100,083	99,914	99,528	100,260	100,159	99,926	99,550	99,270
SD	0,082	0,093	0,246	0,021	0,084	0,056	0,278	0,060
RSD%	0,082	0,093	0,247	0,021	0,084	0,056	0,280	0,060

Tabla 4.2.27 Evaluación de la robustez del Metil parabeno

Condición Variable	Resultados	Criterio		
Temperatura de la columna (°C)	0,169	NO AFECTA	Especificación < a	0,922
Flujo (mL/min)	0,142	NO AFECTA		
pH Fase Movil	0,076	NO AFECTA		
Temperatura del Sample (°C)	0,541	NO AFECTA		

Tabla 4.2.28 Robustez del Propil parabeno

N°	Condiciones variables	Técnica	Cambio Realizado	
			Nivel Alto (+)	Nivel bajo (-)
1	Temperatura de la columna (°C)	30	35	25
2	Flujo (mL/min)	1	1,2	0,8
3	pH Fase Movil	2,5	3	2
4	Temperatura del Sample (°C)	20	25	15

Tabla 4.2.29 Diseño Factorial - Plackett Burman 4 Factores del Propil parabeno

Corrida	A	B	C	D
1	+	-	-	+
2	+	+	-	-
3	+	+	+	-
4	-	+	+	+
5	+	-	+	+
6	-	+	-	+
7	-	-	+	-
8	-	-	-	-

Tabla 4.2.30 Porcentaje de recuperación del Propil parabeno

N° Replicas / Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8
1	99,008	101,055	100,689	99,086	98,834	99,120	98,135	97,843
2	99,087	101,100	100,674	98,986	98,735	98,807	97,418	97,498
3	98,829	101,392	100,996	99,130	98,732	98,726	98,071	97,369
% Recuperación Promedio	98,975	101,182	100,786	99,067	98,767	98,885	97,875	97,570
SD	0,132	0,183	0,182	0,074	0,058	0,208	0,397	0,245
RSD%	0,134	0,181	0,180	0,075	0,059	0,211	0,405	0,251

Tabla 4.2.31 Evaluación de la robustez del Propil parabeno

Condición Variable	Resultados	Criterio		
Temperatura de la columna (°C)	1,578	NO AFECTA	Especificación < a	1,842
Flujo (mL/min)	1,684	NO AFECTA		
pH Fase Movil	-0,029	NO AFECTA		
Temperatura del Sample (°C)	-0,430	NO AFECTA		

Se escogieron 4 variables y en las diferentes combinaciones no presentaron evidencia significativa al ser comparados con la desviación estándar del parámetro de precisión intermedia multiplicado por la raíz cuadrada de 2 sin embargo, se recomienda seguir la metodología tal cual se describe en el protocolo de validación para evitar perder selectividad/especificidad del analito principal.

4.2.14 Ensayo de Retención de Filtro

El estudio de retención de filtro es una comparación de soluciones filtradas y sin filtrar durante la validación del método, para determinar si el filtro que se utiliza retiene algún compuesto activo o contribuye con algún componente desconocido en el análisis. Blanco, muestra y soluciones estándar se analizan con y sin filtración y las comparaciones se realizan en la recuperación y en la apariencia de los Cromatogramas.

Se evaluó los filtros de Polivinildenedifloride (PVDF) y Nylon (RC) frente a soluciones centrifugadas

Las muestras de metil y propil parabeno en jarabe se filtraron a través de filtros de Fluoruro de polivinilideno (PVDF) y Celulosa Regenerada (RC). Los resultados expresados como porcentajes de recuperación comparados frente a una muestra centrifugada e inyectada de metil y propil parabeno en jarabe muestran que el filtro PVDF no retiene analito cumpliendo con la especificación de variación menor al 1,5% absoluto en comparación a la muestra centrifugada tal como se muestran en las tablas 4.2.32 para metil parabeno y 4.2.33 para propil parabeno. Sin embargo, se observa que las áreas de metil y propil parabeno aumentan un porcentaje de recuperación considerable por encima del 15% para el filtro RC, pudiendo deberse a una potenciación del área de la muestra por parte de la interacción de la membrana del filtro con la muestra. Se recomienda descartar los primeros mililitros del filtrado de las soluciones para evitar posibles variaciones en la repetibilidad de las muestras.

Tabla 4.2.32 Ensayo de retención de filtro del metil parabeno

Filtro	N°	% Recuperación	RSD %	% Recuperación por Filtro	Variación No $\pm 1,5\%$ (vs Centrifugado)	Condición
Fluoruro de polivinilideno (PVDF)	1	100,107	0,029	100,262	-0,385	CUMPLE
	2	100,143				
	3	100,166				
	1	100,382	0,276			
	2	100,624				
	3	100,072				
	1	100,523	0,204			
	2	100,193				
	3	100,148				
Celulosa Regenerada (RC)	1	116,077	0,027	116,349	-16,472	NO CUMPLE
	2	116,017				
	3	116,065				
	1	116,863	0,212			
	2	116,373				
	3	116,562				
	1	116,090	0,316			
	2	116,292				
	3	116,804				
Centrifugación	1	99,832	0,320	99,877	N/A	N/A
	2	99,784				
	3	100,360				
	1	99,854	0,414			
	2	99,233				
	3	100,014				
	1	99,782	0,136			
	2	100,021				
	3	100,013				

Tabla 4.2.33 Ensayo de retención de filtro del propil parabeno

Filtro	N°	% Recuperación	RSD %	% Recuperación por Filtro	Variación No $\pm 1,5\%$ (vs Centrifugado)	Condición
Fluoruro de polivinilideno (PVDF)	1	99,072	0,069	99,405	-0,580	CUMPLE
	2	99,206				
	3	99,158				
	1	99,596	0,074			
	2	99,471				
	3	99,466				
	1	99,741	0,160			
	2	99,492				
	3	99,446				
Celulosa Regenerada (RC)	1	114,970	0,134	115,165	-16,340	NO CUMPLE
	2	114,828				
	3	114,662				
	1	115,765	0,383			
	2	115,012				
	3	115,793				
	1	114,970	0,228			
	2	115,035				
	3	115,453				
Centrifugación	1	98,899	0,295	98,825	N/A	N/A
	2	98,785				
	3	99,339				
	1	99,088	1,035			
	2	97,290				
	3	99,020				
	1	98,804	0,175			
	2	99,127				
	3	99,075				

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente trabajo de investigación establece de forma consistente y con evidencia científica / experimental un método para la identificación y cuantificación de los conservantes presentes en la forma farmacéutica jarabe, destacándose los siguientes puntos:

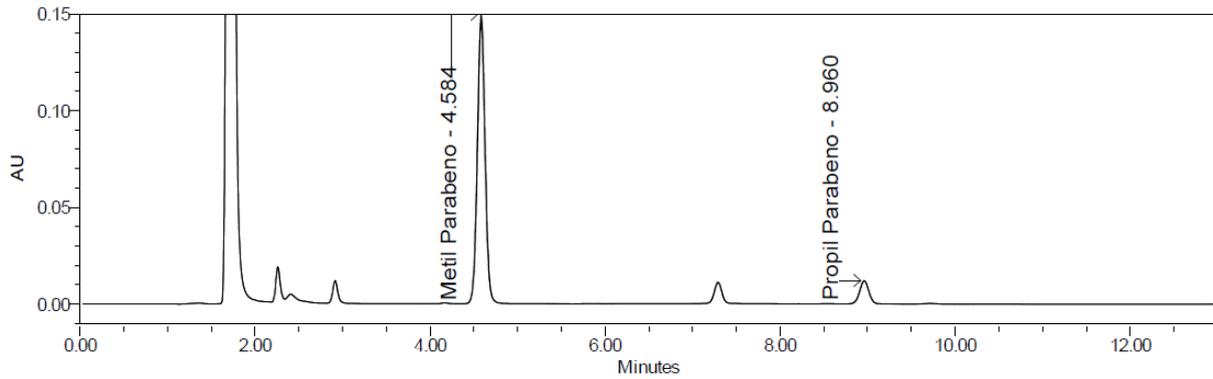
- Se desarrolló un método rápido, sencillo y con alto nivel de precisión RSD % 0,652 para metil parabeno y RSD % 1,308 para propil parabeno, y exactitud de entre 99 y 102 % para la determinación de metil y propil parabeno en la forma farmacéutica jarabe.
- La técnica propuesta se validó según los criterios internacionales de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y la Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH), de esta forma se lograron los objetivos propuestos para exactitud, selectividad, precisión y linealidad en el rango de trabajo desde 43 hasta 101 ug/mL para metil parabeno y desde 5 hasta 11 ug/mL para propil parabeno, usando cromatografía líquida de ultra resolución.
- El límite de cuantificación establecido de 1,60 ug/mL para metil parabeno y 0,24 ug/mL para propil parabeno fue apropiado pues puede reproducirse con facilidad cumpliendo con criterios de precisión y exactitud.
- Por último, se demostró la robustez del método al comprobar la obtención de resultados reproducibles al modificar las variables analíticas más importantes del método (flujo, temperatura de columna, pH de la fase móvil y temperatura del auto muestreador).

RECOMENDACIONES

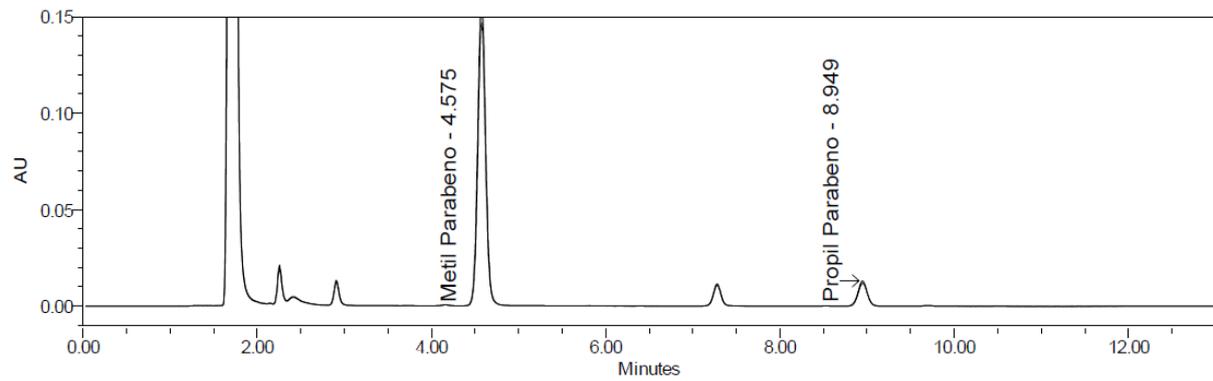
- Considerando las exigencias de las autoridades sanitarias de cada país, que a su vez hacen eco de las nuevas reformas y actualizaciones de los informes de la Organización Mundial de la Salud, y de los sistemas de calidad, entre otros, se recomienda la estimación de la incertidumbre del método en base a los resultados de validación del presente estudio.
- Considerando que la prueba de retención de filtro evidenció una recuperación más elevada en filtros RC aproximadamente un 15% con respecto a su homólogo PVDF, se presenta un nuevo propósito de investigación a desarrollar sobre el estudio del material de retención frente a este tipo de compuestos.
- Considerando las ventajas prácticas de la aplicación de la técnica de UHPLC, se recomienda desarrollar y ampliar la aplicación de la metodología para la identificación y cuantificación de parabenos en otras formas farmacéuticas de potencial interés.

A. ANEXOS

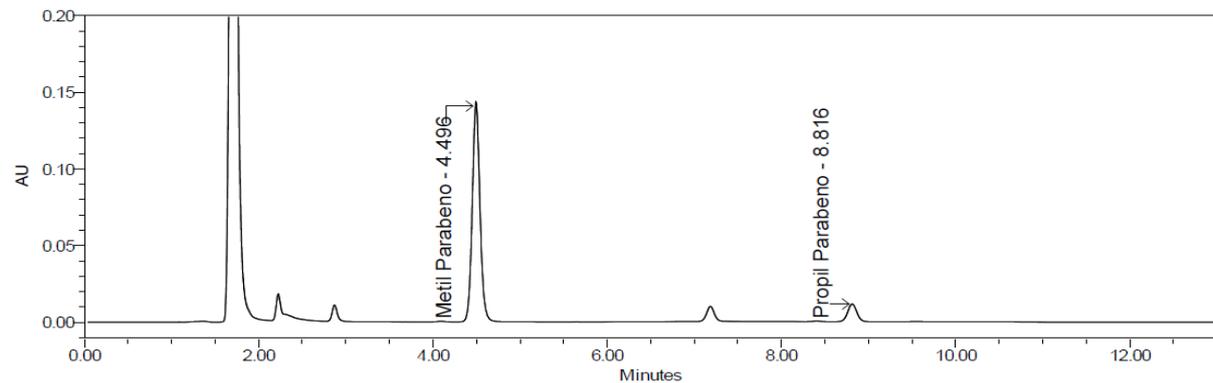
Anexo A.1 Cromatogramas de selectividad antes de estufa – Metil y Propil Parabeno MP + Placebo a 254nm



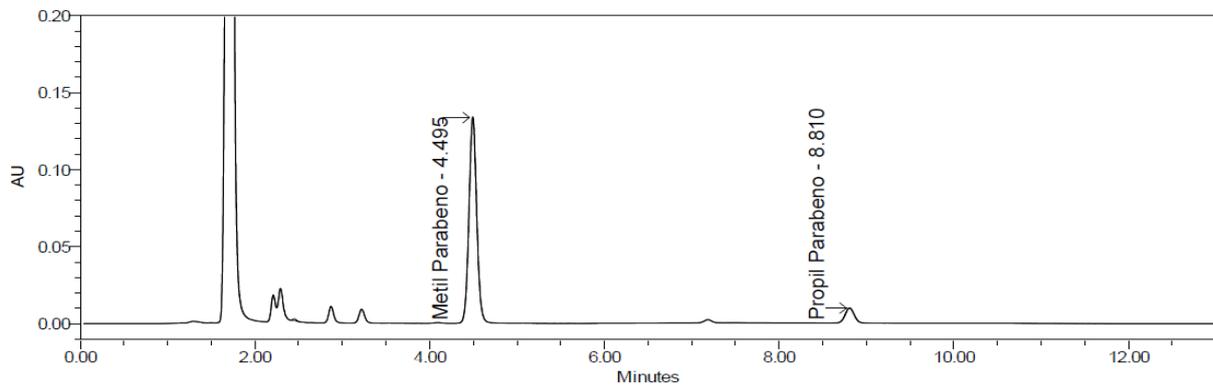
Anexo A.2 Cromatogramas de selectividad después de estufa – Metil y Propil Parabeno MP + Placebo a 254nm



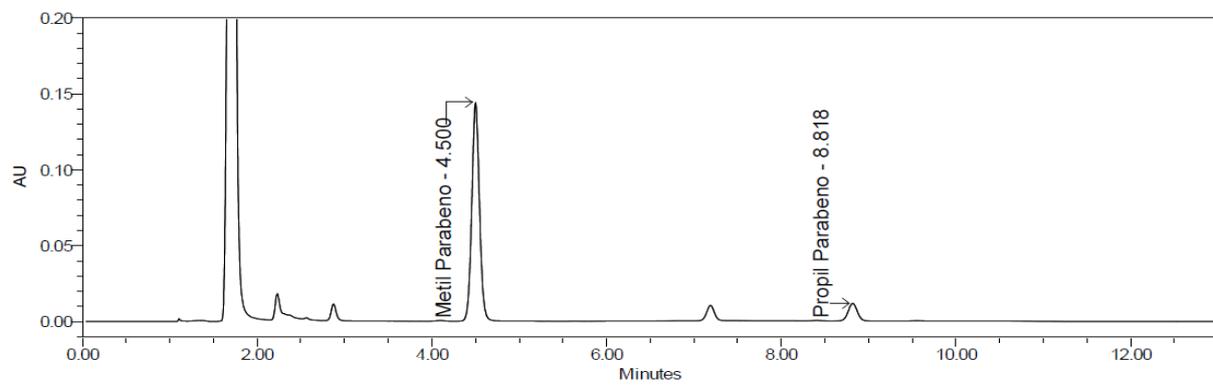
Anexo A.3 Cromatograma de reacciones inducidas - Metil y Propil Parabeno MP + Placebo Termólisis a 254nm



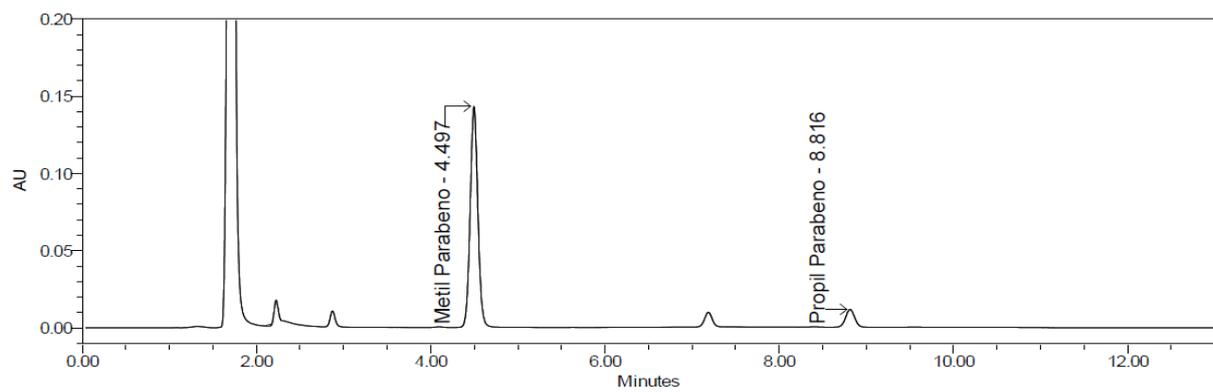
Anexo A.4 Cromatograma de reacciones inducidas - Metil y Propil Parabeno MP + Placebo Hidrolisis Básica a 254nm



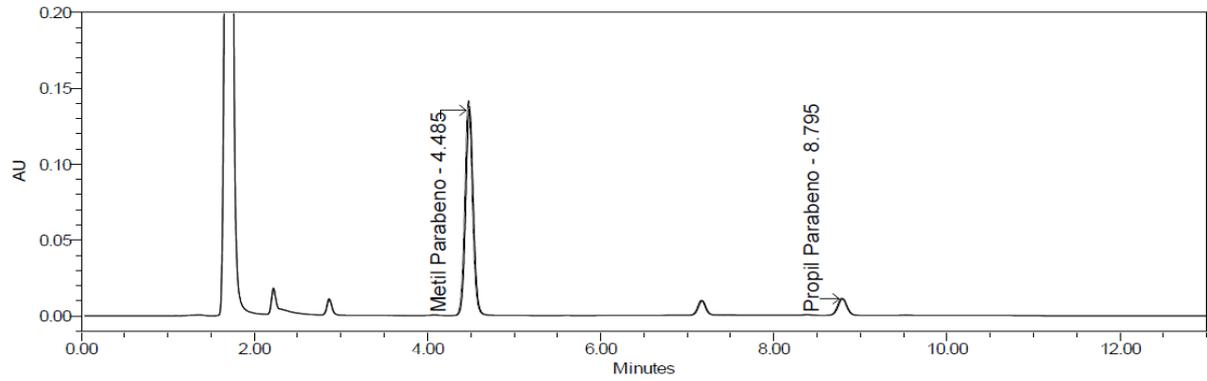
Anexo A.5 Cromatograma de reacciones inducidas - Metil y Propil Parabeno MP + Placebo Hidrolisis Acida a 254nm



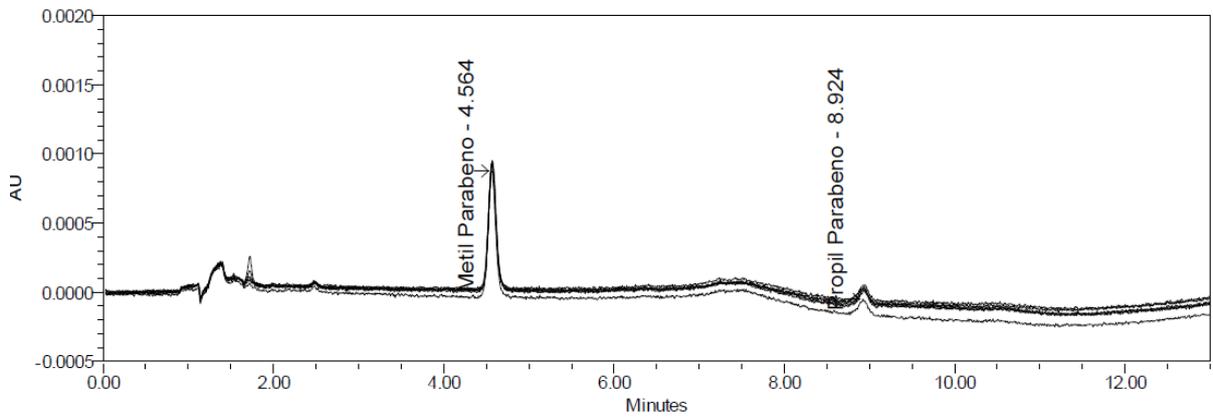
Anexo A.6 Cromatograma de reacciones inducidas - Metil y Propil Parabeno MP + Placebo Oxidación a 254nm



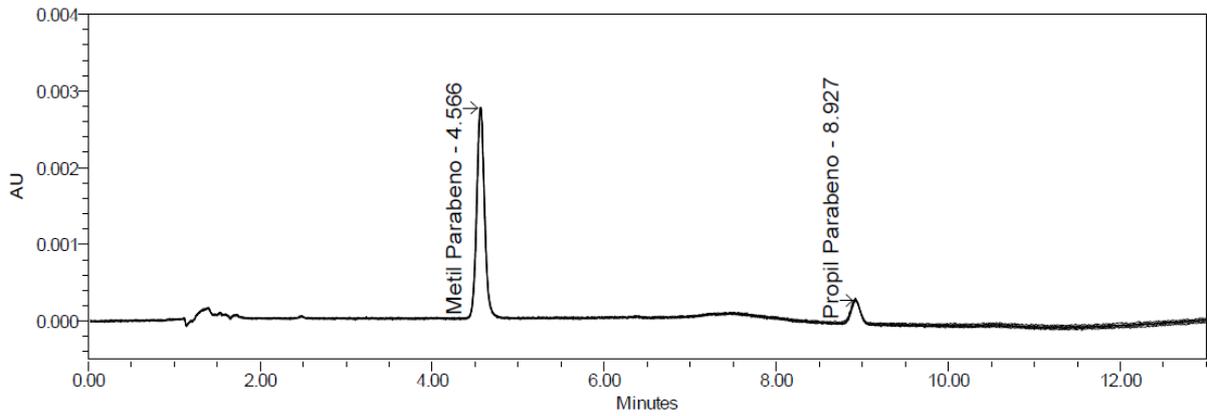
Anexo A.7 Cromatograma de reacciones inducidas - Metil y Propil Parabeno MP + Placebo Fotosensibilidad a 254nm



Anexo A.8 Límite de detección (LOD)



Anexo A.9 Límite de cuantificación (LOQ)



6. REFERENCIAS

- [1] F. Castelain and M. Castelain, "Parabens: A real hazard or a scare story?," *European Journal of Dermatology*, vol. 22, no. 6. pp. 723–727, Dec. 2012. doi: 10.1684/ejd.2012.1835.
- [2] I. Hrádková, M. Kumherová, and J. Šmidrkal, "Preservatives in Cosmetics," *Chemické Listy*, vol. 115, no. 10, pp. 554–556, 2021, doi: 10.1016/b978-0-444-63508-2.00009-6.
- [3] "AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS 'Inactive' Ingredients in Pharmaceutical Products: Update (Subject Review)," 1997.
- [4] V. H. Nguyen *et al.*, "The degradation of paraben preservatives: Recent progress and sustainable approaches toward photocatalysis," *Chemosphere*, vol. 276, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130163.
- [5] G. Pifferi and P. Restani, "The safety of pharmaceutical excipients," *Farmaco*, vol. 58, no. 8, pp. 541–550, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0014-827X(03)00079-X.
- [6] V. N. Kalpana and V. Devi Rajeswari, "Preservatives in beverages: Perception and needs," in *Preservatives and Preservation Approaches in Beverages: Volume 15: The Science of Beverages*, Elsevier, 2019, pp. 1–30. doi: 10.1016/B978-0-12-816685-7.00001-X.
- [7] G. Alvarez-Rivera, M. Llompert, M. Lores, and C. Garcia-Jares, "Preservatives in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods," in *Analysis of Cosmetic Products*, no. 10, Spain: Universidad de Santiafo de Compostela, 2018, pp. 175–224. doi: 10.1016/b978-0-444-63508-2.00009-6.
- [8] N. Halla *et al.*, "Cosmetics preservation: A review on present strategies," *Molecules*, vol. 23, no. 7. MDPI AG, 2018. doi: 10.3390/molecules23071571.
- [9] B. K. Meyer, A. Ni, B. Hu, and L. Shi, "Antimicrobial preservative use in parenteral products: Past and present," *J Pharm Sci*, vol. 96, no. 12, pp. 3155–3167, 2007, doi: 10.1002/jps.20976.
- [10] A. F. Fransway *et al.*, "Parabens," *Dermatitis*, vol. 30, no. 1. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 3–31, Jan. 01, 2019. doi: 10.1097/DER.0000000000000429.
- [11] M. G. Soni, G. A. Burdock, S. L. Taylor, and N. A. Greenberg, "Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature." [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

- [12] A. F. Fransway, P. J. Fransway, D. v. Belsito, and J. A. Yiannias, "Paraben Toxicology," *Dermatitis*, vol. 30, no. 1. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 32–45, Jan. 01, 2019. doi: 10.1097/DER.0000000000000428.
- [13] D. M. Kreuz, A. L. Howard, and D. Ip, "Determination of indinavir, potassium sorbate, methylparaben, and propylparaben in aqueous pediatric suspensions," 1999.
- [14] M. G. Soni, G. A. Burdock, S. L. Taylor, and N. A. Greenberg, "Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature." [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/foodchemtox
- [15] M. G. Soni, S. L. Taylor, N. A. Greenberg, and G. A. Burdock, "Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature." [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/foodchemtox
- [16] Z. Petric, J. Ruzić, and I. Zuntar, "The controversies of parabens - an overview nowadays," *Acta Pharmaceutica*, vol. 71, no. 1. Sciendo, pp. 17–32, Mar. 01, 2021. doi: 10.2478/acph-2021-0001.
- [17] N. Matwiejczuk, A. Galicka, and M. M. Brzóska, "Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 40, no. 1. John Wiley and Sons Ltd, pp. 176–210, Jan. 01, 2020. doi: 10.1002/jat.3917.
- [18] T. Sandle, "Antibiotics and preservatives," in *Pharmaceutical Microbiology*, Elsevier, 2016, pp. 171–183. doi: 10.1016/b978-0-08-100022-9.00014-1.
- [19] F. A. Andersen, "Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products," *International Journal of Toxicology*, vol. 27, no. SUPPL. 4. pp. 1–82, 2008. doi: 10.1080/10915810802548359.
- [20] M. G. Soni, S. L. Taylor, N. A. Greenberg, and G. A. Burdock, "Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 40, pp. 1335–1373, 2002, [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/foodchemtox
- [21] D. Kim *et al.*, "Multispecies bioassay of propylparaben to derive protective concentrations for soil ecosystems using a species sensitivity distribution approach," *Environmental Pollution*, vol. 265, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.envpol.2020.114891.
- [22] R. Szucs, C. Brunelli, F. Lestremau, and M. Hanna-Brown, "Liquid chromatography in the pharmaceutical industry," in *Liquid Chromatography: Applications: Second Edition*, vol. 2, Elsevier Inc., 2017, pp. 515–537. doi: 10.1016/B978-0-12-805392-8.00017-7.
- [23] Y. Hajizadeh, G. Kiani Feizabadi, and A. Feizi, "Exposure to Parabens Through The Use of Personal Care Products Among Iranian Men," *Arch*

Environ Contam Toxicol, vol. 80, no. 3, pp. 587–600, Apr. 2021, doi: 10.1007/s00244-021-00818-2.

- [24] I. Hewala, H. El-Fataty, E. Emam, and M. Mabrouk, “Development and application of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic method using photodiode array detection for simultaneous determination of granisetron, methylparaben, propylparaben, sodium benzoate, and their main degradation products in oral pharmaceutical preparations,” *J AOAC Int*, vol. 94, no. 5, pp. 1447–1460, Sep. 2011, doi: 10.5740/jaoacint.10-129.
- [25] S. Ho Kang and H. Kim, “JOURNAL OF Simultaneous determination of methylparaben, propylparaben and thimerosal by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection,” 1997.
- [26] C. Bereketoglu and A. Pradhan, “Comparative transcriptional analysis of methylparaben and propylparaben in zebrafish,” *Science of the Total Environment*, vol. 671, pp. 129–139, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.358.
- [27] M. S. Ali, M. Ghori, and A. R. Khatri, “Stability indicating simultaneous determination of domperidone (DP), methylparaben (MP) and propylparaben by high performance liquid chromatography (HPLC),” *J Pharm Biomed Anal*, vol. 41, no. 2, pp. 358–365, May 2006, doi: 10.1016/j.jpba.2005.12.026.
- [28] L. N. R. Katakam, S. K. Ettaboina, and T. Dongala, “A simple and rapid HPLC method for determination of parabens and their degradation products in pharmaceutical dosage forms,” *Biomedical Chromatography*, vol. 35, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.1002/bmc.5152.
- [29] I. Martins, M. Lambert, A. F. S. Pereira, H. D. de Faria, E. C. de Lima, and G. R. Pereira, “Serum analysis in women and in vitro skin assay for the assessment of exposure to parabens in antiperspirants,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 27, no. 4, pp. 4219–4226, Feb. 2020, doi: 10.1007/s11356-019-07038-1.
- [30] M. S. R. Dantas, A. S. Lourenço, A. C. Silva, K. M. Bichinho, and M. C. U. Araujo, “Simultaneous determination of methyl, ethyl, propyl, and butyl parabens in sweetener samples without any previous pretreatment using square wave voltammetry and multiway calibration,” *Food Chem*, vol. 365, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130472.
- [31] H. M. Maher, N. Z. Alzoman, M. A. Almeshal, H. A. Alotaibi, N. N. Alotaibi, and H. Al-Showiman, “Quantitative screening of parabens in Ready-to-eat foodstuffs available in the Saudi market using high performance liquid chromatography with photodiode array detection,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 13, no. 1, pp. 2897–2911, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.arabjc.2018.07.019.

- [32] Z. B. Khesina, S. D. Iartsev, A. I. Revelsky, and A. K. Buryak, "Microextraction by packed sorbent optimized by statistical design of experiment as an approach to increase the sensitivity and selectivity of HPLC-UV determination of parabens in cosmetics," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 195, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.jpba.2020.113843.
- [33] C. A. Beasley, J. Shaw, Z. Zhao, and R. A. Reed, "Development and validation of a stability indicating HPLC method for determination of lisinopril, lisinopril degradation product and parabens in the lisinopril extemporaneous formulation," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 37, no. 3, pp. 559–567, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.jpba.2004.11.021.
- [34] M. Becerra-Herrera, V. Miranda, and P. Richter, "Rapid determination of parabens in water samples by ultra-high performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry," *Analytical Sciences*, vol. 36, no. 6, pp. 675–679, 2020, doi: 10.2116/ANALSCI.19P409.
- [35] I. A. Wiraagni, M. A. Mohd, R. A. Rashid, and D. E. B. M. Haron, "Trace Level Detection of Bisphenol A Analogues and Parabens by LC-MS/MS in Human Plasma from Malaysians," *Biomed Res Int*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/2581287.
- [36] M. W. Dong, "HPLC INSTRUMENTATION IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS: STATUS, ADVANCES, AND TRENDS," in *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, M. W. Dong and S. Ahuja, Eds. New York: Purdue Pharma, 2005, pp. 47–75. doi: [https://doi.org/10.1016/S0149-6395\(05\)80047-9](https://doi.org/10.1016/S0149-6395(05)80047-9).
- [37] J. McMillan, "Principles of Analytical Validation," in *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads: Second Edition*, Elsevier Inc., 2016, pp. 239–251. doi: 10.1016/B978-0-444-63688-1.00013-6.
- [38] N. Kumar, D. Sangeetha, and P. Balakrishna, "Development and validation of a UPLC method for the determination of duloxetine hydrochloride residues on pharmaceutical manufacturing equipment surfaces," *Pharm Methods*, vol. 2, no. 3, pp. 161–166, Jul. 2011, doi: 10.4103/2229-4708.90355.
- [39] A. S. Lister, "VALIDATION OF HPLC METHODS IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS," in *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, M. W. Dong and S. Ahuja, Eds. New York: El Selvier, 2005, pp. 191–217. doi: 10.1016/S0149-6395(05)80051-0.
- [40] AOAC, "Guidelines for Single Laboratory Validation Dietary Supplements and Botanicals," 2002.