



Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM)
Mérida-Venezuela



Trabajo Especial de Grado

**Determinación de la uniformidad de contenido de un antimicrobiano
(Azitromicina) ampliamente utilizado en el tratamiento de COVID - 19, por
Espectroscopia Derivativa de Absorción Molecular en el UV-Visible**

Br. Edgar Armando Albarrán Molina

Tutor: Dr. Carlos Ayala

Mérida, 2024

Índice de Contenido

1.	Introducción	12
2.	Marco Teórico.....	13
2.1	COVID – 19.....	13
3.	Transmisión del SARS-CoV-2 desde la Perspectiva Celular.....	14
4.	Antimicrobianos	15
4.1	Clasificación de los Antimicrobianos	15
5.	Azitromicina	16
5.1	Farmacocinética de la Azitromicina.....	17
5.2	Farmacodinámica de la Azitromicina.....	17
5.3	Acción Antiinflamatoria e Inmunomoduladora de la Azitromicina	17
5.4	Usos y Aplicaciones	18
6.	Validación de Métodos Analíticos.....	19
6.1	Importancia de la Validación	19
6.2	Características de Desempeño Aplicables en la Validación de Métodos ..	20
7.	Unidad de Dosificación	23
8.	Métodos Oficiales para Determinar Azitromicina	24
8.1	Farmacopea de los Estados Unidos (USP46 – NF41) (20).....	24
8.2	Farmacopea Argentina.....	25
9.	Métodos Alternativos para Determinar Azitromicina	26
9.1	Método 1. Determinación espectrofotométrica de dihidrato de azitromicina en formulación farmacéutica sólida y su Aplicación a los Estudios de Disolución.....	26
9.2	Método 2. Desarrollo del Método Espectrofotométrico UV de Azitromicina en Estudios de Degradación de API	26

9.3	Método 3. Métodos Espectrofotométricos Selectivos para la Determinación de Azitromicina de Formulación Farmacéutica	27
9.4	Método 4. Análisis Espectrofotométrico de Azitromicina y sus Presentaciones Farmacéuticas: Comparación Entre Espectrofotometría y HPLC (24).....	27
10.	Fundamentos de la Espectroscopia Ultravioleta y Visible (UV-Vis).....	29
10.1	Radiación Electromagnética	29
10.2	Espectro Electromagnético	30
10.3	Absorción de Radiación	31
10.4	Ley de Beer-Lambert	32
11.	Absorción Molecular en el Ultravioleta y Visible (UV-Vis).....	33
11.1	Espectro Ultravioleta y Visible.....	34
12.	Técnica de Espectroscopia de Absorción Molecular UV-Vis	35
13.	Instrumentación para la Técnica de Espectroscopia UV-Vis	36
13.1	Fuentes	37
13.2	Recipiente de la Muestra	38
13.3	Selectores de Longitud de Onda.....	39
13.4	Detectores de Radiación.....	40
13.5	Tipos de Instrumentos.....	41
14.	Aplicaciones de la Técnica de Espectroscopia de Absorción UV-Vis.....	43
14.1	Espectrofotometría Derivada	44
15.	Justificación	46
16.	Hipótesis.....	47
17.	Objetivos.....	48
17.1	Objetivo General	48
17.2	Objetivos Específicos.....	48

18.	Metodología Experimental	49
18.1	Locación.....	49
18.2	Tipo de Estudio y Diseño	49
18.3	Muestras	49
18.4	Materiales y Reactivos	49
18.5	Equipos	50
19.	Procedimiento Experimental.....	51
19.1	Curvas de Calibrado	51
19.2	Preparación de la Muestra	52
20.	Resultados y Discusiones.....	53
20.1	Selección del Solvente.....	53
20.2	Caracterización Espectral	55
20.3	Estudio de la Factibilidad de la Metodología Propuesta	56
20.4	Selección de Criterio de Medida	58
20.5	Optimización de los Parámetros Experimentales.....	65
20.6	Validación del Método Propuesto	69
20.7	Estudios de Exactitud de la Metodología Propuesta	79
21.	Conclusiones	86
22.	Recomendaciones.....	87
23.	Referencias Bibliográficas	88

Índice de Figuras

Figura 1. Representación gráfica del betacoronavirus SARS-CoV-2.....	13
Figura 2. Unión del SARS-CoV-2 con las células del cuerpo a través de los receptores celulares ACE2 y CD147	14
Figura 3. Representación de la estructura de la Azitromicina dihidratada	16
Figura 4. Representación esquemática de la radiación electromagnética	29
Figura 5. Espectro electromagnético.	30
Figura 6. Proceso de absorción de radiación de haz incidente (P_0) y haz emergente o transmitido	31
Figura 7. Transiciones electrónicas en el proceso de absorción UV-Vis	33
Figura 8. Espectro ultravioleta y Visible	34
Figura 9. Esquema general de un espectrofotómetro UV-Vis.....	36
Figura 10. Fuentes.....	37
Figura 11. Representación gráfica de las cubetas.....	38
Figura 12. Detectores a) celda fotovoltaica de capa barrera b) fototubo c) fototubo de silicio.....	40
Figura 13. Esquemática de un espectrofotómetro de doble haz.....	43
Figura 14. Representación gráfica de a) un espectro UV-Vis Absorbancia vs. λ b) un espectro UV-Vis $dA/d\lambda$ vs. λ	44
Figura 15. Esquema de preparación de la curva de calibración.	51
Figura 16. Esquema de tratamiento de la muestra	52
Figura 17. Espectro UV-Visible del Cloroformo en la región de estudio	54
Figura 18. A) Cloroformo (Solvente); B) Solución estándar de Azitromicina (AZI) concentración de 500 mg / L.....	55
Figura 19. Espectro UV-Visible obtenido a partir de: A) Cloroformo (Solvente); B) Solución estándar de Azitromicina (AZI) concentración de 500 mg / L.....	56

Figura 20. Espectro UV-Visible obtenido a partir de: a) Cloroformo (Blanco); b) Solución estándar de Azitromicina (AZI) concentración de 500 mg / L; c) Solución de muestra 500 mg/L de Azitromicina; d) Solución fortificada con patrón de Azitromicina.	57
Figura 21. Criterios de medida espectro de la Azitromicina orden cero (D^0).....	59
Figura 22. Espectro UV-Visible de solución estándar de Azitromicina (AZI) concentración de 500 mg / L a) primera derivada (D^1) b) orden cero (D^0).....	61
Figura 23. Criterios de medida espectro de la Azitromicina primera derivada (D^1)	62
Figura 24. Criterios de medida escogido para la cuantificación de la Azitromicina	64
Figura 25. Representación gráfica de tiempo de sonicación respecto al tiempo.	66
Figura 26. Evaluación velocidad de barrido en solución patrón de Azitromicina	67
Figura 27. Representación gráfica de la evaluación de resolución en muestras farmacéuticas	68
Figura 28. Gráfico de curva de calibración sencilla para la evaluación de la linealidad del método	70
Figura 29. Estudio de estabilidad de las soluciones de trabajo bajo la metodología propuesta.....	73
Figura 30. Curva de calibración primera derivada ($D^1 \lambda=245$). Blanco; Solución estándar AZI de 400, 550, 700, 800 y 1000 mg / L.....	78
Figura 31. Gráfico de la curva de calibración ($D^1 \lambda=245$).....	79

Índice de Tablas

Tabla 1. Metodologías alternativas para determinar el contenido de Azitromicina	28
Tabla 2. Resumen de fuentes utilizadas en los espectrofotómetros (27).....	37
Tabla 3. Materiales utilizados	49
Tabla 4. Reactivos utilizados.....	50
Tabla 5. Equipos utilizados.....	50
Tabla 6. Solubilidad de Azitromicina en diferentes solventes.....	53
Tabla 7. Análisis de los valores de altura, altura pico y área a $\lambda=243$ nm.....	59
Tabla 8. Análisis de altura pico y área de la primera derivada D^1 a $\lambda=239$ nm..	62
Tabla 9. Análisis de altura pico y área de la primera derivada D^1 a $\lambda=245$ nm..	63
Tabla 10. Resumen de las condiciones experimentales	69
Tabla 11. Evaluación de la linealidad del método	70
Tabla 12. Estudios de repetibilidad de la metodología propuesta	71
Tabla 13. Estudios de precisión intermedia de la metodología propuesta	72
Tabla 14. Parámetros analíticos de las curvas de calibración de adición estándar (CAE).....	74
Tabla 15. Resultados de la prueba F para la evaluación entre las curvas de calibración sencilla y adición estándar.....	75
Tabla 16. Resumen de parámetros a evaluar en el estadístico t (Student).....	76
Tabla 17. Resultados del estadístico t para la evaluación entre curvas de calibración sencilla y de adición estándar.....	77
Tabla 18. Características analíticas de la curva de calibración.....	78
Tabla 19. Análisis de muestras de Azitromicina empleando la metodología alternativa desarrollada	80
Tabla 20. Estudio de recuperación en muestras de Azitromicina.....	81

Tabla 21. Análisis de muestras de comercios farmacéuticos por metodología de referencia.....	83
Tabla 22. Parámetros a evaluar en el estadístico t (Student) en la comparación de método desarrollado respecto al método de referencia.	84
Tabla 23. Resultados del estadístico t para la evaluación entre el método desarrollado y método de referencia.	84

Índice de Abreviaturas

Abs: Absorbancia	SARS-CoV-2: Síndrome respiratorio agudo severo
AZI: Azitromicina	OMS: Organización Mundial de la Salud
\bar{x} : Media aritmética de x	ACE2: Angiotensina 2
m: Pendiente de la recta de calibración	CD 147: Grupo de Diferenciación 147
D¹=dA/dλ: Absorbancia de la primera derivada del espectro de absorción	PI3K/AKT: Vía de señalización fosfatidilinositol-3-quinasa
D⁰: espectro de absorción de orden cero	UV: Ultravioleta
%DER: Desviación estándar relativa	Vis: Visible
s: Desviación estándar	mg/L: miligramo sobre litro
s_b: Desviación estándar de la intersección	USP: Farmacopea de los Estados Unidos
s_m: Desviación estándar de la pendiente	Conc.: Concentración
s²: Varianza	F: Prueba F de Fisher
LOD: Limite de detección	t: Estadístico t de Student
LOQ: Limite de cuantificación	HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
r²: Coeficiente de determinación	IR: Infrarrojo
r: Coeficiente de correlación	%R: Recuperación

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a mis padres Lisbeth Molina y Rafael Albarrán, así como a mi hermana Merlis Albarrán por haberme brindado el apoyo necesario para poder llevar a cabo todos mis objetivos académicos, así como las herramientas necesarias en mi crecimiento personal.

A mi tutor Dr. Carlos Daniel Ayala Montilla, le agradezco por su tiempo, dedicación, convicción y paciencia, ya que con sus consejos y correcciones no hubiese logrado tan anhelado objetivo.

Al Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM) por abrirme las puertas para poder realizar el estudio experimental, así como a su personal y colaboradores por brindar sus conocimientos, su apoyo y ayuda en la realización de este Trabajo Especial de Grado (T.E.G.). A ustedes gracias.

Por último, aprecio a todas aquellas personas que durante estos años de formación me brindaron su apoyo de manera desinteresada para que hoy lograra culminar este primer escalón en la formación académica a nivel profesional.

Eternamente Agradecido

Edgar Armando Albarrán Molina

Resumen

La presente investigación busca dar a conocer el desarrollo de una nueva metodología alternativa para la determinación del contenido de Azitromicina en tabletas de 500 mg, por medio de la extracción sólido líquido del analito en cloroformo, con sonicación por 30 minutos, y como medio de cuantificación se emplea la técnica de espectroscopia derivativa de absorción molecular en la región UV-Vis.

De los resultado obtenidos, se monitoriza el mínimo de absorción en 245 nm de la primera derivada de absorbancia respecto a longitud de onda ($dA/d\lambda=D^1$), para un intervalo lineal de concentración de 400 a 1000 mg/L, con un coeficiente de determinación lineal (r^2) de 0,9993, con límites de detección y cuantificación de 25 y 78,5 mg/L, respectivamente. Adicionalmente, se calcula una desviación estándar relativa (%RSD) menor al 5% para el sistema en estudio. Mediante la validación con otra metodología alternativa referenciada en la literatura, se encuentra que las muestras analizadas están en el intervalo de recuperación aceptado por la farmacopea USP46 – NF41 (90 - 110%). De esta manera, la inferencia principal sobre los resultados experimentales indican que el método desarrollado es aplicable para la cuantificación de Azitromicina en tabletas.

Palabras Clave: Azitromicina, Espectroscopia Derivativa, Validación, Cloroformo

1. Introducción

Una de las enseñanzas que ha dejado el COVID-19 en la sociedad humana está relacionada con la consciencia y conocimiento de los fármacos que se utilizan para mejorar la calidad de vida de las personas. Especialmente, cuando hoy día existe una creciente incidencia de medicamentos falsificados fomentando un problema de salud pública.

Esto se puede notar con medicamentos utilizados regularmente por la población venezolana como la Azitromicina, un antimicrobiano con prescripción para sintomatologías respiratorias, que se probó como tratamiento experimental para el COVID-19, propiciando un aumento de su consumo en la población y generando la incertidumbre sobre su calidad.

Es por ello que, desde el área de la química analítica en conjunto con la industria farmacéutica, se busca promover la investigación y desarrollo de nuevos métodos para determinar las propiedades físicas y químicas de las sustancias, especialmente, como alternativa a las metodologías oficiales dictaminadas por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP46-NF41), ya que en su mayoría son altamente costosas y especializadas.

Para responder a esta problemática, se pueden desarrollar métodos que aprovechen las propiedades de solubilidad del analito, así como, el empleo de técnicas complementarias como la espectroscopia derivativa para mejorar las características de desempeño del método al menor costo y con una corta inversión de tiempo.

A partir de lo antes expuesto, queda por mencionar que el propósito de este trabajo especial de grado (T.E.G.) es dar a conocer una nueva metodología alternativa para la determinación cuantitativa del principio farmacéutico activo Azitromicina mediante la técnica de espectroscopia derivativa de absorción molecular en la región ultravioleta y visible (UV-Vis), como opción aplicable al control de calidad en la industria farmacéutica, permitiendo el análisis del producto de forma fácil, rápida, precisa, exacta y económica.

2. Marco Teórico

2.1 COVID – 19

El COVID – 19 (figura 1) es una enfermedad respiratoria causada por un virus que pertenece al género de los β – Coronavirus, específicamente de la familia *Coronaviridae*, que ocasiona el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2), el cual fue descubierto debido a un brote inusual de neumonía en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei en China a finales del 2019. Poco tiempo después, la enfermedad se diseminó aceleradamente por todo el planeta siendo categorizada como pandemia mundial el 11 de marzo de 2020 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1).

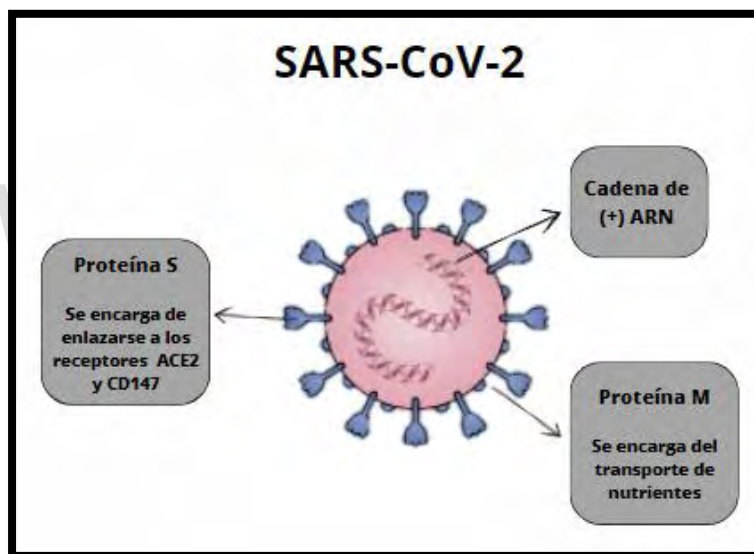


Figura 1. Representación gráfica del betacoronavirus SARS-CoV-2 (1).

Hasta la fecha, más de 6 millones de personas han fallecido a raíz de la enfermedad, siendo una de las principales causas la alta capacidad que tiene el COVID para transmitirse, principalmente a través de los aerosoles provenientes de la saliva o secreciones respiratorias de personas infectadas que pueden presentar un estado presintomático, asintomático o sintomático (2). Así pues, cuando una persona está en contacto con el virus, ocurre un proceso de incubación de 5 días aproximadamente. Luego, comienza una fase de replicación del virus donde

aparecen los principales síntomas de la enfermedad como: fiebre, tos, cansancio, cefalea, pérdida del gusto y del olfato, dificultad para respirar, dolor de pecho, entre otros (3).

3. Transmisión del SARS-CoV-2 desde la Perspectiva Celular

Dentro de los mecanismos de transmisión estudiados para el SARS-CoV-2 (figura 2), se ha encontrado que puede unirse a las células del cuerpo a través de las proteínas (S) con forma de espina en su estructura hacia receptores celulares como la enzima convertidora de la Angiotensina 2 (ACE2), así como al grupo de diferenciación 147 (CD147). En consecuencia, el sistema inmune del cuerpo promueve la liberación de citocinas proinflamatorias que conlleva a la inflamación de los tejidos pulmonares (4).

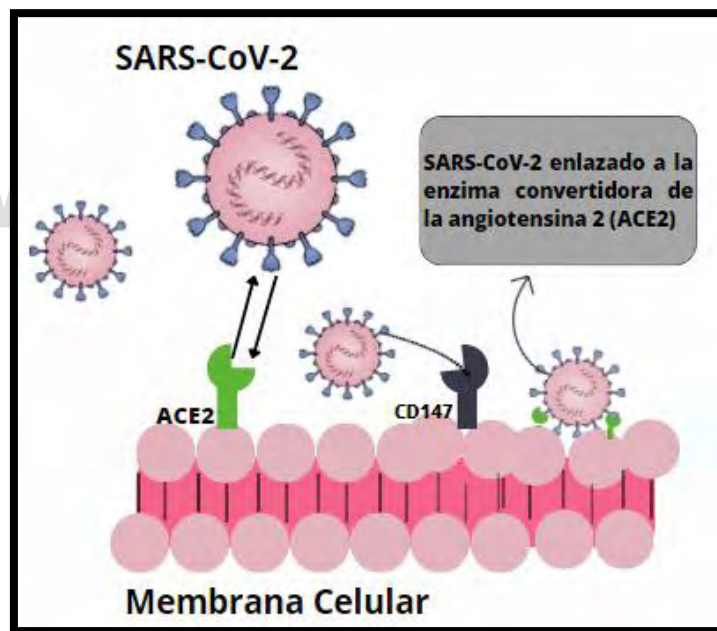


Figura 2. Unión del SARS-CoV-2 con las células del cuerpo a través de los receptores celulares ACE2 y CD147 (4).

Una vez conocido el mecanismo de acción del COVID - 19, se propuso el empleo de medicamentos conocidos que fueran eficaces para inhibir o limitar los procesos de unión celular antedichos. En este caso, se utilizaron fármacos antimicrobianos, antiinflamatorios e incluso inmunomoduladores como la Azitromicina, el cual tomó

relevancia como tratamiento potencial debido a sus posibles efectos para atender algunas patologías respiratorias similares a las reportadas para el coronavirus (2).

Teniendo en cuenta lo mencionado, es conveniente introducir las definiciones relacionadas con la familia de compuestos antimicrobianos donde se clasifica la Azitromicina.

4. Antimicrobianos

Existen sustancias con propiedades terapéuticas capaces atender las afecciones generadas por microorganismos como los virus, bacterias, hongos y parásitos, los cuales se denominan compuestos antimicrobianos. Sus aplicaciones tienen antecedentes que remontan a los orígenes de la civilización humana, sin embargo, no fue hasta inicios del siglo XX que comenzaron a utilizarse de forma regular producto de las investigaciones exhaustivas de estas sustancias por el descubrimiento de la Penicilina (6).

En la actualidad, el consumo de los antimicrobianos, ha generado la mejora en la calidad de vida de las personas, debido a que numerosas enfermedades han sido erradicadas y otras encuentran una cura o solución con una administración adecuada. Estos pueden clasificarse de diferentes maneras como se menciona en la siguiente sección.

4.1 Clasificación de los Antimicrobianos

Hoy en día se pueden encontrar una gran cantidad de fármacos con propiedades antimicrobianas, cada uno con características individuales pero que comparten puntos en común, que se emplea como base para su clasificación.

En concreto, cuando se catalogan por su origen comprende a aquellos compuestos producidos de forma natural por un microorganismo (antimicrobianos naturales). También, se encuentran aquellos generados de forma artificial por síntesis química como los antimicrobianos sintéticos y semisintéticos (6).

Cada uno de estos compuestos presenta diferentes mecanismos y espectros de acción dependiendo de su reactividad química, que se relaciona con la estructura

química y familia de compuestos, como por ejemplo, las sustancias capaces de inhibir la síntesis de proteínas de las bacterias como los macrólidos donde se encuentra el fármaco de estudio Azitromicina, cuya descripción detallada se dará a continuación (7).

5. Azitromicina

La Azitromicina (AZI) es un antimicrobiano semisintético de la familia de los Macrólidos, cuya fórmula molecular es $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot xH_2O$ ($x = 0, 1$ y 2), y está asociada a una estructura química representada en la figura 3, la cual se constituye por una lactona unida a dos azúcares, que son la *D*-Desosamina y la *L*-Cladinoso.

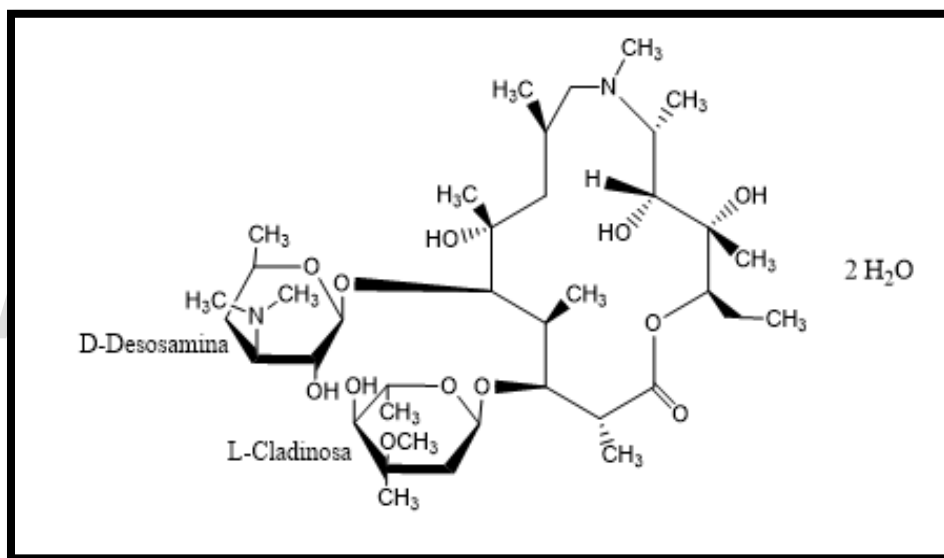


Figura 3. Representación de la estructura de la Azitromicina dihidratada (8).

Presenta una masa molar de 785,0 g/mol para su polimorfo dihidratado y su nombre en la nomenclatura sistemática es: [2R-(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)]-13-[(2,6-Dideoxi-3-C-metil-3-O-metil- α -L-ribohexopiranosil)oxi]-2-etil-3,4,10-trihidroxi-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-11-[[3,4,6-trideoxi-3-(dimetilamino)- β -D-xilohexopiranosil]oxi]-1-oxa -6-azaciclopentadecan-15-ona (8).

Respecto a las propiedades físicas descritas para la Azitromicina, se ha reportado como un compuesto sólido de color blanco y apariencia cristalina a temperatura ambiente, que funde entre 113 - 115 °C aproximadamente (9). Además, es

prácticamente insoluble en medio acuoso. En contraste, es bastante soluble en alcoholes de bajo peso molecular, al igual que en solventes orgánicos (10) (11).

En el caso de las propiedades ácido base, tiene una constante de ionización ácida (pKa) de 7,34, clasificándose como una base débil, donde se asocia esta característica al grupo dimetilamina [$\sim\text{N}(\text{CH}_3)_2$] en el azúcar *D*-Desosamina (12).

Otro punto a mencionar, es que la Azitromicina exhibe tres tipos de polimorfismo que son el anhídrido, monohidrato y dihidrato, siendo la forma dihidratada el polimorfo más estable (9).

5.1 Farmacocinética de la Azitromicina

La Azitromicina presenta una tasa de absorción rápida en el sistema sanguíneo, pudiendo alcanzar concentraciones plasmáticas de 0,2 a 0,4 mg/L en un intervalo de 2 a 4 horas luego del consumo de una dosis única de 500 mg. Además, puede permanecer en el organismo de 50 a 70 horas después de su administración intravenosa y oral, respectivamente. En cuanto a las vías de eliminación, esta ocurre por medio de la orina y las heces tanto por excreción biliar como por secreción transintestinal (13).

5.2 Farmacodinámica de la Azitromicina

La Azitromicina es un antimicrobiano de amplio espectro que es utilizado para tratar afecciones bacterianas principalmente. Adicionalmente, es considerado como un antimicrobiano del tipo bacteriostático, es decir, aquel que inhibe o bloquea algunas funciones básicas de la bacteria a la cual está atacando. Específicamente, la Azitromicina actúa inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas (13).

5.3 Acción Antiinflamatoria e Inmunomoduladora de la Azitromicina

Aparte de sus propiedades antibacterianas, la Azitromicina tiene la capacidad para mejorar la respuesta inmunitaria del cuerpo, proceso que se le denomina inmunomodulación. De igual forma, presenta propiedades para reducir la inflamación de los tejidos, siendo ambas características muy atractivas en el

tratamiento de afecciones respiratorias causadas por virus y bacterias principalmente (4).

Por esta razón, se propuso a la Azitromicina como potencial tratamiento del COVID – 19, ya que el antimicrobiano es capaz de inhibir a las principales vías de recepción del virus como la enzima convertidora de Angiotensina II, el grupo de diferenciación 147 (CD147), y la vía de señalización de PI3K/AKT, promoviendo la desinflamación de los tejidos pulmonares (4). No obstante, hallazgos experimentales han comprobado que la Azitromicina no genera cambios en el cuadro clínico de la enfermedad, desestimando su uso (2).

5.4 Usos y Aplicaciones

Las propiedades indicadas previamente para la Azitromicina, como su amplio espectro, su farmacocinética y farmacodinámica permiten inferir sobre la cantidad de aplicaciones que tiene el medicamento, comenzando por sus efectos sobre las enfermedades inflamatorias infecciosas y no infecciosas de las vías respiratorias como la neumonía, amigdalitis, sinusitis crónica, asma bronquial. Además, se ha encontrado que es efectivo en el tratamiento de infecciones de transmisión sexual (ITS) como la clamidia e incluso en infecciones de piel (13).

Con relación a lo mencionado, se infiere que la Azitromicina tiene una amplia demanda en mercado farmacéutico y, por ende, se requiere que el medicamento se expida con un nivel de confianza apropiado para garantizar la calidad del producto que consumen las personas. Debido a esto, se han desarrollado nuevas metodologías analíticas con la finalidad de aportar información sobre las propiedades físicas y químicas del antimicrobiano de manera rápida, sencilla y precisa, donde la veracidad del procedimiento es respaldada por medio de operaciones como la validación de métodos analíticos.

6. Validación de Métodos Analíticos

Cuando se desarrolla un método analítico se debe garantizar que este funcione adecuadamente respecto a las especificaciones y objetivos previstos para el mismo. Es por ello que, se requiere de operaciones como la validación de métodos analíticos, las cuales consisten en una serie de actividades sistematizadas con la finalidad de confirmar que método diseñado por el laboratorio se ejecuta correctamente (14).

Como tal, en la validación se busca demostrar que el desempeño y la confiabilidad del método es apropiada para su aplicación. Esto se logra a través de la evaluación de errores, porque al determinar el error de un método se puede asegurar que su magnitud no afecta la interpretación de los resultados, pudiéndose establecer su utilidad y aplicabilidad (15).

6.1 Importancia de la Validación

En general, cuando los resultados de un análisis carecen de un nivel de confianza adecuado, ponen en duda su valor, generando un alto nivel de incertidumbre. Por lo tanto, al diseñar un método analítico se recurre a la validación, ya que permite al analista demostrar que los resultados del método son confiables.

En este sentido, la validación proporciona un conocimiento sólido sobre las características esenciales del método, sus virtudes y limitaciones, apoyándose sobre una serie de operaciones estadísticas (características de desempeño) para justificar dichos parámetros. Adicionalmente, se pueden mencionar otros beneficios en la validación de métodos analíticos, entre los que destacan (16):

- Tener conocimiento de la incertidumbre del método analítico.
- Disminución de los errores
- Mejora de la eficiencia y la productividad.
- Optimización de las instalaciones, equipos, sistemas y procesos.

6.2 Características de Desempeño Aplicables en la Validación de Métodos

En el marco de la validación de un método para la cuantificación del principio activo de un producto farmacéutico como la Azitromicina, se tomó en cuenta la necesidad de definir aquellas pruebas estadísticas que sustentan la fiabilidad de los resultados, las cuales son: selectividad, linealidad, sensibilidad, límites, exactitud, precisión y robustez (16). A continuación, se mencionan los principales conceptos de las características de desempeño mencionadas.

6.2.1 Selectividad. Cuando se realiza una medición utilizando una técnica instrumental, normalmente se mide una propiedad física como la intensidad de luz (absorbancia) que proviene del analito. Por esta razón, es necesario establecer que dicha medida provenga del compuesto apropiado y no de alguna sustancia con propiedades similares. Aquí es cuando se requiere que el método sea capaz de diferenciar entre la señal del analito respecto de otras sustancias sin interferencia de otro compuesto de la matriz, lo cual se denomina selectividad o especificidad (14).

Para evaluar la especificidad generalmente se pone a prueba la capacidad de medir al analito en diferentes condiciones. Por ejemplo, se pueden comparar las lecturas obtenidas por soluciones estándar, blancos, muestras e incluso con patrones con agregados intencionales de los componentes de la matriz. De esta forma, se puede discernir sobre las posibles interferencias y en lo posible eliminarlas (14).

6.2.2 Linealidad. Se considera como la capacidad de un método para generar una respuesta instrumental proporcional a la cantidad del analito a determinar dentro de un intervalo establecido (17). El gráfico utilizado para determinar la linealidad se le denomina curva de calibración, donde se estudia un parámetro estadístico denominado coeficiente de determinación (r^2), que es un número que oscila entre +1 y -1, y proporciona la relación lineal entre dos variables, esto quiere decir que mientras más cercano sea r a ± 1 , el método será considerado lineal

en el rango de estudio. El valor aproximado más aceptado para determinar la linealidad de un método es 0,999 (18).

6.2.3 Límite de Detección (LOD). Corresponde a la concentración mínima de analito que puede ser detectada e identificada con un determinado grado de incertidumbre. En otras palabras, el LOD, es un parámetro que informa sobre el valor mínimo detectable y se determina utilizando la ecuación 1 (14). Donde, m es la pendiente de la curva de calibración, y s es la desviación estándar del blanco.

$$\text{LOD} = \frac{3,3s}{m} \quad [1]$$

6.2.4 Límite de Cuantificación (LOQ). Es la cantidad más pequeña del analito que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable (17). Puede considerarse como uno de los criterios más importantes en la caracterización de un método, dado que, indica desde que valor la medición da valores representativos. El LOQ, se calcula mediante la expresión indicada en la ecuación 2, siendo m la pendiente de la curva de calibración, y s es un valor representativo para la desviación estándar del blanco (14).

$$\text{LOQ} = \frac{10s}{m} \quad [2]$$

6.2.5 Sensibilidad Analítica. Es un parámetro estadístico descrito como la variación que experimenta un instrumento debido a los cambios de la magnitud de medida (concentración). En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la curva de calibración (14). En principio, mientras mayor valor tenga la pendiente (mayor cercanía a la ordenada) mayor sensibilidad.

6.2.6 Precisión. Cuando se realizan las operaciones de validación, es necesario conocer la variabilidad típica del método, esto implica conocer todas las condiciones que pueden ocasionar variaciones durante los ensayos de laboratorio. En este sentido, se evalúa la precisión de las mediciones, que es una cuantificación de que tan cerca están los resultados entre sí (14).

Por lo general, la precisión se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados, mediante medidas de dispersión tales como la desviación estándar (s), la varianza (s^2) o la desviación estándar relativa (%DER) representados en la ecuación 3 (14).

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \quad [3. a]$$

$$s^2 = \sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1) \quad [3. b]$$

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}} 100\% \quad [3. c]$$

Existen tres formas de interpretar la precisión, la repetibilidad, la reproducibilidad y la precisión intermedia, cada uno con características singulares y mecanismos de ejecución independientes, como se explica a continuación (14) (16):

6.2.6.1 Repetibilidad. Consiste en aquella actividad donde un solo operador evalúa la precisión de un ensayo aplicando un método sobre la misma muestra, en el mismo laboratorio, utilizando el mismo equipo y en un corto lapso de tiempo.

6.2.6.2 Reproducibilidad. Es el estudio donde se ponen a prueba las mediciones de un analito bajo distintas condiciones, ya sea laboratorio (inter-laboratorio), diferentes operadores o usando distintos equipos.

6.2.6.3 Precisión Intermedia. Comúnmente es definido como reproducibilidad dentro del laboratorio, la cual hace referencia a la estimación cuando las mediciones se realizan en el laboratorio, pero con condiciones variadas como diferentes días, analistas o equipos.

Como se mencionó previamente, al evaluar la precisión se requiere de medidas repetidas en materiales representativos del ensayo, donde cada réplica debe ser independiente de la otra.

6.2.7 Exactitud. En la validación de métodos se busca averiguar la exactitud de los resultados, ya sea estudiando los errores aleatorios o sistemáticos sobre una serie de medidas, así es como se puede definir la exactitud como la proximidad

entre un valor medido y un valor de referencia. De esta forma, una medición es más exacta cuanto más pequeño es el error de la medida, cuyo valor se puede estimar a través del porcentaje de recuperación, que consiste en la porción de la muestra que es cuantificada por el método de ensayo y se describe matemáticamente en la ecuación 4 (14).

$$\%R = \frac{\text{Valor Obtenido}}{\text{Valor de Referencia}} \times 100 \quad [4]$$

6.2.8 Robustez. Es común que los métodos analíticos estén sujetos a cualquier tipo interferentes asociado a las condiciones del método, la muestra e incluso las condiciones ambientales. Por este motivo, se aplican estudios de robustez de métodos, los cuales sirven para determinar la influencia que tienen algunos parámetros externos sobre el ensayo que se realiza (14).

El objetivo de estos ensayos es evaluar que variables del método tiene más efectos (positivos y negativos) sobre los resultados, y de esta manera garantizar una adecuada ejecución de las actividades. Dichos parámetros que podrían afectar al método son: los analistas, equipos, reactivos, estabilidad de la muestra, temperatura, entre otros (14).

7. Unidad de Dosificación

Según la Farmacopea de los Estados Unidos (USP46 – NF41) en el capítulo <905> Uniformidad de Unidades de Dosificación, el término uniformidad de contenido se refiere al grado de homogeneidad que presenta una sustancia farmacológica con relación a la cantidad expresada para sus unidades de dosificación en estado sólido. Es decir, corresponde a una prueba para evaluar si la concentración del fármaco se encuentra dentro de un intervalo aceptable (19).

En este aspecto, la prueba se puede realizar mediante dos métodos, ya sea por uniformidad del contenido o variación de peso. Cuando la cantidad del principio activo es igual o mayor a 25 mg, la Farmacopea recomienda la aplicación del ensayo por uniformidad de contenido por variación de peso, el cual consiste en tomar 30 tabletas del mismo lote y luego pesar 10 de forma individual. Posteriormente, se

calcula su contenido como porcentaje respecto a lo indicado por la casa comercial. Por último, se calcula el valor de aceptación (AV) utilizando la ecuación 5 (19).

$$AV = |M - \bar{X}| + ks \quad [5]$$

Donde \bar{X} es la media de los contenidos individuales, expresado como porcentaje respecto a la cantidad declarada; M es un valor de referencia; k es la constante de aceptabilidad y s es la desviación estándar de la muestra. El valor crítico para aceptar el criterio de uniformidad de dosificación viene definido por $L1=15$ (19).

Los ensayos hasta aquí mencionados consisten en la recomendación metodológica más genérica que existe para determinar la uniformidad de dosificación de un producto farmacéutico y cuyo análisis sirve como soporte para la validación de un método analítico, los cuales pueden compararse con métodos oficiales dictado por organizaciones internacionales como la Farmacopea de los Estados Unidos (USP46 – NF41). A continuación, se mencionan las principales metodologías oficiales y alternativas que sirven como antecedente de la presente investigación.

8. Métodos Oficiales para Determinar Azitromicina

Los medicamentos expedidos por la industria farmacéutica deben mantener un control de calidad apropiado, ya que de este modo se promueve un sistema de salud pública adecuado. Por consiguiente, para mantener la eficacia de un producto farmacéutico existen las guías denominadas farmacopeas que recopilan las principales normas de calidad de los medicamentos. Con relación a esto, en la presente sección se darán a conocer dos metodologías recomendadas por la farmacopea en la determinación de la uniformidad de contenido de la Azitromicina.

8.1 Farmacopea de los Estados Unidos (USP46 – NF41) (20)

La farmacopea de los Estados Unidos (USP46 – NF41) recomienda como método oficial para la determinación cuantitativa de Azitromicina en tabletas el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), el cual trabaja con una columna de 25 cm x 4,6 mm, a una temperatura de 50 °C, con velocidad de flujo de 2 mL/min

y un volumen de inyección de 100 μL . Además, tiene acoplado un detector ultravioleta para la medición de absorbancia en 210 nm.

Por otro lado, las soluciones se preparan con agua de alta pureza y resistividad no menor a $18 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$. En el caso de la fase móvil, esta es una mezcla compuesta por una solución amortiguadora de fosfato de sodio a $\text{pH } 7,50 \pm 0,05$ (900 mL) ajustado con hidróxido de sodio (NaOH 1N) y acetonitrilo en una relación 65:35 respectivamente.

Con respecto a la valoración, se utiliza un patrón de Azitromicina de concentración 1 mg/mL disuelto en fase móvil. La muestra se prepara una solución 1 mg/mL de Azitromicina disuelto en fase móvil, pesando mínimo una cantidad de 20 tabletas, las cuales se trituran y se mezclan hasta obtener un polvo fino.

8.2 Farmacopea Argentina

Según la Farmacopea Argentina, el método para la determinación cuantitativa de la Azitromicina es mediante el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), que está constituido por un detector ultravioleta ajustado a 210 nm con una columna de 25 cm x 4,6 mm con una fase estacionaria constituida por grupos nitrilo químicamente unido a partículas de sílice porosas de 3 a 10 μm de diámetro, con velocidad de flujo 0,5 mL/min.

En el caso de la fase móvil, esta consiste en una solución amortiguadora de fosfato a pH 7,5 en medio acuoso, manteniendo una mezcla de 3:6:1 de agua, metanol y acetonitrilo respectivamente.

Para la valoración se utilizan soluciones de Azitromicina Dihidratada y muestra de Azitromicina disueltas en la fase móvil. Una vez preparado todo, se inyectan por separado aproximadamente 20 μL de patrón y muestra respectivamente. Si se repite consecutivamente esta operación, se estima una desviación estándar relativa no mayor de 2,0 %. Finalmente, el registro de los cromatogramas se realiza con un tiempo de retención de pico de Azitromicina de 12 minutos (8).

9. Métodos Alternativos para Determinar Azitromicina

9.1 Método 1. Determinación espectrofotométrica de dihidrato de azitromicina en formulación farmacéutica sólida y su Aplicación a los Estudios de Disolución (21)

Chiluka R., y Raut R., (2022), (21) desarrollaron un método para determinar el contenido de Azitromicina en presentaciones farmacéuticas sólidas, cuyo enfoque metodológico consistió en disolver el analito en ácido sulfúrico diluido y posteriormente hacerlo reaccionar con ácido sulfúrico concentrado produciendo un compuesto de color amarillo que absorbe (λ_{\max}) en 480 nm. De los resultados obtenidos, se encontró un intervalo lineal de concentración de 20 a 60 mg/L, con un coeficiente de correlación lineal (r) de 0,9994, con límites de detección y cuantificación de 1,936 y 5,868 mg/L, respectivamente. De esta manera, se concluyó que el método diseñado era aplicable en función de los objetivos del estudio.

9.2 Método 2. Desarrollo del Método Espectrofotométrico UV de Azitromicina en Estudios de Degradación de API (22).

Bhimani, S., Sanghvi, G., Pethani, T., Gaurav D., Airao, V., Sharma, T., Sheth, N. y Vaishnavy, D., (2016), (22) propusieron un método espectrofotométrico en la región ultravioleta para determinar el contenido de Azitromicina de presentación farmacéutica (tabletas de 250 mg) mediante una extracción sólido líquido simple utilizando una solución reguladora de fosfato de sodio a pH 6 como solvente, cuya absorción máxima (λ_{\max}) fue de 208 nm. Así pues, se obtuvo un intervalo lineal de concentración de 10 a 50 mg/L, con un coeficiente de correlación lineal (r) de 0,99, con límites de detección y cuantificación de 1,6 y 5 mg/L, respectivamente. Finalmente, se ratificó que el método diseñado era aplicable en relación a sus objetivos, cuando se reportó una desviación estándar relativa (%RSD) menor a un menor a 2 %, y un porcentaje de recuperación de 99,72 %.

9.3 Método 3. Métodos Espectrofotométricos Selectivos para la Determinación de Azitromicina de Formulación Farmacéutica (23).

Abdullah, J. H., Tawfeek, A. A. Y., Alkaf, A. G., Al ghorafi, M. A. y Yassin, S. H., (2014), (23) desarrollaron cuatro métodos espectrofotométricos para determinar el contenido de Azitromicina en presentaciones farmacéuticas (tabletas 500 mg) mediante la formación de complejos coloreados al reaccionar con distintos colorantes, los cuales fueron: verde de bromocresol (BCG), púrpura de bromocresol (BCB), azul de bromofenol (BPB) y azul de bromotimol (BTB), disueltos en una solución de pH 3,0 a 3,5 propiciado por una solución reguladora de acetato-ácido acético. Posteriormente, se realizó una extracción con cloroformo para la medición en la región visible del espectro electromagnético, obteniéndose una absorción máxima (λ_{max}) a 418, 409, 415 y 414 nm, y cuyo intervalo lineal de trabajo fue de 2-20, 2-18, 2-12 y 2-14 mg/L para los métodos BCG, BCB, BPB y BTB, respectivamente. Todos los métodos se validaron en cuanto a exactitud y precisión, selectividad y robustez. En consecuencia, se determinó que la determinación de Azitromicina por los cuatro métodos diseñados es aplicable.

9.4 Método 4. Análisis Espectrofotométrico de Azitromicina y sus Presentaciones Farmacéuticas: Comparación Entre Espectrofotometría y HPLC (24).

Sharmin, N., Nazia Shanta, N. S. y Bachar, S. C., (2013), (15) desarrollaron un método espectrofotométrico para determinar el contenido de Azitromicina oxidando el compuesto con permanganato de potasio y así generar formaldehído de manera cuantitativa, el cual reacciona con un reactivo especial de acetona-amonio donde se produce el 3,5-diacetil-2,6-dihidrolutidina de color amarillo. De modo que, al evaluar las características analíticas del método se encontró una absorción máxima (λ_{max}) en 412 nm, con un intervalo lineal de 10-75 mg/L, un coeficiente de correlación lineal (r) de 0,999 y límites de detección y cuantificación de 0,6 y 1,98 mg/L, respectivamente. Al final, se concluyó que el método diseñado era aplicable en función de los objetivos del estudio, presentando desviación estándar relativa del método (%RSD) menor a 2 %.

En este mismo contexto, se han encontrado otras metodologías alternativas en la literatura para determinar el contenido de Azitromicina en formulaciones farmacéuticas, los cuales utilizan una variedad de técnicas instrumentales y electroquímicas, como se resume en la tabla 1.

Tabla 1. Metodologías alternativas para determinar el contenido de Azitromicina

Autores	Técnica	Muestra	Características Analíticas	
Singh, A., Chauhan, I., Bhardwaj, S., Gaur, P., Kumar, S., y Jayendra, 2019 (25)	HPLC	Suspensión acuosa de AZI	λ_{\max}	212 nm
			Intervalo lineal	1,0-50 mg/L
			R²	0,996
			LOD	0,0144 mg/L
			LOQ	0,04366 mg/L
Robaina, N. F., Paula, C. E., Brum, D. M., de la Guardia, M., Garrigues, S. y Cassellay, R. J., 2013 (11)	FTIR	Tabletas de AZI	λ_{\max}	1729 cm ⁻¹
			Intervalo lineal	5-20 mg/L
			R²	0,9999
			LOD	0,14 mg/L
			LOQ	0,46 mg/L
% RSD	1,0 %			
Biljana, N., 2004 (26)	Voltimetría de Redisolución anódica	Tabletas de AZI	Intervalo lineal	0,25 - 2 mg/L
			R²	0,9992
			LOD	0,11 mg/L
			% RSD	1,72 %

10. Fundamentos de la Espectroscopia Ultravioleta y Visible (UV-Vis)

Los métodos descritos para la determinación de Azitromicina en la sección previa permiten comprender la versatilidad que tienen las distintas técnicas instrumentales en el análisis de una muestra farmacéutica, convirtiéndolos en herramientas clave para el proceso de control de calidad de un medicamento. Por este motivo, se tiene principal atención a la técnica de espectroscopia de absorción molecular en la región ultravioleta y visible, la cual se relaciona con las transiciones electrónicas en las moléculas al momento de absorber la radiación. Dicho proceso contempla una serie de fundamentos teóricos de interés que se mencionan a continuación.

10.1 Radiación Electromagnética

La radiación electromagnética se define como una forma de energía que se origina por la combinación de un campo magnético y un campo eléctrico que se propaga a través del espacio, y cuyo comportamiento puede ser descrito mediante la dualidad onda-partícula (27).

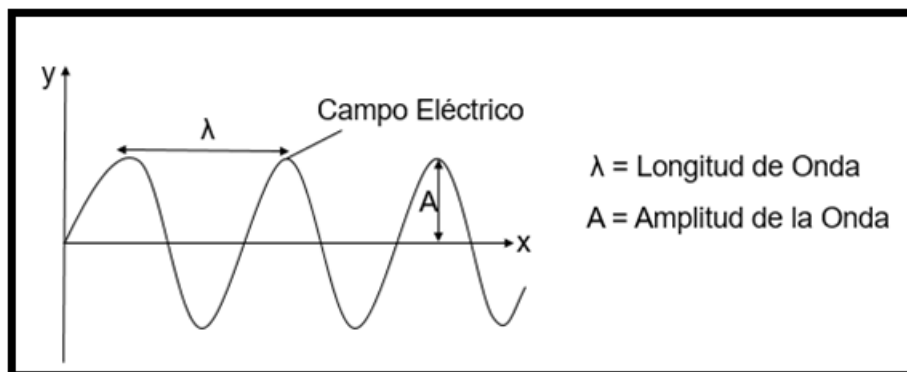


Figura 4. Representación esquemática de la radiación electromagnética (28).

Desde el punto de vista ondulatorio, la radiación electromagnética puede describirse como una onda sinusoidal de amplitud (A) (figura 4), la cual se propaga a través de una sola dirección en el espacio a una velocidad c definida como la velocidad de la luz (3×10^8 m/s), y que es proporcional a la longitud de onda (λ) e inversamente proporcional a la frecuencia (ν). Por otro lado, cuando la radiación interactúa sobre la materia ocurren cambios energéticos sobre la misma y una forma de interpretar

este fenómeno es mediante su descripción como partícula en función de cuantos de luz o fotones, los cuales tienen asociada una energía E que es proporcional a la frecuencia (ecuación 9), donde h es la constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s) (27).

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad [9]$$

A partir de esta definición, la explicación de los fenómenos energéticos relacionados con la radiación electromagnética toma un sentido físico importante, ya que, se comprende que cuanto más corta sea la longitud de onda y la frecuencia sea mayor, entonces la energía asociada será más alta, y esto puede ser retratado en el espectro electromagnético (28).

10.2 Espectro Electromagnético

La descripción entre la radiación y las propiedades físicas como la frecuencia y longitud de onda antedichas, se representan en el espectro electromagnético, que se define como una escala arbitraria la cual clasifica distintos tipos interacción radiación materia en función de la longitud de onda y frecuencia (27).

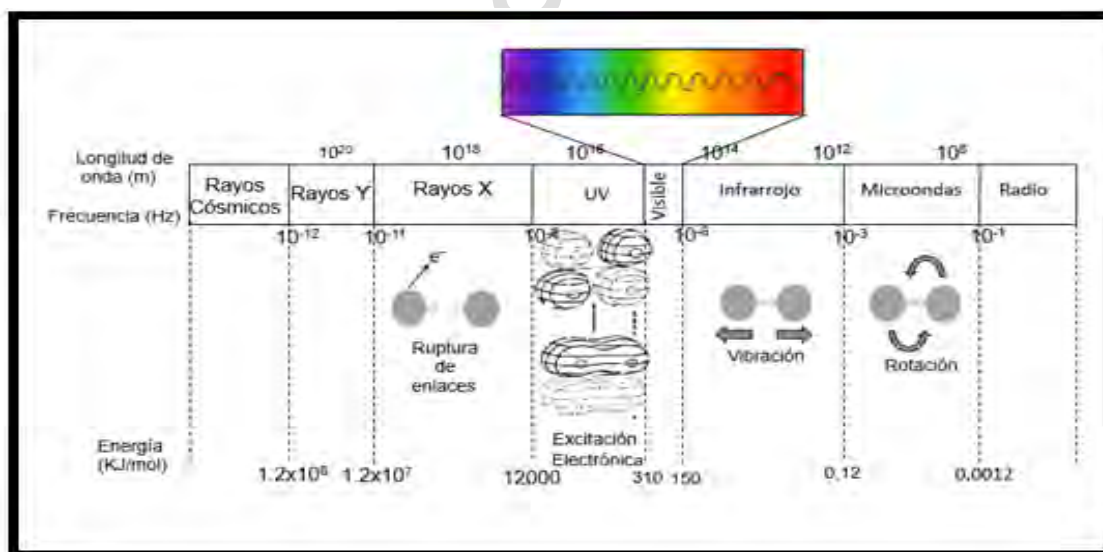


Figura 5. Espectro electromagnético (28).

En la figura 5, se aprecian las principales regiones del espectro electromagnético, como, por ejemplo, los procesos de alta energía que involucra la radiación gamma

(γ) y radiación de rayos X, donde ocurren rupturas de enlaces y procesos de ionización. Consecuentemente, se pueden apreciar los sistemas de menor energía donde ocurren procesos no destructivos como la rotación y vibración de enlaces moleculares en la región infrarroja, así como las transiciones electrónicas de los enlaces químicos en la zona ultravioleta y visible (28)

Por consiguiente, cada una de las regiones del espectro electromagnético puede emplearse como herramienta analítica para la cuantificación e identificación de sustancias, ya que, dependiendo del tipo de radiación que incide sobre una muestra existe la posibilidad de una técnica instrumental diferente que involucra la absorción o emisión de radiación principalmente (29).

10.3 Absorción de Radiación

Intuitivamente, se puede definir la absorción de radiación como aquel proceso donde ocurre la transferencia de energía por parte de una onda electromagnética hacia una sustancia con la que interactúa, ocasionando los fenómenos antedichos como transiciones electrónicas y la rotación y vibración de enlaces moleculares.

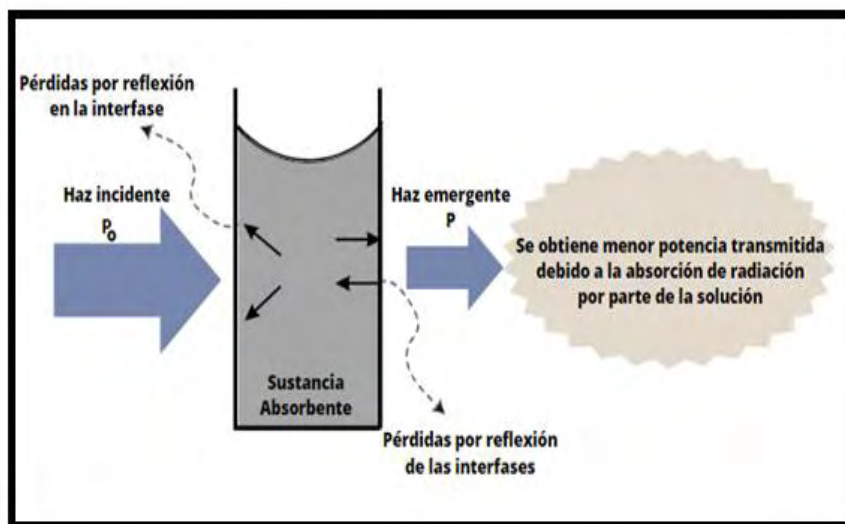


Figura 6. Proceso de absorción de radiación de haz incidente (P_0) y haz emergente o transmitido (P) (27).

Como consecuencia de esta interacción ocurre la atenuación de la radiación a medida que se propagan a través de la materia, tal como se ejemplifica en la figura 6, donde un haz de radiación monocromática incide sobre una sustancia con una potencia radiante P_0 . A medida que el proceso tiene lugar, aumenta la energía cinética del medio generando la liberación de calor, así como la reflexión de radiación de forma radial (28).

Por consiguiente, ocurre la disminución gradual de la energía incidente (absorción de radiación), dando lugar a que sólo una fracción de la luz atraviese la sustancia, pero con una potencia radiante transmitida P , denominada transmitancia (T), donde la atenuación de la radiación mencionada previamente se define como la absorbancia (A) (28).

10.4 Ley de Beer-Lambert

Una vez definido el término de absorción de radiación, es conveniente avanzar con la descripción de su aplicación como herramienta analítica en la identificación y cuantificación de una sustancia a través de la Ley de Beer-Lambert, la cual describe una relación de proporcionalidad directa entre la absorbancia y la concentración, definida en la ecuación 10.

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = \epsilon cb \quad [10]$$

Además, se debe destacar que la absorbancia es una propiedad adimensional, y que también depende de la distancia del paso óptico b , así como la longitud de onda del haz incidente. Dicho esto, para que el sistema de unidades sea correcto, la concentración puede expresarse en unidades de mol/L, la longitud b , se expresa en centímetros, y la constante ϵ (épsilon) o absortividad molar (M^{-1} y cm^{-1}), que indica la cantidad de radiación que absorbe una especie a una longitud de onda determinada representa el coeficiente de extinción molar (28).

11. Absorción Molecular en el Ultravioleta y Visible (UV-Vis)

Dentro de las diversas regiones del espectro electromagnético se encuentra la región de radiación ultravioleta y visible (UV-Vis), que consisten en procesos energéticos capaces de ocasionar transiciones electrónicas en los electrones de enlace de las moléculas. Es decir, cuando una molécula absorbe radiación ultravioleta y visible, esta experimenta una transición electrónica desde un estado inicial hasta un estado excitado por un tiempo muy corto. Posteriormente, la especie excitada libera la energía excedente mediante la generación de calor (27).

Para entender el fenómeno de transición electrónica, se recurre a la teoría de orbitales moleculares, donde se definen las energías de los electrones de una molécula al formar un enlace químico, así como su ubicación en los orbitales HOMO y LUMO. En este aspecto, cuando un electrón que se encuentra en un orbital ocupado de mayor energía (HOMO, por sus siglas en inglés Highest Occupied Molecular Orbital), tiene la capacidad de formar enlaces simples o sigma sigma (σ), seguido por los orbitales enlazantes π y los orbitales no enlazantes n que presentan gradualmente más energía, como se indica en el diagrama de la figura 7.

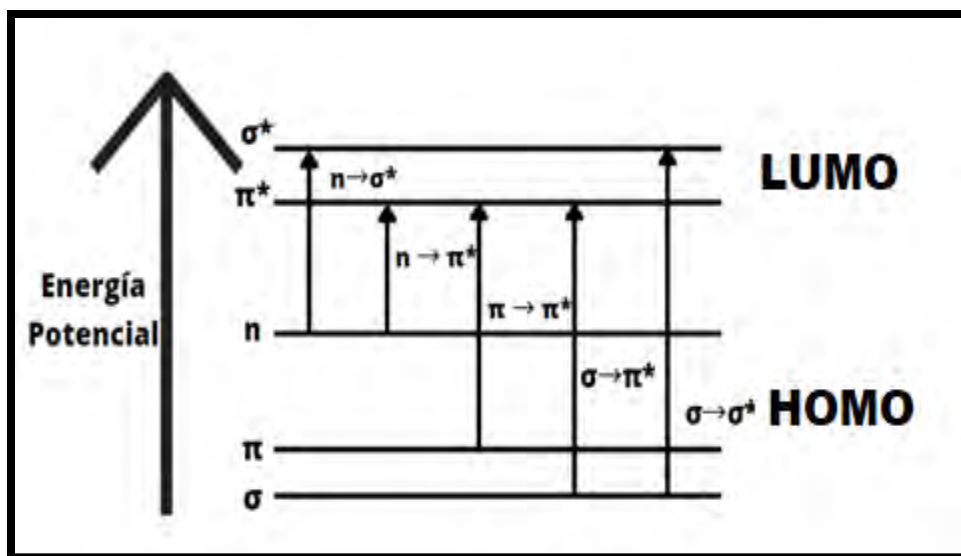


Figura 7. Transiciones electrónicas en el proceso de absorción UV-Vis (30).

Por otro lado, cuando un electrón se encuentra en un orbital desocupado de menor energía potencial (LUMO, por sus siglas en inglés Lowest Unoccupied Molecular Orbital), indica que tiene la capacidad de formar orbitales antienlazantes σ^* y π^* que tienen mayor energía (30).

Como se puede notar en la figura 7, cada transición electrónica tiene un nivel energético diferente, y esto se relaciona directamente con la estructura molecular y la especiación de los átomos. De hecho, las moléculas capaces de absorber la radiación UV-Vis son aquellas que contienen grupos funcionales que tienen orbitales π denominados cromóforos. Dichas moléculas presentan grupos funcionales insaturados o conjugadas como los grupos carbonilo (RC=O) o nitro (NO₂). Asimismo, también se encuentran los grupos funcionales auxocromos como los grupos Amino (NH₂) e hidroxilo (OH), que tienen la capacidad para conjugarse con los cromóforos y así fomentar la absorción en la región UV-Vis (37).

11.1 Espectro Ultravioleta y Visible

La región ultravioleta y visible abarca el intervalo de longitudes de onda λ (nm) desde los 10 hasta los 780 nm aproximadamente, pudiendo clasificarse en tres zonas principales representadas en la figura 8. Comenzando por la región ultravioleta en el vacío (10 – 200 nm), donde los gases atmosféricos e hidrocarburos insaturados pueden absorber radiación experimentando transiciones electrónicas del tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ y $\sigma \rightarrow \pi^*$ principalmente (26).

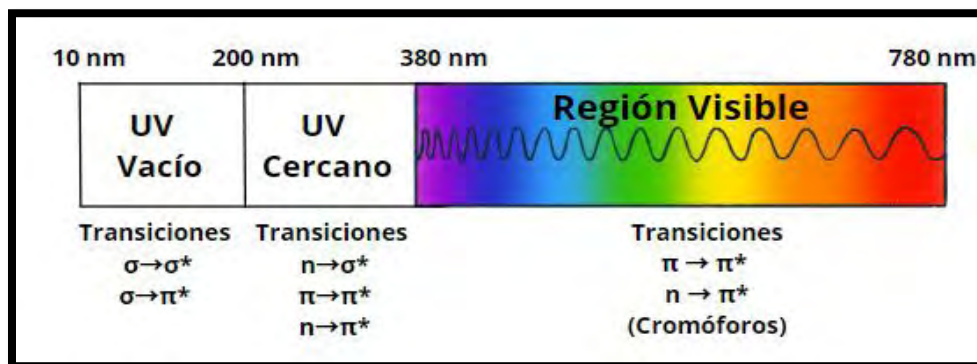


Figura 8. Espectro Ultravioleta y Visible (26)

Seguidamente, se encuentra la región de ultravioleta cercano que abarca las longitudes de onda de 200 a 380 nm, en la cual diversas especies orgánicas e inorgánicas experimentan absorción propiciando transiciones electrónicas del tipo $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ (26).

Por último, se encuentra la región visible (380 a 780 nm), donde ocurre el fenómeno físico del color, propiciado por compuestos orgánicos e inorgánicos con grupos funcionales cromóforos capaces de experimentar transiciones electrónicas de carácter $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ (26).

12. Técnica de Espectroscopia de Absorción Molecular UV-Vis

La espectroscopia por absorción molecular en el ultravioleta y visible (UV-Vis) es una técnica instrumental que consiste en la medición de la absorbancia o transmitancia en la región UV-Vis por parte de compuestos orgánicos e inorgánicos. De esta manera, la técnica relaciona las propiedades electrónicas de las moléculas y su interacción con la radiación para la ejecución de diversas aplicaciones cualitativas y cuantitativas (27).

En este aspecto, los compuestos químicos que sean analizados por la técnica UV-Vis no serán destruidos, ya que esta no induce la alteración de la composición de las sustancias, las cuales pueden estar en fase líquida o gaseosa, ofreciendo una ventaja en la versatilidad de los ensayos químicos (37).

Por otro lado, la forma habitual de representar los resultados de un ensayo por espectroscopia de absorción UV-Vis es mediante un gráfico de intensidad (absorbancia o transmitancia) respecto a la longitud de onda denominado espectro de absorción. Este gráfico es el resultado de la superposición de las vibraciones, rotaciones y transiciones electrónicas en las moléculas cuya forma se representa como líneas continuas denominadas bandas de absorción (30).

13. Instrumentación para la Técnica de Espectroscopia UV-Vis

Las propiedades espectroscópicas de las sustancias tales como la absorción, emisión o dispersión de radiación son descritas a través de equipos especializados denominados espectrofotómetros, cuya función principal es la de descomponer la radiación electromagnética (radiación policromática) en diferentes longitudes de onda para su posterior detección y medición (30).

De forma detallada (Figura 9), un espectrofotómetro se constituye por una fuente de energía cuya radiación abarca las longitudes de onda de interés. Además, cuenta con un medio para aislar el rango de radiación incidente, los cuales pueden ser filtros o monocromadores. Una vez filtrada la radiación, esta incide sobre la muestra que está depositada sobre un recipiente denominado celda. Al final, un detector recibe la señal proveniente de la muestra y la convierte en una señal eléctrica que es convertida en un elemento medible e interpretable analíticamente, como por ejemplo un espectro de absorción UV-Vis (27).

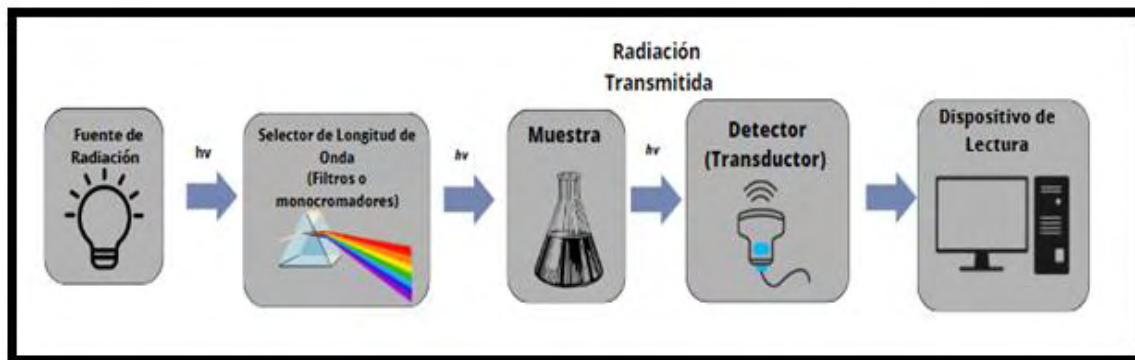


Figura 9. Esquema general de un espectrofotómetro UV-Vis (27).

Una característica esencial sobre estos instrumentos es que presentan distintos diseños dependiendo de las aplicaciones cualitativas y cuantitativas para los cuales son elaborados. Independientemente del tipo de espectrofotómetro que sea utilizado, estos mantienen en general componentes internos similares. A continuación, se mencionan las principales variedades de componentes que constituyen a los espectrofotómetros ópticos.

13.1 Fuentes

Para que ocurra el proceso de absorción molecular es preciso el uso de una fuente de radiación que sea capaz de producir una salida de radiación intensa, constante y estable en la región de longitud de onda de trabajo. Estas se pueden clasificar como fuentes continuas cuya emisión involucra un amplio rango de longitudes de onda y como fuentes lineales las cuales operan en intervalos restringidos (31).

Tabla 2. Resumen de fuentes utilizadas en los espectrofotómetros (27).

Fuente	Tipo	Construcción	Intervalo de Trabajo
Deuterio e Hidrógeno	Continua	H ₂ o D ₂ a baja presión	160-400 nm
Filamento de Tungsteno (W)	Continua	Alambre de Tungsteno (W) al vacío	230 2500 nm
Diodos Emisores de Luz (LED)	Lineal	Mezcla de semiconductores	237-1000 nm
Lámpara de Xenón	Continua	Xe Ionizado	200-1000 nm

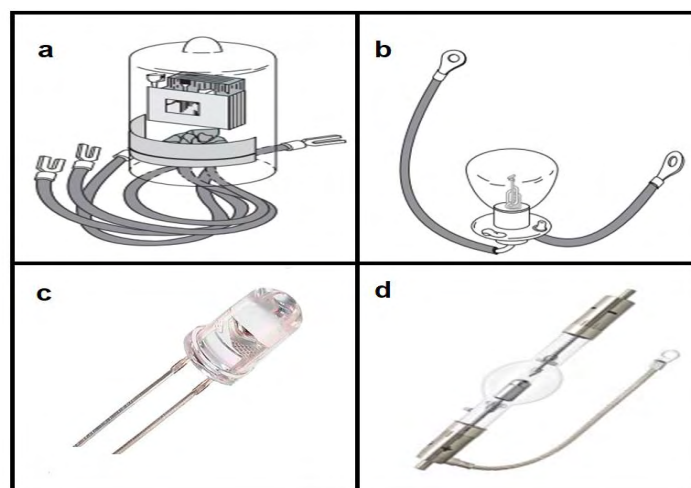


Figura 10. Fuentes a) Lámpara de Deuterio e Hidrógeno b) Lámpara de Filamento de Tungsteno c) Diodos Emisores de luz (LED) d) Lámpara de Arco de Xenón

Adicionalmente, existen varios tipos de fuentes utilizadas en los espectrofotómetros como las resumidas en la tabla 2. Cada una con características singulares que abren paso a un gran número de aplicaciones cuantitativas principalmente. De igual manera, se ilustran en la figura 10 las fuentes mencionadas.

13.2 Recipiente de la Muestra

Los recipientes de la muestra o cubetas son los envases donde se deposita la sustancia cuya absorbancia se va a medir. Para ello, las cubetas de muestra no deben absorber la radiación electromagnética en el intervalo de longitudes de onda que se está estudiando y así garantizar una medición adecuada (32).

En otras palabras, los materiales de construcción de las cubetas determinarán su aplicación práctica, mostrando transparencia en las regiones de estudio, es así como, los recipientes de cuarzo son los óptimos para el trabajo en la región UV-Vis y las cubetas de plástico y vidrio de silicatos son apropiadas para el trabajo en la región visible (27).

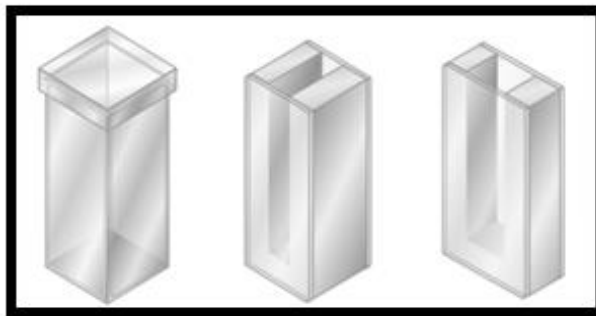


Figura 11. Representación gráfica de las cubetas (32)

Otro a punto a considerar, se relaciona con la geometría de las cubetas, ya que esto delimita las aplicaciones de la técnica espectroscópica. Por ejemplo, en la figura 11 se muestra que las cubetas pueden ser rectangulares o cuadradas principalmente, que por lo regular tienen una longitud de 1 y 0,1 cm. De igual forma, todas las celdas tienen dos caras opacas paralelas entre si y perpendiculares a la dirección del haz, ya que de esta forma se evitan las pérdidas de energía por reflexión.

13.3 Selectores de Longitud de Onda

Cuando se realizan los análisis espectroscópicos uno de los requisitos fundamentales es que la muestra absorba la radiación incidente proveniente de la fuente. Para ello, se necesita restringir el intervalo de longitudes de onda y así garantizar que la muestra absorba esa radiación; lo cual se logra con un selector de longitud de onda.

Estos dispositivos permiten seleccionar un rango de longitud de onda lo suficientemente corto (ancho de banda) para asemejar la idealización de radiación monocromática. De esta forma, las características analíticas como la sensibilidad, selectividad y ruido de fondo se ven mejoradas significativamente. Algo importante si se desean obtener mediciones precisas y confiables (27).

Los selectores de longitud de onda se pueden clasificar según el mecanismo que utilizan para restringir la radiación, existiendo dos tipos principales que son los filtros y los monocromadores. En primer lugar, un filtro es un dispositivo capaz de seleccionar la longitud de onda de interés mediante los procesos de absorción o de interferencia tanto constructiva como destructiva de ondas electromagnéticas. Dentro de los principales tipos de filtros, se tiene (37):

13.3.1 Filtros de Absorción. Están constituidos de materiales como vidrio coloreado o suspensiones coloidales, tales que absorban selectivamente la radiación de una región estrecha del espectro electromagnético, dejando pasar la fracción que no fue absorbida.

13.3.2 Filtros de Interferencia. Son dispositivos ópticos que cuentan con un medio dispersor que se encarga de descomponer la radiación en distintas longitudes de onda, siendo estos principalmente prismas y rejillas de difracción, los cuales se describen a continuación (27):

13.3.3 Prismas. Es un artefacto que tiene como propósito refractar la radiación o luz incidente en distintos componentes de longitudes de onda. Específicamente, cuando la luz atraviesa el prisma este refracta la radiación debido a que el índice

de refracción del material es diferente al del aire y, en consecuencia, ocurre la dispersión de la radiación.

13.3.4 Rejilla de Difracción. Es una estructura constituida por una superficie pulida con ranuras paralelas entre sí, que funcionan como sitios para que ocurra la dispersión lineal de la radiación incidente. De modo que, dependiendo el ángulo por el cual se refleja la radiación se obtendrá una longitud de onda diferente. Además, el número de líneas por pulgada determina la aplicación de la rejilla, por ejemplo, en la región UV-Vis se usan redes con alrededor de 15000 a 30000 líneas/in.

13.4 Detectores de Radiación

Anteriormente se describió como la radiación de la fuente es filtrada y dirigida hacia una muestra para que esta la absorba. Ahora, esta señal proveniente de la muestra debe ser captada por un dispositivo capaz de convertirla y aprovecharla para su medición el cual se denomina transductor.

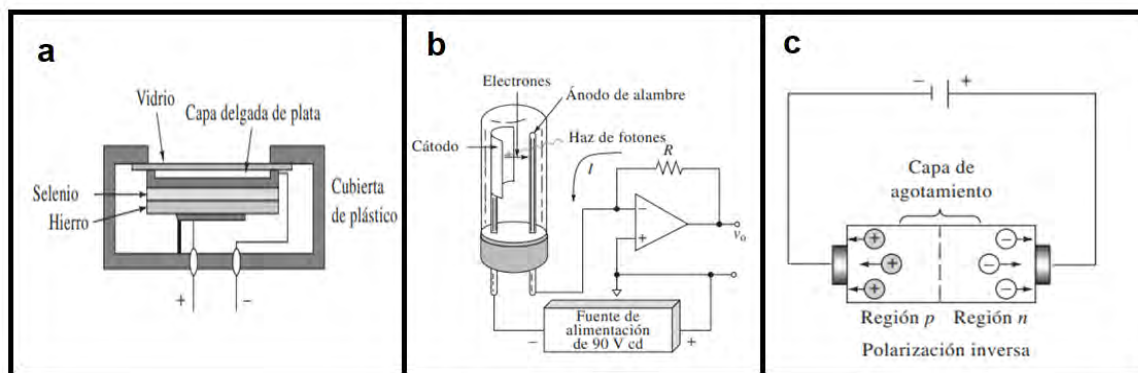


Figura 12. Detectores a) celda fotovoltaica de capa barrera b) fototubo c) fototubo de silicio (27).

Un transductor dispositivo electrónico capaz de convertir una señal química o física como la intensidad de luz, en una señal eléctrica como corriente o voltaje, cuyas magnitudes puedan utilizadas en la descripción analítica de una sustancia química. Para lograr esto, dispositivo debe mantener una relación de proporcionalidad entre la señal eléctrica y la radiación incidente. Además, de asegurar que puede

proporcionar una alta sensibilidad, elevada relación señal/ruido, así como una respuesta rápida y constante en un amplio rango de longitudes de onda (27).

Dentro de las variedades de detectores de radiación se encuentran los transductores de fotones (figura 12), que son capaces de generar una corriente eléctrica cuando reciben radiación, de los cuales se mencionan 3 de los principales tipos.

13.4.1 Celda Fotovoltaica de Capa Barrera. Está construido por un arreglo de electrodos y semiconductores tal que genere un sistema adecuado para la conducción de corriente eléctrica proporcional a la cantidad de fotones emitidos. Esto le confiere una ventaja en aplicaciones en la región visible, siendo relativamente económicos.

13.4.2 Fototubo. Es un tipo de detector con una geometría cilíndrica que garantiza la conducción eléctrica a través de un electrodo semicilíndrico que actúa como fotoemisor. Pueden operar en los intervalos de 180 a 1000 nm, propios para un trabajo en las regiones ultravioleta, visible e infrarrojo cercano.

13.4.3 Fototubos de Silicio. Consiste en un conjunto de fotodiodos de silicio dispuestos en un chip, con un arreglo interno del tipo pn polarizado de forma inversa, pudiendo registrar el espectro en la región de 190-1000 nm que abarca el ultravioleta, visible e infrarrojo cercano.

13.5 Tipos de Instrumentos

Previamente, se describieron las principales partes que constituyen a un espectrofotómetro como la fuente, selector de longitud de onda, recipiente para muestra, detector y dispositivos de lectura, donde se resaltó la importancia de cada una de estas piezas respecto a un diseño sencillo y simple (27). Ahora bien, existen varias maneras de organizar estos componentes en un espectrofotómetro con el objetivo de proporcionar diferentes opciones en las aplicaciones asociadas a la técnica espectroscópica de UV-Vis, lo cual involucra a las características de desempeño del equipo, sus propiedades ópticas e incluso el costo de adquisición.

Dentro los principales tipos de espectrofotómetros se pueden encontrar los instrumentos de haz sencillo y de doble haz, cada uno con características singulares respecto a la dirección de haz que viaja a través de todos los elementos del equipo, como se desarrollará a continuación:

13.5.1 Instrumentos de Haz Sencillo.

Es un tipo de espectrofotómetro donde la radiación proveniente de la fuente experimenta una sola trayectoria simple desde la fuente hasta el detector. Este tipo de instrumentación ofrece ventajas atractivas para considerarlos una opción apropiada en trabajos rutinarios y de campo como, por ejemplo, la posibilidad de usarlo como elemento portátil, son económicos, robustos, de facilidad de operación y de fácil mantenimiento (32).

13.5.2 Instrumentos de Doble Haz

Los instrumentos de doble haz son aquellos que se caracterizan por la división del haz proveniente del monocromador con una serie de espejos (figura 13) con el objetivo de incidir la radiación filtrada tanto a la muestra como a un blanco utilizado como referencia (27).

Una vez dividido el haz existen dos variaciones posibles para la detección de la señal proveniente de la muestra y el blanco. En primer lugar, como se observa en la figura 13.a, hay un detector para cada sustancia a medir, que convierten la radiación de entrada en corriente, siendo luego amplificada y procesada para su lectura. Por otra parte, el segundo mecanismo posible en los instrumentos de doble haz, mostrado en la figura 13.b, consiste en prescindir de un detector y acoplar un espejo giratorio que dirige primero todo el haz que sale del monocromador a través de la celda de referencia y luego a través de la celda de la muestra. En consecuencia, las señales de ambos haces son procesadas y dispuestas para su interpretación (27).

La ventaja de estos instrumentos es que compensan las variaciones inherentes a los procesos de medición ópticos como la intensidad de la fuente, la eficiencia de la red, la reflectividad de los espejos y la fotosensibilidad del detector, por mencionar algunos ejemplos. La idea es que, al afectar simultáneamente ambos haces, todas

las variaciones se mantienen constantes. La desventaja principal es que sus costos de adquisición son más elevados (27).

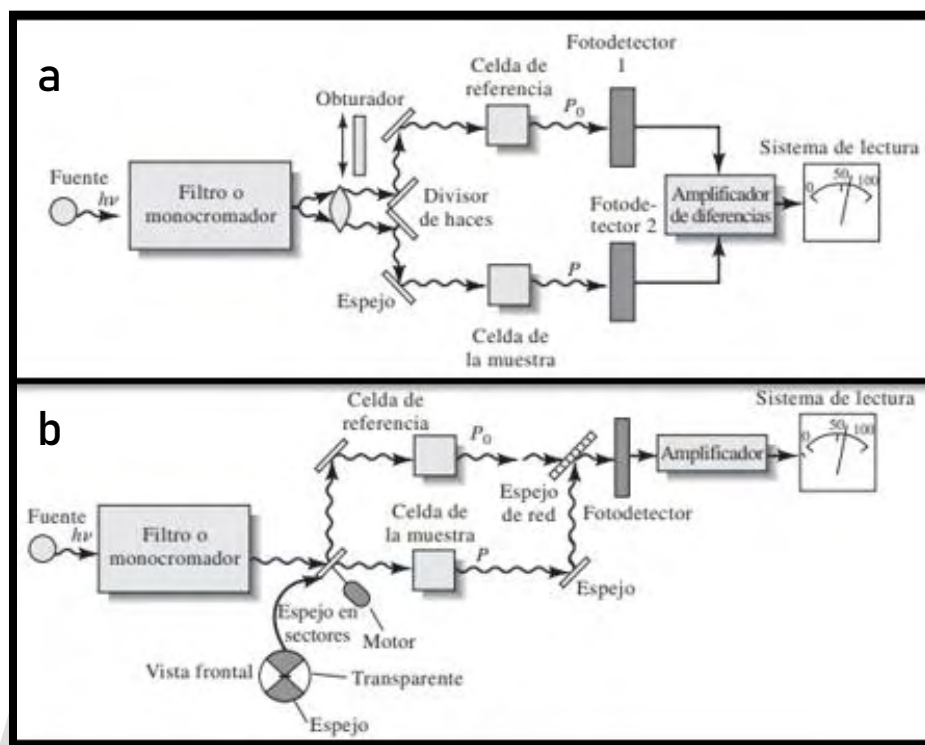


Figura 13. Espectrofotómetro de doble haz con a) doble detector b) un solo detector (27).

14. Aplicaciones de la Técnica de Espectroscopia de Absorción UV-Vis

La técnica de espectroscopia de absorción molecular UV-Vis ha sido utilizada extensamente para analizar una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos en los últimos años, ofreciendo una apertura muy extensa en cuanto aplicaciones tanto en el campo industrial como de investigación y desarrollo (33).

Específicamente, las determinaciones por espectroscopia UV-VIS se resumen en análisis cualitativos y cuantitativos de las sustancias de interés y pueden resumirse dentro del áreas como control de calidad donde, por ejemplo, se realizan procesos como la determinación de concentración e identificación de impurezas en alimentos, productos farmacéuticos, mineros, textiles, cosméticos, entre otros (34). De hecho, la causa de tanta versatilidad y amplitud en las aplicaciones de esta técnica, se debe a que tiene la posibilidad de acoplarse a otras técnicas instrumentales como

detector e incluso modificarse a partir de operaciones matemáticas como la integración o derivación, como se indica en breve (35).

14.1 Espectrofotometría Derivada

Es una técnica que consiste en calcular la primera, segunda o derivadas de orden superior de la intensidad o absorbancia respecto a la longitud de onda y de esta manera, se consigue aumentar la estructura fina de las curvas espectrales, así como la mejora de las características analíticas como la sensibilidad y la selectividad del método (36).

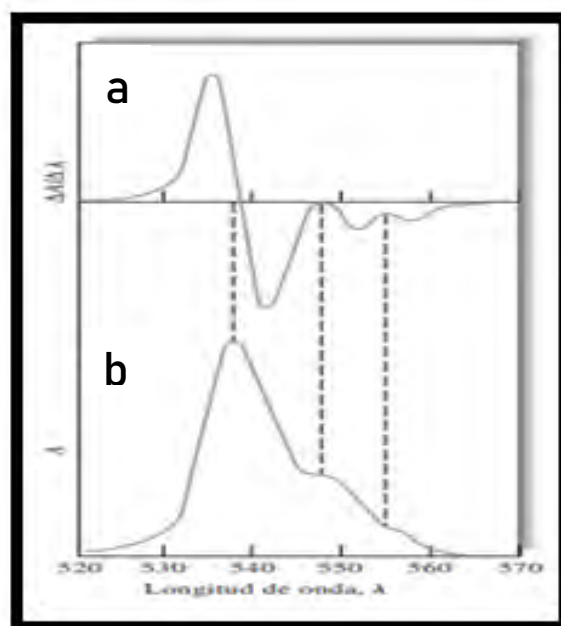


Figura 14. Representación gráfica de a) un espectro UV-Vis de $dA/d\lambda$ vs. λ b) un espectro UV-Vis Absorbancia vs. λ (27).

Como se aprecia en la figura 14, la primera derivada del espectro de absorción ($dA/d\lambda$) presenta un máximo y un mínimo en los puntos de inflexión y vale cero en el máximo respecto a la curva de orden cero. En este sentido, la distancia vertical entre el máximo y el mínimo de la derivada se denomina amplitud y es un parámetro analítico que suele utilizarse para relacionarlo de forma lineal con la concentración, siendo práctico para análisis cuantitativos (27).

Dentro de las ventajas que ofrece esta operación matemática se encuentra que se pueden realizar mediciones más exactas de la longitud de onda del máximo de absorción, se puede obtener una mejor resolución de los espectros, también se pueden realizar análisis de una muestra turbia e incluso se pueden realizar determinaciones cuantitativas en sistemas de dos o más componentes de forma sencilla. Sin embargo, presenta las desventajas de aumentar la distorsión del espectro y disminuir la relación señal ruido (36).

www.bdigital.ula.ve

15. Justificación

La falsificación de medicamentos es un problema de salud a nivel mundial, ya que pone en riesgo a los consumidores y trae consigo consecuencias catastróficas sobre su bienestar. En este sentido, se considera un medicamento falsificado a aquel que: contiene ingredientes de baja calidad o en dosis incorrectas; que tiene ingredientes incorrectos y aquellos que presentan cantidades inferiores de principios activos.

En los últimos años esta situación ha manifestado un crecimiento considerable, donde la rentabilidad del negocio y la red compleja de distribución de medicamentos juegan un papel fundamental sobre el éxito de dicha actividad. Con relación a eso, en Venezuela, la situación socioeconómica ha generado que la adquisición de productos farmacéuticos se realice por vías alternas y poco confiables, así como, por medio de organizaciones no gubernamentales, los cuales expenden medicamentos cuya procedencia pone en duda su calidad.

En otro orden de ideas, la Farmacopea de los Estados Unidos (USP46 – NF41), propone como método para cuantificar el contenido de Azitromicina la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), una técnica bastante extendida para determinaciones de los principios activos de los medicamentos, ya que bajo las condiciones adecuadas sus resultados son precisos, exactos y reproducibles. No obstante, los métodos realizados por HPLC son costosos, su mantenimiento es laborioso, requiere el uso de reactivos de alta pureza especiales que encarecen su adquisición y, además, se necesita de personal altamente capacitado para las determinaciones correspondientes.

Por estos motivos, se desarrolló de una metodología alternativa para la cuantificación del producto farmacéutico Azitromicina, con la intención de obtener los criterios de exactitud y precisión adecuados para asegurar un control de calidad del medicamento, reduciendo costos, acortando procedimientos secundarios y, disminuyendo el uso de productos químicos.

16. Hipótesis

A continuación, se indican las premisas que sustentaron la hipótesis para la elaboración de proyecto:

- La Azitromicina presenta una banda de absorción en la región UV-Vis.
- La Azitromicina presenta solubilidad adecuada en solventes orgánicos.
- La espectroscopia de absorción molecular en el UV-Vis es una técnica de análisis que proporciona información cualitativa y cuantitativa de interés.
- El método espectrofotométrico para cuantificar el contenido de Azitromicina en cloroformo ofrece una alternativa a la planteada por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP46 – NF41).
- Las presentaciones comerciales del producto farmacéutico de estudio son en tabletas de concentración de 500 mg.
- El producto farmacéutico en estudio tiene una demanda moderada por parte de la población venezolana.

Con base a las premisas mencionadas, se planteó:

“Existe la posibilidad del desarrollo de un método alternativo, económico, rápido y sencillo para la determinación de Azitromicina en presentación farmacéutica sólida (Azitromicina dihidratada), mediante la técnica de Espectroscopia de Absorción Ultravioleta-Visible”.

17. Objetivos

17.1 Objetivo General

Determinar la uniformidad de contenido del principio activo farmacéutico del antimicrobiano Azitromicina en muestras farmacéuticas comercializadas en el estado Mérida.

17.2 Objetivos Específicos

- Diseñar una metodología alternativa que sirva para la cuantificación del principio activo Azitromicina mediante la técnica de Espectroscopia de Absorción Molecular UV-Vis.
- Optimizar los parámetros de medida que permitan obtener la mejor estimación del método propuesto.
- Establecer las características de desempeño del método diseñado.
- Demostrar que el método diseñado cumple con las características de desempeño establecidas.
- Validar el método propuesto.
- Analizar muestras provenientes de comercios farmacéuticos de la ciudad de Mérida de la República Bolivariana de Venezuela.

18. Metodología Experimental

18.1 Locación

El establecimiento donde realizó el trabajo especial de grado corresponde a las instalaciones del Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM), perteneciente al Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes. Ubicado en Venezuela, estado Mérida.

18.2 Tipo de Estudio y Diseño

El tipo de estudio se consideró que es univariado debido a que se identificó y describió cada uno de los factores que afectan a los resultados de forma particular. Es así como, en el método propuesto se evaluó individualmente un parámetro, mientras que los demás permanecían constantes, logrando estimar la respuesta óptima del método analítico.

18.3 Muestras

Las muestras de Azitromicina fueron obtenidas de los distintos establecimientos farmacéuticos del estado Mérida, cuyas presentaciones comerciales se encuentran como tabletas y comprimidos recubiertos de 500 mg.

18.4 Materiales y Reactivos

Se contó con material de vidrio, metal, plástico y porcelana para las actividades de laboratorio, los cuales se resumen en la tabla 3. En el caso de los reactivos utilizados para las actividades experimentales, estos fueron proporcionados de la más alta calidad y pureza, cuyas características se resumen en la tabla 4.

Tabla 3. Materiales utilizados

Material	Capacidad	Marca	Clase/Tolerancia
Espátula metálica			
Filtro de Jeringa	5 mL	---	± 0,5 mL

Filtro de membrana de Politetrafluoroetileno,	47 mm	Pall Corporation	---
Frasco de Vidrio Ámbar	120 mL		---
Pesa Sustancia	10 mL		
Matraz aforado	10 mL	Pobe	± 0,025 mL
	25 mL	Elab Glass	± 0,04 mL
Vasos de precipitados	50 mL	Mariefeld	

Tabla 4. Reactivos utilizados

Nombre	Fórmula	Marca	Lote	Grado/Pureza
Agua Ultrapura	H ₂ O	---	---	18 Ω.cm ⁻¹
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	Baker Analyzer	J09054	96,3%
Ácido Clorhídrico	HCl	EMSURE	UN 1789	37%
Azitromicina Dihidratada	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	Copla LTD	1023	99,9%
Cloroformo	CH ₃ Cl ₃	Fisher Scientific	124033	HPLC
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	SIGMA	63410	99,8%
Hidróxido de Sodio	NaOH	EMSURE	UN 1823	99%
Metanol	CH ₃ OH	FLUKA	41870	99,8%

18.5 Equipos

Tabla 5. Equipos utilizados

Equipo	Marca	Modelo	Características	
Balanza Analítica	A&D Weighing	ER 180A	Capacidad	100,0002 g
Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis de doble Haz	Thermo Fisher Scientific	Evolution 300	Fuente	Xenón
			Detector	Fotodiodos de silicio
			Diseño óptico	Ebert modificado

				de doble haz
			Cubeta	Cuarzo
			Software	Vision Pro
Ultrasonido	Branson	2210R-MT	Capacidad	2,80L
			Tiempo	60 minutos

19. Procedimiento Experimental

19.1 Curvas de Calibrado

Se preparó un conjunto de soluciones patrón de Azitromicina dihidratada a partir de una solución madre equivalente a 10.000 mg/L de Azitromicina anhidra, de la cual se realizaron distintas soluciones en un intervalo de concentración 400 a 1.000 mg/L, utilizando como medio cloroformo grado HPLC (Figura 15).

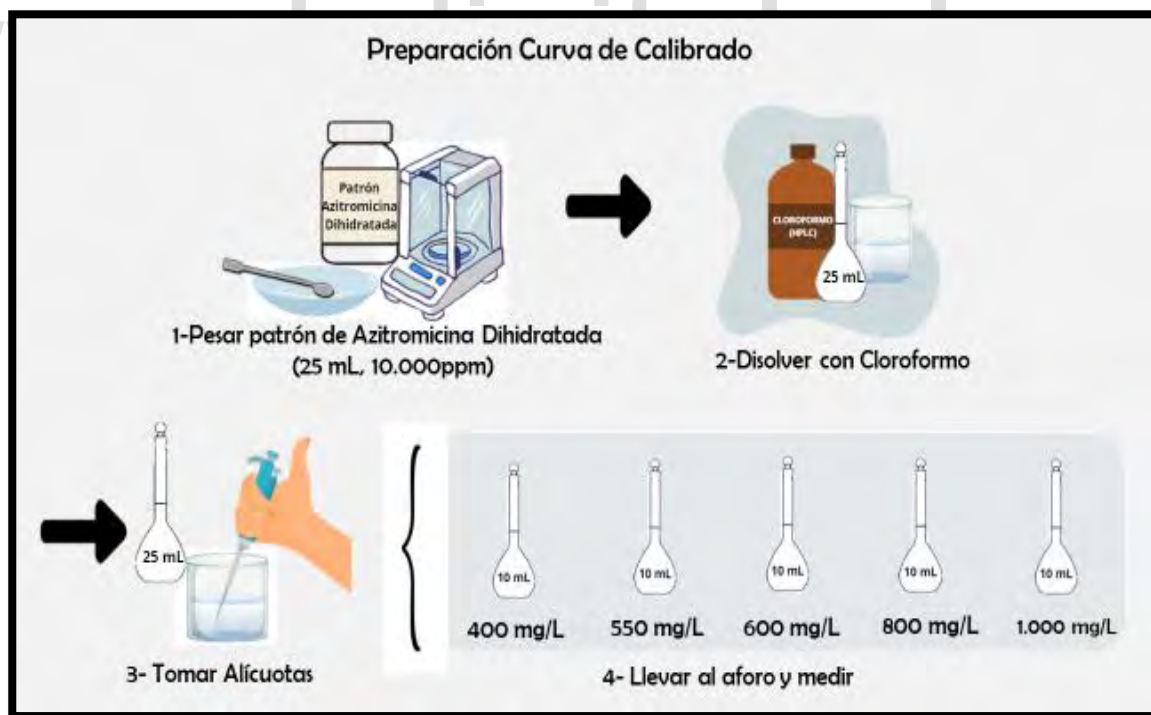


Figura 15. Esquema de preparación de la curva de calibración.

19.2 Preparación de la Muestra

La cantidad indicada de Azitromicina Anhídrida por cada tableta es de 500 mg, lo cual sirvió como referencia para la preparación de la muestra, como se indica a continuación:

Con la finalidad de obtener una muestra representativa, se tomaron de forma aleatoria 10 tabletas del producto farmacéutico, y se pesó cada una, obteniéndose así su peso promedio (\bar{x}) que para las presentaciones farmacéuticas utilizadas osciló entre los 620 y 740 mg. Luego se pulverizó hasta obtener un polvo fino y homogéneo que facilitó su disolución en el medio orgánico. Posteriormente, se tomó una masa equivalente para preparar una solución de la concentración deseada de Azitromicina anhídrida en un papel parafinado que luego se depositó en un frasco ámbar y se disolvió en 3 mL de Cloroformo grado HPLC. Para facilitar la extracción del principio activo se sonicó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

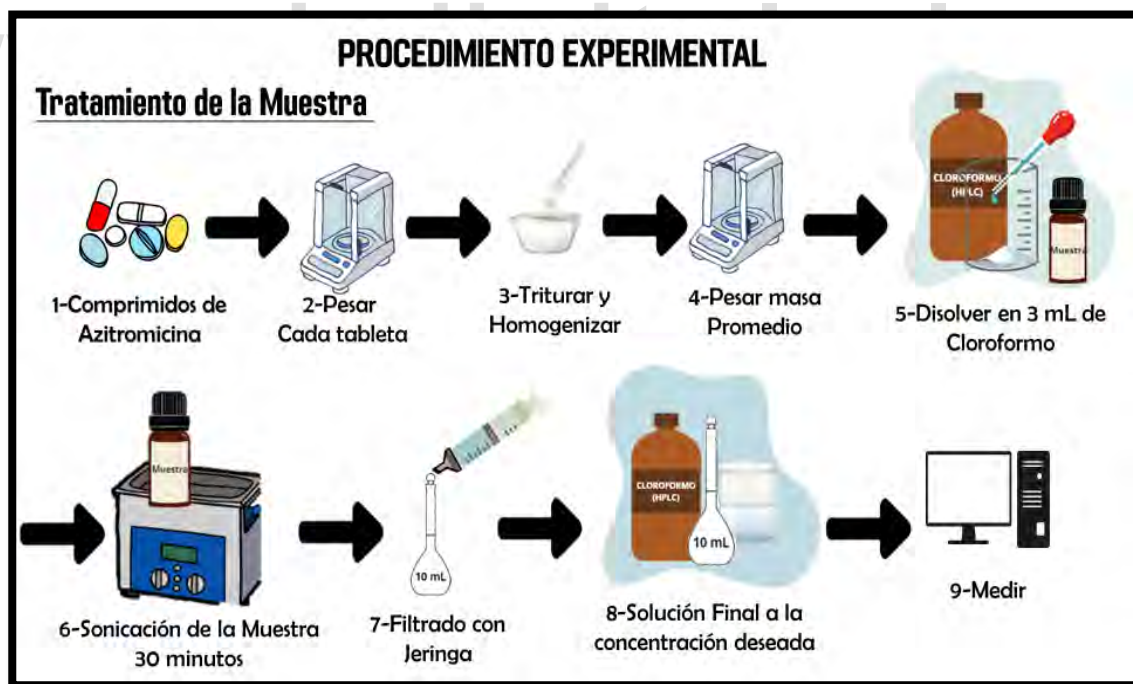


Figura 16. Esquema de tratamiento de la muestra

Como se aprecia en la figura 16, se separaron los excipientes sólidos con un filtro de jeringa manual adecuado con un acrodisco y una membrana de Politetrafluoroetileno

de 47 mm. De esta forma, el filtrado se recolectó en balones aforados de 10 mL, el cual se llevó al aforo con cloroformo grado HPLC. En este punto la solución muestra está lista para realizar el respectivo análisis.

20. Resultados y Discusiones

20.1 Selección del Solvente

Como primer punto en el desarrollo experimental en la determinación del contenido de Azitromicina, se comenzó con la selección de un solvente capaz de extraer el principio activo en las presentaciones farmacéuticas, así como el medio para realizar los análisis espectroscópicos de absorción molecular.

En este sentido, se tomó en cuenta la transparencia del solvente en la región UV – Vis, su estabilidad y la solubilidad de los excipientes de los fármacos afín de minimizar los interferentes que pudieran afectar las características espectrales y por ende la calidad de la señal instrumental.

Tabla 6. Solubilidad de Azitromicina en diferentes solventes

Solvente	Solubilidad Azitromicina	Inferencia
Agua (18 $\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$)	10 mg en 10 mL (22 °C)	No Soluble
	10 mg en 10 mL (37 °C)	No Soluble
	10 mg en 10 mL (40 °C)	No Soluble
	10 mg en 10 mL (45 °C)	No Soluble
Ácido Clorhídrico (1M)	10 mg en 1 mL (22 °C)	Soluble
Ácido Sulfúrico (1M)	10 mg en 1 mL (22 °C)	Soluble
Ácido Nítrico (1M)	10 mg en 1 mL (22 °C)	Soluble
Hidróxido de Sodio (1M)	10 mg en 5 mL (22 °C)	Ligeramente soluble
Metanol	10 mg en 1 mL (22 °C)	Soluble
Cloroformo	10 mg en 1 mL (22 °C)	Soluble
Diclorometano	10 mg en 1 mL (22 °C)	Soluble

Dicho esto, se evaluó la solubilidad del fármaco utilizando ocho solventes de distinta naturaleza química bajo las condiciones indicadas en la tabla 6, los cuales ya han sido utilizados como medio de disolución en desarrollos metodológicos previos para la cuantificación de Azitromicina. Es por ello, que se consideró apropiado estudiar el comportamiento de solubilidad del analito en estos solventes como medida preliminar para encontrar el adecuado.

Los datos reportados indican que el antimicrobiano no fue soluble en medio acuoso. Siendo un resultado esperado, dado que la estructura química del compuesto dificulta la disolución en ese medio. Incluso al aumentar la temperatura, no se apreció ninguna variación en cuanto a la proporción de sólido dispuesto en el agua.

Seguidamente, se puso a prueba la capacidad de los ácidos minerales como el ácido clorhídrico (HCl), sulfúrico (H₂SO₄) y nítrico (HNO₃) 1M, para solubilizar la Azitromicina, encontrándose una inferencia positiva. Claro está, el antimicrobiano tiene propiedades básicas ($pK_a = 7,34$), por lo que es factible su solubilidad en medio ácido. Por el contrario, en hidróxido de sodio (NaOH) la solubilidad fue limitada.

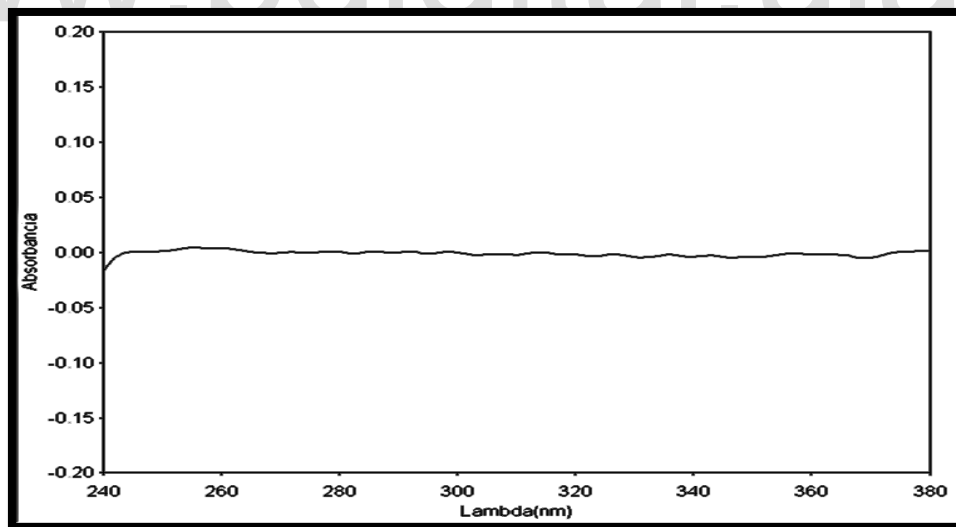


Figura 17. Espectro UV-Visible del Cloroformo en la región de estudio

Adicionalmente, la Azitromicina presentó solubilidad en metanol, diclorometano y cloroformo (Tabla 6). Condición esperada, dado que los solventes mencionados

tienen la capacidad para solubilizar moléculas grandes (lactona de 15 átomos de carbono) con características apolares.

De los solventes utilizados para las pruebas preliminares se escogió el Cloroformo (CHCl_3), debido a la excelente capacidad para solubilizar a la Azitromicina, ofreciendo la ventaja de presentar un comportamiento espectral en la región ultravioleta y visible sencillo y con ausencia de ruido en mayor medida (figura 17).

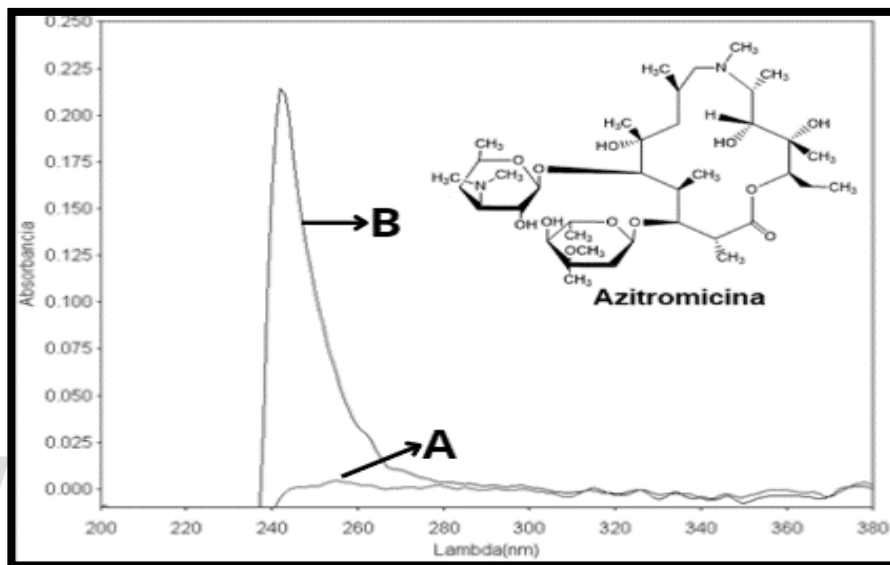


Figura 18. A) Cloroformo (Solvente); B) Solución estándar de Azitromicina (AZI) concentración de 500 mg / L.

Posteriormente, se procedió a adquirir un espectro del analito en estudio en el medio de disolución escogido (figura 18) y se delimitó la zona espectral de trabajo para el intervalo de longitud de onda (λ , nm) entre 200 – 380 nm, encontrándose que no existe ningún tipo de interferencia que permita la determinación y cuantificación del mismo, debido a las virtudes que ofrece el solvente seleccionado.

20.2 Caracterización Espectral

Con la finalidad de describir el sistema de estudio, se procedió a evaluar el espectro UV-Vis de la Azitromicina en el intervalo de 200 – 380 nm, en función de la Absorbancia respecto a la longitud de onda (λ , nm). De este modo, se puede notar que existe un solo máximo de absorción para el compuesto en 243 nm, el cual es

causado por la promoción de un electrón de un estado excitado de un grupo funcional cromóforo.

En este aspecto, se sugiere que el cromóforo causante de la transición electrónica es el grupo carbonilo ($R-C=O$) del anillo lactona como se especifica en la figura 19, donde la transición electrónica más probable es del tipo $n \rightarrow \pi^*$.

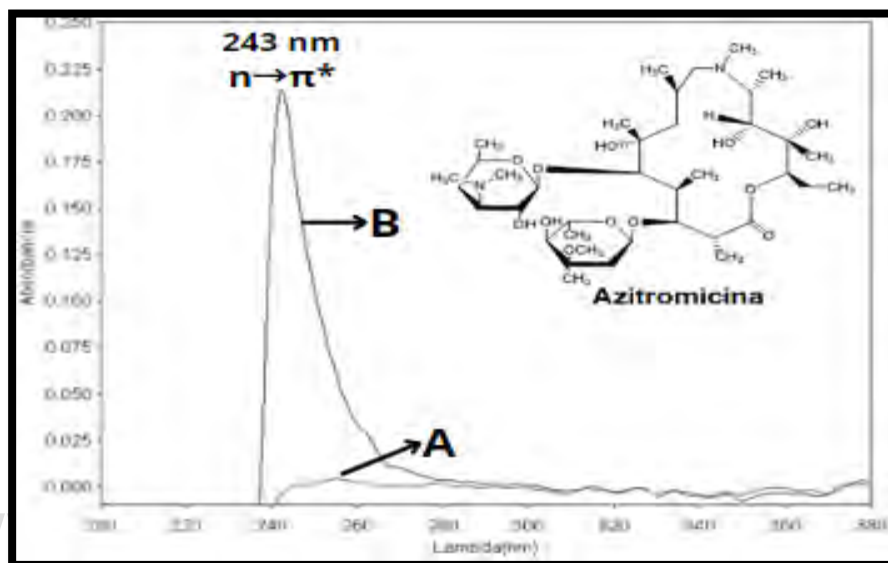


Figura 19. Espectro UV-Visible obtenido a partir de: A) Cloroformo (Solvente); B) Solución estándar de Azitromicina (AZI) concentración de 500 mg / L.

Un punto importante a mencionar es, que el método sugerido por la farmacopea de los Estados Unidos (USP 46- NF41), caracteriza la absorción molecular UV-Vis de la Azitromicina a través del carbonilo del anillo lactona, con la diferencia que el máximo de absorción que experimenta el analito ocurre a una longitud de onda más corta (210 nm) respecto a la encontrada en el presente estudio, debido a la diferencia de polaridad entre los solventes implementados en cada caso.

20.3 Estudio de la Factibilidad de la Metodología Propuesta

En aras de comprobar la factibilidad del sistema en estudio, se evaluó el comportamiento espectral del analito en una solución estándar o patrón y en una presentación comercial sólida. Para ello, se utilizó una solución patrón de 500 mg/L de Azitromicina, una solución de muestra con una concentración estimada de

500mg/L y, por último, una solución de muestra fortificada con patrón, como se aprecia en la figura 20.

Una vez realizado los espectros de las soluciones especificadas, se procedió a la comparación de los mismos de la siguiente manera; en primer lugar, se contrastó la respuesta instrumental del patrón de Azitromicina (B) respecto a una muestra (C) de la misma concentración como se aprecia en la figura 20.a, notándose un comportamiento gráfico similar, dando a entender que la presentación farmacéutica contiene Azitromicina y que es posible su extracción con el solvente seleccionado.

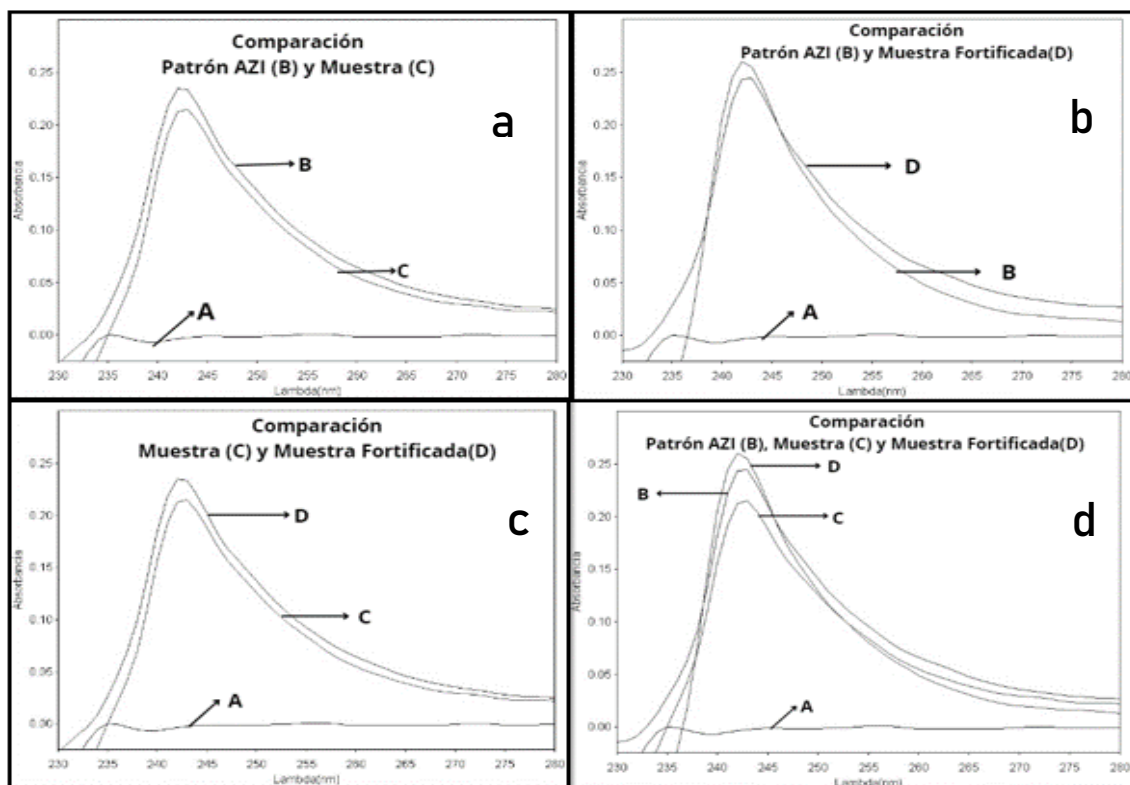


Figura 20. Espectro UV-Visible obtenido a partir de: a) Cloroformo (Blanco); b) Solución estándar de Azitromicina (AZI) concentración de 500 mg / L; c) Solución de muestra 500 mg/L de Azitromicina; d) Solución fortificada con patrón de Azitromicina.

Luego, se comparó el espectro de absorción de la solución patrón (B) respecto a la muestra fortificada (D) (figura 20.b), corroborando que el gráfico obtenido en ambos casos se debe a la Azitromicina. Adicionalmente, en la en la figura 20.c se contrasta la similitud en el espectro de absorción molecular del analito en la muestra fortificada

(D) respecto a una sin fortificar. Finalmente, en la figura 20.d, se detona la semejanza de las bandas para las tres soluciones preparadas.

Debido a lo ya mencionado, queda en evidencia que existe una correspondencia entre el aumento de la señal instrumental con la concentración, así como reproducibilidad en los espectros de absorción molecular UV-Vis de la Azitromicina para las tres soluciones preparadas. Por este motivo, se considera que es factible la cuantificación del principio activo farmacéutico por el desarrollo metodológico que se está proponiendo, donde el solvente orgánico no representa ninguna limitación para el análisis, ya que permite la recolección de información espectral del analito de forma sencilla, tanto en una solución patrón como en una muestra proveniente de un comercio farmacéutico.

20.4 Selección de Criterio de Medida

A partir de los resultados obtenidos en la sección previa, se consideró la posibilidad de la cuantificación del principio activo farmacéutico Azitromicina mediante la técnica de espectroscopia de absorción molecular UV-Vis. Con esa finalidad, se evaluó la respuesta instrumental provista por el equipo y se sometió a distintos tratamientos provistos por el Software de trabajo como: corrección de línea base, suavizado, derivación y normalización, con el propósito de obtener una señal analítica adecuada.

De este modo, se seleccionaron dos criterios de medida proporcionados por el equipo para realizar la cuantificación, siendo estos la altura máxima del pico y el área que ocupa la banda de absorción, como se especifica en la figura 21.

En primer lugar, se realizó monitoreo del máximo de absorción de orden cero (D^0) de la Azitromicina en 243 nm a través de la elaboración de una curva de calibración sencilla en el intervalo 400-1000 mg/L, utilizando los criterios de medida antedichos. Teniendo en cuenta lo mencionado, en la figura 21.a se esquematiza la medición del máximo de absorción en 243 nm con corrección de línea base por altura de pico entre 238-280 nm y la medición del área del espectro que ocupa el intervalo de longitudes de onda desde 238 nm hasta 280 nm, denotado en la figura 21.b.

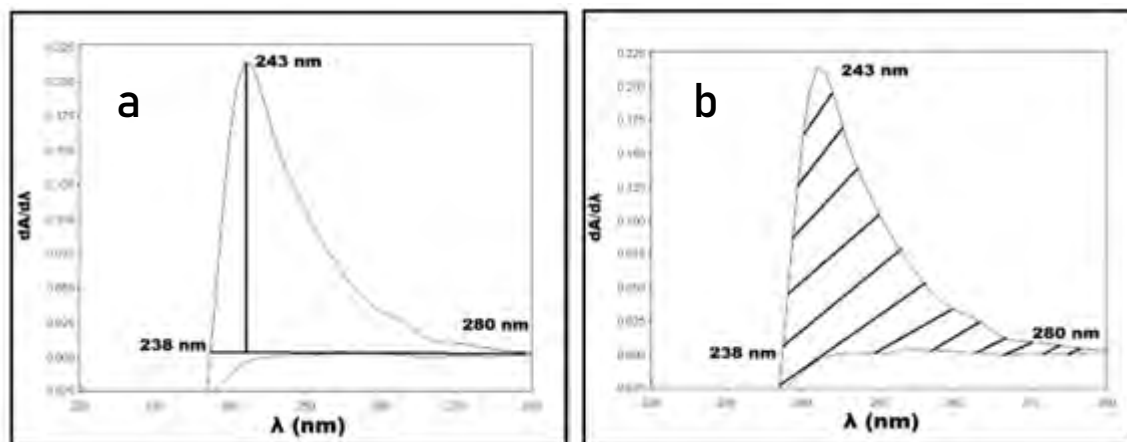


Figura 21. Criterios de medida espectro de la Azitromicina orden cero (D^0) a) altura de pico b) área bajo la curva.

Todos los datos fueron cotejados en la tabla 7, para el resumen de la curva de calibración de orden cero (D^0). Los resultados que se exponen muestran una precisión y linealidad considerable, encontrándose dentro de los márgenes considerados como aceptables, es decir, una desviación estándar relativa (%DER) menor al 5% y un coeficiente de determinación mayor a 0,999.

Tabla 7. Análisis de los valores de altura, altura pico y área a $\lambda=243$ nm

Área $\Delta\lambda= (238-270)$ nm			
Concentración (mg/L)	400	500	800
A	0,9144	1,6029	3,0951
B	0,9972	1,6060	3,0024
C	0,9622	1,7318	3,0581
\bar{x}	0,96	1,65	3,05
s	0,04	0,07	0,05
%DER	4,3%	4,2	1,5%
r^2	0,9924	Ecuación Área = 0,0053[C (mg/L)] - 1,0731	
Absorbancia por Altura Pico $\lambda=243$ nm			
Concentración	400	500	800

(mg/L)			
A	0,0786	0,1341	0,2476
B	0,0837	0,1361	0,2525
C	0,0829	0,1402	0,257
\bar{x}	0,082	0,137	0,239
s	0,003	0,003	0,009
%DER	3,6%	2,26%	3,8%
r²	0,9939	Ecuación	Abs = 0,0005[C (mg/L)] - 0,0632

Como segundo punto en la selección del criterio de medida, se evaluaron las características gráficas de la banda de absorción del espectro UV-Vis de la Azitromicina, tomando en consideración su diferencia respecto a la forma convencional de una curva gaussiana, mostrando una baja resolución espectral el primer tramo de la curva (238 – 243 nm) apreciando una pendiente de casi 90°, lo cual dificulta su monitoreo. No obstante, en el intervalo 243-280 nm la resolución espectral mejora, pudiendo ofrecer información analítica de interés.

Tomando en cuenta la descripción mencionada, se deduce la posibilidad de monitorizar el espectro UV-Vis de la Azitromicina en el intervalo 243-280 nm a través de la operación matemática denominada derivada, la cual es una técnica complementaria que ayuda a resolver mejor los espectros de absorción con características similares a las encontradas en este caso. Dicho esto, en los siguientes párrafos se describirá el seguimiento hacia el espectro derivado de la Azitromicina.

Como se puede apreciar en la figura 22, se muestra la primera derivada del espectro UV-Vis ($D^1=dA/d\lambda$) de un patrón de Azitromicina de concentración 500 mg/L, el cual presenta mejor resolución y está mejor estructurado respecto al espectro original (D^0), mostrando un mayor número de picos. En este caso, se puede apreciar un máximo en 239 nm y un mínimo en 245 nm, ambos potencialmente cuantificables y, cuyo corte con el cero corresponde al máximo de absorción (243 nm) del espectro de orden cero (D^0).

Referente a la selección del criterio de medida, se derivaron los espectros de absorción de la curva de calibración sencilla en el intervalo 400-1000 mg/L descrita con anterioridad, y de igual manera, se aplicaron los dos métodos para obtener la mejor estimación de los valores de medición posible.

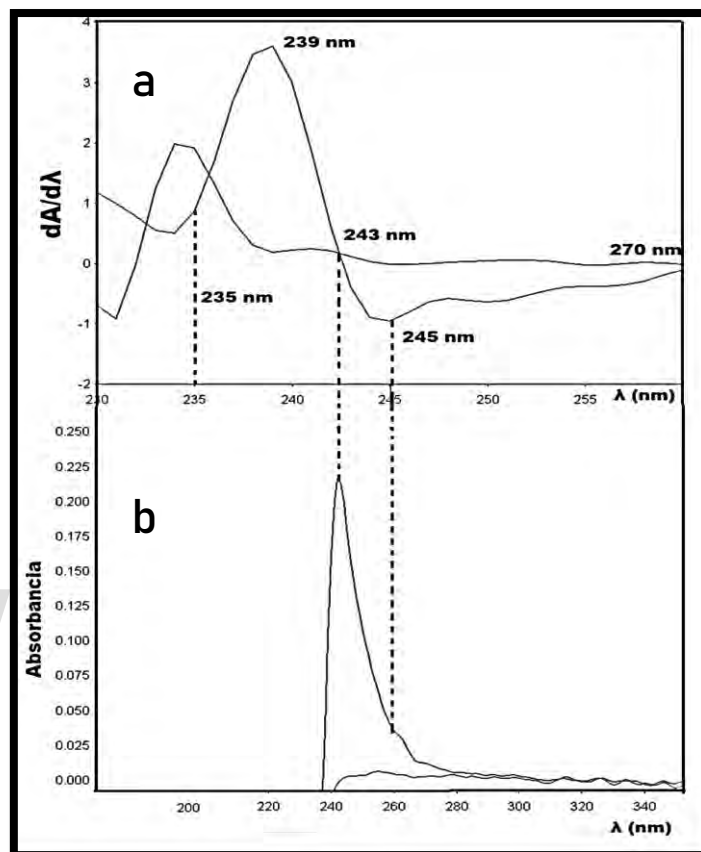


Figura 22. Espectro UV-Visible de solución estándar de Azitromicina (AZI) concentración de 500 mg / L a) primera derivada (D^1) b) orden cero (D^0)

En el caso del máximo en 239 nm (D^1), los resultados presentan características analíticas aceptables (tabla 8). Sin embargo, una evaluación exhaustiva, indicó que la reproducción del máximo se complicaba en mayor medida debido a la disminución de la relación señal-ruido (S/N). Por lo tanto, se descartó su aplicación para la cuantificación del principio activo.

Seguidamente, se evaluó el mínimo de absorción de la primera derivada de absorbancia respecto a la longitud de onda ($dA/d\lambda$ vs. λ (nm)), bajo los dos criterios esquematizados en la figura 23, y cuyos resultados se resumen en la tabla 9,

encontrándose un excelente comportamiento gráfico en relación a la sensibilidad, coeficiente de determinación (r^2), y la precisión, para la medición del mínimo de absorción en 245 nm, con corrección de línea base desde 243 nm hasta 270 nm (figura 23.a).

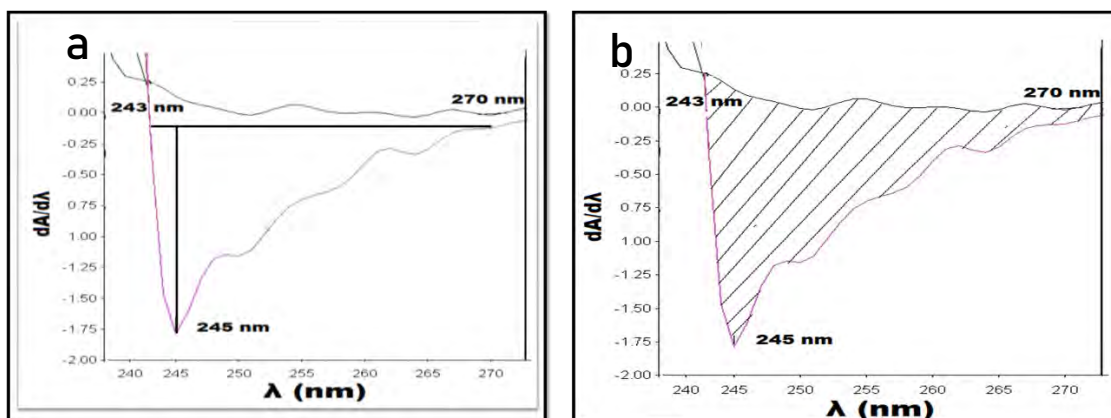


Figura 23. Criterios de medida espectro de la Azitromicina primera derivada (D^1) a) altura de pico b) área bajo la curva.

Dicho de otro modo, la descripción de la banda monitorizada en 245 nm luego de la aplicación de la derivada (D^1) proporciona un comportamiento gráfico excelente (repetibilidad del mínimo), acompañado de un aumento de la estructura fina de la señal instrumental, al igual que una mejora en la selectividad del sistema y sensibilidad analítica.

Tabla 8. Análisis de altura pico y área de la primera derivada D^1 a $\lambda=239$ nm.

D ¹ Área $\Delta \lambda = (235-243)$ nm			
Concentración (mg/L)	400	500	800
A	7,0234	11,6427	19,7995
B	6,7584	11,6338	17,4747
C	6,3074	11,4866	20,0746
\bar{x}	6,7	11,59	19
s	0,4	0,09	1,4

%DER	5,4%	0,77%	7,3%
r^2	0,9823	Ecuación	Área = 0,028[C (mg/L)] - 3,04
D ¹ Altura Pico $\lambda=239$ nm			
Concentración (mg/L)	400	500	800
A	1,5976	2,6535	4,3355
B	1,4857	2,6093	4,4899
C	1,5715	2,7046	4,7073
\bar{x}	1,55	2,66	4,51
s	0,06	0,05	0,2
%DER	3,8%	1,9%	4,1%
r^2	0,9962	Ecuación	Abs = 0,0056[C (mg/L)] - 0,1837

Tabla 9. Análisis de altura pico y área de la primera derivada D¹ a $\lambda=245$ nm.

D ¹ Área $\lambda= (243-270)$ nm			
Concentración (mg/L)	400	500	800
A	0,8267	1,6962	5,5983
B	1,1733	1,6668	5,6824
C	0,8999	1,7686	5,7358
\bar{x}	0,97	1,71	2,6
s	0,2	0,05	0,07
%DER	18%	2,9%	2,6%
r^2	0,9877	Ecuación	Área = 0,013[C (mg/L)] - 4,392
D ¹ Altura Pico $\lambda=245$ nm			
Concentración (mg/L)	400	500	800
A	0,2137	0,3915	0,8928

B	0,2146	0,3944	0,8785
C	0,2313	0,3855	0,9141
\bar{x}	0,22	0,390	0,90
s	0,01	0,004	0,02
%DER	4,5%	1,2%	2,0%
r^2	0,9996	Ecuación	Abs = 0,0017[C (mg/L)- 0,4738

Luego de una revisión detallada de cada uno de los criterios puestos a prueba, se decidió que el criterio de medida óptimo consiste en el mínimo de absorción de la primera derivada a 245 nm con corrección de línea base por pico altura desde 243 hasta 270 nm, como se esquematiza en la figura 24.

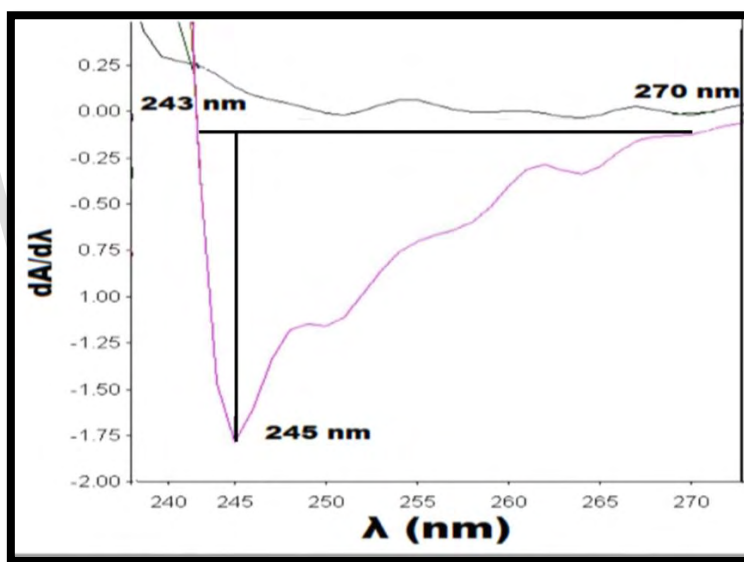


Figura 24. Criterio de medida escogido para la cuantificación de la Azitromicina

Es necesario reiterar que la aplicación de la derivada ofrece la ventaja de mejorar la respuesta gráfica en relación la sensibilidad analítica, la precisión, así como su linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado. Esto quiere decir que, con el criterio de medida escogido se potencian las características analíticas del sistema, permitiendo la descripción de la banda de absorción de la Azitromicina de forma mejorada, facilitando su interpretación para análisis cuantitativos principalmente.

20.5 Optimización de los Parámetros Experimentales

Continuando con la definición de las mejores cualidades del método espectrofotométrico para determinar el contenido de Azitromicina, ahora, se comenta sobre la optimización de los parámetros experimentales, donde se perfilan las características y procesos adecuados para la extracción del analito en la muestra, así como la selección de las condiciones instrumentales y espectroscópicas para la aplicación eficaz de la metodología. En la presente sección, se exploran los aspectos más relevantes de la optimización de las variables experimentales.

20.5.1 Sonicación

Como primer parámetro a evaluar se decidió poner a prueba la capacidad de disolución de la Azitromicina en cloroformo por medio de la aplicación de ondas ultrasónicas de forma indirecta por medio de un ultrasonido a distintos intervalos de tiempo a temperatura ambiente (22 °C). En este caso, cada muestra de Azitromicina comprendía una concentración de 500 mg/L.

En la figura 25, se ilustran los resultados obtenidos para cada una de las muestras utilizadas en el presente estudio. En general, se observa una tendencia creciente de disolución del principio activo Azitromicina a medida que aumenta el tiempo de sonicación hasta un establecimiento de condiciones constantes. Esto se debe a que las ondas sonoras impactan con las partículas del fármaco reduciendo su tamaño, lo que favorece su disolución hasta un punto máximo en 30 minutos.

Por otro lado, algunas muestras manifestaron una tendencia al decrecimiento luego para la medición de 40 minutos de sonicación. El fenómeno que se adjudica a este hecho se relaciona con la dimerización del principio activo bajo las condiciones de sonicación especificadas, ocasionando la disminución de la absorción por parte del analito.

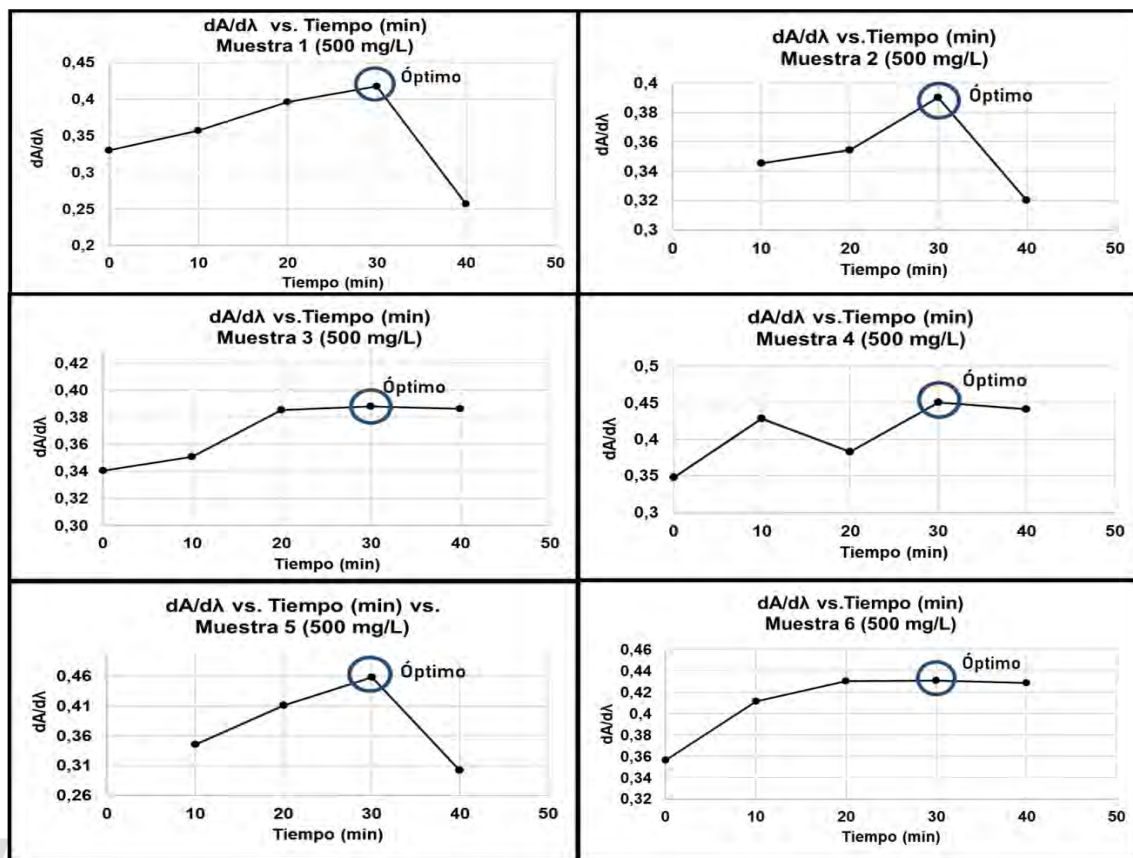


Figura 25. Representación gráfica de tiempo de sonicación respecto al tiempo.

20.5.2 Velocidad de Barrido

Con la finalidad de evaluar la respuesta instrumental respecto al intervalo de longitudes de onda que escanea el espectrofotómetro en un tiempo determinado, se puso a prueba la velocidad de barrido del sistema para una solución patrón y una muestra de concentración 500 mg/L como se aprecia en la figura 26.

Las velocidades de barrido escogidas fueron suministradas por el software del equipo, siendo estas 30, 120, 600, 2400 nm/min e Intelliscan, como se muestra en la figura 26. Tanto la muestra como el patrón indicaron la misma tendencia en la serie de datos, siendo la velocidad del tipo Intelliscan la que presentó mayor valor de absorbancia. Además, queda la certeza que en ninguno de los otros casos estudiados se reproduce la banda de absorción de forma adecuada, donde incluso a 2400 nm/min, ocurre una deformación del espectro ocasionando una menor absorción por parte del analito.

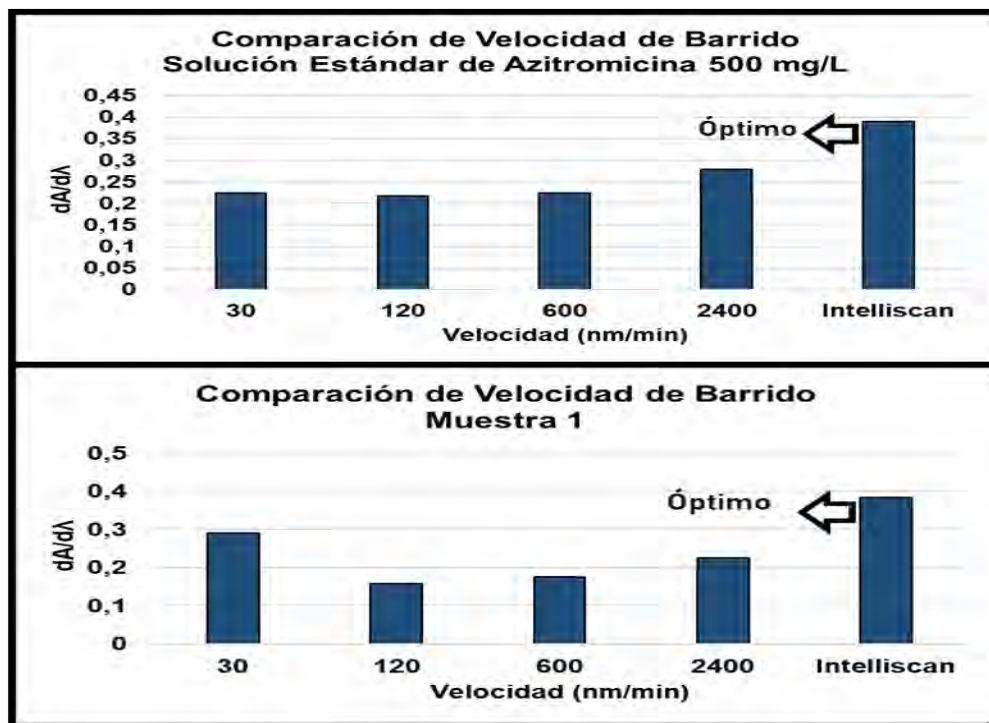


Figura 26. Evaluación velocidad de barrido en solución patrón de Azitromicina

20.5.3 Resolución

Seguidamente, se estudió la capacidad que tiene el equipo de distinguir entre dos valores de longitudes de onda de forma individual, se decidió poner a prueba la resolución espectral o ancho de banda. De esta forma, en la figura 27 resume la evaluación de la resolución (ancho de banda) en todas las muestras y la solución patrón de concentración 500 mg/L.

Las dimensiones de la rendija tomadas en consideración para el estudio estaban denotadas por el equipo, las cuales fueron 0,5, 1, 2 y 4 nm. Como tal, el comportamiento gráfico fue similar para todas las muestras y el patrón, indicando que a medida que aumentaba en ancho de banda, la diferencia entre las longitudes de onda ($\Delta\lambda$) se hace mayor, hasta llegar a un punto máximo en 2 nm. Cuando el ancho de banda aumenta a 4 nm la diferencia entre las longitudes de onda se hace lo suficientemente grande para ocasionar una disminución de la resolución.

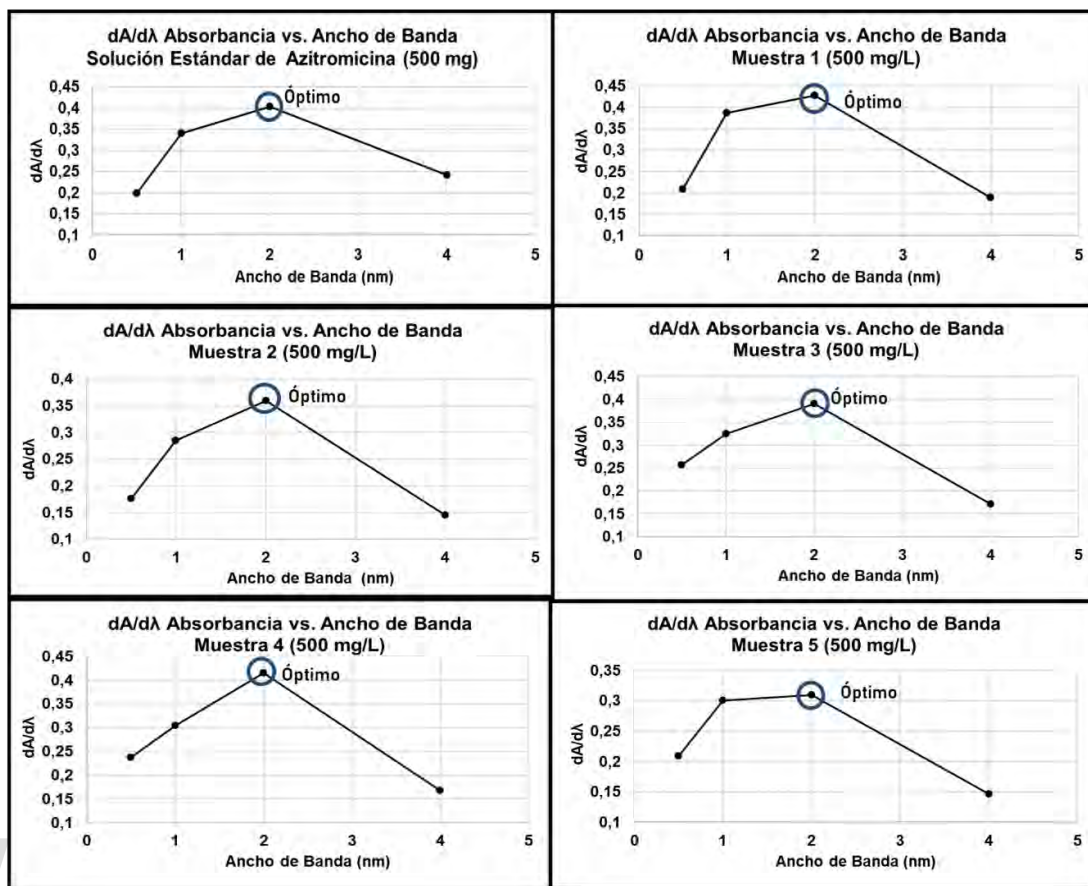


Figura 27. Representación gráfica de la evaluación de resolución en muestras farmacéuticas

Teniendo en cuenta que se han analizado y discutido todos los resultados pertinentes a la caracterización de las condiciones preliminares, así como de la optimización de los parámetros experimentales, en este punto, se considera apropiado resumir en la tabla 10, los datos necesarios que describen las condiciones experimentales para la ejecución de la metodología alternativa que tiene como finalidad la cuantificación del principio activo farmacéutico Azitromicina en tabletas de 500 mg.

Tabla 10. Resumen de las condiciones experimentales

Equipo	Espectrofotómetro de Absorción Molecular UV-Vis de doble haz
Fuente	Lámpara de Xenón
Detector	Fotodiodos de Silicio
Intervalo espectral	200 – 380 nm
Resolución	2 nm
N° de espectros acumulados	3 ciclos
Longitud de onda a estudiar	245 nm
Condición de la medición	dA/dλ vs. λ (nm)
Parámetros de Optimización para la Extracción del Analito	
Tiempo de extracción	30 minutos
Solvente	Cloroformo grado HPLC

20.6 Validación del Método Propuesto

Con el objetivo de garantizar la confiabilidad de la metodología experimental desarrollada, se procedió a validar el mismo. Dicho esto, se realizó una caracterización analítica del sistema mediante estudios de exactitud, precisión, estabilidad y posibles efectos interferentes por parte de la matriz (robustez).

20.6.1 Linealidad de Método

En aras la determinación de la linealidad del método espectrofotométrico, se preparó una curva de calibrado a partir de 6 soluciones patrón a distintas concentraciones (400, 500, 600, 800, 900 y 1000 mg/L), de las cuales 3 de esos patrones fueron analizados por triplicado (400, 800 y 1000 mg/L) bajo los criterios de medida ya establecidos, como se muestra en la figura 28.

Seguidamente, se estudió la precisión de los puntos repetidos, se tomó su promedio (\bar{x}), la desviación estándar (s) y desviación estándar relativa (%DER),

como se aprecia en la tabla 11, encontrándose que los datos reportados son precisos (%DER<5%). Además, se estableció la correlación entre la concentración y la señal derivada del espectro ($dA/d\lambda$) por medio del coeficiente de determinación (r^2) al obtener un valor de 0,9991, valor aceptado dentro de los límites establecidos ($r^2 > 0,999$).

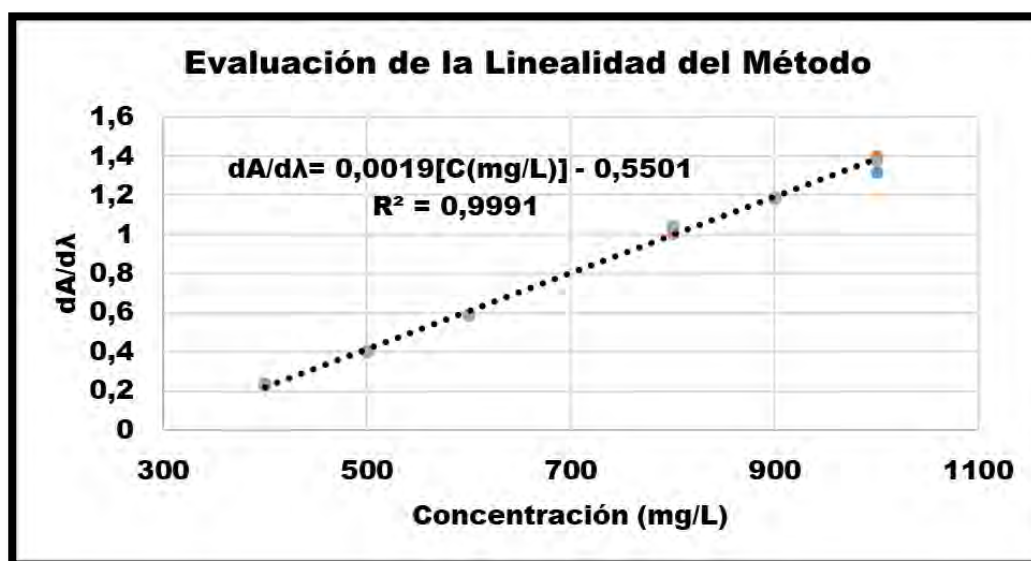


Figura 28. Gráfico de curva de calibración sencilla para la evaluación de la linealidad del método

Tabla 11. Evaluación de la linealidad del método

C (mg/L)	dA/dλ	C (mg/L)	dA/dλ	C (mg/L)	dA/dλ
	0,2348		1,0065		1,3972
400	0,2378	800	1,0313	1000	1,3187
	0,2306		1,0412		1,3743
\bar{x}	0,234	\bar{x}	1,03	\bar{x}	1,36
s	0,004	s	0,02	S	0,04
%DER	1,54	%DER	1,74	%DER	2,96

20.6.2 Límites de Detección (LOD) y Cuantificación (LOQ)

En el caso de la determinación experimental de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), el criterio metodológico escogido consistió en la dilución de un patrón de 400 mg/L hasta que la señal proporcionada fuera equivalente a la del blanco. La dilución previa a este punto, se consideró como el límite de detección real del método siendo este 25,0 mg/L. Luego, se calculó el LOQ real del método, mediante la siguiente ecuación, obteniéndose un valor de 75,8 mg/L

$$LOQ = \frac{10}{3,3} LOD$$

20.6.3 Precisión del Método Propuesto

Para estudiar la precisión del sistema desarrollado se decidió realizar pruebas de repetibilidad y precisión intermedia como se aprecia en las tablas 12 y 13 respectivamente.

En el caso de la repetibilidad del método (tabla 12) se realizó el análisis de 5 réplicas independientes de dos soluciones patrón de 500 y 800 mg/L, así como de una muestra de concentración estimada 500 mg/L. Dicho esto, se determinó la media, la desviación estándar y desviación estándar relativa (%DER) de la serie de datos. En este sentido, la condición para garantizar la repetibilidad consistió en realizar la prueba en el mismo laboratorio, por el mismo analista, bajo las mismas condiciones, equipos y reactivos en un corto periodo de tiempo (intra-día). Dicho esto, se encontró que los resultados obtenidos presentaron una buena precisión, con una %DER menor al 5%, entrando dentro de los márgenes de error permitidos.

Tabla 12. Estudios de repetibilidad de la metodología propuesta

N°	500mg/L	800mg/L	Muestra 6
1	0,3957	0,9279	0,3799
2	0,3822	0,9379	0,3544
3	0,3886	0,9153	0,3807
4	0,3853	0,9180	0,3649

5	0,3891	0,8895	0,3692
\bar{x}	0,39	0,92	0,37
s	0,01	0,02	0,01
%DER	1,31%	1,98%	2,98%

Adicionalmente, se evaluó la precisión intermedia de dos soluciones patrón de 500 mg/L y 800 mg/L, las cuales fueron medidas bajo las mismas condiciones de repetibilidad, con la diferencia que se realizó una segunda serie de soluciones independientes un segundo día consecutivo y de midió su valor, encontrándose que los resultados manejan una desviación estándar relativa menor al 5% y corroborando la similitud de las medidas (tabla 13).

Tabla 13. Estudios de precisión intermedia de la metodología propuesta

Patrón	500 mg/L	800 mg/L	500 mg/L	800 mg/L	
	0,3957	0,9279	0,3932	0,9141	
	0,3822	0,9379	0,3851	0,8779	
Día 1	0,3886	0,9153	Día 2	0,3966	0,9485
	0,3853	0,9180		0,3904	---
	0,3891	0,8895		0,3838	---
\bar{x}	0,39	0,92	\bar{x}	0,39	0,91
s	0,01	0,02	s	0,01	0,04
%DER	1,31%	1,98%	%DER	1,39%	3,86%

20.6.4 Estabilidad de las Soluciones de Trabajo

Con el propósito de estudiar la estabilidad de las 2 soluciones patrón de 500 y 800 mg/L respectivamente, se monitoreó su señal analítica por un periodo de cinco días, siendo estas conservadas en frascos ámbar a temperatura ambiente, y cuyo resultado se muestra en el gráfico de la figura 29. En este, no se observó variación significativa de los resultados obtenidos para los primeros tres días consecutivos de

medición, siendo considerado como el intervalo óptimo de estabilidad de los patrones de Azitromicina bajo las condiciones especificadas.

Cabe resaltar que a partir del cuarto día de medición se pudo apreciar un aumento de la señal instrumental propio de volatilización del solvente de estudio (cloroformo) y pre-concentración del analito. Sin embargo, se estima que el sistema sigue manteniendo la reproducción de la banda de absorción, una virtud que ofrece el solvente en comparación con otros utilizados en desarrollos metodológicos alternativos para la cuantificación de la Azitromicina.

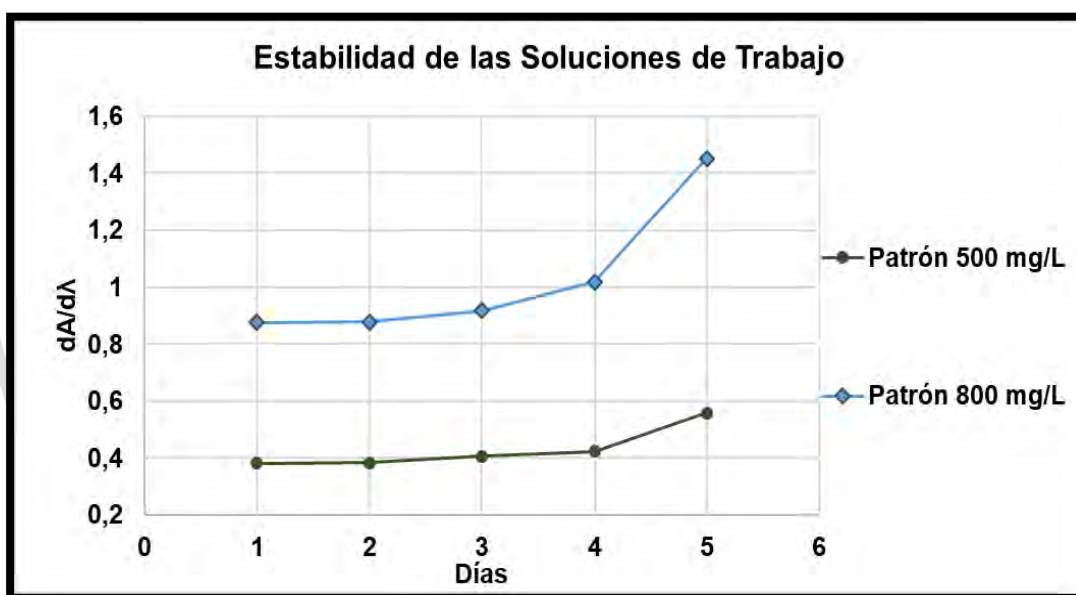


Figura 29. Estudio de estabilidad de las soluciones de trabajo bajo la metodología propuesta.

Con base a lo aquí expuesto, quedan demostradas las características principales de estabilidad del patrón de Azitromicina disuelto en cloroformo, de las muestras farmacéuticas, así como de la robustez del método.

Llegado a este punto, es necesario incorporar la descripción de la influencia que tiene la matriz de cada muestra farmacéutica sobre el analito. Esto se logra por medio de estudios de curvas de calibración por adición estándar (CAE) para cada una de las muestras que se tienen para el análisis de este trabajo.

20.6.5 Análisis de Interferencias por Efecto de Matriz

Las interferencias físicas y químicas por efecto de matriz pueden reducir o aumentar la señal de absorbancia del analito ocasionando errores significativos en los resultados del análisis. Es por ello que, se necesita confirmar la ausencia o presencia de dicho factor en el sistema de estudio.

Dentro de las posibles opciones experimentales, se tiene el método de adición estándar clásico, que consistió en el agregado de una cantidad constante de muestra y la adición de volúmenes crecientes de solución patrón de Azitromicina para un volumen final constante.

En función de lo mencionado, se realizó la comparación de las pendientes de la curva de calibración sencilla (CCS) obtenida con anterioridad, respecto a las diversas pendientes de las curvas de adición estándar diseñadas (Tabla 14), para determinar si existe diferencia significativa entre los métodos de calibración. Esto se logró a través de la evaluación del estadístico t de "Student", efectuando primeramente la prueba F (Fisher) para contrastar la homogeneidad de las varianzas de las rectas de calibrado.

Tabla 14. Parámetros analíticos de las curvas de calibración de adición estándar (CAE).

N° de Muestra	Ecuación de La recta	R ²
1	$dA/d\lambda = (2,3 \pm 0,2) \times 10^{-3} [C \text{ (mg/L)}] - (0,4 \pm 0,1)$	0,9954
2	$dA/d\lambda = (2,1 \pm 0,4) \times 10^{-3} [C \text{ (mg/L)}] - (0,38 \pm 0,02)$	0,9993
3	$dA/d\lambda = (2,1 \pm 0,1) \times 10^{-3} [C \text{ (mg/L)}] - (0,30 \pm 0,07)$	0,9948
4	$dA/d\lambda = (1,9 \pm 0,1) \times 10^{-3} [C \text{ (mg/L)}] - (0,19 \pm 0,08)$	0,9857
5	$dA/d\lambda = (1,92 \pm 0,04) \times 10^{-3} [C \text{ (mg/L)}] - (0,11 \pm 0,03)$	0,9990
6	$dA/d\lambda = (1,93 \pm 0,06) \times 10^{-3} [C \text{ (mg/L)}] - (0,14 \pm 0,03)$	0,9980

En este aspecto, para efectuar el análisis de varianzas mediante la prueba F (Fisher), se consideró necesario contrastar la hipótesis nula (H_0), que indica que las

medias de los datos evaluados se encuentran distribuidos uniformemente y que presentan la misma desviación estándar, en otras palabras, que las varianzas son homogéneas ($s_1^2=s_2^2$). Por otro lado, cuando no se puede asumir que las varianzas son similares ($s_1^2\neq s_2^2$), se aprueba la hipótesis alternativa (H_1). Dicho esto, en la tabla 13, se muestran los resultados de las pruebas estadísticas de evaluación de varianzas F al 95% de confianza para las desviaciones estándar de las pendientes de las rectas de regresión, donde el criterio de aceptación consiste en que el F calculado (F_{cal}) sea menor que un valor de referencia conocido como F crítico ($F_{crit95\%}$), $F_{cal} < F_{crit95\%}$.

Tabla 15. Resultados de la prueba F para la evaluación entre las curvas de calibración sencilla y adición estándar

Curva	s^2	Grados de Libertad (n-2)	F_{cal}	$F_{crit (95\%)}$	H_0
CCS	$8,62 \times 10^{-10}$	4	---	---	---
CAE Muestra 1	$3,51 \times 10^{-8}$	2	40,70	10,65	No Aprobado
CAE Muestra 2	$1,55 \times 10^{-9}$	2	1,80	10,65	Aprobado
CAE Muestra 3	$1,15 \times 10^{-8}$	2	13,31	10,65	No Aprobado
CAE Muestra 4	$1,70 \times 10^{-8}$	3	19,77	9,79	No Aprobado
CAE Muestra 5	$1,90 \times 10^{-9}$	2	2,20	10,65	Aprobado
CAE Muestra 6	$3,78 \times 10^{-9}$	2	4,38	10,65	Aprobado

Al realizar el análisis de varianzas por la prueba F, como se resume en la tabla 15, se puede notar que existen muestras como la 1, 3 y 4 que no aprueban la hipótesis nula ($s_1^2\neq s_2^2$). Sin embargo, esto solo confirma que la varianza de las pendientes entre la CCS y las CAE para las muestras especificadas difiere significativamente y que puede deberse a errores sistemáticos. En cambio, las muestras 2,5 y 6, aprueban la hipótesis nula (H_0), lo que da a entender que estadísticamente las varianzas de cada serie de datos (CCS vs. CAE) son similares ($s_1^2=s_2^2$).

Tabla 16. Resumen de parámetros a evaluar en el estadístico t (Student)

Criterio	Estadístico de Prueba ($\pm t$)	Grados de Libertad	Observación
$s_1^2 = s_2^2$	$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$	$n_1 + n_2 - 2$	$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}}$
$s_1^2 \neq s_2^2$	$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$	$\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{(n_1 - 1)n_1^2} + \frac{s_2^4}{(n_2 - 1)n_2^2}}$	

Condiciones del Estadístico t

Hipótesis Nula (H_0)	$\bar{x}_1 = \bar{x}_2$
Hipótesis Alternativa (H_1)	$\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$
Nivel de Aceptación ($1-\alpha$)	0,95

Una vez determinada la homogeneidad de las varianzas, se procedió a aplicar el estadístico t de Student correspondiente para cada caso, siguiendo los criterios de la tabla 16, donde también se sintetizan las condiciones de aprobación del estadístico en evaluación. Por ejemplo, si se aprueba la hipótesis nula (H_0) indicaría que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las curvas calibración. En contraste, la hipótesis alternativa (H_1) infiere sobre la existencia de diferencias entre los dos valores.

De esta forma, en la tabla 17 se resumen los resultados del estadístico t al 95% ($1-\alpha = 0,95$) de confianza, donde la hipótesis nula se acepta para todos los casos, debido a que $t_{\text{tab}} < t_{\text{crit}95\%}$. Esto indica que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de calibración por adición estándar de cada muestra

respecto a la curva de calibración sencilla bajo un 95% de confianza para las todas las muestras estudiadas.

Tabla 17. Resultados del estadístico t para la evaluación entre curvas de calibración sencilla y de adición estándar.

Curva	t_{cal}	Grados de Libertad	t_{crit} (95%)	H_0
CAE Muestra 1	3,37	2	4,30(*)	Aprobado
CAE Muestra 2	1,05	3	2,31	Aprobado
CAE Muestra 3	2,96	2	4,30(*)	Aprobado
CAE Muestra 4	0,82	3	3,18(*)	Aprobado
CAE Muestra 5	0,51	8	2,31	Aprobado
CAE Muestra 6	0,21	8	2,31	Aprobado

(*) Caso de s^2 no homogéneas

En función de todo lo mencionado, se deduce que el método propuesto está libre de interferencias de tipo físico y químico por parte de la matriz. En otras palabras, mediante la metodología desarrollada, se pueden realizar los ensayos de determinación de contenido del fármaco Azitromicina utilizando una de curva de calibración sencilla.

20.6.6 Características Analíticas del Método Propuesto

A continuación, se resumen las principales características analíticas del método propuesto, comenzando por la construcción de una curva de calibración sencilla en el intervalo de 400-1000 mg/L, aplicando un suavizado medio y la primera derivada ($dA/d\lambda$) al espectro de absorción, y posteriormente cuantificando los valores con el criterio de medida que consiste en la medición de la absorbancia a 245 nm con corrección de línea base 243-270 nm, como se esquematiza en la figura 30.

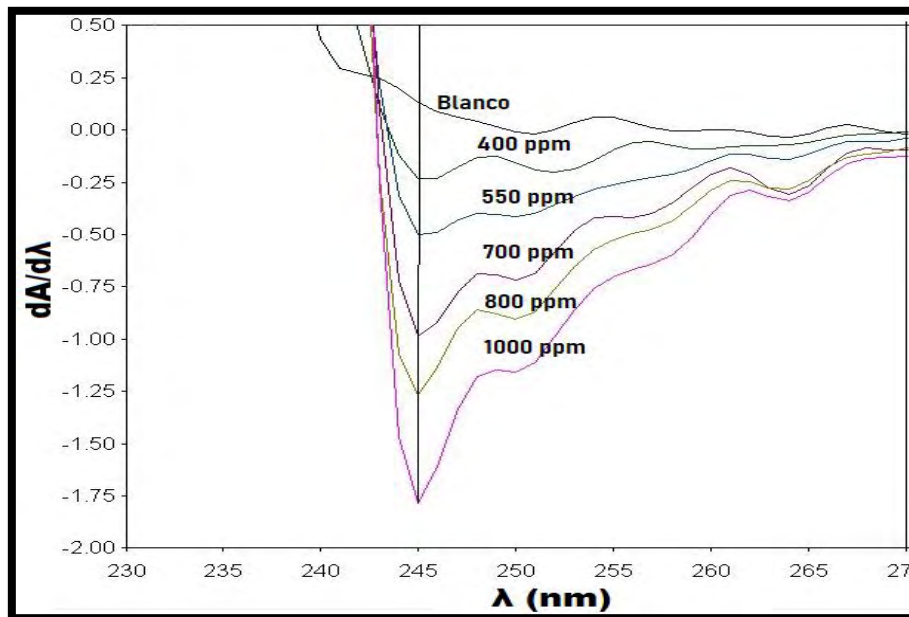


Figura 30. Curva de calibración primera derivada ($D^1 \lambda=245$). Blanco; Solución estándar AZI de 400, 550, 700, 800 y 1000 mg / L.

En la Tabla 18 y figura 31, se resumen los diferentes parámetros cuantitativos de la ecuación de la recta que son proporcionados por el análisis de regresión lineal, como son: la pendiente (m) y su desviación estándar (S_m), el corte en la ordenada (b) y la desviación estándar (S_b). Adicionalmente, se las características de desempeño como límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Tabla 18. Características analíticas de la curva de calibración

Parámetro	Valor
Longitud de onda	245 nm
Pendiente	$2,04 \times 10^{-3}$
Desviación estándar (S_m)	3×10^5
Intercepto	$-5,3 \times 10^{-1}$
Desviación estándar (S_b)	2×10^{-2}
Coefficiente de correlación	0,9993
$LOD_{(real)}$	25,0 mg/L
$LOQ_{(real)}$	75,8 mg/L

Una vez definidas las principales características analíticas del método desarrollado, se consideró apropiado realizar los análisis de cuantificación en muestras farmacéuticas de Azitromicina en presentación de 500 mg. En este sentido, estos resultados sirvieron como base de datos para los estudios de exactitud, como se indica en siguiente sección.

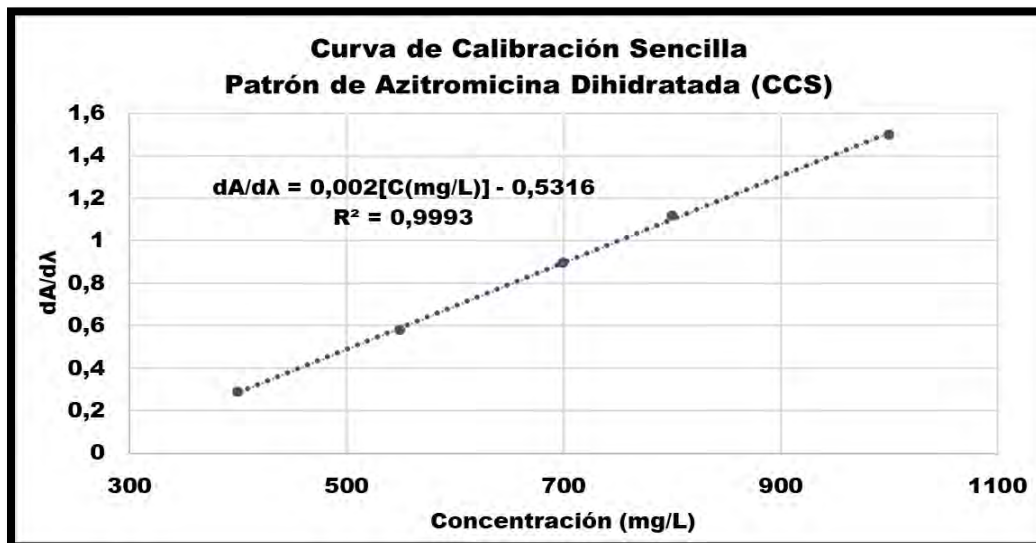


Figura 31. Gráfico de la curva de calibración ($D^1 \lambda=245$).

20.7 Estudios de Exactitud de la Metodología Propuesta

Como último parámetro en la validación del método alternativo para determinar la uniformidad de contenido de Azitromicina, se evaluó la exactitud de la metodología desarrollada a través de dos enfoques. El primero consistió en la evaluación del porcentaje de recuperación con relación a la cantidad declarada del fármaco y, en segundo lugar, se realizó un estudio de comparación de resultados del método analítico propuesto respecto a uno de referencia cuya exactitud ya ha sido establecida.

20.7.1 Análisis de Muestras por la Metodología Alternativa Desarrollada

Después de haber realizado todas las operaciones de optimización y validación de la metodología alternativa, se procedió con el análisis de seis (6) muestras provenientes de distintos establecimientos farmacéuticos del estado Mérida, como se resume en la tabla 19.

Tabla 19. Análisis de muestras de Azitromicina empleando la metodología alternativa desarrollada

N° de Muestra	Cantidad Declarada del Fármaco	Metodología Desarrollada (mg)	%DER
Muestra 1	500 mg	496 ± 16	3,2%
Muestra 2		500 ± 15	3,0%
Muestra 3		470 ± 7	1,5%
Muestra 4		479 ± 18	3,8%
Muestra 5		476 ± 2	0,42%
Muestra 6		482 ± 13	2,7%

En la Tabla 19 se resumen cada uno de los resultados obtenidos para las muestras analizadas, las cuales manifestaron una precisión aceptable (%DER < 5%), infiriendo positivamente sobre este parámetro. Adicionalmente, se encontró que los valores reportados estaban dentro del margen de aceptación recomendado por la farmacopea (USP46 - NF41) para la determinación de Azitromicina en tabletas, siendo este de 450 mg a 550 mg, generando la certeza sobre la exactitud preliminar del método. Sin embargo, para poder asegurar que las mediciones son exactas fue necesario evaluar el porcentaje de recuperación en función de la cantidad declarada del medicamento.

20.7.2 Estudios de Recuperación de la metodología desarrollada

A partir de los resultados obtenidos para la cuantificación de las seis muestras comerciales del estado Mérida, se realizó el estudio de recuperación del contenido de Azitromicina empleando la ecuación 4.

$$\%Recuperación = \frac{Valor\ Obtenido}{Valor\ de\ Referencia} \times 100\%$$

Tabla 20. Estudio de recuperación en muestras de Azitromicina.

N° de Muestra	Valor de Aceptación (USP46-NF41)	%Recuperación
Muestra 1	90 - 110%	99 ± 3
Muestra 2		100 ± 3
Muestra 3		94 ± 1
Muestra 4		95 ± 4
Muestra 5		95,2 ± 0,4
Muestra 6		96 ± 3

Como se puede apreciar, los resultados de la tabla 20 indican que el porcentaje de recuperación para cada una de las muestras analizadas se encuentra dentro del margen de aceptación declarado por la farmacopea USP46 - NF41 (110% - 90%).

Esto quiere decir que los resultados infieren positivamente sobre la exactitud de la metodología alternativa que se desarrolló y su potencial aplicación en la cuantificación del principio activo farmacéutico Azitromicina.

Ahora, queda por efectuar un último ensayo que consiste en la comparación de resultados utilizando una metodología validada y contrastando estadísticamente la veracidad, validez y la aplicabilidad de la metodología alternativa.

20.7.3 Análisis de Muestras por la Metodología de Referencia

En aras de comprobar si la metodología desarrollada presenta resultados verificables y coherentes respecto a los objetivos planteados, se requiere de su validación por medio de otra metodología ya validada. En esta ocasión, se analizaron 6 muestras farmacéuticas expedidas de distintos comercios del estado Mérida, por medio del método desarrollado por Chiluka R. y Raut R., en el año 2022, cuyas características analíticas se resumieron en la sección 9.1 (Método 1) del presente documento.

El procedimiento realizado fue el sugerido por los autores, donde se preparó una solución de 1.000 mg/L de un patrón de Azitromicina en ácido sulfúrico 0,1 M. A partir de esta solución, se elaboró una curva de calibración sencilla de 20, 30, 40, 50 y 60 mg/L, donde se agregó a cada matraz 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (18 M) y se enrasó con agua ultrapura para un volumen final de 5 mL. Adicionalmente, las muestras fueron preparadas pesando, triturando y homogenizando las presentaciones farmacéuticas de Azitromicina, para luego pesar un equivalente de 10 mg del analito por muestra, que fue disuelta en ácido sulfúrico 0,1 M, luego se filtró con papel Whaman 41 y se llevó a un volumen de 10 mL. Una vez realizado este proceso, se agregó una alícuota de 200 µL de muestra en un matraz de 5 mL, así como 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Después, se enrasó con agua ultrapura para un volumen final de 5 mL. Al final, se esperó alrededor de una hora hasta la formación completa del cromóforo de color amarillo.

Posteriormente se realizó la medición en el equipo de absorción molecular UV-Vis, donde se monitorizó el máximo en 480 nm, cuya curva de calibración dio una recta con ecuación $Abs = 0,0182[C(mg/L)] - 0,1002$; con un coeficiente de determinación de $r^2 = 0,9881$. En este sentido, los resultados para el análisis de las muestras farmacéuticas se resumen en la tabla 21.

Como se puede observar en la Tabla 21, los resultados obtenidos se están dentro de un rango aproximado para la unidad declarada de cada una de las muestras (450mg – 550mg). Además, se pudo apreciar que el porcentaje de recuperación estaba dentro de los valores de aceptación demarcados por la farmacopea USP46

- NF41 (110% - 90%), lo que da un indicativo positivo sobre la exactitud de los resultados y su validez.

Tabla 21. Análisis de muestras de comercios farmacéuticos por metodología de referencia

N° de Muestra	Cantidad Declarada del Fármaco	Metodología Alternativa (mg)	%Recuperación
Muestra 1	500 mg	478 ± 9	96 ± 2
Muestra 2		498 ± 7	100 ± 2
Muestra 3		477 ± 24	95 ± 5
Muestra 4		487 ± 16	98 ± 3
Muestra 5		487 ± 23	97 ± 5
Muestra 6		469 ± 7	92 ± 1

De acuerdo con lo mencionado, se tienen los datos necesarios para poder realizar el contraste estadístico entre las dos metodologías alternativas, y así corroborar la exactitud del método desarrollado.

20.7.4 Análisis de Significancia entre el Método Desarrollado y el Método de Referencia

Como siguiente punto en la comparación y validación de resultados, fue necesario realizar el contraste estadístico entre los datos obtenidos por el método desarrollado (tabla 19) y el método de referencia de Chiluka R. y Raut R. (tabla 21). De esta forma, se pudo evaluar la exactitud de la nueva metodología alternativa para determinar el contenido de Azitromicina en tabletas.

Por consiguiente, se realizó un estudio de comparación de medias muestrales entre los dos métodos, donde primeramente se aplicó la prueba F al 95% de confianza, cuyo resultado indicó que no existen diferencias significativas entre las varianzas de las muestras analizadas. En consecuencia, se aplicó el estadístico t al 95% de

confianza para el caso de varianzas homogéneas bajo las condiciones establecidas en la tabla 22.

Tabla 22. Parámetros a evaluar en el estadístico t (Student) en la comparación de método desarrollado respecto al método de referencia.

Estadístico			
Criterio	de Prueba ($\pm t$)	Grados de Libertad	Observación
$s_1^2 = s_2^2$	$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$	$n_1 + n_2 - 2$	$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}}$
Condiciones del Estadístico t			
Hipótesis Nula (H_0)	$\bar{x}_1 = \bar{x}_2$		
Hipótesis Alternativa (H_1)	$\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$		
Nivel de Aceptación ($1-\alpha$)	0,95		

Tabla 23. Resultados del estadístico t para la evaluación entre el método desarrollado y método de referencia.

N° de Muestra	Cantidad Declarada	t _{cal}	t _{crít} (95%)	H ₀
Muestra 1	500 mg	1,78	2,78	Aprobado
Muestra 2		2,15		Aprobado
Muestra 3		0,41		Aprobado
Muestra 4		0,75		Aprobado
Muestra 5		0,65		Aprobado
Muestra 6		2,57		Aprobado

Los resultados obtenidos en la tabla 23 indican que no existen diferencias significativas con un 95 % de confianza entre las medidas realizadas por el nuevo método alternativo respecto al método de referencia sugerido por Chiluka R. y Raut R. en el año 2022, indicando que la metodología desarrollada presenta exactitud. Esto quiere decir, que el método propuesto es válido y aplicable para el análisis cuantitativo de Azitromicina en tabletas de 500 mg.

www.bdigital.ula.ve

21. Conclusiones

- Se ha desarrollado una nueva metodología alternativa para la determinación cuantitativa del fármaco Azitromicina en tabletas de 500 mg, utilizando la técnica de espectroscopia derivativa de absorción molecular en la región UV-Vis.
- El diseño experimental del tipo univariado permitió la optimización de los parámetros indicados, facilitando el análisis de las muestras farmacéuticas de forma exacta y precisa.
- El uso de cloroformo como solvente en la determinación de Azitromicina permite realizar los análisis con la menor interferencia física y química por parte de la matriz de los productos farmacéuticos.
- Con el empleo de la espectroscopia derivativa de absorción molecular UV-Vis, se obtiene una mejora en la sensibilidad y selectividad para el método diseñado, así como en sus características de desempeño.
- Los estudios de correlación con el método de referencia y la metodología desarrollada indican que los resultados obtenidos son confiables para realizar este tipo de análisis.
- Se comprobó la idoneidad del sistema de estudio para la cuantificación de Azitromicina en tabletas de 500 mg, resultando en un método sencillo, rápido, preciso y robusto, por lo que puede ser usado de forma rutinaria para el control de calidad de formulaciones sólidas en la Industria Farmacéutica.

22. Recomendaciones

Se recomienda ampliar los estudios de trazabilidad de la metodología que se ha desarrollado, así como las operaciones de reproducibilidad a través de estudios inter laboratorio, ya que de esta manera puede existir una base de datos más amplia y sólida sobre la precisión y exactitud del método diseñado.

Finalmente, se recomienda continuar con el desarrollo de nuevos métodos que busquen la determinación cuantitativa de los principios activos de los productos farmacéuticos, de forma rápida, económica y sencilla, para que de esta manera se pueda brindar una alternativa metodológica a la industria farmacéutica en aras de la optimización en las operaciones de control de calidad de un medicamento terminado.

www.bdigital.ula.ve

23. Referencias Bibliográficas

1. Hu, B., Guo, H., Zhou, P. y Li Shi, Z. *Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19*, Nature Reviews, 19, págs. 141-154, 2021. DOI: 10.1038/s41579-020-00459-7
2. Cascella, M., Rajnik M., Aleem A., Dulebohn S.C. y Napoli R.D. 2023, Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). *National Library of Medicine*. [En línea] [Citado el: 21 de Mayo de 2023]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>.
3. Organización Mundial de la Salud (OMS). Coronavirus. [En línea] 2023 de Junio de 2021. <https://www.paho.org/es/temas/coronavirus>.
4. Khezri, M. R., Zolbanin, N. M., Ghasemnejad, B. M. y Jafari, J. *Azithromycin: Immunomodulatory and Antiviral Properties for SARS-CoV-2 Infection*. European Journal of Pharmacology, págs. 1-9, 2021. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174191
5. Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, Hong J., Tan, K. S., Wang, D. Y., Yan, Y. *The Origin, Transmission and Clinical Therapies on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak – an update on the status*. Military Medical Research, 7, págs. 1-10, 2020. DOI: 10.1186/s40779-020-00240-0
6. Kenneth J. R. y Ray, G. *Sherris Medical Microbiology : An Introduction to Infectious Diseases*. McGraw-Hill Companies, Inc, 2004.
7. Calvo, J. y Martínez, L. *Mecanismos de Acción de los Antimicrobianos*, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., págs. 44-52, 2009.
8. Farmacopea Argentina. *Farmacopea Argentina 7^{ma} edición*. Buenos Aires, 2003.
9. Bakheit, A. H. H., Al-Hadiya, B. M. H. y Abd-Elgalil, A. A. Chapter One - Azithromycin. [aut. libro] Harry G Brittain. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. New Jersey : Elsevier Inc, págs. 1-40, 2014.
10. Wang, X., Qin, Y., Zhang, T., Tang, W., Ma, B. y Gong, j. *Measurement and Correlation of Solubility of Azithromycin Monohydrate in Five Pure Solvents*, American Chemical Society, págs. 784-791, 2014. DOI: 10.1021/je400899e
11. Robaina, N. F., Paula, C. E., Brum, D. M., de la Guardia, M., Garrigues, S. y Cassellay, R. J. *Novel Approach for the Determination of Azithromycin in Pharmaceutical Formulations by Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Film-Through Transmission Mode*, Microchemical Journal, págs. 301-307, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.04.015>
12. Babić, S., Horvat, A. J. M., Mutavdžić, P. D., Kastelan-Macan, M. *Determination of pKa Values of Active Pharmaceutical Ingredients*, Trends in Analytical Chemistry, págs. 1043-1061, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.004>

13. Parnham, M. J., Haber V. E., Giamarellos, B. E. J., Perletti, G., Verleden, G. M. y Vos, R. *Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications*. *Pharmacology & Therapeutics*, 143, págs. 225-245, 2014. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.03.003
14. Eurolab España y Morillas. *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. Madrid, 2016.
15. Westgard, J. *Validación Básica de Método*. QC Westgard, Inc, 2013.
16. Konieczka, P., y Namiensnik, J. *Quality Assurance and Quality Control in Analytical Chemical Laboratory*. London: CRS Press, 2018.
17. Miller, J., y Miller, J. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Madrid : Pearson Education, 2002.
18. Navidi, W. *Estadística para ingenieros y científicos* : Mc Graw Hill Interamericana, 2006.
19. The United States of Pharmacopea Convention. (905) UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS. [aut. libro] United States of Pharmacopea Convention. *United States Pharmacopea (USP)*. 2023.
20. The United States of Pharmaceutical Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 46- NF 41)*. Rockville, 2023.
21. Chiluka, R., y Raut, R. *Spectrophotometric Determination of Azithromycin Dihydrate in Formulation and its Application to Dissolution Studies*, *IJPQA*, 13(2), 2022.
22. Bhimani, S., Sanghvi, G., Pethani, T., Gaurav D., Airao, V., Sharma, T., Sheth, N. y Vaishnavy, D. *Development of the UV Spectrophotometric Method of Azithromycin in API and Stress Degradation Studies*. *International Letters of Chemistry Physics and Astronomy*, págs. 48-53, 2016. DOI: 10.18052/www.scipress.com/ILCPA.68.48
23. Abdullah, J. H., Tawfeek, A. A. Y., Alkaf, A. G., Al ghorafi, M. A. y Yassin, S. H. *Selective Spectrophotometric Methods for the Determination of Azithromycin in Pharmaceutical Formulation*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, págs. 202-208, 2014.
24. Sharmin, N., Nazia Shanta, N. S., y Bachar, S. C. *Comparison between Spectrophotometry and HPLC. Spectrophotometric Analysis of Azithromycin and its Pharmaceutical Dosage Forms*, *Faculty of Pharmacy, University of Dhaka*, págs. 171-179, 2013. DOI: 10.3329/dujps.v12i2.21981
25. Singh, A. P., Chauhan, I., Bhardwaj S., Gaur, P., Kumar S. S. y Jayendra. *HPLC Method for HPLC Method Development and Validation for Azithromycin in Oral*

Suspension, College of Pharmacy, Muradnagar, págs. 7-12, 2019. DOI: : <https://doi.org/10.31069/japsr.v2i1.2>

26. Nigovic, B. *Absortive Stripping Voltametric Determination of Azithromycin at a Glassy Carbon Electrode Modified by Electrochemical Oxidation*, Analytical Sciences, págs. 369-343, 2004. DOI: 10.2116/analsci.20.639

27. Skoog, D., Holler, J. y Crouch, S. *Principios de Análisis Instrumental*. México : Cengage Learning, 2008.

28. Harris, D. *Química Analítica Cuantitativa*. W. H. Freeman and Company , 2003.

29. Rubinson, K. A., y Rubinson, J. F. *Análisis Instrumental*. Madrid : Pearson Education S.A., 2001.

30. Pavia, Donald L., Lampman, G. M. y Kriz, G. S. *Inroduction to spectroscopy*. washington : Cengage Learning, 2009.

31. Harvey, D. *Modern analytical chemistry*. McGraw-Hill Companies, 2000.

32. Christian, G. D. *Química Analítica*. Mexico. Mc Graw Hil Companies Inc, 2009.

33. Nishi, J. International Collegiate Journal of Science (ICJS). *UV-Vis Spectroscopy: A Step In The Light Direction*. [En línea] 12 de Mayo de 2021. [Citado el: 25 de Julio de 2023.] [https://icjs.us/uv-vis-spectroscopy-a-step-in-the-light-direction/#:~:text=Historical%20Development%20of%20UV%20Spectroscopy&text=The%20first%20UV%2DVis%20devices,devices%20\(Buie%2C%202011\)](https://icjs.us/uv-vis-spectroscopy-a-step-in-the-light-direction/#:~:text=Historical%20Development%20of%20UV%20Spectroscopy&text=The%20first%20UV%2DVis%20devices,devices%20(Buie%2C%202011).).

34. Bosch O., C. y Sanchez R., F. *Process Analytical Chemistry: Applications of Ultraviolet/Visible Spectrometry in Environmental Analysis: An Overview.*, Malaga: Applied Spectroscopy Reviews, 44, págs 245-265, 2009.

35. Govinda, Verma y Manish, Mishra. *Development and Optimization of UV-VIS Spectroscopy a Review*. World journal of pharmaceutical research, págs. 1170-1180, 2018. DOI: DOI: 10.20959/wjpr201811-12333

36. Redasani, V.K., Patel, P.R., Marathe, D.Y., Chaudhari, S.R., Shirkhedkar, A.A., y Surana, S.J. *A Review on Derivative UV-Spectrophotometry Analysis of Drugs in Pharmaceutical Formulations and Biological Samples*, J. Chil. Chem. Soc., 63(3), 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-97072018000304126>