

Universidad de los Andes  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Laboratorio de Espectroscopía Molecular  
Mérida-Venezuela

Trabajo Especial de Grado

**Determinación de la uniformidad de contenido del principio activo  
farmacéutico -Captopril- utilizado para el tratamiento de la hipertensión  
en comprimidos y pastillas por Espectroscopía de Absorción Molecular  
en el UV-Visible**

Br. Mariana Guadalupe Salcedo Romero

Tutor: Dr. Carlos Ayala

Mérida, 2024

## Índice de Contenido

Introducción .....	8
Marco Teórico.....	10
Control de Calidad Farmacéutico .....	10
i.    Pesaje y Dosificación de Sustancias.....	10
ii.   Procesamiento.....	11
iii.  Envasado Final.....	11
iv.  Traslado del Producto.....	11
Farmacopeas .....	11
Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).....	12
Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” .....	12
Falsificación de productos farmacéuticos .....	12
Determinación de uniformidad de contenido.....	13
Clasificación de productos farmacéuticos.....	14
i.    Por su acción farmacológica .....	14
ii.   Por su vía de administración .....	14
iii.  Sistema de Clasificación ATC .....	14
Hipertensión.....	15
Antihipertensivos .....	16
Clasificación de antihipertensivos.....	16
Captopril.....	18
Farmacocinética .....	19
Farmacodinámica .....	19
Indicaciones y aplicaciones .....	19
Métodos para determinar Captopril .....	20
Técnicas Espectroscópicas.....	24
Radiación Electromagnética.....	24
Espectro Electromagnético .....	25
Absorbancia y Transmitancia.....	27
Ley de Beer-Lambert .....	28
Absorción en el Ultravioleta Visible (UV-Vis).....	29
i.    Transiciones electrónicas $\pi$ , $\sigma$ y $n$ .....	30
ii.   Transiciones electrónicas $d$ y $f$ .....	31
iii.  Transiciones electrónicas por transferencia de carga. ....	31
Técnica de Espectroscopía de Absorción Molecular en la región UV-Visible .....	31

Instrumentación para la técnica de Espectroscopía de Absorción Molecular en la región UV-Visible .....	32
i. Fuentes .....	33
ii. Selector.....	34
iii. Recipientes para las muestras.....	35
iv. Detectores .....	36
v. Procesador de señal y lectura .....	38
Tipos de instrumentos en la Espectroscopía UV-Vis. ....	38
Aplicaciones Cuantitativas y Cualitativas de la Espectroscopía de Absorción Ultravioleta Visible .....	39
Planteamiento del problema.....	41
Hipótesis.....	41
Objetivo General .....	42
Objetivos Específicos.....	42
Metodología de trabajo.....	42
Locación.....	42
Tipo de estudio.....	42
Muestras.....	42
Materiales y reactivos .....	42
Procedimiento Experimental.....	43
Preparación de la muestra .....	44
Resultados y discusiones .....	45
i. Caracterización Espectral .....	46
ii. Factibilidad de la metodología propuesta.....	47
iii. Selección de Criterio de Medida.....	48
Optimización de los Parámetros Experimentales.....	51
i. Sonicación .....	52
ii. Velocidad de Barrido .....	53
iii. Resolución .....	55
iv. Ciclos .....	56
Resumen de las condiciones experimentales.....	57
Validación del Método Propuesto .....	57
i. Límites de detección y cuantificación .....	58
ii. Linealidad del método.....	58
iii. Precisión .....	60
iv. Estabilidad .....	61

v. Análisis de Interferencias por parte de la matriz .....	61
vi. Exactitud.....	64
Conclusiones .....	70
Recomendaciones .....	71
Referencias Bibliográficas.....	72

### Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de la Hipertensión basada en mediciones de presión arterial (PA). .....	15
Tabla 2. Análisis para la determinación de Captopril .....	20
Tabla 3. Análisis para la determinación de Captopril con detección UV - Vis .....	21
Tabla 4. Selectores de longitudes de onda.....	35
Tabla 5. Materiales utilizados .....	42
Tabla 6. Reactivos utilizados.....	43
Tabla 7. Equipos utilizados .....	43
Tabla 8. Pruebas de solubilidad.....	45
Tabla 9. Análisis y comparación de la altura de pico y área en la cuantificación. ....	50
Tabla 10. Datos de optimización tiempos de sonicación.....	52
Tabla 11. Datos de optimización tiempos de sonicación.....	54
Tabla 12. Datos de optimización del ancho de banda .....	56
Tabla 13. Datos de optimización de ciclos por medida .....	57
Tabla 14. Resumen de las condiciones experimentales .....	57
Tabla 15. Evaluación linealidad del método .....	59
Tabla 16. Figuras de mérito de la metodología .....	59
Tabla 17. Estudios de precisión para la metodología propuesta.....	60
Tabla 18. Parámetros analíticos de las curvas de calibración de adición estándar .....	63
Tabla 19. Comparación entre varianzas de las pendientes (Prueba F).....	63
Tabla 20. Resultados para la prueba t para la comparación entre curvas.....	64
(estadístico t).....	64
Tabla 21. Análisis de muestras de Captopril empleando la metodología alternativa .....	65
Tabla 22. Estudio de recuperación en muestras de Captopril.....	65
Tabla 23. Análisis de muestras por metodología de referencia .....	66
Tabla 24. Comparación entre varianzas de las muestras (Prueba F) .....	67
Tabla 25. Resultados para la prueba t para la comparación entre muestras .....	68
(estadístico t).....	68

## Índice de Figuras

Tabla 1. Clasificación de la Hipertensión basada en mediciones de presión arterial (PA). .....	15
Tabla 2. Análisis para la determinación de Captopril .....	20
Tabla 3. Análisis para la determinación de Captopril con detección UV - Vis .....	21
Tabla 4. Selectores de longitudes de onda.....	35
Tabla 5. Materiales utilizados .....	42
Tabla 6. Reactivos utilizados.....	43
Tabla 7. Equipos utilizados .....	43
Tabla 8. Pruebas de solubilidad.....	45
Tabla 9. Análisis y comparación de la altura de pico y área en la cuantificación. ....	50
Tabla 10. Datos de optimización tiempos de sonicación.....	52
Tabla 11. Datos de optimización tiempos de sonicación.....	54
Tabla 12. Datos de optimización del ancho de banda.....	56
Tabla 13. Datos de optimización de ciclos por medida .....	57
Tabla 14. Resumen de las condiciones experimentales .....	57
Tabla 15. Evaluación linealidad del método .....	59
Tabla 16. Figuras de mérito de la metodología .....	59
Tabla 17. Estudios de precisión para la metodología propuesta.....	60
Tabla 18. Parámetros analíticos de las curvas de calibración de adición estándar .....	63
Tabla 19. Comparación entre varianzas de las pendientes (Prueba F).....	63
Tabla 20. Resultados para la prueba t para la comparación entre curvas.....	64
(estadístico t).....	64

## Resumen

Los sistemas de gestión de control de calidad en la industria farmacéutica son de gran importancia, ya que permite el monitoreo de todo lo que abarca el proceso de fabricación de estos. El estudio conocido como la determinación de la uniformidad de contenido es vital en dicho proceso, debido que se encarga de estipular la variabilidad de la cantidad de principio activo en un determinado lote verificando la eficacia de los medicamentos que llegan al mercado y con ello a los consumidores. Actualmente se requieren de diferentes metodologías alternativas que faciliten este control de calidad.

Por lo que en este trabajo especial de grado se presenta el desarrollo y validación de una metodología rápida, sencilla, eficaz y de bajo costo para la determinación de uniformidad de contenido en el antihipertensivo captopril en comprimidos y pastillas, siendo este uno de los de consumo moderado en Venezuela, por medio de la técnica espectroscópica de absorción molecular en el UV-Vis.

La metodología requiere la medición de la absorbancia del captopril disuelto en diclorometano a una longitud de onda de 231 nm, correspondiente a la transición electrónica de los carbonilos conjugados que presenta la molécula, provenientes de un ácido carboxílico y otro cetónico. Las muestras fueron sometidas a una extracción sólido-líquido ( $H_2O / 25^{\circ}C$ ), con un tiempo de sonicación de 20 min. Se realizó la optimización con un diseño univariado y para la validación se utilizó el método de la USP. Encontrando que las muestras analizadas estaban en el intervalo permitido por la Farmacopea con un 95% de confianza. También se realizaron los estudios de recuperación que se encontraron dentro del intervalo expresado en la farmacopea USP - NF ( $\pm 10\%$ ). Finalmente se realizó un análisis de comparación entre lotes y de correlación reforzando de esta manera la exactitud de la metodología alternativa.

## Introducción

La industria farmacéutica, en su proceso de globalización, ha experimentado un desarrollo y evolución constantes, convirtiéndose en un pilar fundamental en la vida de millones de personas. Su expansión se debe al uso y consumo global de productos diseñados para combatir diversas enfermedades y mejorar la calidad de vida. Este crecimiento no solo busca beneficios económicos, sino que también se compromete con la mejora de la salud pública, lo que implica una regulación estricta por parte de entidades nacionales e internacionales que buscan proteger a los consumidores y garantizar la seguridad de los medicamentos.

La fabricación y distribución de fármacos debe adherirse rigurosamente a las normativas legales y asegurar la implementación de sistemas de gestión de calidad confiables. Esto es crucial, ya que cualquier desviación puede tener un impacto directo y significativo en la salud pública. Dentro de estos sistemas, la uniformidad de contenido es un aspecto crítico, ya que asegura la correcta presencia y dosificación del principio activo farmacéutico (API), elemento esencial para la eficacia del medicamento.

La eficacia de los medicamentos en Venezuela se ha convertido en un objeto de estudio debido a la crisis que ha afectado fuertemente a la administración pública; como consecuencia la disponibilidad de fármacos e insumos médicos es sustentada tanto por empresas nacionales como internacionales que no siempre cumplen con los registros sanitarios debidos contribuyendo a un mercado ilegal, en donde estos productos no solo entran de manera irregular al país sino que muchas veces se desconoce su lugar de procedencia y por ende, su respectiva calidad. En este descontrol, según reportes a finales del año 2023 del Ministerio Público, se han encontrado medicamentos falsificados que afectan de manera directa y negativa a las condiciones y trastornos de salud de los ciudadanos.

Actualmente, existen ciertos trastornos de salud que afectan a millones de personas alrededor del mundo manteniéndose como principales causas de muerte año tras año, estas enfermedades son las cardiovasculares y respiratorias, el cáncer y la diabetes. Por lo que la calidad de estos medicamentos que componen su tratamiento es de suma importancia. Específicamente, en Venezuela las enfermedades cardiovasculares también se encuentran entre las primeras causas de mortalidad, por lo tanto, el estudio de los medicamentos que combaten esta enfermedad se ha convertido en una necesidad; Estudiar los estándares de calidad de los antihipertensivos es fundamental para abordar este problema de salud pública.

Los antihipertensivos, aunque se componen de diversos principios activos y mecanismos de acción, comparten el objetivo común, el de reducir la presión arterial. En el país, el Captopril es uno de los más utilizados en los centros de salud y comercializados para el tratamiento clínico para la hipertensión.

Dada la relevancia del Captopril en Venezuela, es imperativo profundizar en los métodos de identificación y cuantificación de este principio activo para su común e ideal análisis ya que estos deben alinearse con los estándares vigentes implementados por las farmacopeas, que generalmente recomiendan la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Además de estas, también se han reportado métodos alternativos para su identificación y cuantificación.

Considerando lo anteriormente expuesto, se propone y es de interés la creación, desarrollo y evaluación de un método cuantitativo que sea rápido, eficaz y de bajo costo para determinar la uniformidad de contenido en productos farmacéuticos que contengan al Captopril como principio activo, de forma de emplearlo en el sistema de controles de calidad, permitiendo su correcta elaboración y comercialización con el más alto nivel de confianza.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Marco Teórico

### Control de Calidad Farmacéutico

El control de calidad es un conjunto de procesos y acciones que se aplican para asegurar que los productos y servicios se apeguen a los estándares de calidad establecidos para ser reconocidos en su respectiva industria.

En la industria farmacéutica, el control de calidad busca asegurar que los medicamentos sean seguros y efectivos, y que se alcance el objetivo terapéutico para el que fueron desarrollados. Mediante la aplicación de controles, que permiten evaluar que cada producto cumpla con los estándares impuestos evitando contaminaciones y dosificaciones incorrectas, asegurando la protección de la salud pública. Estos controles buscan implementar regulaciones nacionales e internacionales que contribuyen a mejorar eficientemente la operatividad de la producción, y así evitar sanciones, retiradas o devoluciones de productos que generan a las empresas grandes pérdidas de tiempo y dinero.

Los productos farmacéuticos antes de llegar al mercado y al consumidor, son sometidos a un riguroso proceso de control de calidad para asegurar su eficacia. El proceso comienza con la selección y estricta valoración de la materia prima, garantizando la calidad de cada componente involucrado en la estructura final del producto comercial. A lo largo de todo el proceso, desde la elección de la materia prima hasta el traslado, se realiza un monitoreo para evitar desviaciones o contaminaciones, constatando que el proceso completo cumple con los estándares impuestos, este seguimiento es conocido como trazabilidad <sup>(1)</sup>.

Posteriormente, la materia prima es sometida a un proceso de cuatro etapas generales, que la transforman en el producto farmacéutico final que será comercializado. Cada etapa debe ser ejecutada meticulosamente, cuidando cada detalle para asegurar la efectividad y seguridad de los medicamentos <sup>(2)</sup>.

#### i. Pesaje y Dosificación de Sustancias

Este proceso se realiza en cuartos conocidos como zonas de pesaje, en donde los controles de higiene deben ser severos y las medidas deben ser lo más precisas posibles para mantener la calidad de cada componente o ingrediente de la formulación del medicamento final.

El pesaje y la dosificación de cada sustancia debe realizarse de manera meticulosa garantizando la seguridad, exactitud y precisión en cada proporción del producto final. Realizar este proceso de manera correcta permite maximizar la eficiencia de los recursos y disminuir gastos. Además, la dosificación individual es esencial para aquellos pacientes

polimedicados con diversos tratamientos ya que facilita el seguimiento terapéutico y potencia los sistemas gestionados por las farmacias.

## **ii. Procesamiento**

Estas salas son higienizadas para evitar mínimas contaminaciones por parte de partículas presentes en el aire. Consiste en procesar cada ingrediente ya medido y dosificado correctamente, varía dependiendo del producto que se esté elaborando. Se requiere que el equipamiento que se utiliza sea fácil de limpiar y es fundamental que los operadores posean buena pericia para una cuidadosa manipulación y así evitar contaminaciones.

Para los productos que se combinan de forma homogénea se debe asegurar una distribución uniforme de los ingredientes activos, los que necesitan de compresión y buena solubilidad se granulan, los que se destinan a ser tabletas o cápsulas requieren de moldura y algunos otros pueden necesitar procesos adicionales como el recubrimiento o la encapsulación.

## **iii. Envasado Final**

Este es primordial para la preservación del producto finalizado. Debe realizarse de manera segura para proteger el producto de factores como luz, humedad, temperaturas o algún otro que lo pueda alterar, modificar o contaminar.

## **iv. Traslado del Producto**

Una vez listo el producto para ser destinado a su comercialización, se traslada desde la planta de fabricación hasta el punto de distribución o venta. Este proceso debe realizarse garantizando que llegue en óptimas condiciones al consumidor.

Las pruebas a las que es sometido el producto finalizado son pruebas específicas para evaluar la identidad, pureza, potencia y estabilidad del medicamento, además se realizan pruebas para estudiar su comportamiento a lo largo del tiempo, con variaciones de temperatura o humedad. Este estudio integral asegura que el producto cumpla los estándares de calidad y seguridad antes de llegar al consumidor <sup>(1)</sup>.

El control de calidad farmacéutico también se extiende al cumplimiento de legislaciones, normas y organizaciones que trabajan de manera integrada para establecer un marco de referencia que asegure los más altos estándares de calidad y seguridad en los laboratorios y procesos de producción y análisis de productos farmacéuticos requeridos por los entes gubernamentales y la industria a nivel internacional, como las descritas a continuación.

## **Farmacopeas**

La farmacopea es un conjunto de normas y estándares que regulan la calidad de los medicamentos y productos farmacéuticos. Se encarga de establecer los criterios para la elaboración y comercialización de los medicamentos, así como de estandarizar los

procesos de fabricación, análisis y almacenamiento de los mismos. La farmacopea también incluye información sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de las sustancias utilizadas en la fabricación de medicamentos <sup>(3)</sup>.

Las farmacopeas más comunes a seguir son la de los Estados Unidos (USP), la europea (Ph. Eur) y la británica (BP). Sin embargo, cada nación posee una recopilación de estándares y métodos, en caso de no contar con ella se apegan a algunas de las tres mencionadas inicialmente.

### **Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)**

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) son un conjunto de normas y estándares establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que se aplican en los laboratorios de investigación y desarrollo para garantizar la calidad y seguridad de los productos elaborados en diversos campos científicos como la química, biología, farmacología y ciencias ambientales. Estas guías se aplican a cualquier laboratorio de control de calidad donde se trabaje con sustancias químicas o medicamentos, ya sea nacional, comercial o no gubernamental.

Para cumplir con las BPL, los laboratorios deben tener personal capacitado, infraestructura adecuada, equipos y materiales calibrados, y seguir procedimientos que promuevan la integridad científica <sup>(4)</sup>.

### **Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”**

Es el organismo técnico del Ministerio del Poder Popular para la Salud en Venezuela, encargado de la evaluación integral de los medicamentos introducidos para el trámite de Registro Sanitario, también realiza diagnósticos de enfermedades transmisibles, produce bienes y da servicios de calidad para satisfacer las demandas nacionales de agentes inmunizantes y de diagnóstico de enfermedades infecciosas y capacita al recurso humano necesario para la prestación de servicios en las áreas de su competencia <sup>(5)</sup>.

En el año 2023, este instituto emitió seis alertas sobre medicamentos presuntamente falsificados. Por lo tanto, el Instituto Nacional de Higiene posee la crucial responsabilidad de la detección y alerta de la falsificación de medicamentos en Venezuela, contribuyendo a la seguridad y buena salud de la población.

A pesar de la presencia y operatividad de este instituto en el país, las regulaciones y controles que supervisan y aseguran los medicamentos funcionan de manera irregular, debido a la crisis humanitaria que padece el país y que afecta fuertemente al área de la salud pública desde el año 2015.

### **Falsificación de productos farmacéuticos**

La crítica situación en la que se vio afectada la administración sanitaria hace algunos años, dejó consecuencias graves. La escasez y los altos costos de los medicamentos provocaron un aumento en el comercio ilegal de medicamentos y suministros médicos, que se ha vuelto cada vez más extenso e incontrolable, perjudicando a millones de ciudadanos.

El consumo farmacéutico de producción nacional para el año 2020 cubría solo el 80 % y el otro 20% era importado. La tendencia actual apunta a que crezca más la importación que la producción nacional, debido a que se está promoviendo por parte del Estado la importación para combatir el desabastecimiento <sup>(6)</sup>.

Los productos farmacéuticos e insumos médicos no solo están siendo introducidos al país con controles sanitarios ilícitos, sino que no siempre se conoce su lugar de procedencia, elaboración y composición química, aun así, el ciudadano común no tiene más opción que hacer uso de estos.

Debido a toda esta incertidumbre que se vive en el país, es pertinente conocer con más detalle la importancia de la dosificación en los productos farmacéuticos y su estudio, dado que está estrechamente vinculada con la uniformidad de contenido, ya que este parámetro se refiere a la consistencia en la cantidad de principios activos por unidad entre diferentes lotes de un mismo medicamento. Por tanto, el estudio de la dosificación y la uniformidad de contenido son aspectos fundamentales en la investigación y desarrollo de productos farmacéuticos.

#### **Determinación de uniformidad de contenido**

Es un análisis vital para garantizar la calidad y eficacia de los productos farmacéuticos. Este método cuantitativo verifica la variabilidad de la cantidad de principio activo que presenta un determinado lote de un medicamento, en cualquiera que sea la forma que se oferta al público <sup>(7)</sup>.

Su objetivo es asegurar que la dosificación de cada principio activo varíe entre los límites establecidos por las normas y legislaciones vigentes, optimizando las formulaciones y garantizando la estabilidad del producto final <sup>(8)</sup>. La determinación de la uniformidad de contenido se realiza a través del estudio y análisis de grado analítico; dependiendo de la técnica empleada, se puede lograr la identificación de impurezas o contaminantes que afecten el trabajo realizado.

La homogeneidad de los medicamentos es un parámetro que puede afectar como el cuerpo del paciente absorbe, distribuye, metaboliza y excreta un medicamento, este proceso es conocido como caracterización farmacocinética. Por otro lado, también afecta al proceso en que el medicamento interactúa con los receptores del organismo ejerciendo el efecto terapéutico, conocido como caracterización farmacodinámica por lo que es esencial para llegar a conclusiones significativas y relevantes de la eficacia clínica del producto <sup>(9)</sup>.

Cuando los medicamentos presentan una excelente uniformidad en su contenido, significa que todos los medicamentos del mismo tipo pueden compararse entre sí en términos de calidad, efectividad y seguridad. Esto es muy importante para los medicamentos genéricos, ya que deben ser prácticamente iguales al medicamento original para ser considerados equivalentes.

Por lo que conocer cómo se clasifican los productos farmacéuticos es considerado necesario para cualquier estudio de uniformidad de contenido.

### **Clasificación de productos farmacéuticos**

Clasificar los medicamentos es crucial tanto en el campo de la atención médica y la farmacología como en el ámbito de sus respectivos análisis de control de calidad, permite obtener una visión clara de cómo se administran en los entornos farmacéuticos. Además, conocer esta clasificación facilita su uso de manera segura y es un recurso útil para el desarrollo y fabricación de nuevos medicamentos.

Los productos farmacéuticos pueden clasificarse según una gran cantidad de criterios, por lo que, dentro de los principales tipos de clasificación se pueden resaltar los siguientes <sup>(10, 11, 12)</sup>:

#### **i. Por su acción farmacológica**

En el primer tipo de clasificación, los medicamentos son clasificados según el objetivo que tenga su acción farmacológica, por lo que, sus nombres vienen según los órganos o sistemas del cuerpo sobre los que actúan. Dentro de esta clasificación se pueden resaltar los agentes antiinflamatorios, cardiovasculares, antidepresivos, antivirales, anticonvulsivos, anticoagulantes, antihipertensivos, antimicóticos, entre otros.

#### **ii. Por su vía de administración**

Esta depende de los resultados de los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos, de forma que según sea el caso, existen vías de administración, algunas más eficientes que otras, para lograr alcanzar una absorción adecuada del principio activo, que el mismo cumpla su función y luego sea metabolizado o expulsado adecuadamente. En este sentido, dentro de la clasificación se destacan los medicamentos orales, tópicos, óticos, intravenosos, intramusculares, intradérmicos, rectales, vaginales, entre otros.

#### **iii. Sistema de Clasificación ATC**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) creó el llamado Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química (ATC) para clasificar las sustancias farmacéuticas y medicamentos y emplear este sistema a nivel mundial para una identificación inequívoca. Este sistema organiza los fármacos en grupos terapéuticos según su uso, el sistema u órgano sobre el que actúan, sus indicaciones terapéuticas y su estructura química, de forma que cada producto farmacéutico tiene un código alfanumérico único.

La forma en que el código es generado es la unión de diferentes subclasificaciones. En primer lugar, se presenta el grupo anatómico principal, siendo una indicación del órgano o sistema del cuerpo humano en que actúa el fármaco, un ejemplo, es el sistema cardiovascular. Luego, se presenta el subgrupo terapéutico donde indicado por dos cifras, se indica el tipo de tratamiento, como puede ser un antibacteriano. A continuación, se indica el subgrupo farmacológico con una letra del alfabeto, donde se especifica la clase de fármaco como son los derivados benzodiazepínicos. Una letra, también es la indicación del subgrupo químico donde se hace referencia al tipo de estructura química de la sustancia, como lo son las penicilinas. Por último, se atribuye un carácter al principio activo completando el código ATC. Por ejemplo, el Captopril, antihipertensivo perteneciente al grupo de los IECA tiene el código C09AA01.

En el grupo por acción farmacológica se encuentran los antihipertensivos, como su nombre lo indica son los medicamentos utilizados para reducir los niveles de presión arterial, es decir, los aplicados para tratamientos de la hipertensión. Estos son el objeto de estudio de este trabajo, razón por la cual se abordarán de manera breve y concisa.

### Hipertensión

La presión arterial alta (PA) es una enfermedad cardiovascular, en donde los niveles de presión arterial, es decir, la presión que ejerce el corazón sobre las arterias presenta niveles altos de manera constante y continua. Es considerada el factor de riesgo más importante de muerte a nivel mundial, es una de las enfermedades cardiovasculares más comunes y con menos síntomas reconocibles <sup>(13)</sup>. Esta es la afección más frecuente en adultos mayores de 60 años, afectando a uno de cada cuatro hombres y una de cada cinco mujeres, es decir, más de 1000 millones de personas <sup>(14)</sup>. Generalmente se define como un aumento sostenido de la presión arterial (PA), puede ser sistólica (PAS), que es la presión resultante de los ventrículos cuando bombean sangre fuera del corazón mayor, o la presión arterial diastólica (PAD), que es la presión entre latidos cuando el corazón se está llenando de sangre. En la tabla 1, se observa la clasificación de la PA que se aplica en los distintos centros médicos a toda persona mayor de 18 años <sup>(15)</sup>.

<b>Tabla 1. Clasificación de la Hipertensión basada en mediciones de presión arterial (PA).</b>		
<b>Categoría</b>	<b>Sistólica (mmHg)</b>	<b>Diastólica (mmHg)</b>
PA Normal	120	<80
PA Elevada	120 – 129	<80
Hipertensión Grado 1	130 – 139	80 – 89
Hipertensión Grado 2	≥ 140	≥ 90

Existen medidas preventivas eficaces para evitar el padecimiento de hipertensión arterial, ya que al aumentar la edad la tasa de personas con esta afección aumenta, como la implementación de cambios en los hábitos alimenticios o en el ejercicio físico. Sin con estas variaciones no se observan mejoras, será necesario acudir a los tratamientos farmacológicos impuestos por los expertos de la salud, ya que cada paciente requiere de un procedimiento específico dependiendo de los síntomas y características que presente. La mayoría de estos tienen una alta probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares o enfermedades como insuficiencia renal, enfermedades del corazón y derrames cerebrales, todos inducidos por la hipertensión <sup>(14)</sup>.

### **Antihipertensivos**

Como ya se había hecho mención, los medicamentos utilizados para disminuir los altos niveles de presión arterial, mejor conocido como hipertensión son los antihipertensivos. Estos controlan y monitorean la presión arterial disminuyendo el riesgo accidentes cardiovasculares en pacientes que padecen de hipertensión <sup>(15)</sup>.

El tratamiento con medicamentos antihipertensivos se comienza considerando el grado de hipertensión que el paciente padezca, comenzando con uno o dos fármacos de acción prolongada administrado en una única dosis diaria. Para el grado 1 se inicia recetando un fármaco y para el grado 2 se indican dos fármacos de manera simultánea. Para ambos casos la finalidad es establecer una cifra de presión arterial ideal controlable con medicamentos farmacológicos <sup>(16)</sup>.

Actúan sobre mecanismos fisiopatológicos del sistema nervioso y cardiocirculatorio, influyendo en la función renal y el equilibrio hidroeléctrico. Además, existen algunos que ejercen su efecto a través de la actividad enzimática <sup>(17)</sup>. Por lo que, al seleccionar un tratamiento, se deben considerar los factores de riesgo cardiovascular y las enfermedades asociadas a la hipertensión, como la diabetes mellitus, la insuficiencia renal, la enfermedad coronaria y los eventos cerebrovasculares <sup>(18)</sup>. Incluso factores como la edad del paciente y la tolerancia a los medicamentos son importantes a la hora de tomar esta decisión.

### **Clasificación de antihipertensivos**

Los antihipertensivos se pueden clasificar según su mecanismo de acción. Comenzando con los diuréticos, que eliminan el exceso de agua del cuerpo y reducen la presión arterial, como la hidroclorotiazida y la clortalidona. Los antagonistas de calcio que reducen el nivel de este que ingresa a las paredes de los vasos sanguíneos, como el amlodipino y el felodipino. También hay un grupo que bloquea a los receptores de la angiotensina II, quien tiene efectos vasoconstrictores como el losartan y telmisartán. Y, por último, se encuentran los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) quienes reducen la producción de la enzima encargada de producir angiotensina

II, previniendo el daño de órganos como los riñones, los más utilizados de esta categoría son el captopril, enalapril y el lisinopril <sup>(18)</sup>.

También, se encuentra un grupo secundario de antihipertensivos que se aplican si los del grupo anterior no surten efecto y está compuesto por los betabloqueadores quienes hacen que el corazón lata con menos intensidad y más lentamente. Los bloqueadores alfa, que surten efecto sobre el sistema nervioso central enviando la señal de relajar los vasos sanguíneos, los vasodilatadores quienes relajan los músculos de los vasos sanguíneos y finalmente se encuentra un grupo desarrollado recientemente, quienes inhiben la producción de renina, sustancia precursora de angiotensina <sup>(16)</sup>.

El antihipertensivo en estudio de este trabajo pertenece al grupo de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), razón por la cual se profundizará un poco sobre cómo actúan estos en el organismo.

Los efectos beneficiosos de los IECA en la hipertensión son evidentes. Actúan sobre el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), un mecanismo principalmente hormonal. Como se observa en la figura 1, este sistema es quien se encarga de la formación de la angiotensinógeno, quien es segregado por el hígado luego consta de dos principales etapas. La primera es la transformación del angiotensinógeno en angiotensina I, producto de la canalización con renina, sustancia que segrega el riñón y la envía al torrente sanguíneo al percibir una disminución de presión arterial. La angiotensina I es un deca péptido que por sí solo no tiene ningún efecto en la presión arterial, pero en la segunda etapa se transforma a angiotensina II, mediante la reacción con la enzima peptidildipeptidasa que se encuentra en los pulmones, específicamente en los neumocitos. La angiotensina II es un octa péptido con efectos en el sistema vascular produciendo vasoconstricción, en el sistema renal promoviendo la producción de aldosterona quien retiene agua y sodio aumentando el volumen de la sangre y a nivel cardíaco produciendo las contracciones cardíacas <sup>(19)</sup>.

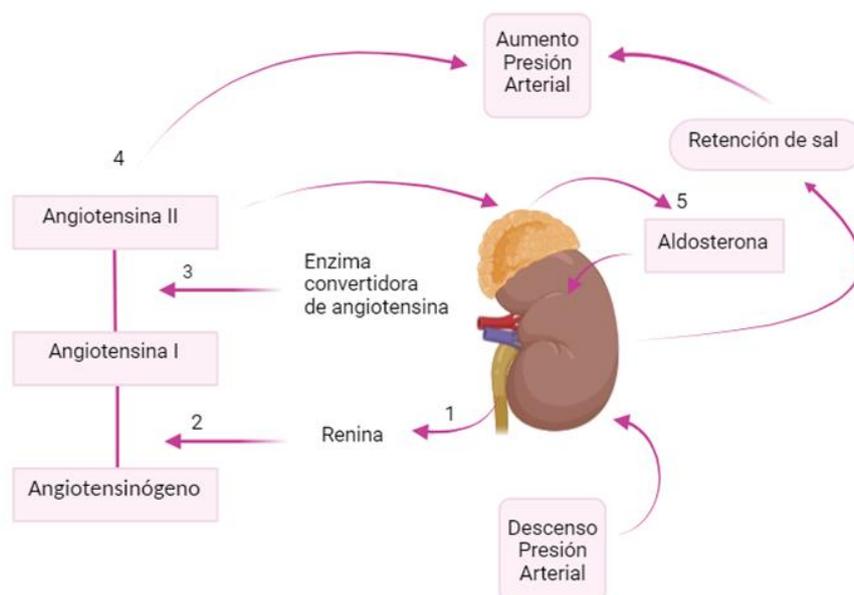


Figura 1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Los IECA con suficiente potencia y especificidad se obtuvieron del veneno procedente de una víbora de origen brasileño, este solo era efectivo por vía intravenosa. Con el tiempo se fueron desarrollando nuevas estructuras de las cuales surgió el primer representante del grupo: Captopril <sup>(19)</sup>. El antihipertensivo objeto de estudio en este trabajo.

### Captopril

El captopril (CAP) es un vasodilatador (con estructura peptídica) utilizado en el tratamiento de la hipertensión y la insuficiencia cardiaca congestiva. Fue desarrollado en 1977 y su comercialización inicialmente era restringida, su vía de administración era exclusivamente parenteral, es decir, por medio de inyecciones <sup>(19)</sup>. Actualmente es uno de los IECA más utilizados alrededor del mundo.

Su fórmula molecular  $C_9H_{15}NO_3S$  y nombre sistemático 1-(2S)-3-mercapto-2-metilpropionil-L-prolina. Dentro de su estructura presenta un radical sulfhidrilo quien es quien se une a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) <sup>(20)</sup>.

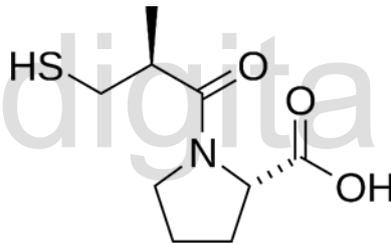


Figura 2. Estructura molecular captopril

Físicamente es un polvo blanco casi cristalino, con punto de fusión (105-108) °C y peso molecular de 217,29 g/mol con un ligero olor a azufre. Es fácilmente soluble en solventes polares como el agua (160 mg/mL), alcoholes como metanol, etanol, isopropanol, y en solventes orgánicos clorados como cloroformo y diclorometano; Es parcialmente soluble en acetato de etilo, 1mg/mL en aceites de sésamo y maíz y 20 mg/mL en aceites como el gliceriltriacetato. También se disuelve en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos <sup>(22)</sup>.

Este antihipertensivo ha demostrado presentar una buena estabilidad en estado sólido incluso a temperaturas altas cercanas a los 50 °C y valores de pH entre (1 - 2). Sin embargo, como materia prima debe protegerse de manera hermética para evitar que factores como la luz, humedad y temperatura promuevan la degradación del grupo sulfhidrilo, oxidándolo en donde se produce su principal impureza el disulfuro de captopriló 1,1'-[Ditiobis [(2S)-2-metil-1-oxo-3,1-propanodiol]]bis-L-prolina. Esta tendencia también se ha detectado en soluciones con pH básico y ácidos a partir de 3,5, como en mezclas con excipientes higroscópicos <sup>(23)</sup>. Algunas de sus otras impurezas por

la degradación son L-prolina, ácido-3-mercapto-2-metilpropanoico y ácido-3-acetiltio-2-metilpropanoico<sup>(21)</sup>.

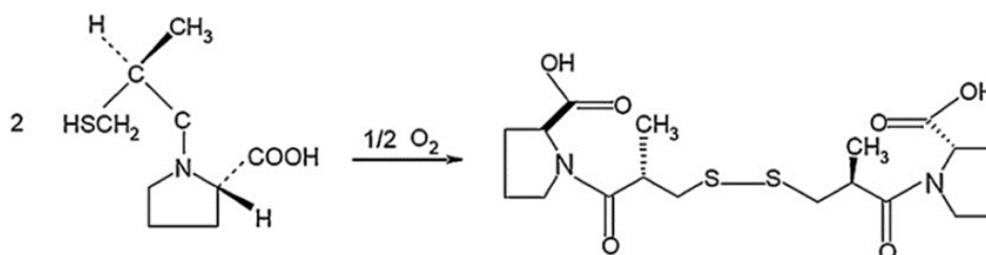


Figura 3. Reacción de degradación de captopril produciendo disulfuro de captopril <sup>(21)</sup>.

Asimismo, en ensayos para estudiar su comportamiento al ser expuesto a la luz no se han encontrado cambios en cuanto a color, olor, apariencia, rotación óptica o seguridad.

### Farmacocinética

El inicio de acción, es decir, el tiempo que tarda un fármaco en producir su efecto terapéutico después de su administración comienza a los (15 – 60) min, las absorciones gástricas máximas alrededor de 1,2 horas y su metabolización, que es el proceso por el cual el cuerpo altera químicamente el fármaco ocurre en el hígado a las 2 horas, pero sus efectos pueden durar entre 6 a 12 horas.

El radical sulfhidrido se une a los grupos sulfhidrido de las proteínas de los alimentos, como consecuencia disminuye el porcentaje de biodisponibilidad desde un (60 – 70) % hasta (30 - 40) % por lo que se recomienda ingerirse una hora antes de la ingesta. Lo mismo sucede cuando reacciona con antiácidos.

Su vía de eliminación es por medio de la orina en donde un poco más del 95% se expulsa en forma de captopril y el resto en forma de metabolitos <sup>(22)</sup>.

### Farmacodinámica

Su mecanismo de acción es propio de los IECA, actuando específicamente sobre el SRAA, disminuyendo los niveles de angiotensina II y aldosterona, también aumenta los niveles de bradicinina que es un agente vasodilatador.

### Indicaciones y aplicaciones

El captopril pocas veces se aplica de manera individual, generalmente se complementa con antihipertensivos del tipo diurético. Inicialmente se recomiendan (25 - 30) mg al día bien sea en una o dos dosis al día, si esto no genera resultados satisfactorios se incrementa a 100 mg en una o dos dosis diarias. Se debe evitar exceder los 150 mg diarios.

Algunos efectos adversos que se pueden presentar al consumirse son hipotensión, hiperpotasemia, tos, exantema, urticaria, angioedema, dispepsia, cefalea, mareos, náuseas, molestias gastrointestinales <sup>(22)</sup>.

Generalmente se comercializa en presentaciones sólidas con un contenido nominal del principio activo farmacéutico (API) de 50 y 25 mg por tableta.

Conociendo como está compuesto el captopril, sus características y propiedades es necesario profundizar en los métodos de determinación cuantitativa tanto propuestos como vigentes como los alternativos.

### Métodos para determinar Captopril

Las Farmacopeas más consultadas y seguidas son la estadounidense, británica y europea. Para el caso del antihipertensivo en estudio, captopril, las dos primeras sugieren como método idóneo para la determinación cuantitativa el análisis de cromatografía líquida de alta resolución o HPLC, al igual que la farmacopea japonesa.

La Farmacopea USP -NF implementa las siguientes características: la columna cromatográfica de 3.9 mm x 30 cm con relleno LC de 5 µm de diámetro, con flujo de 1 ml por minuto y un volumen de inyección de 20 µL, fase móvil una solución 9 en 100 de tetrahidrofurano en metanol y solución 1 en 2000 de ácido fosfórico, el detector ultravioleta ajustado a 220nm, la solución estándar de Disulfuro de Captopril en metanol 10 µg/mL y la solución de la muestra de captopril disuelta en metanol 2 mg/mL de Captopril y finalmente un criterio de aceptación de 90,0 – 110 % <sup>(24)</sup>.

De igual manera, la farmacopea británica y japonesa reportan la técnica HPLC como el método de referencia para la cuantificación y purificación de captopril, con parámetros muy similares solo que con distinta mezcla de solventes presentando en común la presencia del ácido fosfórico. La farmacopea británica emplea el captopril disuelto en metanol y como fase móvil agua, metanol y ácido fosfórico (1000:1000:1), por otro lado, la Farmacopea Japonesa utiliza el captopril disuelto en una mezcla de solventes: ácido fosfórico, acetonitrilo y agua (0,08:10:90) <sup>(25,26)</sup>.

También se han reportado otras alternativas con distintos métodos y técnicas de análisis para la determinación cuantitativa de este fármaco, en forma pura, formulaciones farmacéuticas y fluidos biológicos que se observan en la Tabla 2. Estas son las publicadas actualmente, ya que el Captopril ha sido objeto de estudio desde su comercialización.

Tabla 2. Análisis para la determinación de Captopril			
Autor	Técnica	Característica Analítica	Tratamiento
Shen, Xing, Yaqin 2015	RMN H <sup>1</sup>	99,8 ± 0,42 m/m % U = 0,53 m/m, K = 2	Aisló el CAP con Ac. Maleico en deutóxido a T° ambiente por 48 horas
Mukoshiwa, Khamanga, Walker	Electroforesis capilar / Detección UV	I.Lineal: (5 - 70) µg/mL R <sup>2</sup> : 0,9995	Buffer fosfato a pH 7, 23,90 kV

2017		LOD: 1,5 µg/mL LOQ: 5 µg/mL Banda: 214 nm	
Rahman, Khan 2019	Espectroscopía dicroísmo circular	LOD: (1,26; 1,48; 2,38) µg/mL LOQ: (3,83; 7,22; 4,50) µg/mL RSD ≤ 1,5%	-
Zare, Moradlou, Iranpour, Tahmesibe 2022	Electrocatalisis: Electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de oro	LOD: 8,8x10 <sup>-2</sup> µM I.Lineal 1: (1,14 – 16,98) µM I.Lineal 2: (21,49 – 62,1) µM	Buffer fosfato a pH 8, Desoxigenación de CAP con nitrógeno
Ebtihal et al 2022	Fluorescencia	I.Lineal: (20 - 450) ng/mL R <sup>2</sup> : 0,9993 LOD: 19,5 mg/mL LOQ: 6,4 mg/mL Banda: 334 nm	Formación de un fluorescente ternario disolviendo el CAP en metanol
Bunú, Ebeshi 2024	Titulación y Cromatografía de capa fina	LOD: (0,0776) mg/mL LOQ: 0,2589 mg/mL R <sup>2</sup> : 0,9982 Rf: 0,70 – 071	Titulación de CAP con HCl, hexanocianoferrato (III) y ZnSO <sub>4</sub>

En la Tabla 3 se exponen las técnicas y método aplicados acoplados con la Espectroscopía de Absorción Molecular en el Ultravioleta – Vis, la cual es la técnica a aplicar en este trabajo.

**Tabla 3. Análisis para la determinación de Captopril con detección UV - Vis**

Autor	Técnica	Característica Analítica	Tratamiento
Albero et al. 1993	Inyección de flujo con UV-Vis	LOD: 2 µmol/L LOQ: 2.2mg/L Rango: (20-600) µmol/L Banda: 400nm	Complejo con Pd (II) en medio ácido
<u>Hosseinimehr, Ebrahimi,</u> <u>NHassani,Mirzabeigi,</u> <u>Amini</u> 2004	Espectroscopía UV- Vis / HPLC	Rango: 1-10x10 <sup>-5</sup> M R <sup>2</sup> : 0,997 Banda: 412 nm	CAP de 25mg Reacción con DTNB a pH 8 para producir una especie amarilla medible
Stulzer, Tagliari, Segatto. 2006	Espectroscopía UV- Vis	Rango: (5-40) µmol/L %Recuperacion: 100,20 ± 0,28% Banda: 212 nm	CAP de 45mg CAP con buffer de fosfato pH 7
Suarez et al. 2007	Potenciometría / UV-Vis	LOD: 5µmol/L Rango: (10-800) mol/L Banda: 540 nm	Oxidación de Fe (III) seguido por la reacción de Fe (II) con 1,10- fenantrolina
El-Enany, Belal, Rizk 2008	Espectroscopía UV- Vis	LOD: 0.66 µg/mL LOQ: 2.0 µg/mL Rango: (10-50) µg/mL Banda: 443 nm	CAP de 25mg 2,6-dicloroquinona-4-cloroamida

Schmidt, Melchert, Rocha 2009	Inyección en flujo con UV-Vis	LOD: 1,0 $\mu\text{mol/L}$ Rango: (5.0-200) $\mu\text{mol/L}$ Banda: (350-580) nm	Formación en línea del reactivo triyoduro partiendo de $\text{KMnO}_4$ y $\text{KI}$ , que se consume en presencia del analito generando una señal transitoria.
Tzanavaras, Tsiomlektis, Zacharis, 2010	Inyección de flujo con UV-Vi	MP-CAP LOD $1.84 \times 10^{-7}$ mol/L MP-CAP LOQ $6.0 \times 10^{-7}$ mol/L MB-CAP LOD $2,08 \times 10^{-7}$ mol/L MB-CAP LOQ $6.86 \times 10^{-7}$ mol/L Banda: 285 nm	Reacción del tiol del CAP con propiolato de etilo, metilpropiolato (MP) y butilpropiolato (BP) en condiciones de flujo inyección secuencial, resultando un compuesto de alquiltioacrilato estable
Moldovan 2012	Titulación / UV-Vis	LOD: 0,06 $\mu\text{g/mL}$ LOQ: 0,19 $\mu\text{g/mL}$ $R^2$ : 0,9998 Rango: (0,2-4,50) $\mu\text{g/mL}$ %Recuperación: (99,76 - 100,36) Banda: 436 nm	Exceso conocido de $\text{BrO}_3^-/\text{Br}^-$ al CAP en medio de $\text{HCl}$ , seguido de la determinación del exceso de oxidante basándose en su reacción con fluoresceína saturada (FL)
Alwan, Qassim 2017	Espectroscopía UV-Vis	<b>Análisis convencional</b> LOD: 0,0962 mg/L LOQ: 0,321 mg/L Rango: (1-45) mg/L RSD%: 0,89 <b>FIA</b> LOD: 0,0157 mg/L LOQ: 0,0524 mg/L Rango: (1-35) mg/L Rendimiento: 51muestras/hora Banda: 511 nm RSD%: 0,38	CAP con hidroclorotiazida 25mg Reacción de Fe (III) a Fe (II), luego Fe (II) con 1,10-fenantrolina

En cada análisis presentado, es necesario utilizar una cantidad específica de reactivos y equipos. Estos se seleccionan con el objetivo de optimizar parámetros críticos como la sensibilidad, exactitud y precisión, incluso mejorando o comparando las técnicas existentes. A continuación, se describen algunos de los métodos más accesibles para el análisis del fármaco en cuestión mediante Espectroscopía Ultravioleta-Visible.

- Alwan y Qassim (2017): El procedimiento consta en la reducción de Fe (III) como  $\text{FeCl}_3$  a Fe (II) mediante CAP en ácido acético como medio; el Fe (II) producido interactúa con 1,10-fenantrolina para formar un producto soluble de color rojo anaranjado que se determina a una longitud de onda máxima de 511 nm. El análisis se realizó de manera convencional y por inyección de flujo para luego comparar resultados. El sistema múltiple de la FIA pudo determinar el CAP con un rendimiento de 51 muestras/h. Las curvas de calibración de absorbancia

frente al signo de concentración de la Ley de Beer se someten dentro de la escala de concentración de 1-45 y 3-200 mg/L de CAP. Con límites de detección 0,0962, 0,0157 mg/L y límites de cuantificación, 0,321, 0,0524 mg/L 1 de CAP. Para sistema por lotes y CFIA, respectivamente. La repetibilidad (RSD%) (n=7) fue 0,89 y 0,38 para la estimación de soluciones de CAP con concentración 60 y 130 mg/L.<sup>(40)</sup>

- Moldovan (2012): En este procedimiento se lleva a cabo la adición de un exceso conocido de mezcla de bromato y bromuro al CAP en medio de ácido clorhídrico, seguido de la determinación del exceso de oxidante basándose en su reacción con fluoresceína saturada (FL) midiendo la absorbancia a 436 nm. El sistema obedece la Ley de Beer para (0,2 - 4,50) µg/mL de CAP con un coeficiente de correlación de 0,9998. Los límites de detección y cuantificación se calculan en 0,06 y 0,19 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. El método propuesto se aplicó con éxito para la determinación de CAP en formulaciones farmacéuticas con recuperaciones medias del 99,76 al 100,36 por ciento <sup>(39)</sup>.
- El-Enany, Belal, Rizk (2008): El método se basa en acoplar captopril con 2,6-dicloroquinona 4-clorimida (DCQ) en dimetilsulfóxido. El producto de reacción amarillo se midió a 443 nm. El gráfico de absorbancia-concentración fue rectilíneo en el rango de 10 a 50 µg/ml con un límite mínimo de detección (LOD) de 0,66 µg/ml y un límite de cuantificación (LOQ) de 2,0 µg/ml. El método se aplicó al análisis de tabletas comerciales y los resultados coincidieron con los obtenidos utilizando métodos espectrofotométricos oficiales y de referencia. La hidroclorotiazida, que frecuentemente se formula conjuntamente con CAP, no interfirió con el ensayo <sup>(38)</sup>.
- Stulzer, Tagliari, Segatto (2006): En la elaboración del método se utilizó la Espectroscopía Ultravioleta (UV) para cuantificar el fármaco captopril en tabletas de liberación prolongada. La determinación del contenido del fármaco se analizó por medio de la solución estándar de captopril y los excipientes utilizados solos, disueltos en tampón fosfato de sodio 0,05 N pH 7,0 mediante un barrido entre 200 y 400 nm en un espectrofotómetro UV. Los parámetros utilizados en el proceso de validación fueron especificidad, linealidad y rango, precisión, exactitud y robustez. La linealidad en el rango de 5,0 - 40,0 µg/ml mostró un coeficiente de correlación de 0,9998. Los excipientes de las formulaciones no interfirieron con el análisis y la recuperación de la muestra fue de 100,20 ± 0,28%<sup>(36)</sup>.

Los métodos y técnicas expuestos son determinaciones que presentan buenos valores de parámetros analíticos, pero algunas de ellas requieren de reactivos y equipos que no siempre se encuentran en los laboratorios. Además, se implementan compuestos acomplejantes, reacciones redox o soluciones buffer que requieren controlar parámetros implícitos fisicoquímicos y cinético que rigen estas reacciones.

El método a proponer en este trabajo involucra la técnica de Espectroscopía de Absorción Molecular en el Ultravioleta – Visible, por lo que es necesario profundizar en los fundamentos que rige esta técnica.

### **Técnicas Espectroscópicas**

La espectroscopía se ha convertido en una herramienta fundamental en los laboratorios de investigación y desarrollo, tanto en el área de la química como en el de la física.

En el área de química analítica se ha convertido en un soporte indispensable, sin embargo, en las demás ramas como la orgánica, la cinética, desarrollo de materiales y medicamentos es una técnica indispensable para conocer información importante con respecto a la composición, estructura y propiedades de los materiales, como también permite conocer las variaciones de una sustancia en el tiempo. Por otro lado, en el área de la física, se aplica para el entendimiento de las propiedades fundamentales de la materia y energía, permitiendo ver más allá de lo que no es posible con el ojo humano elucidando la estructura de la materia y los procesos físicos que ocurren en el universo.

Todas las técnicas que componen a la espectroscopía, estudian como las diferentes formas de la radiación electromagnética interactúan con los átomos y moléculas de la materia. Esta interacción provoca fenómenos de absorción, emisión o dispersión que perturban a la materia en estudio, permitiendo la elucidación de estructuras, determinación de concentraciones y cuantización de cambios en los niveles energéticos que sufre la materia cuando absorbe o emite energía.

#### **Radiación Electromagnética**

La radiación electromagnética (REM) es una forma de energía cuyo comportamiento es dual, es decir, se describe mediante propiedades de ondas como también de partículas. Puede manifestarse de diversas maneras como calor radiado, luz visible, rayos X o rayos gamma y a diferencia de otros tipos de onda, como el sonido, que necesitan un medio material para propagarse, la radiación electromagnética se puede propagar en el vacío. Cuando se describe como onda, se está hablando de la combinación de un campo eléctrico (E) y un campo magnético (B) como los de color azul y rosa, respectivamente en la Figura 4, oscilantes que varían en el tiempo en ángulos rectos y perpendiculares entre sí transportando energía de un lugar a otro <sup>(43)</sup>.

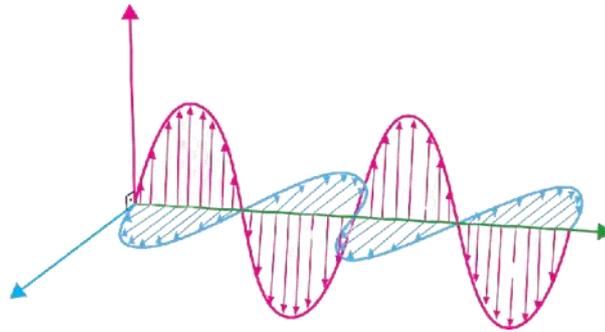


Figura 4. Representación esquemática de la radiación electromagnética como onda

También existen otras interacciones que definen de mejor manera los cambios energéticos producidos en la materia cuando esta es irradiada y es definiendo la radiación como una partícula, conocidas como un fotón o un cuanto de luz. Estos pueden ser explicados por medio de una sola componente como el campo eléctrico, que no es más que una onda sinusoidal con una amplitud (A), la cual se propaga a través de una sola dirección en el espacio a la velocidad de la luz ( $3 \times 10^8$  m/s), y que es proporcional a la longitud de onda ( $\lambda$ )<sup>(43)</sup>.

Cada cuanto o fotón transporta una cantidad de energía E, a una frecuencia dada que se describe con la ecuación de Planck de la siguiente manera:

$$E = h\nu = \frac{h\nu}{\lambda} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde h es la constante de Planck y es igual a  $6,62 \times 10^{-34}$  J.s. Esta ecuación predice que la energía (E) de un fotón es directamente proporcional a su frecuencia ( $\nu$ ) e inversa a su longitud de onda ( $\lambda$ ), por ello una radiación de alta energía se presentara al tener frecuencias altas y longitudes de onda cortas<sup>(43)</sup>.

Dependiendo de las energías que transportan los fotones se clasifican en un conjunto llamado espectro electromagnético. Las zonas que componen esta clasificación son los tipos de radiación a las que es sometida la materia para su estudio en forma de luz.

### Espectro Electromagnético

El espectro electromagnético, es el rango completo de todas las posibles frecuencias de radiación electromagnética. Se compone de diferentes tipos de radiación, cada uno correspondiente a un rango de las energías que puede contener un fotón. Además, la longitud de onda de este fotón es la misma que la de la onda electromagnética a la que pertenece. En base a estas variables, es decir, la energía, la longitud de onda y la frecuencia la clasificación de diferentes regiones, como se observa en la figura 5, abarcan desde radiación de alta energía y alta frecuencia (1020 Hz) que se propaga en longitudes

de onda cortas, como los rayos X y los rayos gamma; seguidas por la región intermedia infrarrojo (IR), visible (Vis) y ultravioleta (UV) (quienes son los de mayor aplicación en espectroscopía) hasta radiación de baja energía y baja frecuencia (10<sup>4</sup> Hz) que se propaga en longitudes de onda largas, como las ondas de radio y las microondas. Estas regiones no son precisamente rígidas entre sí, siempre puede existir cierta superposición entre ellas <sup>(44)</sup>.

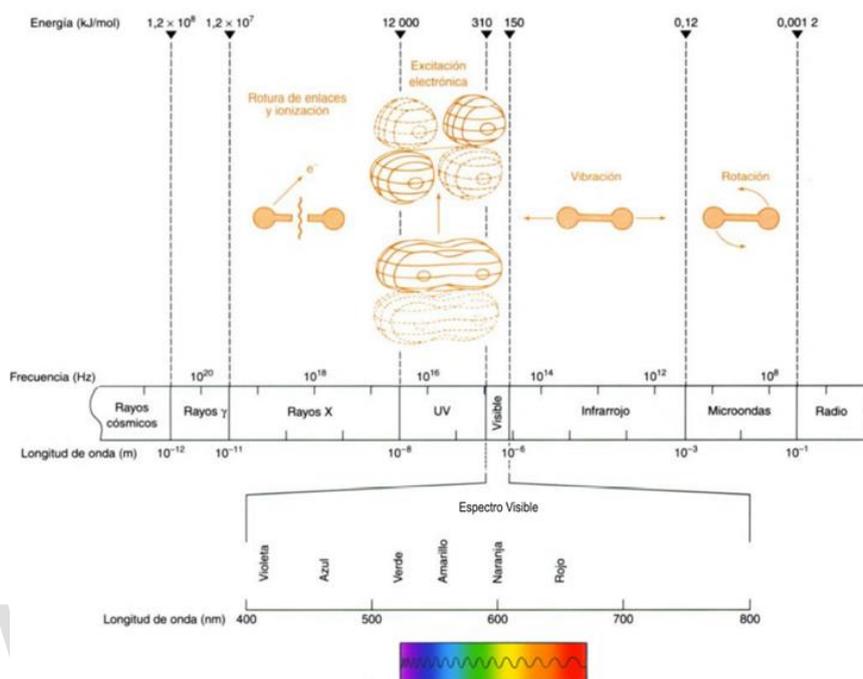


Figura 5. Regiones del espectro electromagnético con sus respectivos tipos de cambios al interactuar con la radiación <sup>(44)</sup>.

La materia es expuesta a la radiación electromagnética de diferentes zonas del espectro en forma de luz, energía eléctrica, calor, partículas o de una reacción química, dependiendo de estas puede experimentar cambios o transformaciones producto de la excitación. Por ejemplo, en los procesos de alta energía que involucra la radiación gamma ( $\gamma$ ) y radiación de rayos X, ocurren rupturas de enlaces y procesos de ionización atómicos o moleculares. Consecuentemente, al disminuir la energía y, por ende, aumentar la longitud de onda, se encuentran procesos no destructivos que se relacionan con transiciones electrónicas en los átomos que forman enlaces moleculares, precisamente en la zona ultravioleta y visible. De esta forma, las interacciones vibracionales y rotacionales de enlaces moleculares estarían asociados a la zona infrarroja del espectro correspondiendo a procesos de menor energía potencial <sup>(45)</sup>.

Las interacciones producto de la absorción o emisión de un fotón, es decir, la luz con la que se realizan los análisis espectrales, genera un cambio de energía igual a la energía que presenta dicho fotón. Estos cambios son medidos en términos de absorbancia y transmitancia.

## Absorbancia y Transmitancia

La relación entre la absorbancia y transmitancia permite entender como la REM interactúa con la materia en la espectroscopía de absorción.

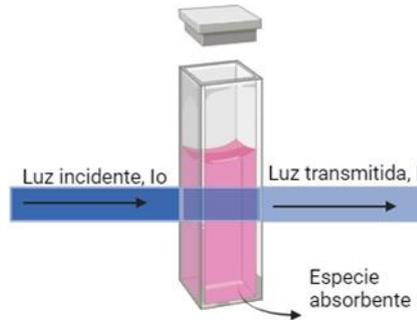


Figura 6. Proceso de absorción de radiación de haz incidente ( $I_0$ ) y haz emergente o transmitido ( $I$ ).

La muestra es perturbada con un haz de radiación que atraviesa al recipiente contenedor de la solución en estudio y posteriormente a una capa de solución que tiene un espesor y una concentración específica, de una especie absorbente. Así, la transmitancia ( $T$ ) de la solución es la fracción de la radiación incidente transmitida por la solución y se puede demostrar con la siguiente ecuación:

$$T = \frac{I}{I_0} \text{ Ec. 2}$$

Donde  $I_0$  es la intensidad de radiación inicial e  $I$  es la intensidad de la radiación remanente luego de atravesar la solución (27). Expresada en porcentaje queda de la siguiente manera:

$$\%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \text{ Ec. 3}$$

La absorbancia es la fracción de radiación que la solución deja pasar cuando la REM atraviesa la muestra, provocando que la muestra o analito pase de un estado basal o fundamental a un estado excitado. Como consecuencia de las interacciones entre los fotones y las partículas absorbentes la potencia del haz de luz es atenuada, definiéndose como:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \text{ Ec. 4}$$

Esto quiere decir que, mientras mayor sea la absorbancia menor será la transmitancia.

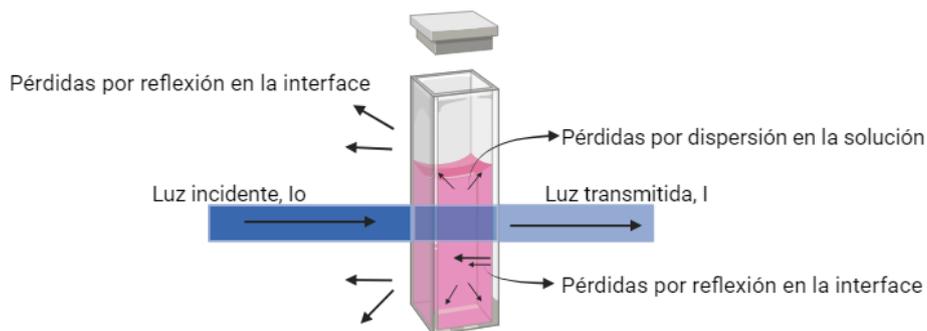


Figura 7. Pérdidas por reflexión y dispersión de un haz de luz incidido sobre una solución.

En la figura 8, se observa la reflexión en las interfases, tanto aire-celda, como celda-solución. La atenuación del haz emergente es considerable, ya que ocurre la dispersión de las moléculas grandes como también puede ocurrir absorción por las paredes del recipiente. Para contrarrestar estos efectos, la intensidad del haz de luz transmitido por la solución del analito es comparada con la intensidad del haz transmitido por una celda idéntica que contiene solvente puro. Una absorbancia experimental que se aproxima mucho a la absorbancia verdadera se obtiene de la siguiente manera:

$$A = \log \frac{I_{\text{solvente}}}{I_{\text{solucion}}} \quad \text{Ec. 5}$$

La mayor parte de los trabajos analíticos se realizan mediante soluciones de las muestras o del analito al que se busca determinar la concentración quien tiene una relación directa con la absorbancia, de manera que es indispensable exponer la relación entre la concentración de la solución y su capacidad de absorber la REM <sup>(43,45)</sup>.

### Ley de Beer-Lambert

La relación entre la absorbancia y la concentración, está fundamentada en la Ley de Beer-Lambert, que establece que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente de la muestra o analito.

$$A = \varepsilon * b * c \quad \text{Ec. 6}$$

La absorbancia (A) es una magnitud adimensional, la concentración (c) se expresa en moles por litro (molaridad), la longitud del trayecto óptico (b) en centímetros, la absortividad molar o coeficiente de extinción ( $\varepsilon$ ) es la constante de proporcionalidad característica de cada sustancia a una longitud de onda determinada, es decir, una medida de qué tan intensa es la absorción de luz de la muestra a esa longitud de onda y sus unidades son molaridad por centímetros, ambos a la menos uno <sup>(45)</sup>.

Las mediciones de las absorbancias realizadas en este trabajo se obtendrán por medio de la radiación proveniente de la región del ultravioleta – visible, por lo que a continuación se explicaran los procesos por los que pasan los electrones al experimentar transiciones electrónicas.

### Absorción en el Ultravioleta Visible (UV-Vis)

La radiación ultravioleta – visible (UV-Vis) del espectro abarca el intervalo de (100 – 780) nm. Como se observa en la figura 8, esta región se subdivide en tres zonas. La primera es la zona del ultravioleta en el vacío, que abarca desde los 100 hasta los 200 nm. La segunda zona es el ultravioleta cercano, abarca longitudes de onda desde los 200 hasta los 380 nm. La tercera y última zona es la del visible, abarcando longitudes de onda de aproximadamente 380 a 760 nm, siendo responsable del color perceptible al ojo humano.

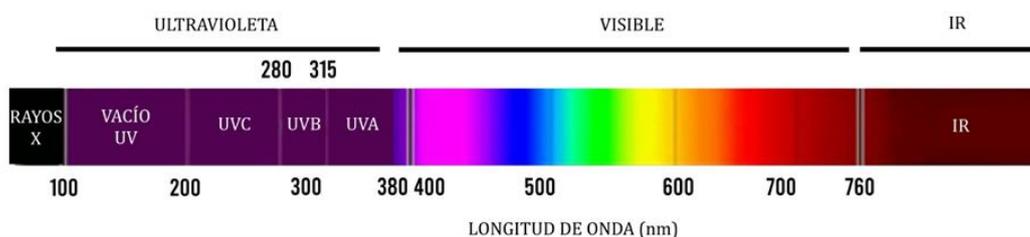
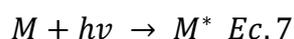
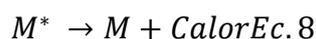


Figura 8. Región del espectro que comprende el Ultravioleta y Visible.

Las especies atómicas o moleculares (M) que absorben la radiación UV-Vis pasan por un proceso de dos etapas, la primera consiste en una excitación electrónica, donde la especie en su estado fundamental es perturbada con energía ( $h\nu$ ) en forma de fotones, dando como resultado una especie excitada ( $M^*$ ), que es la segunda etapa:



Esta especie excitada presenta un tiempo de vida muy corto, aproximadamente de ( $10^{-8}$  a  $10^{-9}$ ) s, en el que libera la energía excedente mediante calor o el fenómeno de luminiscencia, seguidamente la especie se relaja hasta pasar a un estado de menor energía nuevamente.



Sin embargo, en algunos casos la relajación también puede ocurrir por la descomposición de  $M^*$ , para dar lugar a nuevas especies por medio de un proceso llamado reacción fotoquímica <sup>(43)</sup>.

Como ya se hizo mención esta radiación genera la energía suficiente para producir transiciones electrónicas en los átomos que forman enlaces moleculares y estas varían

dependiendo de la radiación que la materia absorba. En estas transiciones el electrón que forma el enlace en las moléculas se encuentra en los denominados orbitales moleculares, en principio este ocupa un orbital ocupado de mayor energía (HOMO, por sus siglas en inglés *Highest Occupied Molecular Orbital*), luego al absorber la radiación asciende hasta un orbital desocupado de menor energía (LUMO, por sus siglas en inglés *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Los orbitales HOMO son los que forman principalmente los enlaces sigma ( $\sigma$ ), luego forman los orbitales pi ( $\pi$ ) y finalmente los no enlazantes (n) quienes presentan la mayor energía. Los orbitales LUMO, son los orbitales antienlazantes  $\sigma^*$  y  $\pi^*$  que tienen mayor energía <sup>(46)</sup>.

#### i. Transiciones electrónicas $\pi$ , $\sigma$ y n

Dependiendo de la radiación que absorban los diferentes tipos de electrones que forman los enlaces moleculares se presentan diferentes tipos de transiciones <sup>(46)</sup>.

- Transiciones  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  y  $\sigma \rightarrow \pi^*$  son las que requieren mayor energía. Corresponde a la zona de UV de vacío, por lo que no pueden estudiadas por espectroscopía UV-Vis. Se utiliza como solventes alcanos y cicloalcanos ya que solo contienen enlaces sigma y serán transparentes a la radiación UV-Vis.
- Transiciones  $n \rightarrow \sigma^*$  se dan en compuestos que contienen átomos con pares de electrones no enlazantes y las señales son registradas en la región del UV Cercano.
- Transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  o  $\pi \rightarrow \pi^*$ , son las que tienen mayor aplicación en la espectroscopía ya generalmente son moléculas orgánicas que aportan orbitales  $\pi$  dado que presentan grupos cromóforos, que son centros absorbentes insaturado o que se encuentra conjugado con heteroátomos como el oxígeno (O), nitrógeno (N) o azufre (S), también pueden ser compuestos aromáticos o multicíclicos. De igual manera, existe otro grupo llamado auxocromos que son grupos funcionales que por sí solos no absorben en una región espectral concreta, pero que al unirse a un cromóforo son capaces de modificar su capacidad de absorción. Generalmente son heteroátomos con pares de electrones sin compartir como hidroxilo (-OH), amino (-NH) y halógenos (-Cl, -I, -Br). Las energías de excitación en las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  son medianamente altas, correspondiendo a la región UV lejano y próximo, mientras que las  $n \rightarrow \pi^*$  son considerablemente menores, correspondiendo a la región visible del espectro.

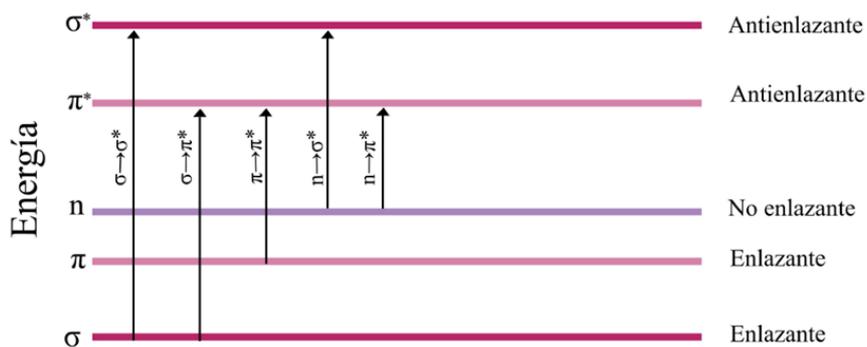


Figura 9. Niveles de energía moleculares electrónicos.

## ii. Transiciones electrónicas d y f

La mayoría de los iones y complejos de los materiales de transición absorben en la región UV o Vis del espectro electromagnético. Por ejemplo, los lantánidos y actínidos presentan transiciones electrónicas de electrones 4f y 5f, respectivamente mientras que los metales de la primera y segunda serie presentan transiciones de electrones 3d y 4d.

## iii. Transiciones electrónicas por transferencia de carga.

Las especies que presentan este tipo de absorción son de particular interés, ya que sus absorptividades molares son muy altas ( $\epsilon_{\text{máx}} > 10.000$ ) por lo que sus análisis proporcionan medios de sensibilidad para detecciones y determinaciones muy elevadas.

Muchos complejos inorgánicos presentan absorción por transferencia de carga. El complejo debe tener características de dador de electrones y el otro componente de aceptor de electrones. El estado excitado es consecuencia de un proceso de oxidoreducción interno. Por ejemplo, en el complejo Fe (III)/tiocianato, la absorción de un fotón produce la transferencia de un electrón del tiocianato al Fe (III). El producto es una especie excitada que implica al ion Fe (II) y al radical neutro SCN<sup>(43)</sup>.

Algunas de estas transiciones son las estudiadas en este trabajo de investigación por Espectroscopía de Absorción Molecular en la región UV-Vis.

### Técnica de Espectroscopía de Absorción Molecular en la región UV-Visible

Es una técnica espectroscópica de absorción en la que se ilumina una muestra con radiación electromagnética con longitudes de onda en el intervalo del ultravioleta y el visible. Se fundamenta en la Ley de Beer-Lambert, que relaciona la absorbancia y la concentración de las soluciones de forma directa adecuando las diluciones con los requerimientos del equipo, permitiendo realizar determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas.

La técnica consiste en la medición de la longitud de onda absorbida con respecto a la concentración de cada transición electrónica, vibración o rotación generando líneas por

cada uno de estos procesos que se diferencian entre sí por cantidades mínimas de energía, por lo que estas líneas tienden a superponerse y el equipo las une todas en forma de una capa ancha centrada en la longitud de onda de la transición principal, conocida como banda de absorción, como la que se observa en la figura 10. Cada banda dependerá de los enlaces que presenten las estructuras en estudio.

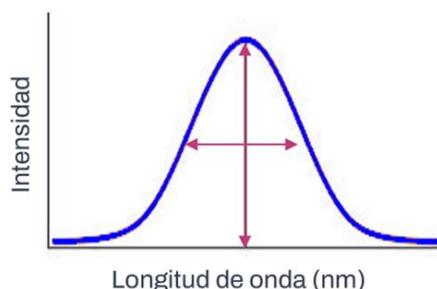


Figura 10. Modelo de bandas de absorción.

Se puede aplicar en soluciones de especies orgánicas e inorgánicas con grupos absorbentes o altamente conjugados como también en soluciones con iones de metales de transición o en aleaciones que requieran estudiar algún metal en especial, como también es posible el estudio de algunos fármacos. En el análisis cualitativo generalmente se complementan con otras técnicas, como las espectroscopías de infrarrojo o de resonancia magnética nuclear.

La espectroscopía de absorción molecular UV-Vis ofrece varias ventajas significativas para el análisis químico como lo son:

- No es destructiva para las muestras.
- Rápida, sencilla y eficaz.
- Es de amplia aplicabilidad (compuestos orgánicos, inorgánicos o mixtos).
- Posee buena selectividad.
- Presenta buena exactitud, con un porcentaje de incertidumbre de 3%
- Las concentraciones para el LOD ( $10^{-4} - 10^{-5}$ ) M
- Permite identificar y cuantificar.

### **Instrumentación para la técnica de Espectroscopía de Absorción Molecular en la región UV-Visible**

El instrumento por el que se realizan estas mediciones se llama espectrofotómetro, como ya se hizo mención. Es un dispositivo que separa y analiza la radiación electromagnética que atraviesa una muestra o analito en diferentes longitudes de onda que son medidas y utilizadas para extraer información sobre la muestra en estudio.

Pueden ser de varios tipos como los usados en espectrometría de fotoelectrones, espectrometría de masas, entre otros. Pero los usados para la espectroscopía de absorción molecular UV-Vis son los ópticos, que describen propiedades de absorción,

emisión y dispersión. Estos están compuestos principalmente por cinco componentes: fuentes, selectores de longitud de onda, recipientes para la muestra, detectores de la radiación y procesadores de señal/dispositivo de lectura <sup>(43)</sup>.

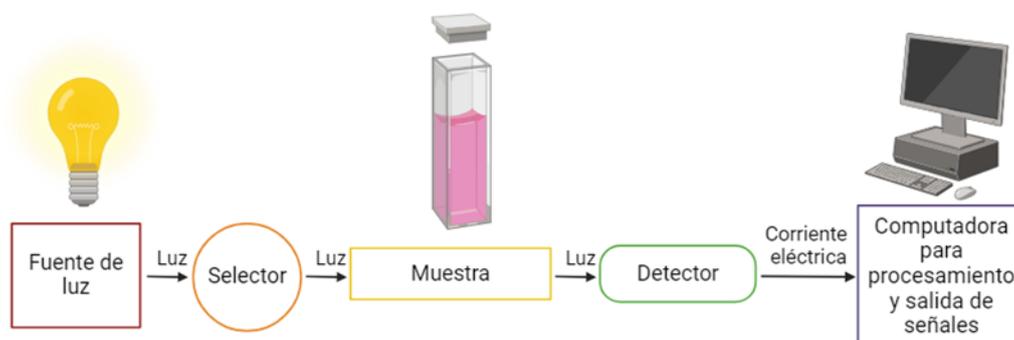


Figura 11. Esquema general de un espectrofotómetro UV-Vis.

En principio el proceso comienza en la fuente de luz policromática que emite la radiación electromagnética en la región UV-Vis del espectro. El selector descompone el haz de luz en las longitudes de onda que lo conforman para que irradie a la muestra contenida dentro del equipo. La luz que atraviesa la muestra llega al detector quien registra la intensidad de la luz transmitida y lo envía como una señal eléctrica, que es recibida e interpretada por el procesador de señal para finalmente ser mostrada como un conjunto de datos en función de la absorbancia y la longitud de onda.

Existe una amplia variedad de espectrofotómetros, dependiendo de la calidad tanto para análisis cualitativo o cuantitativo. Esto implica variaciones en funcionamiento, rendimiento, costos y campo de aplicación. Sin embargo, en general todos están elaborados por los mismos componentes internos, la principal diferencia está en la distribución de los componentes ópticos, así como en la adición de algunos componentes adicionales. A continuación, se describen los cinco elementos principales.

#### i. Fuentes

Una fuente excelente para estudios espectroscópicos debe generar radiación suficiente, constante y por tiempos razonables, para que detecte y mida en la longitud de onda seleccionada, pero esto es solo una idealización ya que la potencia de esta varía según la tensión de su fuente de alimentación, por lo que, generalmente se necesita una fuente de potencia regulada.

Las fuentes se pueden clasificar en continuas o lineales. Las continuas son las que varían la intensidad en función de la longitud de onda, las lineales emiten radiación restringida en un intervalo corto de longitudes de onda, tal que, simula la emisión de líneas discretas de radiación <sup>(43)</sup>. En consecuencia, en el caso de mediciones de absorción molecular, es requerido disponer de una fuente continua, entre las que se destacan las siguientes:

- Lámpara de Deuterio e Hidrógeno: Consta de un electrodo metálico y un filamento de óxido en un tubo de vidrio con ventanas de cuarzo que contienen hidrógeno o deuterio gaseoso. Su rango de trabajo se sitúa entre (160-800) nm, pero como fuente continua solo actúa en el intervalo de (190-400) nm. Se excita eléctricamente el deuterio o el hidrógeno a baja presión ocasionando su ionización y posterior emisión de radiación para generar un espectro continuo en la región UV. Requiere el uso de un equipo adecuado para compensar la baja intensidad en la región visible.
- Lámpara de Filamento de Tungsteno: Se trata de lámparas que constan de un alambre de tungsteno encapsulado al vacío en un recipiente de cuarzo, al que se le aplica corriente eléctrica para lograr la emisión de luz en el intervalo de 320 a 2500 nm, convirtiéndola en una de las fuentes más populares para los equipos de absorción molecular UV-Vis e infrarrojo. Por otro lado, la temperatura de trabajo del filamento es de (2870 – 3500) K por lo que los instrumentos de medición tienen reguladores de tensión conectados para estabilizar y corregir las desviaciones inherentes al proceso de emisión de radiación.
- Diodos Emisores de Luz (LED): Son dispositivos semiconductores con la capacidad de dejar pasar corriente en una sola dirección en un circuito eléctrico y como consecuencia emiten luz (43). Dicho esto, las fuentes de diodos LED manejan un intervalo de trabajo alrededor de los 375 a 1000 nm, en cuyo caso, el rango vendrá especificado por la mezcla de semiconductores utilizados, ya que, pueden trabajar como fuentes de radiación continua.
- Lámparas de Arco de Xenón: Esta formada por dos electrodos de tungsteno cubiertos por un bulbo cuarzo, que contiene xenón. Una corriente eléctrica pasa a través de la atmósfera de alta presión de xenón generando radiación de alta intensidad. Esta puede funcionar de forma continua o intermitente con descargas generadas por un condensador en un intervalo continuo que oscila los 200 a 1000 nm.

La radiación emitida por la fuente, no es más que una luz policromática, por lo que debe acotarse antes de llegar a la muestra.

## ii. Selector

El selector de longitud de onda tiene la función específica de filtrar la radiación o luz policromática necesaria para el análisis, transformándola en luz monocromática, o en una aproximación muy cercana a esta, permitiendo así que el analito pueda absorberla eficientemente. La radiación que finalmente incide sobre la muestra se presenta como un haz de luz estrecho y uniforme, denominado banda.

La selección adecuada de este dispositivo potencia la sensibilidad en las mediciones de absorbancia y mejora la selectividad en los métodos de absorción y emisión. Además, contribuye significativamente a la reducción del ruido de fondo, ya que debe existir una correlación directa entre la señal óptica y la concentración del analito <sup>(43)</sup>.

Estos pueden ser de dos tipos, filtros o monocromadores. Las diferencias entre estos se establecen en la tabla 4.

<b>Tabla 4. Selectores de longitudes de onda</b>		
<b>Filtros</b>	<b>De absorción</b>	<b>De interferencia</b>
Están compuestos de materiales que transmiten selectivamente una longitud de onda	Están elaborados por dos placas de vidrio que contienen una solución coloidal o un polímero coloreado que elimina el color complementario al color en estudio. Absorben selectivamente la radiación de una región específica. Anchos de banda efectivo entre (30 - 250) nm	Consiste en un material dieléctrico transparente que está intercalado entre dos placas de vidrio cada una recubierta con una película metálica delgada y semitransparente. Funcionan bajo los fenómenos de interferencias constructiva y destructiva. Anchos de banda efectivos entre (10 - 20) nm
<b>Monocromadores</b>	<b>Prismas</b>	<b>Rejillas</b>
Cuentan con medios dispersivos encargados de dividir la radiación en diferentes longitudes de onda	Refractan la luz incidente en distintos componentes de longitudes de onda. Pueden ser de sílice y cuarzo (UV) o vidrio (Vis e IR). Dependen del índice de refracción del material del que estén hechos.	Superficies pulidas con ranuras paralelas entre sí, en base al ángulo por el cual se refleja la radiación se obtendrá una longitud de onda diferente. Redes de (15000 – 30000) líneas/in en UV-Vis y (1500 a 2500) líneas/in en IR.

Independientemente de su tipo, el haz de luz monocromática emitido por el selector se dirige hacia el recipiente que contiene la muestra.

### iii. Recipientes para las muestras

Los recipientes en donde se deposita la muestra para las medidas de absorbancia, son conocidas como celdas o cubetas. Estos no deben absorber la radiación electromagnética en el intervalo de longitudes de onda que se está estudiando por lo que deben ser elaborados con materiales transparentes a la radiación en el rango espectral de trabajo. Para el caso del trabajo en el rango del UV-Vis, se requieren celdas hechas de cuarzo o sílice fundido, pues ambos materiales son transparentes en esta

región, existiendo la alternativa de usar vidrios de silicato para un rango de trabajo de (350-2000) nm.

Presentan diferentes formas y tamaños relacionados con la practicidad y estado de agregación de la muestra. Como se puede apreciar en la figura 12, generalmente son rectangulares o cuadradas y pueden tener una longitud de 0,1 a 10 cm, siendo la de 1cm la medida más común. La característica con la que todas cuentan son las dos caras opacas paralelas entre sí y perpendiculares a la dirección de la luz, ya de esa forma se evitan las pérdidas de energía por reflexión <sup>(43)</sup>.



Figura 12. Tipos de celdas para medida <sup>(47)</sup>.

Es importante señalar que la calidad de las mediciones depende en gran medida del uso y mantenimiento de la celda, ya que la suciedad de cualquier origen (residuos de componentes, huellas, grasa, etc.) tendrá un efecto directo en los resultados obtenidos.

Una vez la muestra es contenida en la celda limpia y dispuesta dentro del equipo, la luz monocromática que la atraviesa es finalmente captada por el detector de señales, el cual es un componente clave en la determinación de las propiedades espectrofotométricas.

#### iv. Detectores

Este componente es quien transforma la señal transmitida por la muestra en forma de radiación en una señal eléctrica cuya magnitud proporciona información de la muestra o analito. La señal eléctrica producida por el detector puede ser corriente o voltaje.

La finalidad de este dispositivo es lograr una señal de alta sensibilidad y una excelente relación señal-ruido. También es importante que mantenga una respuesta coherente frente a diversas longitudes de onda, que posea cortos tiempos de reacción y que la magnitud de la señal eléctrica producida sea proporcional a la potencia de la luz incidente <sup>(43)</sup>.

Pueden ser de dos tipos, de fotones o térmicos. Los primeros poseen una superficie fotosensible que genera una corriente eléctrica al ser incidido por la luz y son los más

utilizados en la región UV-Vis. Los segundos, perciben el calor de la radiación siendo este parámetro el que miden, son utilizados específicamente en la región del infrarrojo.

En vista de que los transductores fotoeléctricos son utilizados en la región del UV-Vis cabe mencionar algunos de los más usados:

- Celdas Fotovoltaicas de Capa Barrera: Está compuesto internamente por un electrodo plano, hecho de cobre o hierro, sobre el cual se aplica una capa de material semiconductor, tal como el selenio. La capa externa consiste en una delgada película metálica semitransparente, hecha de oro o plata, que facilita la conducción de una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de fotones recibidos. Además, este dispositivo es económico y no necesita fuentes externas de regulación. Sin embargo, su sensibilidad disminuye al disminuir los niveles de luz y puede sufrir fatiga con el uso. Este dispositivo alcanza su máxima sensibilidad alrededor de los 550 nm.
- Fototubo: Se compone de un electrodo semicilíndrico que funciona de manera simultánea como cátodo y fotoemisor, frente a este se encuentra un alambre recto que actúa como ánodo. De manera que al ser incidido por la radiación proveniente de la muestra el fotoemisor envía una corriente de electrones hacia el ánodo, lo que resulta en una señal eléctrica. Esta corriente es posteriormente amplificada y registrada para su medición. Opera en un rango espectral de 180 a 1000 nm.
- Fotomultiplicador: Su diseño es parecido al de un fototubo, pero incluye electrodos adicionales hechos de un material fotosensible denominados dinodos. Estos dinodos generan una emisión secundaria en cascada que llega amplificada al ánodo, donde se convierte en una corriente eléctrica medible. Detecta niveles bajos de luz y posee buena relación con el ruido.
- Fotodiodos de Silicio: Consta de una unión p-n polarizada inversamente montada en un chip de silicio. La polarización inversa crea una zona de despoblación que reduce casi a cero la conductancia de la unión cuando incide la radiación sobre el chip, se forma en la zona de despoblación huecos y electrones que, al moverse a través del dispositivo, dan lugar a una corriente que es proporcional a la potencia radiante. Adicionalmente, tiene acoplado un capacitor que almacena la corriente generada y por medio de ciclos de carga y descarga, se puede registrar todo un espectro en el intervalo espectral que va desde los 190nm a más de 2000nm.

Finalmente, la señal eléctrica que genera el detector es recibida por el procesador de señales quien la transforma a un conjunto de datos.

## v. Procesador de señal y lectura

La función de este componente es amplificar la señal eléctrica proveniente del detector y transformarla en una señal interpretable por el analista, así como realizar la conversión de corriente directa a alterna o viceversa; además de filtrarla. Adicionalmente, este componente es capaz de realizar operaciones matemáticas de derivación, integración, conversión logarítmica, entre otras, según sea requerido <sup>(43)</sup>.

Esta señal es convertida en un conjunto de datos resultando en datos de lectura, que son presentados al analista por medio de medidores digitales, pantallas LCD en el equipo, o son transferidos a una computadora con el uso de un software adecuado.

### Tipos de instrumentos en la Espectroscopía UV-Vis.

Ahora, dependiendo de la disposición de estos componentes el espectrofotómetro es utilizado para diferentes fines asociados a la espectroscopía UV-Vis, lo cual involucra a las características de desempeño del equipo, sus propiedades ópticas e incluso el costo de adquisición. 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 <sup>(43)</sup>.

En el de haz sencillo como se observa en la figura 13, el proceso comienza en la fuente que genera el haz de luz, este es separado en un intervalo de longitudes de onda más corto por el selector, pasa luego a la muestra que genera el haz medible mediante el detector. Se mide la transmitancia que llega al detector, primero la del blanco o solución de referencia y seguidamente la de la muestra que contiene el analito.

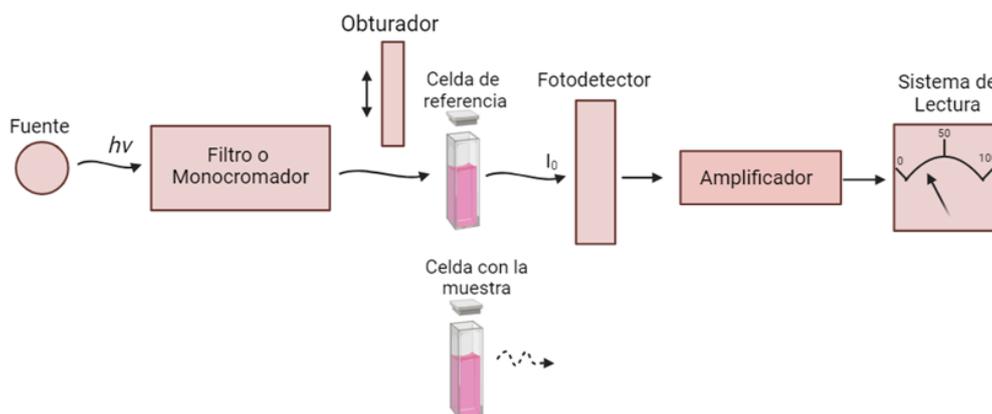


Figura 13. Espectrofotómetro de haz sencillo.

El de doble haz puede ser de dos tipos, con haces separados en el espacio o con los haces separados en el tiempo. En el primero, que se observa en la figura 14, el haz de luz proveniente de la fuente es dividido en dos haces al salir del selector por medio de un sistema de espejos divisores. Cada uno de los haces se dirige a las celdas que contienen el blanco y el analito, luego llegan a detectores que están separados para obtener la señal correspondiente. En el segundo, se agrega un espejo giratorio con la finalidad de

que primero dirija todo el haz que sale del selector a la celda de referencia y luego dirige hacia la celda que contiene el analito, como se esquematizo en la figura 15. Luego, ambos haces se procesan y clasifican para su interpretación.

La ventaja de estos instrumentos es posibilitan la corrección automática de las variaciones que se pueden presentar en la potencia de la fuente y el desempeño del detector con respecto al tiempo y a la longitud de onda, presentando como desventaja un alto costo para su adquisición <sup>(49)</sup>.

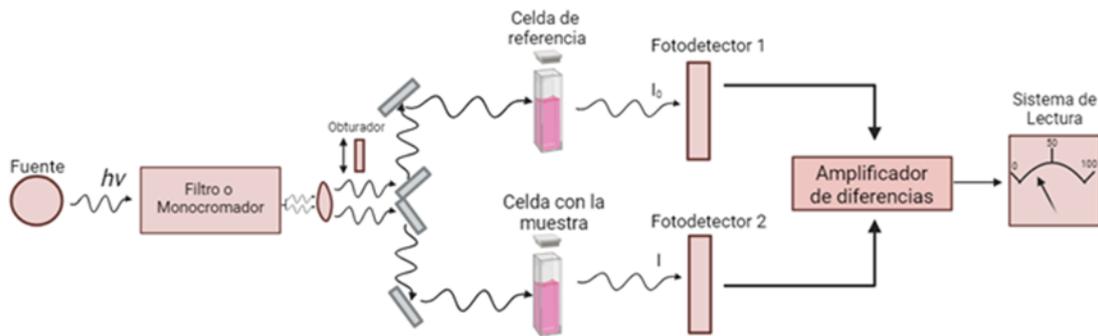


Figura 14. Espectrofotómetro de doble haz, con haces separados en el espacio.

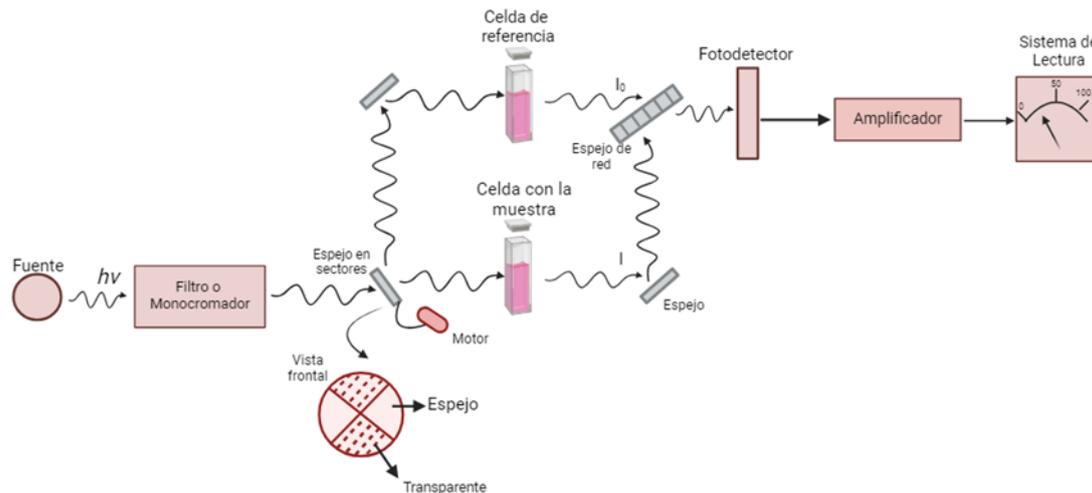


Figura 15. Espectrofotómetro de doble haz, con haces separados en el tiempo.

### Aplicaciones Cuantitativas y Cualitativas de la Espectroscopía de Absorción Ultravioleta Visible

La espectroscopía UV-visible tiene diversas aplicaciones en el ámbito científico y analítico. Esta es aplicable en análisis cualitativos y cuantitativos de sustancias de interés. Utilizando patrones de referencia se pueden realizar comparaciones para la identificación de compuestos, ya para la cuantificación se aprovecha la ley de Beer-Lambert, en la que se la relación de la luz absorbida es proporcional a la concentración de la muestra.

Algunas de sus aplicaciones más comunes son el análisis de control de calidad en la industria farmacéutica, bioquímica, minera, textil, cosmética, alimenticia, petrolera, etc. En donde funciona como una herramienta eficiente para obtener resultados precisos y rápidos con pequeñas cantidades de muestra. Algunas aplicaciones específicas son mediciones de cinética química en donde se monitorean los cambios a lo largo de la reacción, identificación de grupos funcionales en las que se puede determinar la fuerza de las sustancias, determinación cuantitativa de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Planteamiento del problema

La falsificación de fármacos y medicamentos es un problema a nivel mundial. En Venezuela, especialmente, la creciente crisis económica y de salud pública, ha llevado a millones de personas con enfermedades y dolencias a buscar medicinas en el mercado informal, no solo por la escasez sino por los elevados costos que tanto genéricos como de marcas registradas presentan, lo que contribuye al crecimiento de un mercado de medicamentos falsificados. Todo esto da lugar a que investigadores del territorio nacional sientan la necesidad de corroborar la calidad de los medicamentos de fácil acceso al consumidor.

El antihipertensivo en estudio, Captopril, es reportado por la Farmacopea Estadounidense como un medicamento validado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y absorción en el espectro infrarrojo, equipos que requieren de reactivos de alta pureza, personal calificado y elevados costos tanto para el manejo como el mantenimiento de éstos.

Se plantea una alternativa de tratamiento de muestra y análisis para la cuantificación rápida, sencilla, eficaz y de bajo costo para el antihipertensivo captopril, buscando que sea exacta, precisa y de fácil acceso para cualquier analista.

## Hipótesis

- Tomando en cuenta todo lo anterior se plantean las siguientes premisas para el trabajo de investigación:
- El captopril presenta una banda de absorción en la región UV-Vis.
- El captopril presenta solubilidad adecuada en solventes orgánicos clorados.
- La espectroscopía de absorción molecular en el UV-Vis es una técnica de análisis que proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa de interés.
- El método espectrofotométrico para cuantificar el contenido de captopril en diclorometano ofrece una alternativa a la planteada por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP).
- Las diversas presentaciones comerciales del producto farmacéutico de estudio son tabletas de concentración de 25 mg.
- El producto farmacéutico en estudio tiene una demanda moderada por parte de la población venezolana.

En base a estas premisas se plantea la siguiente hipótesis:

*“Es factible el desarrollo de un método alternativo, rápido, eficaz y de bajo costo para la determinación de captopril en presentaciones farmacéuticas sólidas comerciales por medio de la técnica de espectroscopía absorción ultravioleta-visible”.*

### Objetivo General

Determinar la uniformidad del principio activo farmacéutico Captopril utilizado en el tratamiento de la hipertensión en muestras farmacéuticas del estado Mérida, Venezuela.

### Objetivos Específicos

- Diseñar un método analítico para la cuantificación del principio activo Captopril usando la técnica de Espectroscopía de Absorción Molecular en el rango UV-Vis.
- Optimizar las condiciones experimentales para la realización de las medidas con el método propuesto.
- Realizar la respectiva validación del método propuesto para la determinación del principio activo farmacéutico.
- Analizar las muestras obtenidas de las diferentes farmacias establecidas en la ciudad de Mérida, estado Mérida.

### Metodología de trabajo

#### Locación

El desarrollo experimental del trabajo especial de grado, se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Espectroscopía Molecular (LEM), del Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, ubicada en la ciudad de Mérida, Venezuela.

#### Tipo de estudio

El estudio realizado es de tipo univariado, ya que se identificaron y describieron de manera individual los factores que influyen en los resultados. En el método propuesto, cada parámetro fue evaluado por separado, manteniendo las demás constantes, lo que permitió estimar la respuesta óptima del método analítico.

#### Muestras

Las muestras del antihipertensivo, captopril, fueron obtenidas de los distintos establecimientos farmacéuticos del estado Mérida, dichas presentaciones son tabletas y comprimidos recubiertos de 25 mg.

#### Materiales y reactivos

Se utilizó material de vidrio, plástico, metal y porcelana para los procesos del laboratorio, que se detallan en la tabla 1.

Tabla 5. Materiales utilizados			
Material	Capacidad	Marca	Clase/Tolerancia

Espátula metálica			
Filtro de jeringa	5 mL	--	± 0,5 mL
Filtro de membrana de Politetraflouroetileno	47 mm	PallCorporation	--
Envase de vidrio ámbar	120 mL	--	--
Matraz aforado	5 mL		±
	10 mL	Pobe	± 0,025 mL
	25 mL	ElabGlass	± 0,04 mL
Vasos de precipitado	50 mL	Marienfield	

En el caso de los reactivos y equipos utilizados para las actividades experimentales, estos fueron proporcionados de la más alta calidad y pureza, cuyas características se resumen en la tabla 2 y tabla 3 respectivamente.

**Tabla 6. Reactivos utilizados**

Nombre	Formula	Marca	Lote	Grado/Pureza
Agua ultra pura	H <sub>2</sub> O	--	--	18 Ω.cm <sup>-1</sup>
Captopril	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> S	--	V0508015	99,78%
Diclorometano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Merck	8515884	99,95%

**Tabla 7. 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	Termo 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: 2,80 L
			Tiempo: 60 minutos

### Procedimiento Experimental

Se comienza preparando una curva de calibración sencilla, en donde se necesita una serie de soluciones estándar con concentraciones conocidas del analito, en este caso, captopril de alta pureza. Las soluciones se preparan diluyendo una solución madre de concentración alta en diferentes volúmenes de solvente, como el diclorometano (DCM), para obtener una gama de concentraciones crecientes. La solución madre inicial es de concentración  $1 \times 10^{-3}$  M en un volumen de 25 mL, seguidamente se toman los volúmenes correspondientes para las diluciones de cinco soluciones para la curva, en el intervalo de  $(1 - 5) \times 10^{-4}$  M. Este proceso se representa gráficamente en la figura 1.

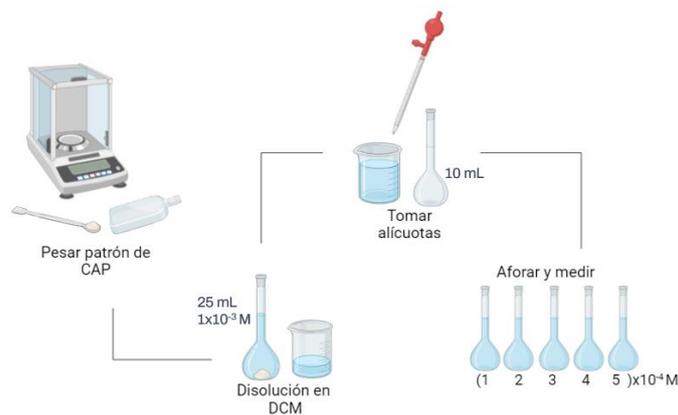


Figura 16. Esquema de preparación de la curva de calibración

Seguidamente se realizan las medidas con el espectrofotómetro, en donde primeramente se configura cada uno de los parámetros del equipo que influyen en el análisis, como el rango de medida que abarca la zona de 220 a 270 nm, 3 ciclos por cada medición, el ancho de banda se fija en 2.0 nm y la velocidad en “Intelliscan”. Luego, se introducen las celdas, la de referencia y la de la muestra (ambas con DCM), se toma la medida de la señal de fondo “background” y de la señal del blanco (solvente), se miden las soluciones patrón de la curva de calibración y, por último, las muestras. Los resultados de medida son registrados y procesados por el software VisionPro™ con el que se aplica el criterio medida seleccionado para posteriormente realizar la determinación de captopril (CAP) por medio de una curva de calibración sencilla.

#### Preparación de la muestra

El contenido de CAP por cada tableta o pastilla es de 25 mg. Partiendo de esta cantidad se prepara la solución de la muestra, en donde inicialmente se toman de manera aleatoria 10 unidades del producto farmacéutico, se pesa cada una para obtener un valor promedio. Estos valores para cada muestra comercial oscilan entre (0,0800 – 0,1400) mg. Luego se trituran hasta obtener un polvo fino homogéneo del cual se toma solo 1/8 parte de producto, valor que se seleccionó con la finalidad de disolverlo en la mínima cantidad de solvente y fuese adecuada para el análisis espectral. Seguidamente, se lleva a cabo un proceso de extracción sólido-líquido, con la finalidad de obtener la mayor cantidad posible del principio activo farmacéutico (PAF) en una solución de muestra de 5 mL. El baño de sonicación se realiza por un tiempo de 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se deja reposar la solución sonicada por un lapso de 5 minutos, para que se nivele la temperatura con la del ambiente ya que, con los gases emitidos por el solvente, esta se calienta. Se procede a filtrar con un sistema de jeringa con acrodisco y una membrana de politetrafluoroetileno de 47 mm. Cada filtrado se recolecta en balones aforados de 10 mL, luego se lleva al aforo con DCM de alta pureza para finalmente realizar una dilución extrayendo 1,4 mL de la solución concentrada para diluirla en un matraz de 5 mL aforado con el solvente para una concentración de  $4 \times 10^{-4}$  M. Este proceso se representa gráficamente en la figura 2.



Figura 17. Esquema de la preparación y tratamiento de la muestra.

### Resultados y discusiones

La primera prueba preliminar realizada en el desarrollo experimental de la determinación de la uniformidad de contenido de CAP fue la selección del solvente. Se requería de un solvente con la capacidad de extraer el principio activo del producto farmacéutico, también que presentara transparencia en la región del ultravioleta y el visible, que fuese estable y solubilizara lo mejor posible el principio activo en estudio presente en los fármacos evitando interferencias que pudiesen afectar las características espectrales y con ello la calidad de la señal instrumental.

Se evaluaron ocho solventes de distinta naturaleza química de los cuales algunos ya han sido utilizados como medio de disolución en desarrollos metodológicos previos para la cuantificación de CAP. Se comenzó agregando un mililitro de solvente adicional hasta observar la solubilización parcial o absoluta en cada prueba como se observa en la tabla 4. Considerando lo reportado en la literatura especializada, el CAP es soluble en solventes polares debido a su naturaleza polar<sup>(50)</sup>. Se comenzó con el solvente universal polar, el agua, sin embargo, este estudio ya se ha reportado por lo que se descarta este solvente como medio. Por otro lado, es oportuno destacar que el CAP es susceptible a los cambios de pH ya que provocarían su dimerización o descomposición, por lo que en análisis con ácidos o en hidróxido de sodio como solventes, se requiere de soluciones buffer en donde también se tendría que estudiar su solubilidad en estos compuestos, complicando la metodología con respecto a parámetros fisicoquímicos y cinéticos de reacción, además de aumentar los costos del análisis<sup>(51)</sup>. También, se consideró la N,N-dimetilformamida, en la que es totalmente soluble, sin embargo, este solvente tiene un costo más elevado que el seleccionado.

Tabla 8. Pruebas de solubilidad			
Solvente	Vol. Ste. (mL)	Patrón Captopril ( $\pm 0,0001$ ) g	Inferencia
Agua	1,0	0,0112	Soluble
Ácido nítrico	1,0	0,0116	Soluble
Ácido sulfúrico	1,0	0,0110	Parcialmente soluble
	2,0		
	3,0		

	4,0		Mayormente soluble
Cloroformo	1,0	0,0112	Parcialmente soluble
	2,0		
	3,0		Mayormente soluble
Diclorometano	1,0	0,0101	Parcialmente soluble
	2,0		
	3,0		Soluble
Hidróxido de sodio	1,0	0,0112	Soluble
Metanol	1,0	0,0109	Soluble
N,N-dimetilformamida	1,0	0,0119	Soluble

Por lo que, tomando en consideración la disponibilidad de cada uno de los demás solventes y el excelente comportamiento soluble del fármaco en estudio se selecciona el DCM como solvente y medio para el análisis. En la figura 4, se observa el espectro de absorción que se obtiene en la región del ultravioleta del DCM, ubicándose cerca del cero, siendo una señal estable y sin picos o interferencias en la región espectral seleccionada para el análisis.

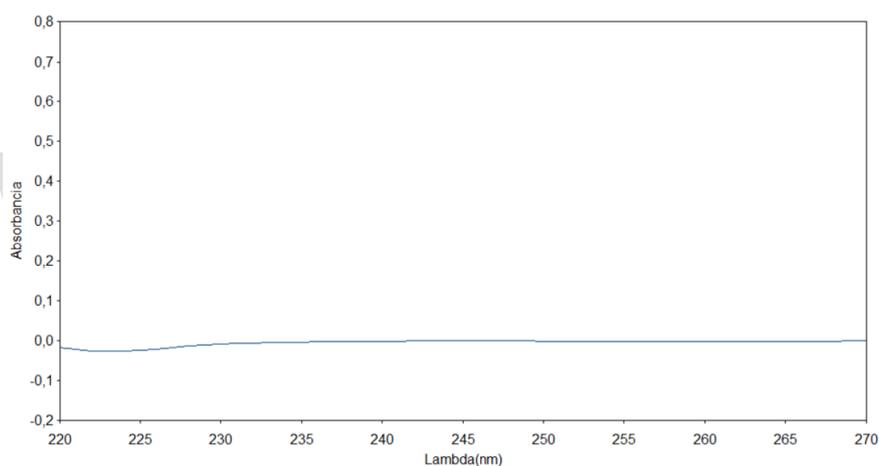


Figura 18. Espectro UV-Vis del blanco diclorometano.

### i. Caracterización Espectral

Esta prueba se realiza con la finalidad de obtener la señal instrumental que se obtiene del analito en el medio seleccionado, por lo que seguidamente, se realizó el espectro de una solución patrón del analito en estudio disuelto en el solvente seleccionado con una concentración de  $4 \times 10^{-4}$  M. Como se observa en la figura 5, la banda de absorción en la longitud de 229 nm es la única que presenta dicho analito en la zona de interés para la determinación y cuantificación del analito en el solvente seleccionado.

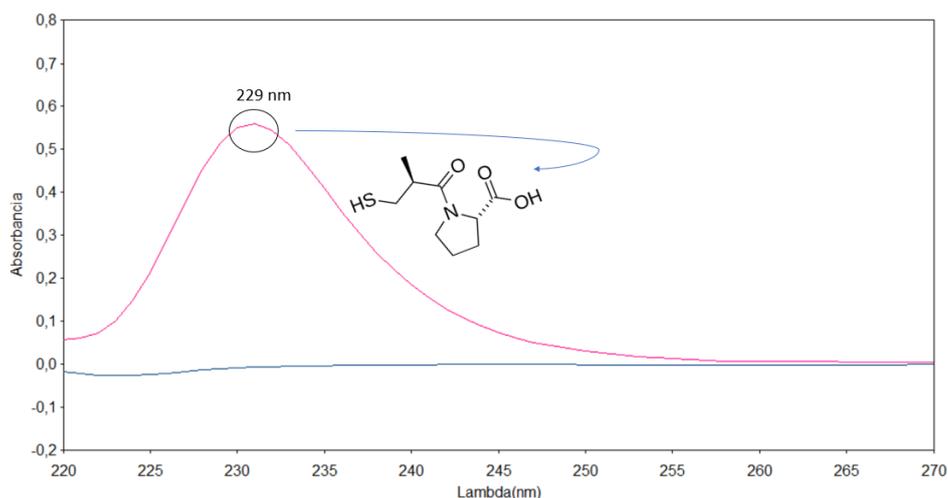


Figura 19. Banda de absorción de una solución de CAP de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M con respecto a la del blanco DCM.

La banda presente del CAP en 229 nm se debe a la promoción de un electrón al estado excitado, dicho electrón proveniente de un grupo funcional cromóforo.

Sugiriéndose de esta manera, que el cromóforo causante de la transición electrónica es el grupo carbonilo (R-C=O) proveniente del ácido carboxílico, en donde la transición electrónica más probable es del tipo  $n \rightarrow \pi^*$ .

## ii. Factibilidad de la metodología propuesta

Para comprobar la factibilidad del sistema en estudio, se realizó una comparación de comportamientos espectrales del analito, es decir, se prepararon tres soluciones diferentes a las que se les realiza una medida instrumental. La primera solución fue un patrón de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M, la segunda solución fue una muestra comercial de concentración estimada de  $4 \times 10^{-4}$  M y la tercera solución una muestra fortificada con una concentración aproximada de  $5 \times 10^{-4}$  M.

Al comparar la respuesta instrumental de cada solución se observa, en primera instancia, el mismo comportamiento espectral entre ellas. El patrón se compara con la muestra comercial verificando de esta manera que la presentación farmacéutica contiene CAP, por lo tanto, es posible su extracción con DCM. También, al contrastar la banda generada por el patrón con la banda de la muestra fortificada se corrobora que ambas soluciones contienen CAP en intervalos de concentración cercanos entre sí como se observa en la figura 6.

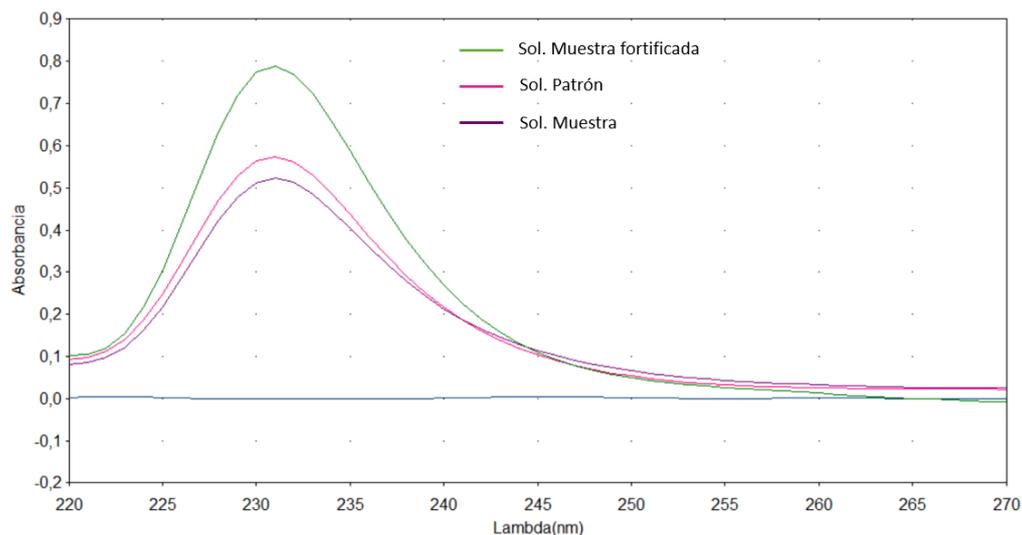


Figura 20. Comparación de los espectros UV-Vis de una solución de muestra fortificada de concentración aproximada  $5 \times 10^{-4}$  M, una solución patrón de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M y una solución de muestra de concentración estimada de  $4 \times 10^{-4}$  M.

De esta manera se evidencia la relación entre el aumento de la señal instrumental con la concentración, así como la reproducibilidad en los espectros de absorción molecular UV-Vis del CAP en las tres soluciones preparadas; considerándose factible la cuantificación del principio activo farmacéutico por medio de la metodología alternativa propuesta en donde el análisis con el solvente orgánico DCM no presenta limitaciones en soluciones patrón o en soluciones de muestras comerciales farmacéuticas para el respectivo análisis espectroscópico.

### iii. Selección de Criterio de Medida

La selección del criterio de medida, es una etapa importante en el análisis espectroscópico molecular, debido a que no siempre la respuesta instrumental coincide con la señal analítica. En muchos casos hay que realizar tratamiento a la data espectral, y esto conlleva realizar operaciones que nos aportan los softwares como: suavizado, corrección de línea-base, deconvolución, normalización, derivada, sustracción, entre otras. Considerando que el análisis propuesto es factible, se procedió al procesamiento de la respuesta instrumental adquirida por el software y el espectrofotómetro. Es fundamental establecer la banda específica a monitorear y definir claramente el criterio de cuantificación. Esto permite una revisión detallada del espectro obtenido, facilitando los ajustes necesarios para luego optimizar los resultados. Al seleccionar adecuadamente estos parámetros, se asegura que los datos obtenidos sean precisos y confiables, lo que es crucial para la interpretación correcta de los resultados y la toma de decisiones. Además, un criterio de medida bien definido permite comparar resultados entre diferentes estudios y laboratorios, garantizando la reproducibilidad y la validez de los experimentos realizados.

La cuantificación del principio activo farmacéutico se evaluó considerando la herramienta del suavizado. Para ello, se aplicó los suavizados; bajo, medio y alto. Obteniéndose la mejor representación gráfica y mejores valores de precisión, para el suavizado alto. Es necesario destacar, que cada suavizado causa la disminución de la absorbancia y el desplazamiento de la longitud de onda del máximo de absorción, como consecuencia, se trabajará como máximo de absorción el valor de 231 nm para la cuantificación.

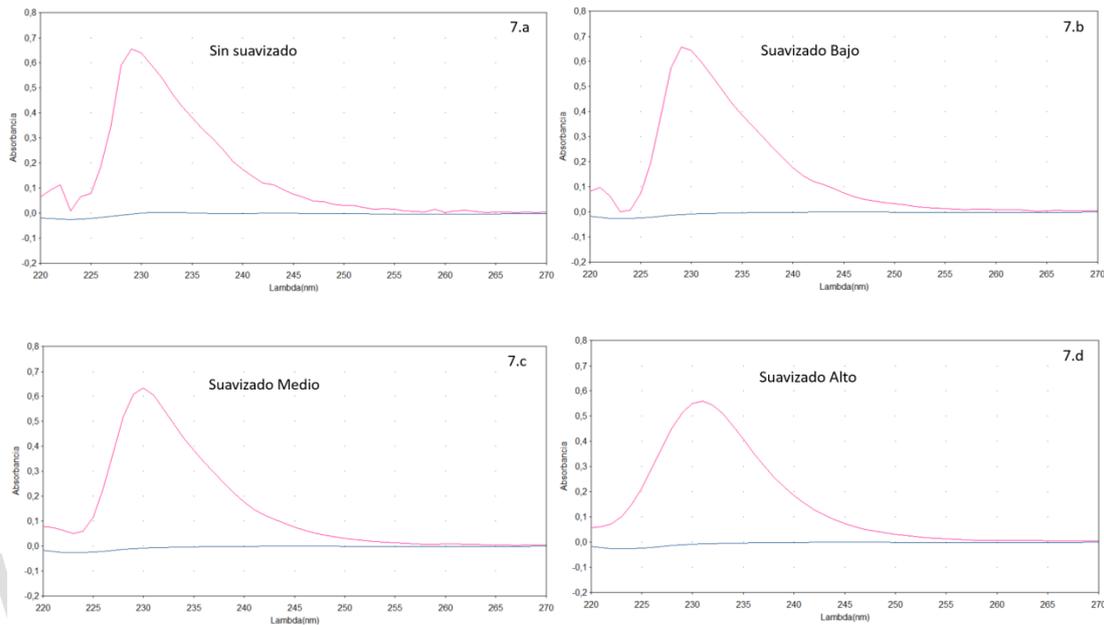


Figura 21. Espectros UV-Vis de una solución estándar de CAP de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M disuelta en DCM. 7.a) Sin suavizar. 7.b) Suavizado bajo. 7.c) Suavizado medio. 7.d) Suavizado alto.

Seguidamente se realizó la medición de una curva de calibración sencilla, presentada en la figura 8, en el intervalo de concentración de  $(1 - 5) \times 10^{-4}$  M, en donde el máximo de absorción de orden cero (D0) de cada solución patrón fue en 231 nm.

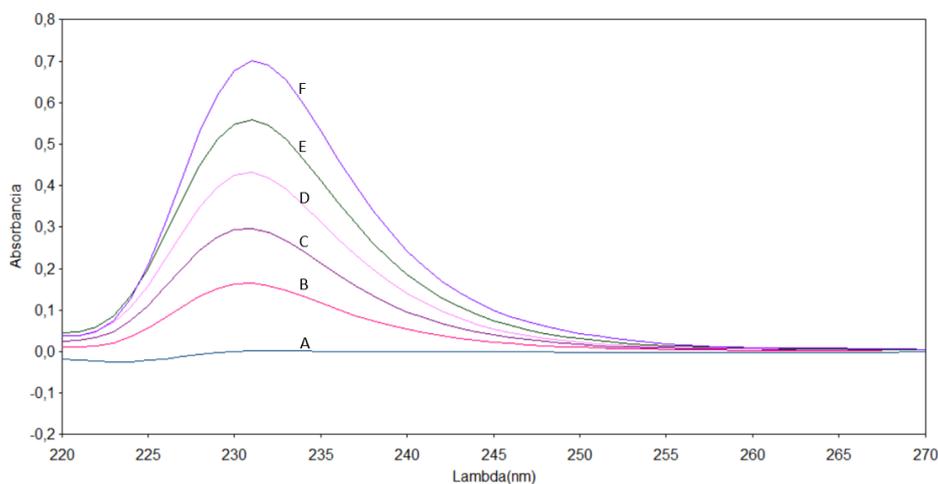


Figura 22. Espectros UV-Vis de curva de calibración sencilla.  
A) Blanco. B)  $1 \times 10^{-4}$  M. C)  $2 \times 10^{-4}$  M. D)  $3 \times 10^{-4}$  M. E)  $4 \times 10^{-4}$  M. F)  $5 \times 10^{-4}$  M.

Cada solución patrón de la curva se analiza con las herramientas, pico de altura y pico de área. En la primera se obtiene el valor de absorbancia máxima de la banda (pico), en la segunda el valor del área de la banda completa. En la figura 8, se representa gráficamente el fundamento de cada herramienta. En la 7.a se esquematiza la medición del máximo de absorción en 231 nm con corrección de línea base por altura de pico entre 222 a 267 nm y en la 7.b la medición del área bajo la curva de la banda de absorción que ocupa el mismo intervalo de longitudes de onda.

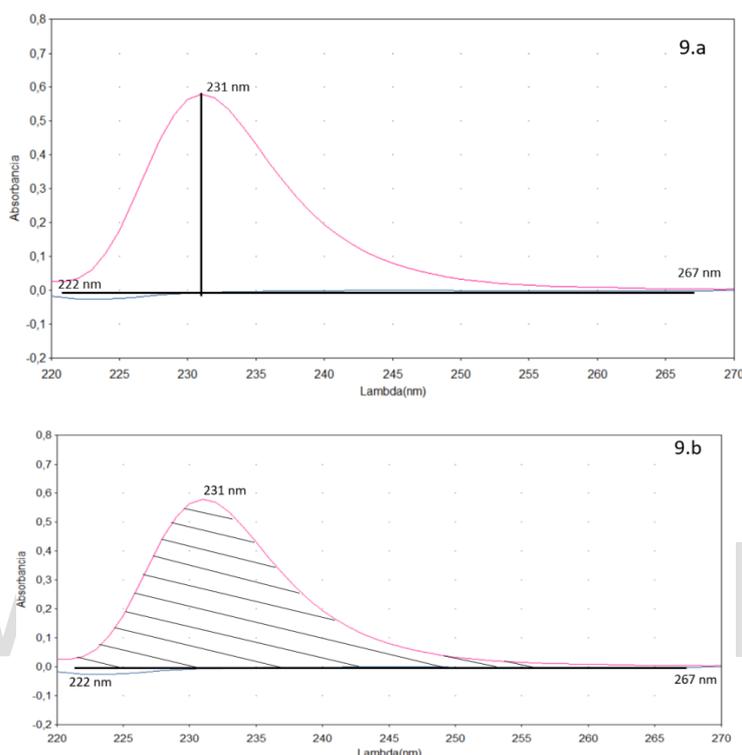


Figura 23. Espectros de los criterios de medias de una banda de CAP de orden cero en soluciones patrón de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M.

En la tabla 5, se presentan los datos correspondientes a la precisión y linealidad de la curva de calibración sencilla, en donde se encuentran valores dentro de los márgenes considerados como aceptables, como el coeficiente de determinación mayor a 0,999 y una desviación estándar relativa (%DER) menor al 5% para el análisis tanto por la altura de pico y el área de pico, sin embargo, en la mayoría de los valores de precisión obtenidos de la altura de pico son menores con respecto a los del área, lo que es indicativo de una menor dispersión de los datos, por lo tanto, la altura de pico será la herramienta elegida como el criterio de medida para la cuantificación.

<b>Tabla 9. Análisis y comparación de la altura de pico y área en la cuantificación.</b>					
Altura de pico en 231 nm entre (222 a 267) nm					
Concentración ( $\times 10^{-4}$ ) mol/L	1	2	3	4	5
1	0,1432	0,2850	0,4183	0,5442	0,6562
2	0,1549	0,2850	0,4123	0,5445	0,6610

3	0,1460	0,2756	0,4046	0,5359	0,6610
Media	0,1480	0,2818	0,4117	0,5415	0,6594
Desviación estándar	0,0061	0,0053	0,0068	0,0048	0,0027
%DSR	4,12	1,89	1,66	0,90	0,42
R <sup>2</sup>	0,9995				
Ecuación lineal	Altura = 1208,8 M + 0,0122				
<b>Área bajo la curva (224 - 267) nm</b>					
Concentración (x10 <sup>-4</sup> ) mol/L	1	2	3	4	5
1	1,5751	3,2858	4,9412	6,5182	7,8464
2	1,7874	3,3133	4,7836	6,4906	7,9741
3	1,5485	3,3135	4,6756	6,3526	7,9813
Media	1,6370	3,3042	4,8001	6,4538	7,9339
Desviación estándar	0,1309	0,0159	0,1335	0,0887	0,0759
%DSR	58,9947	0,4614	2,6989	1,3437	0,9389
R <sup>2</sup>	0,9998				
Ecuación lineal	Base = 15678 M + 0,1269				

Tomando en consideración que las bandas de absorción obtenidas en la región del UV-Vis presentan una estructura gaussiana con el suavizado seleccionado y un excelente comportamiento gráfico con respecto a la sensibilidad, buen coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) y buenos valores para la precisión se utilizó el espectro de absorbancia respecto a la longitud de onda de orden cero (D0) para la cuantificación de la banda en estudio.

### Optimización de los Parámetros Experimentales

Con el criterio de medida ya definido, se procede al desarrollo de la optimización de los parámetros involucrados en el proceso de análisis de las muestras, es decir, mejorar y establecer las condiciones que aseguran la exactitud y precisión de los resultados, minimizar errores y variabilidad en las mediciones. Además, permite reducir costos y tiempo de análisis de manera que otros analistas puedan reproducir el método propuesto y obtener resultados consistentes en la detección y cuantificación del analito. A continuación, se describen los parámetros estudiados para la metodología con una solución patrón de concentración de 4x10<sup>-4</sup> M y una solución de muestra de concentración estimada de 4x10<sup>-4</sup> M siendo estos, tiempo de sonicación, velocidad de barrido, anchura de banda y cantidad de ciclos por medida.

## i. Sonicación

La sonicación consiste en someter las soluciones de las muestras disueltas en el solvente a un proceso de energía que agita las partículas en el solvente para maximizar la disolución y extracción del analito, en este caso se está realizando una extracción sólido/líquido que es el proceso en el cual se separan componentes solubles de una matriz sólida utilizando un disolvente líquido <sup>(52)</sup>. El disolvente entra en contacto con el sólido que contiene los componentes solubles y en efecto, los disuelve. Este proceso es facilitado por la agitación de ondas ultrasónicas (sonicación), el aumento de la temperatura o la reducción del tamaño de las partículas del sólido. Una vez que los componentes solubles se han disuelto, la mezcla se separa. El disolvente con los componentes disueltos se conoce como extracto, mientras que el sólido restante, que aún puede contener algo de disolvente, se llama refinado o residuo, razón por la cual se somete la solución al proceso de filtrado.

En la optimización de este parámetro se aplicó la sonicación a una solución de muestra de concentración estimada de  $4 \times 10^{-4}$  M de CAP en DCM a distintos intervalos de tiempo, los datos registrados se presentan en la tabla 6.

**Tabla 10. Datos de optimización tiempos de sonicación**

Tiempo (min)	Absorbancia	Tiempo (min)	Absorbancia
0	(0,403 ± 0,006)	15	(0,445 ± 0,006)
5	(0,425 ± 0,006)	20	(0,499 ± 0,006)
10	(0,444 ± 0,006)	25	(0,463 ± 0,006)

Se comenzó tomando los espectros de una muestra sin sonicar (tiempo 0) en donde se obtuvo señal, es decir, la muestra sólida contiene buena parte del CAP que puede solubilizarse fácilmente, sin embargo, se le realizó el proceso de sonicación a distintos tiempos para evaluar una mayor extracción, comenzando en intervalos de 5 min hasta llegar a los 25 min en donde se observó un comportamiento creciente de extracción del principio activo en estudio, como se observa en la figura 10, en donde el valor más alto de la altura de pico fue en los 20 min de sonicación, siendo este el valor óptimo para la extracción sólido-líquido. Luego, a los 25 min la muestra presentó un comportamiento decreciente en la altura de pico, esto se atribuye a la dimerización del CAP, que tiende fácilmente a reaccionar con él mismo, cambiando la conjugación del grupo carbonilo responsable de la banda de absorción que se está monitoreando.

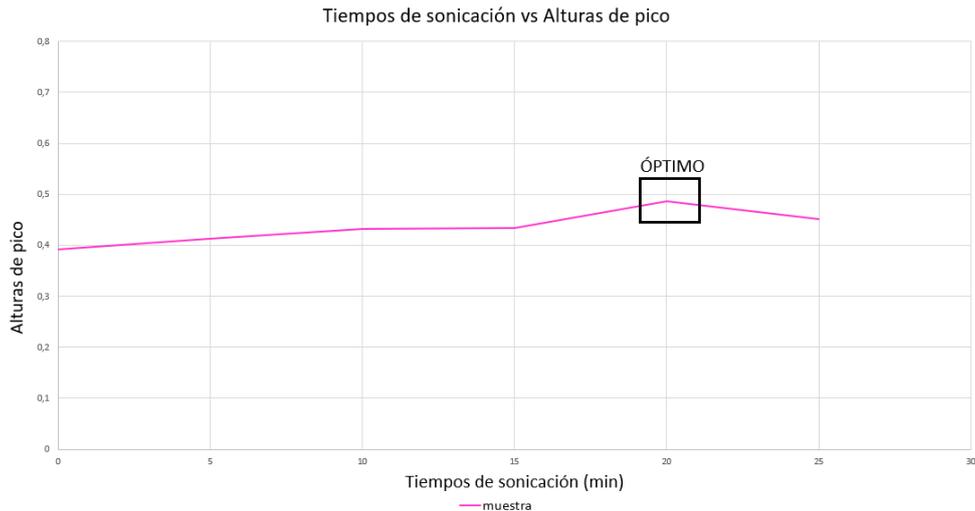


Figura 24. Gráfico de tiempos de sonicación, soluciones de muestra de CAP de concentración estimada de  $4 \times 10^{-4}$  M.

## ii. Velocidad de Barrido

La velocidad de barrido es uno de los parámetros a optimizar ya que es la respuesta instrumental del espectrofotómetro en términos de la longitud de onda (nm) que escanea con respecto al tiempo (min), es decir, es la rapidez con la que el monocromador cambia la longitud de onda de la luz que incide sobre la muestra <sup>(53)</sup>. Su importancia radica en que a mayor velocidad de barrido más rápido se obtiene el espectro de la muestra y como consecuencia, de está depende la cantidad de ruido presente en la medida. Para estudiar este parámetro, se sometió a una muestra y una solución patrón de CAP de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M.

Dichas velocidades de barrido son opciones predeterminadas del equipo, por lo que se escogieron seis de estas, en donde las más rápidas son 3800 y 1200 nm/min, sin embargo, estas opciones no presentan un intervalo de recolección de datos que se acoplara al criterio de medida ya seleccionado, además de ello, éstas no cuentan con una buena resolución para los espectros obtenidos, como se observa en la figura 11.

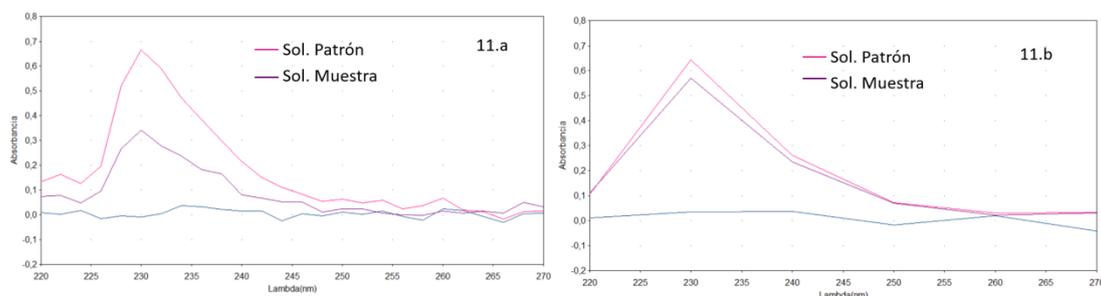


Figura 25. Espectros de medidas de solución patrón de CAP de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M y una solución de muestra de CAP de concentración estimada de  $4 \times 10^{-4}$  M con diferentes velocidades.

11.a) Velocidad 1200 nm/min. 11.b) Velocidad 3800 nm/min.

Tabla 11. Datos de optimización tiempos de sonicación		
Velocidad (nm/min)	Alturas de pico	
	Solución patrón	Muestra
60	(0,481 ± 0,006)	(0,527 ± 0,006)
120	(0,477 ± 0,006)	(0,518 ± 0,006)
600	(0,378 ± 0,006)	(0,415 ± 0,006)
Intelliscan	(0,490 ± 0,006)	(0,522 ± 0,006)

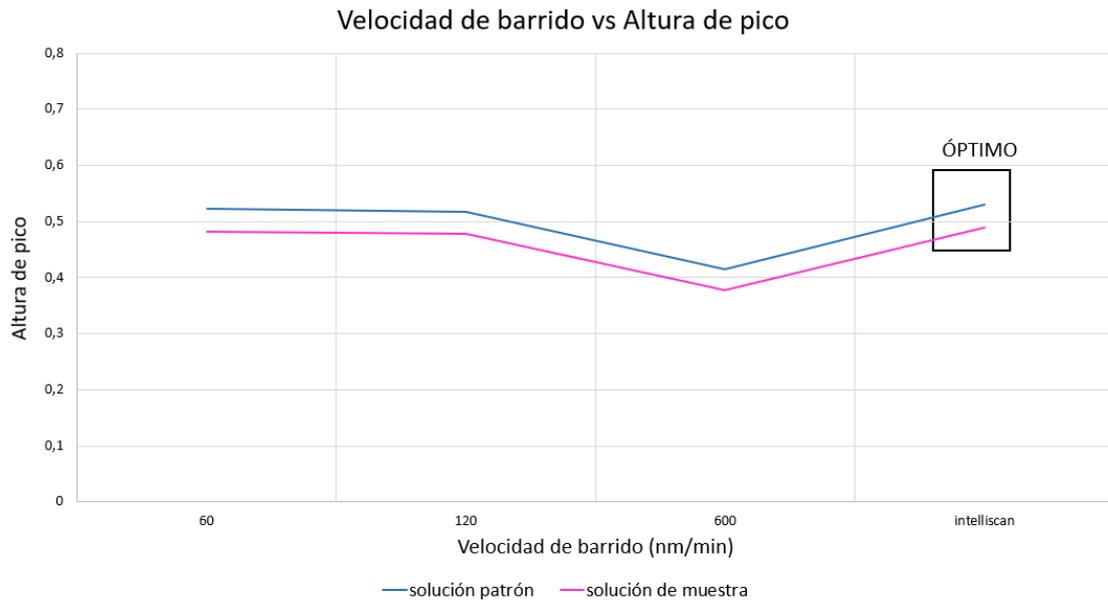


Figura 26. Gráfico de velocidades de barrido optimizadas de una solución patrón de CAP de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M y una solución de muestra de CAP de concentración estimada de  $4 \times 10^{-4}$  M.

Complementario a estos datos se presenta en la figura 13 el espectro de absorción obtenido para la velocidad Intelliscan seleccionada. Con este espectro fue posible aplicar el criterio de medida para la cuantificación, además de presentar un tiempo razonable por medida y buena resolución espectral.

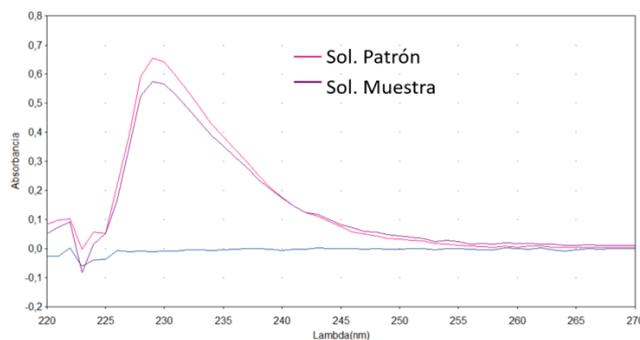


Figura 27. Espectro de medidas de solución patrón de CAP de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M y solución de muestra de CAP de concentración estimada de  $4 \times 10^{-4}$  M con velocidad intelliscan.

### iii. Resolución

La precisión de una medida está influenciada por el ancho de banda, lo que afecta tanto la exactitud de la absorbancia como la relación señal-ruido. Al incrementar el ancho de banda, el instrumento pierde sensibilidad ante las variaciones en la absorbancia, por lo que, modificar este parámetro ayuda a identificar si hay picos no resueltos en el espectro (54).

Los valores de ancho de banda que el equipo proporciona son (0.5 – 1.0 – 1.5 – 2.0 – 4.0) nm, en este caso se realizó el estudio de todos ellos. Los dos primeros valores presentaron exceso de ruido además de esto al aplicar el suavizado alto, elegido como criterio de medida, el espectro obtenido con el ancho de banda de 0.5 nm no fue apto para dicho parámetro, como se observa en la figura 14.

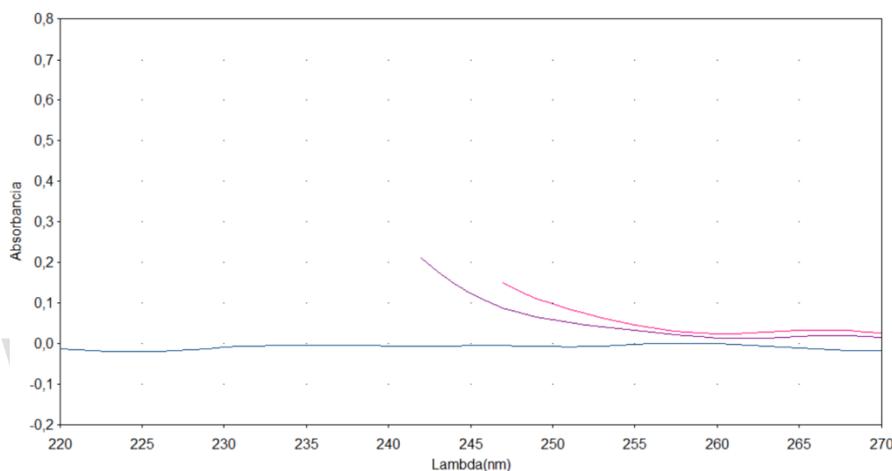


Figura 28. Espectro con criterio de medida aplicado para el ancho de banda de 0.5 nm.

Los espectros obtenidos con los demás valores arrojaron los resultados presentados en la figura 15. Por lo que se seleccionó el valor óptimo en base a la altura de pico obtenida, siendo el valor de 2.0 nm el más aceptable.

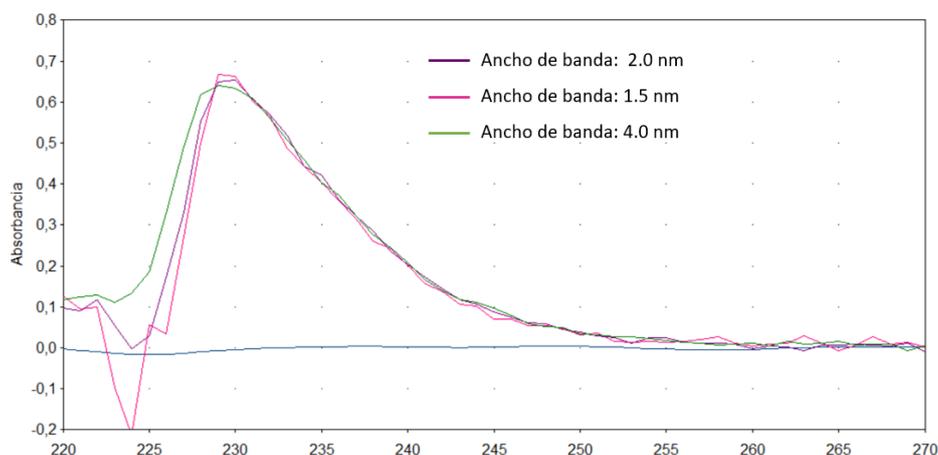


Figura 29. Espectros de medida de solución patrón de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M comparando la resolución por medida.

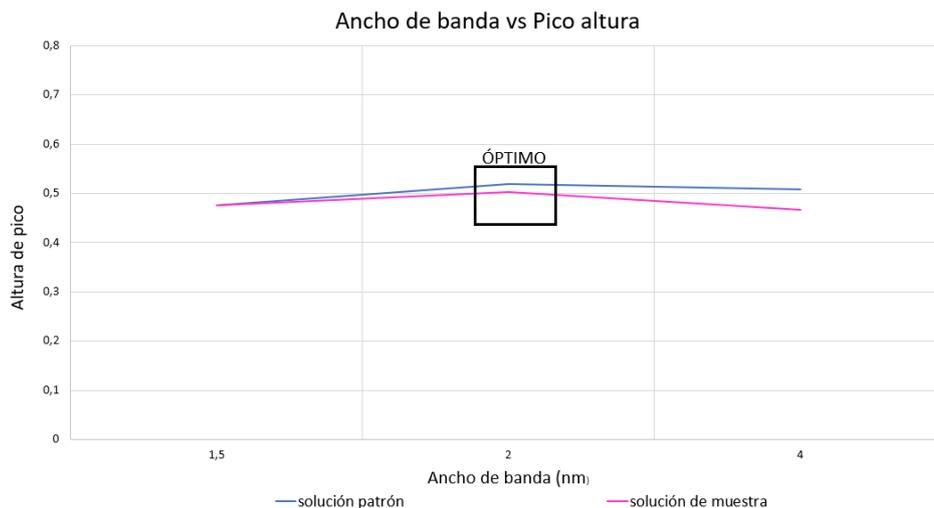


Figura 30. Gráfico de anchos de banda optimizados para una solución patrón de CAP de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M y una solución de muestra de CAP de concentración estimada de  $4 \times 10^{-4}$  M.

Tabla 12. Datos de optimización del ancho de banda		
Ancho de banda	Alturas de pico	
	Solución patrón	Muestras
1.5	(0,476 ± 0,006)	(0,475 ± 0,006)
2.0	(0,520 ± 0,006)	(0,502 ± 0,006)
4.0	(0,508 ± 0,006)	(0,467 ± 0,006)

#### iv. Ciclos

Finalmente, se realizaron las medidas de la cantidad de ciclos que se toman por medida. Se prepararon dos soluciones, una muestra y un patrón, en donde la cantidad de 3 ciclos presentó el mayor valor de pico altura. Los datos de este estudio se presentan en la figura 16 y la tabla 9.

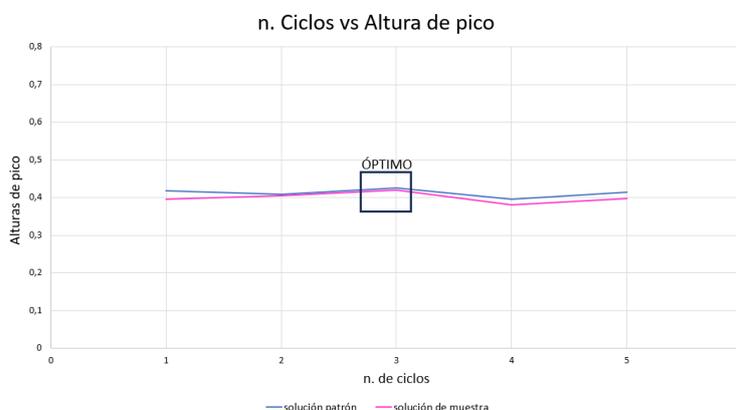


Figura 31. Gráfico de números de ciclos por medida optimizados para una solución patrón de CAP de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M y una solución de muestra de CAP de concentración estimada de  $4 \times 10^{-4}$  M.

<b>Tabla 13. Datos de optimización de ciclos por medida</b>		
Números de ciclos	Alturas de pico	
	Solución patrón	Muestra
1	(0,418 ± 0,006)	(0,396 ± 0,006)
2	(0,408 ± 0,006)	(0,406 ± 0,006)
3	(0,425 ± 0,006)	(0,421 ± 0,006)
4	(0,395 ± 0,006)	(0,381 ± 0,006)
5	(0,414 ± 0,006)	(0,397 ± 0,006)

### Resumen de las condiciones experimentales

Teniendo ya establecidos y analizados los valores óptimos de cada variable experimental establecida para el sistema de medida, se resumen en la tabla 6, detallando la información del tratamiento de la muestra, parámetros del equipo y sus respectivas características, conformando así la metodología alternativa propuesta para la cuantificación de CAP en las muestras comerciales.

<b>Tabla 14. Resumen de las condiciones experimentales</b>	
Equipo	Espectrofotómetro de Absorción Molecular UV-Vis de doble haz espacial
Fuente	Lámpara de arco de xenón
Detector	Fotodiodos de silicio
Intervalo espectral	(220 - 270) nm
Intervalo de longitud de onda a estudiar	(222 - 267) nm
Longitud de onda máxima	231 nm
Resolución	2.0 nm
Velocidad de barrido	Intelliscan
N° Ciclos	3
Condición de medición	D0 vs $\lambda$ nm
Tiempo de sonicación de muestra	20 min; Temperatura ambiente
Solvente	Diclorometano de grado analítico

### Validación del Método Propuesto

El éxito en el desarrollo de un método de análisis es alcanzado cuando este genera resultados confiables y sus características de desempeño son adecuadas; lo que requiere que sean evaluados los parámetros de precisión, exactitud, especificidad, sensibilidad, linealidad y los posibles efectos de interferencias por parte de la matriz de las muestras<sup>(55)</sup>. Durante el proceso de validación, se pueden identificar y corregir posibles errores o limitaciones del método, mejorando así su robustez y fiabilidad. Además, un método validado puede ser reproducible, es decir, está en la capacidad de producir los mismos resultados cuando se aplica en diferentes laboratorios o por diferentes operadores. Para

el método de análisis propuesto, se realizó la respectiva validación del mismo, a continuación, se presentan todas las características evaluadas:

### i. Límites de detección y cuantificación

Este parámetro indica cuales son las mínimas cantidades de analito que puede ser detectada y cuantificada, respectivamente, con un nivel de confianza específico y niveles de precisión y exactitud aceptables. Esta determinación experimental consistió en la dilución de una solución patrón de  $1 \times 10^{-4}$  M, el primer punto de la curva de calibración sencilla, hasta que la señal espectral resultante fuese equivalente al blanco, este punto fue el correspondiente a la dilución 1.32, como se observa en la figura 17. Para el valor del LOD real de la metodología se determinó  $3,13 \times 10^{-6}$  M, seguidamente con la ecuación 1, se obtuvo el LOQ real siendo este valor  $9,47 \times 10^{-6}$  M.

$$LOQ = \frac{10}{3,3} LOD \text{ Ec. 9}$$

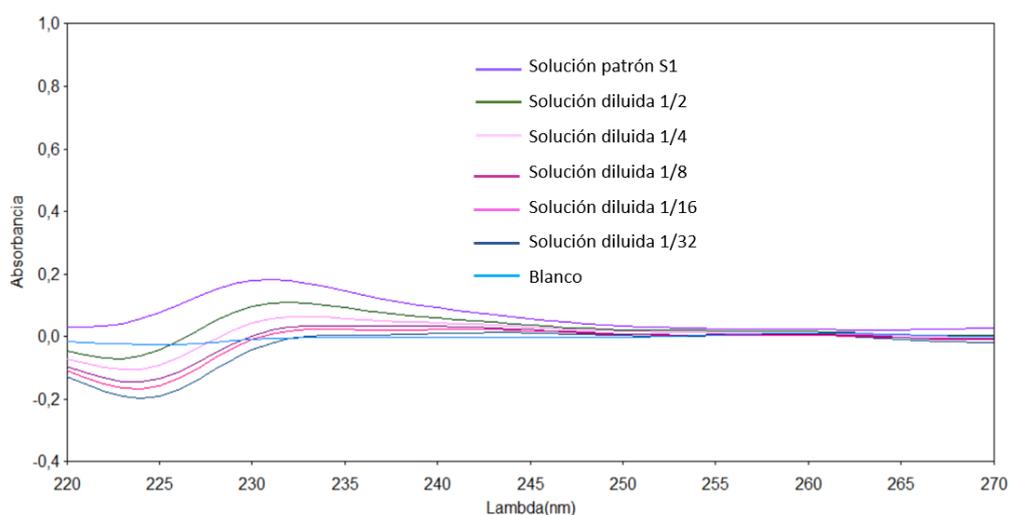


Figura 32. Espectros de las diluciones para la determinación del LOD y LOQ partiendo de una solución patrón de concentración  $4 \times 10^{-4}$  M.

### ii. Linealidad del método

Evaluar la linealidad de un método espectrofotométrico asegura que la respuesta instrumental es directamente proporcional a la concentración del analito en un rango específico, en este caso, que cumpla con Ley de Beer-Lambert. Esto permite obtener resultados precisos, exactos y reproducibles dentro del rango de concentraciones esperado. La determinación de la linealidad de la metodología alternativa propuesta se realizó con la preparación de una curva de calibración con 6 soluciones patrones en un rango de concentraciones de (1, 2, 3, 4, 5, 6)  $\times 10^{-4}$  M de las cuales a partir del último se observó la pérdida de linealidad por lo que se descartó, permaneciendo la curva con solo 5 puntos. De estos 5 puntos se tomaron tres patrones y se analizaron por triplicado (1,

3, 5)  $\times 10^{-4}$  M por medio del criterio de medida ya establecido como se observa en la figura 18.

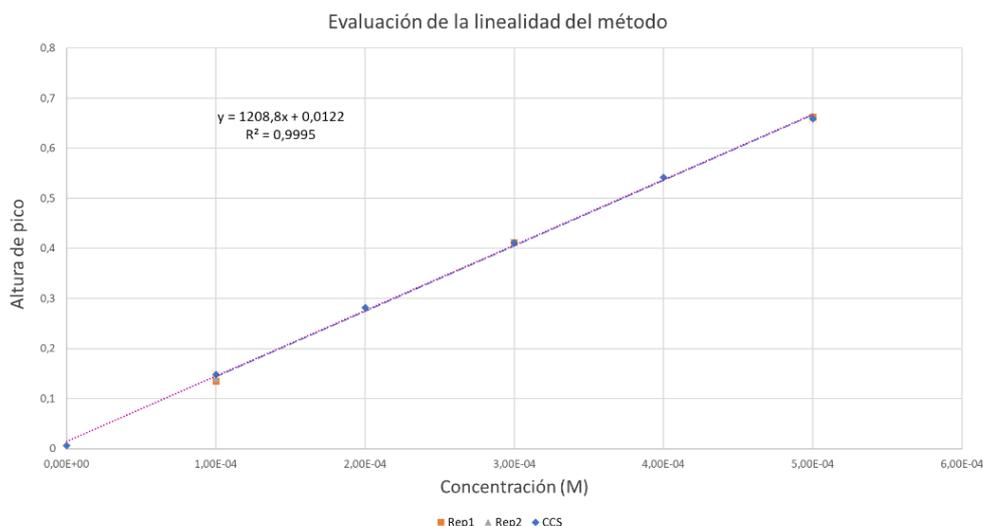


Figura 33. Gráfico de evaluación de la linealidad del método. CCS en un rango de concentración  $(1 - 5) \times 10^{-4}$  M comenzando desde el blanco.

A estos puntos analizados se les determinó la precisión tomando el promedio y calculando la desviación estándar (S) y desviación estándar relativa (%DER), encontrándose que los valores son precisos ya que son menores al 5%. Además, se corroboró la correlación entre la señal espectral de orden cero (D0) por medio del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) al obtener un valor de 0,9995, como se observa en la tabla 7.

Tabla 15. Evaluación linealidad del método			
N° de repetición	$S_1$ ( $1 \times 10^{-4}$ M)	$S_3$ ( $3 \times 10^{-4}$ M)	$S_5$ ( $5 \times 10^{-4}$ M)
1	0,140	0,412	0,663
2	0,134	0,414	0,662
3	0,148	0,418	0,656
$\bar{x}$	0,141	0,411	0,661
S	0,007	0,002	0,002
%DER	4,906	0,049	0,281

A continuación, en la tabla 13 se presentan los valores de las figuras de mérito de la metodología.

Tabla 16. Figuras de mérito de la metodología	
Parámetro	Valor
Longitud de onda	Altura de pico a 231 nm en el intervalo (222 – 267) nm
Pendiente (m)	1208,8
$S_m$	6,1546

Corte (B)	0,0122
S <sub>b</sub>	0,0018
R <sup>2</sup>	0,9995
LOQ (M)	9,47x10 <sup>-6</sup>
LOD (M)	3,13x10 <sup>-6</sup>

### iii. Precisión

Este parámetro se evaluó realizando estudios de repetibilidad y precisión intermedia o reproducibilidad. El primero consiste en verificar que el análisis es consistente cuando lo realiza el mismo analista, en las mismas condiciones y en un corto periodo de tiempo. Para esta se tomaron tres puntos de la curva de calibración sencilla por triplicado, el primero, el de en medio, y el último, es decir, de concentraciones de (1, 3, 5) x10<sup>-4</sup> M y una muestra de concentración estimada de 3x10<sup>-4</sup> M también por triplicado y se les monitoreo por medio del criterio de medida seleccionado. Seguidamente, se les evaluó los valores de desviación estándar (s) y desviación estándar relativa (%DER), todo efectuado por el mismo analista, en el mismo laboratorio con las mismas condiciones (equipo, reactivos y materiales) y en un mismo día, es decir, se realizaron mediciones intradías.

La precisión intermedia se evaluó preparando la misma serie de soluciones patrón, pero con una solución madre independiente bajo las mismas condiciones por dos días consecutivos, monitoreando y realizando los mismos cálculos que en el punto anterior.

Los resultados de estos estudios se presentan en la tabla 10, encontrándose que los datos obtenidos son precisos (%DER < 5%) corroborando que la metodología presenta buena precisión intermedia.

Tabla 17. Estudios de precisión para la metodología alternativa propuesta					
Repetibilidad de la metodología alternativa propuesta					
N° de solución	S <sub>1</sub> (1x10 <sup>-4</sup> M)	S <sub>3</sub> (3x10 <sup>-4</sup> M)	S <sub>5</sub> (5x10 <sup>-4</sup> M)	Muestra (3x10 <sup>-4</sup> M)	
1	0,140	0,410	0,656	0,399	
2	0,140	0,408	0,6556	0,390	
3	0,137	0,400	0,663	0,396	
$\bar{x}$	0,139	0,406	0,658	0,395	
S	0,001	0,005	0,004	0,005	
%DER	1,263	1,308	0,635	1,223	
Precisión intermedia de la metodología alternativa propuesta					
Día 1	N° de solución	S <sub>1</sub> (1x10 <sup>-4</sup> M)	S <sub>3</sub> (5x10 <sup>-4</sup> M)	S <sub>5</sub> (5x10 <sup>-4</sup> M)	Muestra (3x10 <sup>-4</sup> M)
	1	0,139	0,401	0,650	0,376
	2	0,144	0,407	0,655	0,385
	3	0,136	0,401	0,662	0,385
	$\bar{x}$	0,140	0,403	0,656	0,381

	S	0,004	0,003	0,006	0,005
	%DER	3,040	0,766	0,877	1,361
Día 2	1	0,139	0,399	0,645	0,373
	2	0,136	0,410	0,642	0,384
	3	0,140	0,401	0,662	0,387
	$\bar{x}$	0,138	0,403	0,650	0,381
	S	0,001	0,006	0,011	0,007
	%DER	1,432	1,429	1,667	1,788

#### iv. Estabilidad

Este parámetro se estudió con dos soluciones, un patrón de concentración  $4 \times 10^{-4}$  y una muestra de la misma concentración. Se monitoreo la señal analítica de estas soluciones por 5 días consecutivos, dichas soluciones se conservaron en frascos ámbar, sellados con parafina y resguardadas en la nevera, debido al punto de ebullición del solvente ( $40^{\circ}\text{C}$ ). El resultado de este estudio se muestra en la figura 18, en donde se observa como los valores de las alturas de pico aumentan desde el día 1 hasta el día 5, como se esperaba a causa de la volatilización del DCM, en donde se pre-concentra el analito aumentando la señal instrumental, lo que indica una limitación de la metodología propuesta.

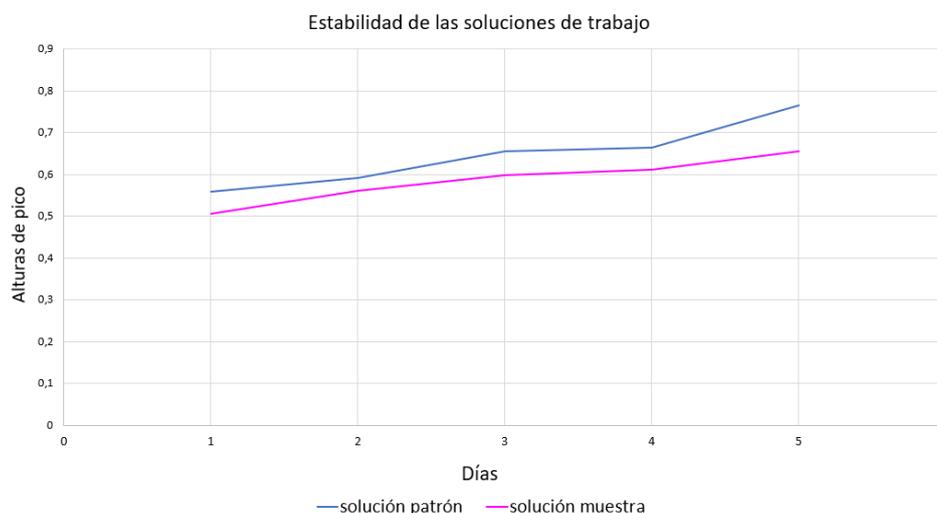


Figura 34. Estudio de estabilidad de las soluciones de trabajo bajo la metodología propuesta.

Con este estudio se presentan la robustez de la metodología propuesta con respecto al patrón y a las muestras farmacéuticas.

#### v. Análisis de Interferencias por parte de la matriz

Las interferencias por los efectos que puede causar la matriz de una muestra en análisis cuantitativo se estudian por medio de una curva de calibrado por adición estándar. Esta se aplica cuando la muestra de interés tiene varios componentes que resultan en efectos

de matriz, donde los aditivos o compuestos adicionales pueden reducir o aumentar la señal de absorbancia del analito ocasionando errores significativos en dichos análisis <sup>(56)</sup>.

Para estudiar estos efectos se aplicó el método de adición estándar clásico, en donde se toman los volúmenes de patrón utilizados en la curva de calibración sencilla (CCS) ya optimizada y se le agrega una cantidad de volumen fijo de muestra, para finalmente enrasar con el solvente a un volumen final constante. Seguidamente se comparan las pendientes de la curva de CCS respecto a las pendientes de la curva de adición estándar (CAE) obtenida para cada muestra, determinando si existen diferencias significativas entre ambos métodos de calibración. Esto se realiza por medio de la prueba F de Fisher y el estadístico t de "Student", para comprobar la homogeneidad o similitud de las varianzas de las rectas de calibrado <sup>(57)</sup>.

El CAP en presentaciones farmacéuticas comerciales generalmente está compuesto por excipientes como almidón de maíz, lactosa, croscarmelosa sódica, dióxido de silicio coloidal, celulosa microcristalina y ácido esteárico. Estos compuestos, a excepción del ácido esteárico, presentan muy poca o nula solubilidad en el solvente DCM, razón por la cual estos se quedan en el residuo luego de la extracción sólido/líquido donde se solubiliza la mayor cantidad del principio activo. En la figura 21 se presentan la curva de calibración sencilla y las curvas de adición estándar para cada muestra, en donde se puede inferir que no existen interferencias por efecto matriz, corroborando que la mayoría de los excipientes permanecen en estado sólido luego de la extracción y que la poca cantidad que queda de estos en solución no afecta significativamente el análisis.

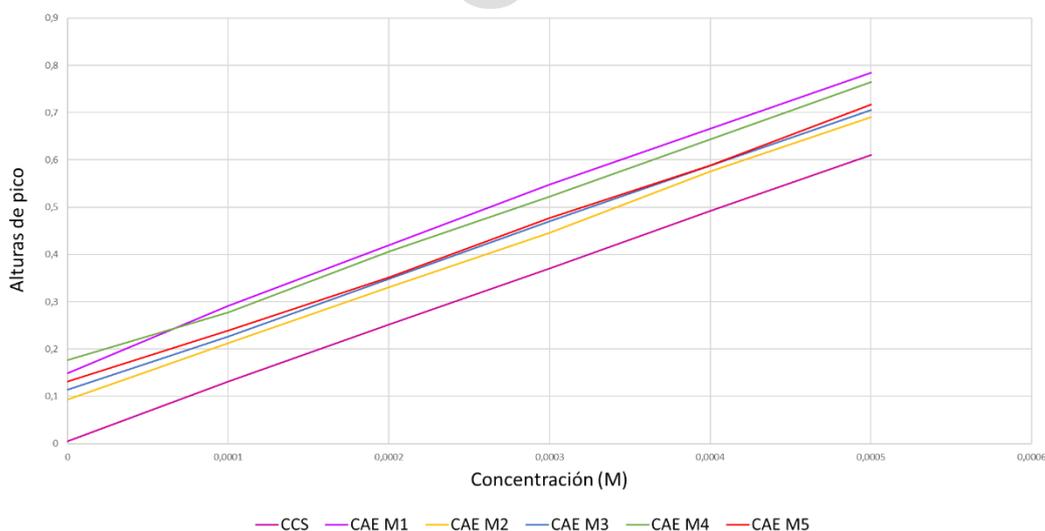


Figura 35. Gráfico comparativo curvas de calibración sencilla y estándar de cada muestra.

En la tabla 12 se presentan las ecuaciones de las rectas de cada curva de adición estándar con la regresión lineal y su coeficiente de correlación.

Tabla 18. Parámetros analíticos de las curvas de calibración de adición estándar		
Nº de muestra	Ecuación de la recta	R <sup>2</sup>
1	Y= (1265,84 M) + (0,158 ± 0,008)	0,9994
2	Y= (1198,1 M) + (0,092 ± 0,002)	0,9998
3	Y= (1187,6 M) + (0,112 ± 0,002)	0,9999
4	Y= (1187,0 M) + (0,168 ± 0,005)	0,9995
5	Y= (1170,4 M) + (0,121 ± 0,008)	0,9995

El análisis de varianzas realizado con la prueba F, aprueba o desaprueba dos opciones. La primera es la hipótesis nula (H<sub>0</sub>), que indica cuando las medias de los datos obtenidos se encuentran distribuidos de manera uniforme presentando la misma desviación estándar, es decir, que estas varianzas son homogéneas (S<sub>1</sub><sup>2</sup>=S<sub>2</sub><sup>2</sup>), o la segunda que es la hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>) que se aprueba cuando no se puede verificar que las varianzas son similares (S<sub>1</sub><sup>2</sup>≠S<sub>2</sub><sup>2</sup>). En la tabla 13, se presentan los resultados de la prueba estadística 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 debe ser menor que un valor de referencia conocido como F crítico.

Tabla 19. Comparación entre varianzas de las pendientes (Prueba F)				
Curva	S <sup>2</sup>	F <sub>cal</sub>	F <sub>crit</sub> (95%)	H <sub>0</sub>
CCS	420,25	-	-	-
CAE M1	903,00	2,15	9,55	ACEPTADA
CAE M2	69,00	6,08	6,59	ACEPTADA
CAE M3	83,36	5,06	6,94	ACEPTADA
CAE M4	377,00	1,11	9,28	ACEPTADA
CAEM5	725,00	1,72	5,79	ACEPTADA

Como se observa en la tabla 13 el análisis de varianzas con la prueba F, proporcionó como resultado que para cada CAE se aprueba la hipótesis nula (H<sub>0</sub>), lo que indica que estadísticamente las desviaciones estándar de cada serie de datos (CCS vs. CAE) son similares (S<sub>1</sub><sup>2</sup>=S<sub>2</sub><sup>2</sup>).

Ahora, se procede a aplicar el estadístico t de "Student" para comparar las pendientes de la CCS con cada una de las pendientes de las CAE de cada muestra, tomando en cuenta el hecho de que sus varianzas resultaron ser homogéneas. Para esto se aplicaron las ecuaciones 2 y 3.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \text{ Ec. 10}$$

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \text{ Ec. 11}$$

En la tabla 14 se presentan los resultados de la prueba estadística t al 95% de confianza ( $1-\alpha = 0,95$ ) en donde la hipótesis nula ( $H_0$ ) se acepta para las 5 muestras analizadas ya que el valor de  $t_{cal} < t_{crit (95\%)}$ , indicando que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las CAE de cada muestra con respecto a la CCS bajo un 95% de confianza para dichas muestras.

<b>Tabla 20. Resultados para la prueba t para la comparación entre curvas (estadístico t)</b>			
Curva	$t_{cal}$	$t_{crit (95\%)}$	$H_0$
CAE M1	2,52	2,77	ACEPTADA
CAE M2	1,53	2,30	ACEPTADA
CAE M3	1,85	2,77	ACEPTADA
CAE M4	1,87	2,36	ACEPTADA
CAE M5	2,55	2,57	ACEPTADA

Con los resultados obtenidos presentados en la tabla 14 para la comparación de pendientes entre las CAE y CCS, más la visualización de dichas curvas que no se interceptan en la figura 21 se puede asumir que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las curvas, es decir, que no existen interferencias por parte de la matriz generadas por los excipientes o demás componentes de las muestras farmacéuticas en análisis. Por lo que, la cuantificación de los ensayos para la determinación de CAP en las muestras comerciales por la metodología alternativa puede realizarse empleando la curva de calibración sencilla.

Después de establecer las características analíticas clave del método desarrollado por medio de la optimización y validación de los parámetros experimentales, se procedió a llevar a cabo los análisis de exactitud de la metodología, es decir, se realizó la cuantificación en muestras farmacéuticas de Captopril en presentaciones de 25 mg.

#### **vi. Exactitud**

El último paso en la validación de la metodología alternativa propuesta para determinar la uniformidad del contenido de Captopril fue evaluar la exactitud del método desarrollado mediante dos enfoques. Primero, se evaluó el porcentaje de recuperación respecto a la cantidad declarada del fármaco. Segundo, se realizó un estudio comparativo entre los resultados del método analítico propuesto y un método de referencia cuya exactitud ya está establecida.

- **Análisis de muestras y porcentaje de recuperación**

Esta evaluación se realizó mediante el análisis de cinco (5) muestras comerciales provenientes de distintos establecimientos farmacéuticos del estado Mérida por medio de la curva de calibración sencilla planteada y evaluada. En la tabla 21, se presentan los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas, las cuales mostraron una precisión aceptable (%DER < 5%), confirmando positivamente este parámetro. Además,

los valores determinados estaban dentro del rango aceptado por la farmacopea (USP - NF) para la determinación de Captopril en tabletas, siendo este (22,5 – 27,5) mg, validando preliminarmente la exactitud del método.

Tabla 21. Análisis de muestras de Captopril empleando la metodología propuesta		
Muestras	Cantidad declarada para el fármaco CAP (mg)	Metodología alternativa propuesta (mg)
1	25	(23, 20 ± 0,04)
2		(24,22 ± 0,02)
3		(23,47 ± 0,04)
4		(16,51 ± 0,01)
5		(23,17 ± 0,04)

Ahora, con el fin de corroborar la exactitud de la información obtenida anteriormente se presentan los porcentajes de recuperación con respecto a la cantidad reportada por cada muestra en su presentación comercial, los cuales se determinaron por medio de la ecuación 12.

$$\%Recuperacion = \frac{Valor\ obtenido}{Valor\ de\ referencia} \times 100 \quad Ec. 12$$

En la tabla 22, se presentan los resultados obtenidos para cada muestra, en donde el porcentaje de recuperación para cada una de estas se encuentra dentro del margen de aceptación declarado por la Farmacopea USP – NF (110% - 90%). Lo que nos indica, que la metodología alternativa propuesta posee un alto potencial para la cuantificación del principio activo farmacéutico Captopril.

Tabla 22. Estudio de recuperación en muestras de Captopril		
Muestras	Valor de aceptación	%Recuperación
1	(90 – 110)%	(105 ± 2)
2		(92± 3)
3		(94± 2)
4		(66± 2)
5		(96± 1)

Finalmente, se realizó el segundo estudio de exactitud, en donde se llevó a cabo la comparación estadística de los resultados obtenidos por la metodología alternativa propuesta y otra metodología validada.

- **Análisis de Muestras por la Metodología de Referencia**

En este caso, se realizó la metodología planteada por la Farmacopea Estadounidense (USP - NF) por medio de la técnica de espectroscopía de absorción molecular en el UV-Vis con HCl como medio de disolución, para contrastar estadísticamente los resultados obtenidos con la metodología alternativa propuesta y así evaluar la veracidad, validez y la aplicabilidad de ésta en el mismo grupo de muestras farmacéuticas comerciales.

Se comenzó pesando 0,1088 g de patrón de alta pureza de CAP, seguidamente se diluyó a un volumen de 10 mL de HCl 0,01 N y luego se sometió a centrifugación. De esta solución concentrada, se partió para preparar el patrón de 500 mL a 0,01 M de concentración. Se tomaron las respectivas alícuotas para un intervalo de  $(1 - 5) \times 10^{-5}M$  en 10 mL, y se realizó una dilución final de cinco veces la solución inicial, y se tomó la medida de la curva.

Con respecto a las muestras, se analizaron las mismas cinco (5) muestras farmacéuticas estudiadas anteriormente, cada una por triplicado. Se pesaron 10 unidades de muestras, se obtuvo un valor promedio equivalente a la unidad, se trituraron y pulverizaron hasta obtener una mezcla homogénea, se tomó la cantidad correspondiente a una pastilla y se disolvió en 10 mL de HCl 0,01 N; luego se sometió cada solución a centrifugación, por 20 min y 50 rpm, se filtraron por gravedad y este concentrado se diluyó a un volumen final de 50 mL, de ésta se tomó un valor de 4,3 mL para una solución final de 25 mL y concentración aproximada de  $4 \times 10^{-5}M$ .

Posteriormente se realizó la medición en el equipo de absorción molecular UV-Vis, donde se monitorizó el máximo en 203nm, cuya curva de calibración dio una recta con ecuación  $Abs = 8438 M - 0,0049$ ; con un coeficiente de determinación de  $R^2 = 0,9969$ . En este sentido, los resultados para el análisis de las muestras farmacéuticas se resumen en la tabla 23.

**Tabla 23. Análisis de muestras por metodología de referencia (USP - NF).**

Muestras	Cantidad declarada del fármaco CAP (mg)	Metodología alternativa (mg)	%Recuperación
1	25	(23,60 ± 0,02)	(94 ± 1)
2		(24,69 ± 0,03)	(99 ± 1)
3		(23,70 ± 0,04)	(95 ± 2)
4		(16,23 ± 0,02)	(65 ± 2)
5		(23,12 ± 0,02)	(93 ± 1)

Como se puede observar en la tabla 23, los resultados obtenidos para la concentración en miligramos se encuentran dentro de un rango aproximado para la unidad declarada de cada una de las muestras (22,5 – 27,5) mg. Además, se puede apreciar que el porcentaje de recuperación se encuentra dentro de los valores de aceptación demarcados por la farmacopea USP -NF (110% - 90%), lo que da un indicativo positivo sobre la exactitud de los resultados y su validez. Sin embargo, como se observa para la muestra 4, el valor de la concentración en miligramos determinada en ambas

metodologías es mucho más bajo de lo que se reporta, por lo que ésta no se acopla al rango demarcado por la farmacopea.

Muestras	Cantidad declarada del fármaco CAP (mg)	Metodología desarrollada (mg)	Metodología alternativa (mg)
1	25	(23, 20 ± 0,04)	(23,60 ± 0,02)
2		(24,22 ± 0,02)	(24,69 ± 0,03)
3		(23,47 ± 0,04)	(23,70 ± 0,04)
4		(16,51 ± 0,01)	(16,23 ± 0,02)
5		(23,17 ± 0,04)	(23,12 ± 0,02)

En la tabla 24, se presentan las concentraciones en miligramos determinadas tanto por la metodología alternativa como por la metodología de referencia aplicada (USP - NF) para cada una de las muestras analizadas. En esta se evidencia, que las muestras 1, 2, 3 y 5, cumplen con los estándares impuestos por la farmacopea estadounidense, correspondiendo los valores de concentración al intervalo de (22,5 – 27,5) mg, sin embargo, la muestra 4 por ambos métodos presentó valores muy cercanos de concentración, corroborando esta información obtenida y demostrando que dicha muestra comercial no presenta la cantidad reportada.

Con base en lo mencionado, se cuentan con los datos necesarios para llevar a cabo el contraste estadístico entre las dos metodologías alternativas y confirmar la exactitud del método desarrollado.

- **Análisis de Significancia entre el Método Desarrollado y el Método de Referencia**

Como siguiente punto en la comparación y validación de resultados, se llevó a cabo el contraste estadístico entre los datos obtenidos por el método desarrollado (tabla 21) y el método de referencia de la farmacopea USP - NF. De esta forma, se pudo evaluar la exactitud de la metodología alternativa propuesta para determinar el contenido de CAP 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 y determinar si existen diferencias significativas entre las varianzas de las medias muestrales, cuyo resultado indicó que se aprueba la hipótesis nula, es decir, que no existen diferencias significativas entre éstas, ya que el valor del  $F_{cal} < F_{proba. (95\%)}$ . Dichos resultados se presentan en la tabla 24.

	Suma de cuadrados	Medios cuadrados	$F_{cal}$	$F_{proba. (95\%)}$
Modelo	0,05827	0,05827	0,00537	0,9434
Error	86,86863	10,85858		

Total	86,9269			
<p><b>*Nota:</b> Hipótesis nula: las medias muestrales son iguales  Hipótesis alternativa: las medias muestrales son diferentes.  En el nivel 0,05; las medias poblacionales no poseen diferencias significativas</p>				

En consecuencia, se realizó la comparación de las medias muestrales con el estadístico t de dos colas al 95% de confianza para varianzas homogéneas. Los resultados para esta se presentan en la tabla 25.

Tabla 26. Resultados para la prueba t para la comparación entre muestras (estadístico t)			
Cantidad declarada del fármaco (mg)	t <sub>cal</sub>	t <sub>crit</sub> (95%)	H <sub>0</sub>
25	0,94	2,30	ACEPTADA
<p><b>*Nota:</b> Hipótesis nula: las medias muestrales son iguales  Hipótesis alternativa: las medias muestrales son diferentes.  En el nivel 0,05; las medias poblacionales no poseen diferencias significativas</p>			

Los resultados obtenidos aprueban la hipótesis nula ya que el  $t_{cal} < t_{crit(95\%)}$ , es decir, no existen diferencias significativas con un 95 % de confianza entre las medidas realizadas por el nuevo método propuesto respecto al método de referencia de la farmacopea USP - NF, indicando que la metodología desarrollada presenta exactitud. Con esto se puede inferir, que el método propuesto es válido y aplicable para el análisis cuantitativo de CAP en productos farmacéuticos en fase sólida (pastillas y comprimidos).

- **Correlación del método propuesto y el método de referencia**

Finalmente, se llevó a cabo un estudio de correlación entre los resultados del método analítico propuesto y el método de referencia.

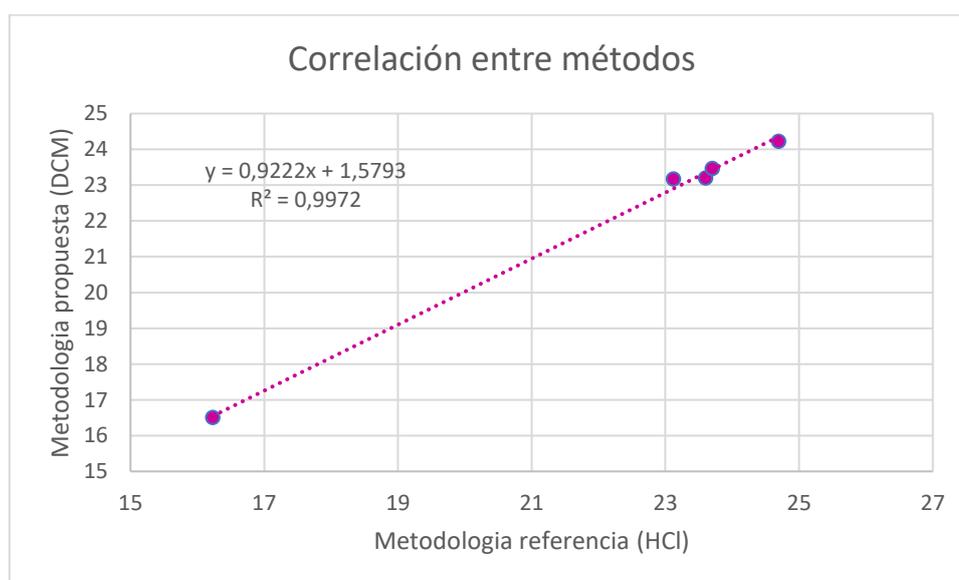


Figura 36. Correlación entre el método propuesto y el método de referencia

La figura 36 presenta los resultados obtenidos para la correlación lineal entre la metodología propuesta con la extracción en diclorometano y el método de referencia aplicado, siendo este valor cercano a 1 para los lotes analizados de cada muestra, indicando que ambas metodologías no presentan diferencias significativas en las medias muestrales. Lo que apunta a que la metodología propuesta es fiable, válida y exacta para realizar la determinación de la uniformidad de contenido del antihipertensivo Captopril en presentaciones de 25 mg para las cinco (5) muestras comerciales analizadas.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

### Conclusiones

- Se ha desarrollado una nueva metodología alternativa para la determinación cuantitativa del fármaco Captopril en tabletas de 25 mg, utilizando la técnica de espectroscopía 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 diclorometano como solvente en la determinación de Captopril 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 espectroscopía 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 Captopril en tabletas de 25 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.

www.bdigital.ula.ve

### **Recomendaciones**

Es aconsejable extender los estudios de trazabilidad de la metodología desarrollada y realizar pruebas de reproducibilidad mediante estudios inter laboratorio. Así, se puede construir una base de datos más robusta y completa sobre la precisión y exactitud del método diseñado.

También se recomienda, cuantificar las muestras comerciales nuevamente variando los lotes de cada una y así, corroborar que todas estas cumplen con la dosificación que se reporta, con el fin de evaluar la muestra que no cumplió con los valores de concentración presentado.

Finalmente, se sugiere proseguir con el desarrollo de nuevos métodos para la determinación cuantitativa de los principios activos en productos farmacéuticos, priorizando que sean rápidos, económicos y sencillos. Esto permitirá ofrecer una alternativa metodológica a la industria farmacéutica, mejorando así las operaciones de control de calidad de los medicamentos terminados.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Referencias Bibliográficas

1. Escuela de postgrado industrial, 2024, Control de Calidad Farmacéutico: ¿qué es y quién lo regula? [En línea], [Citado el: 16 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://postgradoindustrial.com/control-de-calidad-farmaceutico/>
2. Universidad Francisco de Vitoria, 2023, Formación Profesional UFV, ¿Qué es la fabricación de productos farmacéuticos? [En línea], [Citado el: 16 de marzo de 2024]. Disponible en: <https://www.ufv.es/cetys/blog/que-es-la-fabricacion-de-productos-farmaceuticos/>
3. FEUM, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (s.f.). Farmacopeas. <https://farmacopea.org.mx/>
4. Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica. (2010). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Guía de autoevaluación de BPL. Documento técnico n. 6. Disponible en: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Espanol-control-calidad-laboratorios-farmaceuticos.pdf
5. Portal de Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”. Revisado el 5 de marzo de 2024. Disponible en: [https://inhrr.gob.ve/?page\\_id=1096](https://inhrr.gob.ve/?page_id=1096)
6. Cuyas J, (2021) Oficina Económica y Comercial de España en Caracas. FICHAS SECTOR VENEZUELA. Citado el 22 de enero de 2024. Disponible en: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.icex.es/content/dam/es/icex/oficinas/030/documentos/2021/04/documentos-anexos/DOC2021879535.pdf
7. Pérez E., Morales K., Rojas A, Vargas A, (2013), Prueba comparativa de uniformidad de contenido en tabletas de teofilina (150 mg/tab) de dos casas farmacéuticas en Costa Rica, Tecnología en marcha, Vol. 27, N° 2, Abril/Junio 2014. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4835429.pdf>
8. Rang H.P., R G Hill, R.G., (2033). Drug Discovery and Development. 2° Ed. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4299-7.00014-7>
9. Chávez A, (2014), Farmacología general. Una guía de estudio. McGraw-Hill Education. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookId=1489&sectionId=96950107>
10. Food and Drug Administration (U.S.), General Drug Categories, 2024. [En línea], [Citado el 5 de marzo de 2024.] Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/investigational-new-drug-ind-application/general-drug-categories>

11. Kim J, De Jesus O. Vías de administración de Medicamentos, 2023. [En línea]. [Citado el 7 de junio de 2023]. StatPearls. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568677/>
12. Organización Mundial de la Salud (2024). Clasificación Anatómica Terapéutica Química (ATC). [En línea] 2024. [Citado el: 7 de marzo de 2024.] Disponible en: <https://www.who.int/tools/atc-ddd-toolkit/atc-classification>
13. Unger et al. (2020). Directrices de práctica mundial de hipertensión de la Sociedad Internacional de Hipertensión, Hipertensión. Vol. 75, pág. (1334-1357).
14. Organización Mundial de la Salud, 2024. Hipertensión. [En línea]. [Citado el: 28 de enero de 2024] Disponible en: [https://www.who.int/es/health-topics/hypertension#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/hypertension#tab=tab_1)
15. Asociación Americana del Corazón, 2024. Comprender las lecturas de presión arterial. [En línea]. Citado el 7 de junio de 2024. Disponible en: <https://www.goredforwomen.org/es/health-topics/high-blood-pressure/understanding-blood-pressure-readings>
16. Enciclopedia Médica A.D.A.M. Johns Creek (GA): Ebix, Inc., A.D.A.M.; ©1997-2020. Medicamentos antihipertensivos; [En línea]. Citado el 28 enero de 2024. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007484.htm>
17. Benedí, J. (2005, 1 octubre). Antihipertensivos. Farmacias Profesional. Citado el 28 de enero de 2024. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-antihipertensivos-13079693>
18. Organización Mundial de la Salud, 2023. Hipertensión. [En línea]. [Citado el 7 de junio de 2024] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension#:~:text=Si%20no%20se%20trata%2C%20la,Dolor%20en%20el%20pecho>
19. Díaz, S. (2000). Inhibidores de la enzima angiotensina convertasa (IECA). Farmacología e indicaciones terapéuticas. Vol. 19. Núm. 3. Pág. 80-89. Revisado el: 30 de enero de 2024. Disponible en : <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-15466>
20. Quispe, Z. (2015). Estudio comparativo de las propiedades fisicoquímicas de las tabletas de captopril de 25mg en su forma genérica y comercial adquiridos en oficina de farmacia.
21. Souza, J. A. L., et al. Cuantificación del disulfuro de captopril como producto de degradación en tabletas de captopril mediante espectroscopía y quimiometría del infrarrojo cercano, Espectroscopía Vibracional, v. 62, p. 35-41, 2012.
22. ITMI, Instituto Tecnológico del Medicamento Individualizado, (s.f.), Desarrollo, caracterización y estudio de estabilidad de una solución de Captopril 1 mg/mL para su

formulación magistral. Disponible en: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/http://imti.es/ficheros/captopril.pdf

23. Andario, M., 2013, Preformulación y formulación de una forma farmacéutica magistral oral líquida pediátrica de Captopril.

chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis\_sanchez\_gonzalez.pdf

24. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos. Monografías Oficiales de USP

25. Farmacopea Japonesa. Captopril

26. Farmacopea Británica. Oficina Estacionaria de su Majestad, London: electronic versión, 2013. Vols. I-II.

27. Alberio, M.I., Sánchez, C., M.S. Garcá, M.S., (1993). Determinación de captopril en muestras farmacéuticas mediante análisis de inyección de flujo. Elsevier. Volume 11, Issue 10, October 1993, Pages 887-891

28. Hosseinimehr SJ, Ebrahimi P, Hassani N, Mirzabeigi P, Amini M. Determinación espectrofotométrica de captopril con reactivo DTNB en formulación farmacéutica. *BollChim Farm.* 2004 Jul-Aug;143(6):249-51. PMID: 15881803

29. Stulzer, et all. (2006). Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación por espectroscopía UV de captopril en comprimidos de liberación prolongada. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas - Farmacéuticas*, 35(2), 212-223.

30. Suarez, W., Madi. A., Figueiredo-Filho, L., Fatibello-Filho, O. (2007). Sistema espectrofotométrico de inyección de flujo para la determinación de captopril en productos farmacéuticos. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 18, No. 6, 1215-1219, 2007

31. El-Enany N, Belal F, Rizk M. Nuevo método espectrofotométrico para el ensayo de captopril en formas farmacéuticas utilizando 2,6-dicloroquinona-4-clorimida. *Int J BiomedSci.* 2008 Jun;4(2):147-54. PMID: 23675082; PMCID: PMC3614690

32. Schmidt Jr. E, Melchert, W. and Rocha, F. (2009). Determinación yodimétrica por inyección de flujo de captopril en preparaciones farmacéuticas. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, No. 2, 236-242, 2009

33. Tzanavaras, P. (2010). Determinación automatizada de captopril mediante análisis de flujo e inyección secuencial: una revisión. *AnalyticalLetters.* Vol 44, 2011 - Issue 1-3

34. Moldovan, Z. 2012. Un método espectrofotométrico para la determinación de captopril mediante el sistema de fluoresceína natrio-bromo. *Rev. Roum. Chim.*, 2012, 57(7-8), 721-727

35. Alwan, A., Qassim, B., (2017). Indirect Way for the Assay of Captopril Drug in Dosage Forms Using 1,10-Phenanthroline as a Selective Spectrophotometric Agent for Fe (II) Via Homemade CFIA /Merging Zones Technique. Ibn Al-Haitham Journal for Pure and Applied science
36. Florey, K. (1981). Perfiles analíticos de sustancias farmacológicas. Vol 11. Academic Press. Pp 79-137
37. Shi Shen, S. Yang, X. Shi, Y. (2015). Aplicación de RMN cuantitativa para la determinación de la pureza de inhibidores de la ECA estándar. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.
38. Mukoshiwa, S. Khamanga, S. Walker, S. (2017). El uso de un diseño experimental para el desarrollo de un método de electroforesis de zona capilar para la cuantificación de captopril. Pharmazie 72: 518–524 (2017)
39. Rahman, N. Khan, S. (2019). Espectroscopía de dicroísmo circular: un enfoque sencillo para la investigación cuantitativa | Análisis de Captopril y Estudio de su Degradación. ACS Omega 2019, 4, 4252–4258
40. Sayed, D. et al. (2022). Enfoque innovador y ecológico de fluorescencia para el ensayo factible y confiable de tiol que contienen los medicamentos, como modelo: Captopril. RSC Adv., 2022, 12, 17607
41. Zare, M. et al. (2022). Determinación electrocatalítica de captopril en un electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de oro. Journal of Optoelectronic Nanostructures. Autumn 2022 / Vol. 7, No. 4
42. Bunu, S. Ebeshi, B. (2024). Análisis de huellas dactilares titrimétricas y cromatográficas en capa fina de captopril. Forma de dosificación sólida: un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina. Drug Discovery, January 2024
43. Skoog, D., Holler, J. y Crouch, S. Principios de Análisis Instrumental. Ed. 5. México: Cengage Learning, 2008
44. Harris, D. Química Analítica Cuantitativa: W. H. Freeman and Company, 2003
45. Skoog, Douglas A., y otros. Fundamentos de Química Analítica. 9. D. F.: Cengage Learning, 2014.
46. Transiciones electrónicas (s.f.). Química Orgánica. Germán Fernández. <https://www.quimicaorganica.net/transiciones-electronicas-espectroscopia-vis-uv.html>
47. AHSECO Perú, S. A. (s.f). Cubetas para Espectrofotómetros. Disponible en: <http://www.ahsecooperu.com.pe/productos-detalle/cubetas-para-espectrofotometros/>
48. Harvey, D. Química Analítica Moderna. McGraw-Hill Companies, 2000.
49. Harris, D. Química Analítica Cuantitativa: W. H. Freeman and Company, 2003.

50. National Library of Medicine (NIH USA). Captopril. [En línea] 2024.  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Captopril>.
51. Chen. Degradation Rates of Captopril in Aqueous Medium Through Buffer-Catalysis Oxidation. [En línea] 2008. <http://dx.doi.org/10.3109/03639049509026643>.
52. Priego-Capote. Solid–liquid extraction techniques. [En línea] 2021.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822139-6.00002-X>.
53. Instituto Nacional de Metrología de Colombia. GUÍA DE CALIBRACIÓN DE ESPECTROFOTÓMETROS UV-Vis INM/GTM-FR-E/01. [En línea] 2021.  
<https://inm.gov.co/web/wp-content/uploads/2021/11/M-06-F-01-Guia-de-calibracion-espectrofotometros-ISBN.pdf>.
54. Thermo Scientific. VISIONPro User Guide. [En línea] 2021.  
[https://knowledge1.thermofisher.com/Molecular\\_Spectroscopy/Molecular\\_Spectroscopy\\_Software/VISION\\_Operator\\_Manuals/269-188000\\_-\\_Rev\\_A\\_-\\_VISIONPro\\_User\\_Guide](https://knowledge1.thermofisher.com/Molecular_Spectroscopy/Molecular_Spectroscopy_Software/VISION_Operator_Manuals/269-188000_-_Rev_A_-_VISIONPro_User_Guide).
55. Organización Panamericana de la Salud. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. [En línea] 2003.  
[https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13\\_Modulo\\_VALIDACION\\_de\\_Metodos\\_Fisicoqcos.pdf](https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf).
56. Skoog. *Principios de análisis instrumental*. s.l. : Mc Graw Hill, 2007.
57. Miller. *ESTADÍSTICA Y QUIMIOMETRÍA PARA QUÍMICA ANALÍTICA*. s.l. : Pearson Education, 2002.