



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

***DETERMINACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE PROPANOLOL Y LOSARTÁN POR  
ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA

**CINTHYA ALEJANDRA MÁRQUEZ LÓPEZ**

ASESORES

**L.F. RAÚL SAMPIERI CABRERA**

**DRA. LUISA MARTINEZ AGUILAR**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN**

DETERMINACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE PROPRANOLOL Y LOSARTÁN POR  
ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN FARMACIA**

**PRESENTA**

CINTHYA ALEJANDRA MARQUEZ LOPEZ

**ASESORES**

L.F. RAÚL SANPIERI CABRERA  
DRA. LUISA MARTINEZ AGUILAR

# AGRADECIMIENTOS

Tengo tanto que agradecer, y a tantas personas, primeramente tengo que agradecer a Dios por haberme puesto sin duda este reto en mi camino, por haberme dado la capacidad, las ganas y la paciencia para esto y muchas cosas más, por la familia que me ha dado y los amigos que tengo, por la gente que he conocido y por los lugares y situaciones que él ha puesto en mi vida. ¡Gracias Dios mío!

A los mejores abuelitos Juana María Téllez Hernández y Sabino López Muñoz, Gracias, no tengo palabras para agradecerles tanto, doy gracias a Dios por haberme dado a los viejitos más lindos del mundo, gracias por todos esos consejos, por todo el aguante y paciencia que me han tenido, Gracias por todo el amor que me han dado, sin duda esto es de ustedes, por ustedes y para ustedes. Sin su apoyo y su amor, yo no estuviera aquí!!

LOS AMO CON TODO MI CORAZÓN MIS POLLOS!!! Gracias por todo!!

A mi Mamá Sagrario López, gracias Sagui por tu apoyo, por todos los permisos dados, gracias Mami eres lo máximo y te amo muchísimo de verdad, gracias por darme la vida y por aguantarme!! Esto es para ti también.

A Raulito y a Raúl Posadas, gracias también a ustedes, a Raulito por brindarme los momentos más divertidos y los corajes más lindos del mundo, te amo hermano, espero ser un buen ejemplo a seguir cuentas conmigo siempre!! A ti Raúl por brindarme tu apoyo y los consejos que cualquier padre le daría a una hija, de verdad muchísimas gracias.

A mi Papá Fidel Márquez, por el apoyo económico y los consejos que me brindaste los últimos años, a pesar de la distancia y las pocas veces que convivimos has sido pieza clave en este logro. Muchas gracias, esto también es tuyo, te amo!

A mis amigos los chocheros, Ale, Fabi, Marian, Jimmy, Peque, Martita, Juan Carlos chicos los amo de verdad gracias por todos los momentos divertidos que hemos pasado juntos, por los consejos y por quererme tanto como yo los quiero a ustedes, esta etapa de mi vida fue y ha sido maravillosa gracias a ustedes, siempre juntos niños los amo mucho, Gracias a Dios por haberlos puesto en mi vida, no tengo palabras para expresar todo mi agradecimiento los quiero mucho amigos... ¡México, Pumas, Universidad!!

A Pau y a Raúl, Chicos, conocerlos fue una gran experiencia los quiero muchísimo porque con ustedes comencé este camino, saben que los amo mucho amigos, gracias por todo su apoyo, por su paciencia para conmigo y por los momentos divertidos que hemos vivido, los amo!!!

A mis Asesores Raúl Sampieri Cabrera y a la Dra. Luisa Martínez Aguilar, gracias Raúl por toda tu paciencia y tu apoyo para conmigo en este proyecto, por el asesoramiento técnico, muchas gracias. A la Dra. Luisa, gracias por su confianza y por la oportunidad que me ha brindado, Dios la bendiga, Gracias por todo su apoyo!

A mis asesores técnicos por su ayuda y colaboración, Licenciados en Farmacia Raúl Sampieri Cabrera y Anuar Gómez-Tagle Gómez.

Al proyecto PAPIIT - IN 212213-3 y FES-Cuautitlan-Unam Catedra PIAPIC-30

A la máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi Alma Mater y mi segunda casa la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por tantas experiencias vividas y tanto aprendizaje durante los mejores 5 años de mi vida.

A la primera, segunda y tercera generación de la Licenciatura en Farmacia de la FES-Cuautitlán: Alan, Alejandro (Reggage), Carlos, Ray, Yuno, Angie, Roberta, Luisito Prado, Oscar, Christian, Rosa, Andy, Dany, Malú, Noemí, Arturo, Javier, Juan, Ema, Carlos, Oscar por mencionar a algunos, chicos, fueron los mejores compañeros que pude tener. ¡Los quiero mucho!

A mis amiguitos de Laboratorio de Farmacología del Miocardio: Diego, Anuar, Anita, Luis, Rafael y Phanie gracias por su apoyo, los quiero mucho a todos, Diego gracias por aguantarme y por darme tus consejos extremos, te ganaste mi cariño, Anita y Anuar, chicos hicimos clic desde que nos conocimos, gracias por su amistad, los quiero muchísimo. Luis gracias por tus enojos y por los momentos divertidos en el labo, y gracias por tu apoyo, Rafa, sin palabras, gracias por todo, por hacerme reír y enojar, conocerlos ha sido toda una experiencia!! Los quiero mucho a todos.

A la Dra. Piñón gracias por sus consejos y por su comprensión, la admiro por ser tan profesional y tan buena persona, gracias Doctora!

A mis profesores de la carrera, en especial a la Profesora Maru Posada, profesora muchas gracias por todo su apoyo y comprensión, al Profesor José Antonio Garduño por hacerme ser la persona más paciente del mundo, gracias profe, a todos y cada uno de mis profesores, gracias por haber compartido toda su sabiduría. <sup>5</sup>

A los laboratoristas, la señora Reynita y Don Baldo, gracias por todo su apoyo!!

A mis tíos, Paco (QPD), Pilar, Rosa y Mario y a mis primos Sergio, Shelby, Beto, Dany y Fer, chicos si se pudo!!.

A mis padrinos Blanca y Samuel, gracias por sus consejos y su apoyo!! Esto también es para ustedes.

A mis amiguitos de Alfa y Omega, chicos los amo, sin sus oraciones no se en dónde estaría ahora, gracias por aguantar mis intermitencias, pero saben que el cariño es reciproco. Gracias a Dios por ponerlos en mi vida!! Los amo!!

A mis amigos Jenny, Nelly, Karen Pollete, Monse, Karen, Lucy, Luis Angel, Oscar, Ericka, Agustin, Julio, Gerardo amigos gracias por su amistad, a pesar de la distancia, los quiero mucho.

A cada persona que se ha cruzado en mi camino, perdón por no mencionar a todos, pero nunca acabaría, pero eso no les resta importancia, cada uno me ha enseñado algo que me ha sido útil para estar en donde estoy, gracias a todos ustedes, porque este logro también es para ustedes! Gracias por todo, Dios los bendiga!!!!

*“Si quieres tener éxito,  
debes respetar una regla...  
Nunca te mientas a ti mismo”*

*-Anonimo*

# Índice

Índice.....	1
Glosario.....	4
Índice de figuras.....	5
Índice de tablas.....	6
Índice de graficas.....	8
1. Introducción.....	9
2. Objetivo general.....	11
2.1 Objetivos particulares.....	11
3. Hipótesis.....	11
4. Generalidades.....	12
4.1 Espectrofotometría Uv- Visible.....	12
4.1.1 El espectro electromagnético.....	13
4.1.2 Ley de Lambert- Beer.....	16
4.1.3 El espectro de absorción.....	17
4.1.4 Cuando se incumple la ley de Beer.....	18
4.1.5 El espectrofotómetro.....	18
4.1.5.1 Componentes básicos.....	19
4.1.6 Tipos de espectrofotómetros.....	24
4.2 Método analítico.....	27
4.2.1. Clasificación de métodos analíticos.....	27
4.2.2 Métodos analíticos clásicos.....	27
4.2.3 Métodos analíticos instrumentales.....	28
4.2.4 Clasificación de métodos analíticos según la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.....	28
4.2.5.1 Clasificación de métodos analíticos instrumentales.....	30
4.2.5.2 Calibración de un estándar externo.....	30
4.2.5.3 Errores en la calibración de un estándar externo.....	31
4.2.6 Errores sistemáticos durante el proceso de calibración.....	32



4.2.7 Elección de un método analítico.....	33
4.3 Parámetros de validación de un método analítico.....	36
4.4 Hipertensión arterial y fármacos antihipertensivos.....	38
4.4.1 Clasificación de la hipertensión con base en la presión arterial.....	38
4.4.2 Fármacos antihipertensivos.....	39
4.4.3 Fármacos bloqueadores $\beta$ -adrenérgicos.....	40
4.4.4 Fármacos antagonistas de los receptores de angiotensina.....	40
4.5 Propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas de Propranolol.....	41
4.5.1 Propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas.....	42
4.5.2 Propiedades Farmacológicas .....	42
4.6 Propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas y farmacológicas de Losartán.....	43
4.6.1 Propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas.....	44
4.6.2 Propiedades farmacológicas.....	45
5. Metodología.....	46
5.1 Materiales.....	46
5.2. Equipos.....	46
5.3 Reactivos y soluciones.....	46
5.4 Diseño experimental.....	47
5.5 Preparación de la solución stock de Propranolol.....	48
5.5.1 Preparación de la curva de calibración de Propranolol.....	48
5.5.2 Preparación del stock de Losartán.....	49
5.5.3 Preparación del stock de $\text{CuSO}_4$ .....	49
5.5.4 Preparación de la curva de calibración de Losartán.....	50
5.6 Validación de las curvas de calibración .....	51
5.6.1 Validación de la curva de calibración de Propranolol y Losartán.....	51
6. Resultados.....	52
6.1 Validación de la curva de calibración de Propranolol.....	54
6.1.1 Exactitud del sistema.....	54
6.1.2 Linealidad del sistema.....	54
6.1.3 Precisión del sistema.....	56

6.1.4 Reproducibilidad.....	57
6.1.5 Repetibilidad.....	61
6.2 Validación de la curva de calibración de Losartán.....	64
6.2.1 Exactitud del sistema.....	64
6.2.2 Linealidad del sistema.....	64
6.2.2.1 Linealidad del sistema por el método de los mínimos cuadrados.....	64
6.2.3 Precisión del sistema.....	66
6.2.4 Reproducibilidad.....	67
6.2.5 Repetibilidad.....	67
7. Análisis de Resultados.....	74
7.1 Análisis de grupos funcionales de Propranolol.....	74
7.2 Determinación espectrofotométrica de Propranolol.....	74
7.3 Validación del método analítico de Propranolol.....	74
7.3.1 Linealidad del sistema por el método de los mínimos cuadrados.....	77
7.4 Reacción de formación de complejo Losartán-Cobre.....	79
7.4.1.2 Efecto del exceso de reactivo.....	80
7.4.1.3 Efecto del tiempo.....	80
7.4.1.4 Efecto del pH.....	81
7.4.1.5 Efectos de la temperatura.....	81
7.4.1.6 Conformidad con la Ley de Beer.....	81
7.4.1.7 Análisis de la estabilidad del complejo mediante diagrama de zonas de predominio.....	82
7.4.1.8 Diagrama de zonas de predominio.....	84
7.5 Análisis de grupos funcionales de Losartán.....	84
7.6 Determinación espectrofotométrica de Losartán.....	85
7.7 Validación del método analítico de Losartán.....	85
8. Conclusiones.....	87
9. Futuras Perspectivas.....	88
10. Referencias.....	89

# Glosario

A o Abs	Absorbancia
A I	Analista uno
A II	Analista dos
(b)	Longitud del paso óptico
(c)	Concentración de la especie absorbente
cm <sup>-1</sup>	Centímetros a la menos uno
E	Absortividad molar
M <sup>-1</sup>	Molar a la menos uno
M	Molaridad
mg	miligramos
mL	mililitros
μL	microlitros
nm	nanómetros
(P)	potencia
Po	potencia radiante
T	transmitancia
Uv	ultravioleta
Uv-Vis	ultravioleta-visible
Vaso pp	vaso de precipitados

# Índice de figuras

Figura 1 Componentes electromagnéticos de una onda.....	12
Figura 2 Espectro electromagnético y luz visible .....	13
Figura 3 Niveles de energía de los espectros de absorción.....	14
Figura 4 Espectrofotómetro.....	19
Figura 5 Dispersión óptica producida por un prisma.....	22
Figura 6 diagrama esquemático de una medida espectrofotométrica de haz simple.....	25
Figura 7 Diagrama esquemático de una medida espectrofotométrica de doble haz.....	26
Figura 8 Ejemplo de una curva de calibración para determinar isoctano en una muestra de hidrocarburo.....	31
Figura 9 Combinaciones entre los principales fármacos antihipertensivos.....	39
Figura 10 Estructura química de Propranolol.....	41
Figura 11 Estructura química de Losartán.....	43
Figura 12 Cálculo de la recta con mejor ajuste por el método de los mínimos cuadrados.....	78
Figura 13 Fórmulas para calcular la ecuación de la recta con mejor ajuste por el método de los mínimos cuadrados.....	79
Figura 14 Reacción propuesta para la formación del complejo Losartan-Cobre.....	82

## Índice de tablas

Tabla 1 Tipos de transiciones entre los niveles de energía.....	15
Tabla 2 Colores de la luz visible.....	18
Tabla 3 Propiedades físicas y químicas usadas en los métodos instrumentales.....	34
Tabla 4 Criterios numéricos para elegir métodos analíticos.....	35
Tabla 5 Clasificación de la hipertensión con base en los valores de la presión arterial.....	38
Tabla 6 Parámetros estadísticos de la curva de calibración de Propranolol.....	53
Tabla 7 Parámetros estadísticos de la curva de calibración de Losartán.....	53
Tabla 8 Parámetros estadísticos de validación para la exactitud de la curva de calibración de Propranolol.....	54
Tabla 9 Análisis estadístico para obtener el mejor ajuste de la curva de calibración de Propranolol mediante el método de los mínimos cuadrados.....	55
Tabla 10 Comparación de los resultados de linealidad obtenidos por el método de los mínimos cuadrados y por el cálculo del coeficiente de correlación para la curva de calibración de Propranolol.....	56
Tabla 11 Parámetros estadísticos para la reproducibilidad del método analítico de Propranolol por A I.....	58
Tabla 12 Parámetros estadísticos para la reproducibilidad del método analítico de Propranolol por A II.....	60
Tabla 13 Parámetros estadísticos para la repetibilidad del método analítico de Propranolol por A I.....	62
Tabla 14 Resultados finales obtenidos en la validación del método analítico de Propranolol.....	63
Tabla 15 Parámetros estadísticos de validación para la exactitud de la curva de calibración de Losartán.....	64
Tabla 16 Análisis estadístico para obtener el mejor ajuste de la curva de calibración de Losartán por el método de los mínimos cuadrados.....	65
Tabla 17 Comparación de los resultados de linealidad obtenidos por el método de los mínimos cuadrados y por el cálculo del coeficiente de correlación para la curva de calibración de Losartán.....	66
Tabla 18 Parámetros estadísticos para la reproducibilidad del método analítico de Losartán por A I.....	68

Tabla 19 Parámetros estadísticos para la reproducibilidad del método analítico de Losartán por A II.....	70
Tabla 20 Parámetros estadísticos para la repetibilidad del método analítico de Losartán.....	72
Tabla 21 Resultados finales para la validación de la curva de calibración de Losartán.....	73
Tabla 22 Comparación de los resultados finales de validación de los métodos analíticos de Propranolol y Losartán.....	73
Tabla a Preparación de la curva de calibración de Propranolol.....	48
Tabla b Preparación de la curva de calibración de Losartán.....	48

## Índice de gráficas

Gráfica 1 Curva de calibración de Propranolol.....	52
Gráfica 2 Curva de calibración de Losartán.....	52
Gráfica 3 Curva de calibración para la reproducibilidad del método analítico de Propranolol por A I.....	57
Gráfica 4 Curva de calibración para la reproducibilidad del método analítico de Propranolol por A II.....	57
Gráfica 5 Tercera curva de calibración realizada por el primer analista.....	58
Gráfica 6 Primera curva de calibración realizada por el segundo analista.....	59
Gráfica 7 Segunda curva de calibración realizada por el segundo analista.....	59
Gráfica 8 Tercera curva de calibración realizada por el segundo analista.....	60
Gráfica 9 Primera curva de calibración realizada por el primer analista.....	61
Gráfica 10 Segunda curva de calibración realizada por el primer analista.....	61
Gráfica 11 Tercera curva de calibración realizada por el primer analista.....	62
Gráfica 12 Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.....	67
Gráfica 13 Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.....	67
Gráfica 14 Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.....	68
Gráfica 15 Curva de calibración de Losartán realizada por el segundo analista.....	69
Gráfica 16 Curva de calibración de Losartán realizada por el segundo analista.....	69
Gráfica 17 Curva de calibración de Losartán realizada por el segundo analista.....	70
Gráfica 18 Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.....	71
Gráfica 19 Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.....	71
Gráfica 20 Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.....	72
Gráfica 21 Diagrama de zonas de predominio del complejo Losartán-Cobre.....	84

# 1. Introducción

La determinación de métodos analíticos de fácil ejecución y bajo costo es una necesidad para el estudio de fármacos, poder diseñarlos utilizando espectrofotometría UV/Vis permite reducir costos de operación, capacitación del analista así como optimizar su ejecución. Las características fisicoquímicas de los fármacos brindan cualidades indispensables en la elección de la metodología analítica a desarrollar, muchas veces estas características impiden su cuantificación por equipos UV/Vis, por lo que es necesaria la formación de complejos que permitan su determinación por estos equipos.

La utilización de la técnica analítica de espectrofotometría UV/Vis permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Básicamente esta técnica se fundamenta en la absorción de las radiaciones electromagnéticas de las moléculas, por lo tanto la cantidad de luz que puede absorber una molécula se relaciona directamente con la concentración. El equipo que se utiliza para determinar estas mediciones se conoce como espectrofotómetro, mediante el cual podemos elegir la longitud de onda de la luz que pasará a través de la solución y así poder medir la cantidad de luz que es absorbida por la solución. (Ayres, 1970)

Un método analítico se define como la secuencia de acciones establecidas que se llevan a cabo con el objetivo de determinar cuantitativamente o cualitativamente una especie química en una muestra determinada, para lo cual se necesita de una técnica analítica específica. Para decidir si un método analítico es adecuado se debe demostrar su validez en la resolución del problema analítico, para ello, se evalúan ciertos parámetros de calidad, los cuales demuestran la validez del método. Para comprobar que el método analítico desarrollado cumple con el objetivo deseado se realiza la validación de éste, de esta manera la validación queda definida como el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. (Guía de validación de métodos analíticos, colegio QFB, 2002)

En este trabajo experimental, se propone el desarrollo del método analítico de Losartán mediante la formación de un complejo con sulfato de cobre y por otro lado, la determinación del método analítico de Propanolol, ambos en medio acuoso. Estos



fármacos pertenecen al grupo de fármacos antihipertensivos, el estudio de estos fármacos así como la implementación de nuevos métodos e investigaciones es de suma importancia ya que como sabemos la hipertensión arterial es un grave problema de salud en México, la prevalencia de presión arterial alta, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, tomando en cuenta los criterios establecidos para la población de 20 años y más, es de 33.33 en hombres y de 30.8 en mujeres de cada 100 personas de este grupo de edad y sexo. (ENSANU, 2012)

El desarrollo de estos métodos apoyara la determinación de estos fármacos en plasma sanguíneo.

## 2. Objetivo General

Desarrollar y validar el método analítico de Propranolol y Losartán mediante la elaboración de curvas de calibración para la cuantificación de ambos fármacos por espectrofotometría UV/Vis.

### 2.1 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones para la elaboración de las curvas de calibración de Propranolol y Losartán.
- Validar el método analítico para Propranolol y Losartán.

## 3. Hipótesis

La formación de un complejo colorido de Losartán con sulfato de cobre a través de una reacción de complejacion permitirá el desarrollo y validación de un método analítico utilizando la técnica de espectrofotometría UV/Vis para la posterior cuantificación de Losartán.

Mediante la realización de curvas de calibración de Propranolol en solución se desarrollara y validara un método analítico utilizando la técnica de espectrofotometría UV/Vis para la posterior cuantificación de Propranolol.

## 4. Generalidades

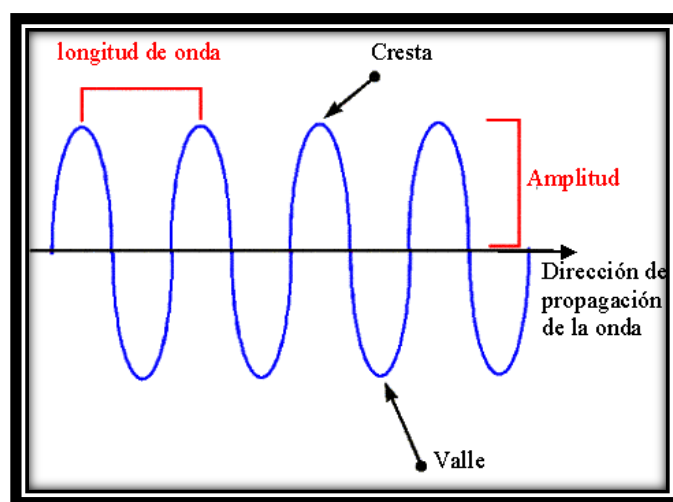
### 4.1 Espectrofotometría Uv-Visible

La espectroscopia de absorción consiste en la medición e interpretación de fenómenos de absorción, dispersión o emisión de radiación electromagnética que ocurren en átomos, moléculas y otras especies químicas. Esta absorción o emisión se encuentra asociada a los cambios de estados de energía. (Skoog D.A., et al 2001).

La radiación electromagnética se representa como un campo eléctrico y otro magnético, con oscilaciones sinusoidales en un ángulo recto de uno respecto al otro y a una dirección de propagación. Existen componentes eléctricos y magnéticos en la onda de luz dispuestos en ángulo recto entre sí.

Puede considerarse a la radiación electromagnética como una onda que viaja a la velocidad de la luz, esta radiación se encuentra constituida por partículas conocidas como fotones, los cuales son partículas discretas (cuantos) de energía, estas partículas de energía son emitidas por una fuente y caracterizadas por una onda electromagnética.

La longitud de onda de una radiación es definida como la distancia que existe entre los máximos de cualquiera de los componentes electromagnéticos de una onda. Como se observa en la figura 1.

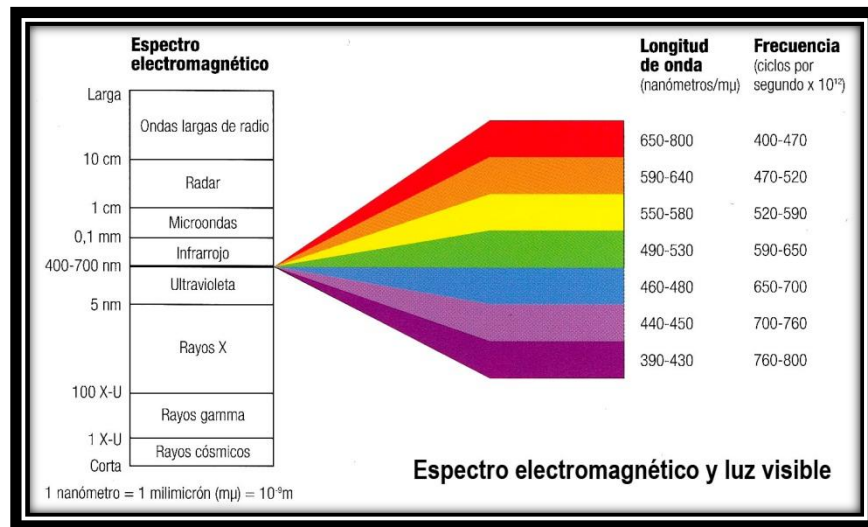


**Figura 1.** Componentes electromagnéticos de una onda. Se muestra la longitud de onda, cresta, valle y amplitud (Recuperado de <http://www.google.com.mx/imagenes./search?51365454=456>)

Otro concepto importante relacionado con la longitud de onda es la frecuencia, la cual hace referencia al número de ondas que pasan por un punto dado, P, por unidad de tiempo. (Skoog D.A., et al 2005)

#### 4.1.1 El espectro electromagnético

La interacción de la materia con la radiación ocurre en todo el espectro electromagnético, el amplio intervalo de radiaciones que se extiende desde los rayos cósmicos, hasta las ondas de radio. Dentro de esos extremos y comenzando desde las longitudes de onda más cortas tenemos los rayos X, rayos UV, la porción UV visible, los rayos infrarrojos y las micro radio ondas. La naturaleza de estas radiaciones es la misma y todas se desplazan a la velocidad de la luz, sus diferencias se encuentran en la frecuencia, la longitud de onda y los efectos que producen en la materia. La región ultravioleta visible se define como la radiación asociada a la absorción en un intervalo de 200 a 700 nm, para la región de ultravioleta corresponde una longitud de onda de 200 a 400nm y para la región visible la longitud de onda es de 400 a 700 nm. (Skoog D.A., et al 2001). Como se observa en la figura 2.



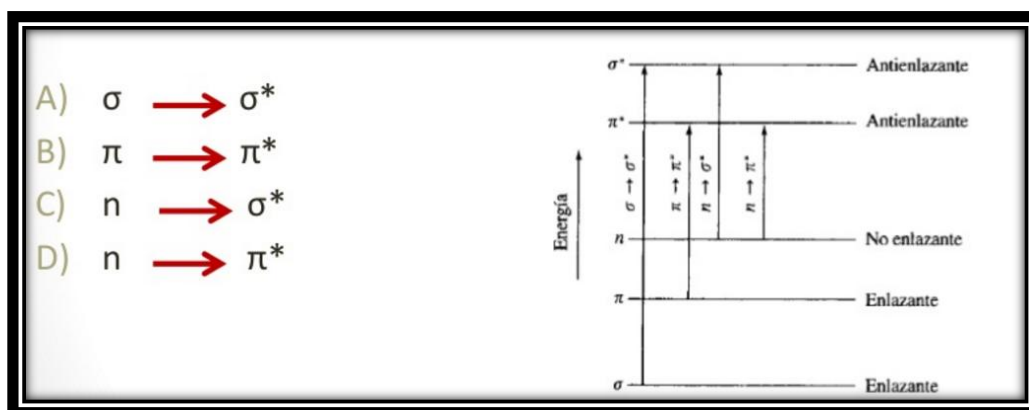
**Figura 2.** Espectro Electromagnético y luz visible. Longitudes de onda que abarca el espectro electromagnético y luz visible. (Recuperado de

<http://www.google.com.mx/imagenes./search?espectro+electr51314220=8814>)

La absorción de fotones en esta región del espectro electromagnético se debe a la presencia de grupos funcionales de la molécula a los cuales se les llama cromóforos. Este tipo de grupos puede ser desde un par de electrones de no enlace, hasta una serie de dobles enlaces conjugados y varios grupos funcionales como por ejemplo el grupo carbonilo, nitro, entre otros (Skoog D.A., 2001).

La absorción de una sustancia depende directamente de la cantidad de grupos absorbentes que presente el compuesto, por lo que a mayor cantidad de grupos la de longitud de onda a la que absorba el compuesto será mayor. Los fotones de energía que se emiten en la región UV-Vis son capaces de hacer que los electrones de una molécula puedan ser elevados a un nivel mayor de energía, para que se pueda llevar a cabo la excitación de electrones de valencia de los átomos es necesario que el compuesto absorba un fotón (Harvey, D 2002).

Cuando una partícula absorbe un fotón, la energía de la partícula se encuentra en un estado de excitado y cuando una partícula emite un fotón, su energía disminuye por lo que se encuentra en un estado menor de energía denominado estado basal o fundamental, como se observa en la figura 3.



**Figura 3.** Niveles de energía de los espectros de absorción. Niveles de energía por los que pasa un electrón de cierta molécula cuando absorbe o emite un fotón. (Recuperado de <http://www.google.com.mx/imagenes./search?/jhgdg=354687niveles+de+enegias8987=88>)

Los espectros moleculares de Uv- Vis se deben principalmente a cuatro tipos de transiciones entre los niveles de energía. En la tabla 1 se observan las principales transiciones que se llevan cabo en la espectrofotometría Uv-Vis, las longitudes de onda a las cuales se llevan a cabo todas ellas y algunos ejemplos. (Daniel, et al 1997)

**Tabla 1** Tipos de transiciones entre los niveles de energía.

Tipo de transición	Rango de longitudes de onda (nm)	Ejemplos
$\alpha \rightarrow \alpha^*$	Menor a 200 nm	C-C, C-H
$n \rightarrow \alpha^*$	160-260	H <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> OH, CH <sub>3</sub> Cl
$\pi \rightarrow \pi^*$	200-500	C=O, C=N, N=N, N=O
$n \rightarrow \pi^*$	250-600	

La espectroscopia de absorción está basada en la medida de la transmitancia (T) o de la absorbancia (A) de disoluciones que se encuentran en celdas transparentes que tienen un paso óptico (b) en cm.

Cuando una muestra absorbe luz, la potencia radiante del haz de luz disminuye. La potencia radiante (P) se evalúa como energía por segundo por unidad de área del haz de luz. La luz poli cromática se hace pasar por un monocromador (un filtro de absorción, una rejilla de difracción o un prisma para aislar una longitud de onda). Este rayo de luz monocromática de potencia radiante (Po) incide sobre una muestra de espesor (b) la potencia radiante del haz emergente es (P), la muestra puede absorber una fracción de la luz, de manera que  $P \leq P_o$ .

La transmitancia (T) se define como la fracción de luz que traspasa la muestra, es la manera en la que se mide la atenuación de un haz luminoso basado en la comparación entre la intensidad de la radiación transmitida ecuación 1.

$$T = \frac{P}{P_0} \text{(Ecuación 1)}$$

Dónde:

T: Transmitancia

P: intensidad de la radiación que emerge después de atravesar la disolución que contiene la especie absorbente.

P<sub>0</sub>: radiación de la intensidad incidente.

Por lo tanto T puede valer de 0 a 1. El porcentaje de transmitancia es simplemente 100T y puede valer desde 0 a 100%.

La absorbancia se define como:

$$A = \log_{10} \frac{P_0}{P} = -\log T \text{(Ecuación 2)}$$

Cuando no se absorbe luz, P=P<sub>0</sub> y A=0. Si se absorbe el 90 % de luz se transmite el 10%, y P=P<sub>0</sub> /10. Este cociente vale A=1. Si solamente se transmite el 1% de la luz A=2. La absorbancia a veces se llama también densidad óptica.

La absorbancia es importante porque es directamente proporcional a la concentración de la especie que absorbe la luz en la muestra. (Skoog, et al. 2002).

#### 4.1.2 Ley de Lambert-Beer

La absorbancia es una magnitud de mayor utilidad en espectrofotometría, la cual está definida por la ecuación conocida como ley de Lambert-Beer. Esta ley fue establecida gracias a los trabajos del matemático francés Lambert y al físico alemán Beer, los cuales fundamentaron las bases de la fotometría. La fórmula que describe el comportamiento de la absorbancia con respecto a la concentración del analito absorbente es la ecuación siguiente:

$$A^\lambda = \epsilon_x b^\lambda C^x \text{(Ecuación 3)}$$

Dónde:

A: Absorbancia adimensional

$\epsilon$ : Coeficiente de absortividad de la especie

b: longitud del paso óptico (celda)

C: Concentración de la especie absorbente

$\lambda$ : Una determinada longitud de onda.

La ecuación 3 muestra la relación de proporcionalidad de la absorbancia con la concentración del analito. La absorbancia es adimensional, la concentración de la muestra C, normalmente viene dada en unidades de mol/L (M). El paso óptico, b, normalmente se expresa en centímetros. La cantidad  $\epsilon$  se llama absortividad molar o coeficiente de extinción y tiene unidades de  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y así el producto  $\epsilon bC$  es adimensional. La absortividad molar es una característica de una sustancia que nos dice cuanta luz absorbe a una longitud de onda determinada. La absorbancia y el coeficiente de absortividad dependen de la longitud de onda de la luz. La cantidad  $\epsilon$  es simplemente un coeficiente de proporcionalidad entre la absorbancia y el producto  $bC$ . Cuanto mayor es la absortividad molar, mayor es la absorbancia. La absortividad es una constante de proporcionalidad independiente de la concentración, del paso de la luz e intensidad de la radiación, cabe mencionar que este coeficiente puede tomar diferentes valores debido a que depende de la temperatura, disolvente, estructura molecular y longitud de onda de la radiación a la que se realicen las mediciones, las unidades de  $\epsilon$  se determinan a partir del espesor de la celda y de la concentración de la muestra (Skoog, et al. 2005).

#### 4.1.3 El espectro de absorción

Es un gráfico que muestra como varía A o  $\epsilon$  al variar las longitudes de onda, un cromóforo es una molécula o parte de una molécula, la cual es responsable de la absorción de la luz. Todas las sustancias que absorben luz visible aparecen coloreadas cuando transmiten o reflejan la luz. La luz blanca contiene todos los colores del espectro visible. La sustancia absorbe ciertas longitudes de onda de la luz blanca y, de esta manera nuestros ojos detectan las longitudes de onda que no se absorben. En la tabla 2. Se observa el color complementario del color absorbido, por ejemplo el azul de bromo fenol tiene un máximo de absorción a 591 nm y aparece de color azul.



**Tabla 2** Colores de la luz visible.

máxima de absorbancia	Color absorbido	Color observado
380-420	Violeta	Amarillo verdoso
420-440	Azul violáceo	Amarillo
440-470	Azul	Naranja
470-500	Verde azulado	Rojo
500-520	Verde	Purpura
520-550	Verde amarillento	Violeta
550-580	Amarillo	Azul violáceo
580-620	Naranja	
620-680	Rojo	Verde azulado
680-780	Purpura	Verde

#### 4.1.4 Cuando se incumple la ley de Beer

Esta ley afirma que la absorbancia es proporcional a la concentración de la especie absorbente. Esta ley se aplica a la radiación monocromática y es válida exactamente para disolución monocromática y es válida exactamente para disolución diluida ( $\leq 0.01$  M) de la mayoría de las sustancias. En disoluciones concentradas, las moléculas de soluto interaccionan entre sí debido a su proximidad, por lo tanto al estar muy cerca unas de otras sus propiedades (absortividad molar) cambian a concentraciones muy altas, los solutos prácticamente se convierten en disolvente. Los solutos de una disolución que no absorben también pueden interaccionar con las especies absorbentes y alterar la absortividad. Si la molécula absorbente participa en un equilibrio químico que depende de la concentración, la absortividad cambia con la concentración. (Daniel, et al, 1997)

#### 4.1.5 El espectrofotómetro

Es el instrumento destinado para medir la absorbancia de la luz. La luz procedente de una fuente continua pasa a través de un monocromador, que selecciona una banda estrecha de longitudes de onda del haz incidente. Esta luz monocromática atraviesa una muestra de paso óptico  $b$ , y mide la potencia radiante de la luz que emerge. Como se muestra en la figura No. 4.



**Figura 4.** Espectrofotómetro Cole-parmer, un espectrofotómetro convencional.

Los espectrofotómetros son aparatos más complicados y caros, ya que utilizan un sistema monocromador ya sea un prisma o una red de difracción, lo cual permite que exista una variación continua en la selección de la longitud de onda, obteniendo de este modo, una región espectral muy amplia. Como sistema de detección usan fototubos o fototubos multiplicadores. (Recuperado de <http://www.google.com.mx/imagenes./search?bcvkugd v=jbvn b3543espectrofotometro+cole-pamer+lkkf85768=35435>)

#### 4.1.5.1 Componentes básicos

##### Fuentes de energía radiante

Por lo general están constituidas con materiales que se excitan adecuadamente y que al volver a un estado fundamental, estas, emiten radiación electromagnética.

Las fuentes de radiación cumplen con lo siguiente:

- A) Proporcionan un haz de radiación con suficiente intensidad para poderla detectar y medir exactamente.
- B) Producen una radiación continua, esto es, la radiación emitida debe poseer todas las longitudes de onda de la región de estudio. Es deseable que además de esto, haya una intensidad continua con la longitud de onda.
- C) La fuente debe de emitir una intensidad constante con el tiempo, por lo menos durante el periodo necesario para medir la intensidad inicial así como la intensidad, ya que solo así serán reproducibles las medidas de absorción.

Las fuentes de radiación en la zona UV y visible pueden ser de dos tipos: fuentes térmicas, en las que la radiación es el resultado de altas temperaturas y fuentes de descarga eléctrica en atmosfera gaseosa.

### **Fuentes térmicas de radiación**

En la zona visible, el ejemplo más común es la lámpara de Wolframio. Por lo regular la temperatura más frecuente es de 3,000 K, por lo que la mayor parte de la radiación estará en la zona IR, se debe utilizar un filtro entre la lámpara y el monocromador para seleccionar la radiación visible. El espectro continuo de emisión de las fuentes incandescentes sólidas, se debe a la excitación térmica por choque de átomos y moléculas, cuyos niveles energéticos, electrónicos y vibracionales, están muy próximos. (Pino y et al, 1997)

### **Fuentes de descarga eléctrica.**

En la zona UV, la excitación se produce por el paso de los electrones a través de un gas; las colisiones entre los electrones y las moléculas de los gases causan transiciones electrónicas, vibracionales y rotacionales. A presión gaseosa reducida se emiten solo líneas espectrales. A alta presión se originan espectros continuos debido a que la interacción mutua entre los átomos conduce a un acercamiento de los niveles energéticos. (Pino y et al, 1997)

Los tres tipos más usados son:

### **Lámpara de hidrogeno**

De alto voltaje (2.500 V de corriente alterna)

De bajo voltaje (40 V de corriente continua) la presión de hidrogeno es de 0.2 a 5mm. El límite superior es de 375nm, en donde la energía ya es mínima. El límite inferior viene impuesto por la transmisión del material debido a que el cuarzo absorbe por debajo de 200nm, y la sílice fundida por debajo de 185nm.

### **Lámpara de deuterio**

Produce un rango similar de longitudes de onda que la lámpara de hidrogeno, pero la intensidad es de 3 a 5 veces superior. Es más cara, pero se emplea universalmente.

### Lámpara de descarga de Xenón

Estas lámparas operan con presiones altas de 20 a 30 atmosferas y pequeño voltaje, 40 v de corriente continua). Tiene una potencia muy por encima a la de hidrogeno.

### Filtros

Los filtros de banda permiten la trasmisión de una banda más o menos estrecha de longitudes de onda. Un filtro de banda se caracteriza por:

**Ancho de banda efectivo**, que se define como el ancho de la banda en la región en que la transmisión es del 50% del valor máximo.

**Transmitancia del pico**(t) es el valor máximo del %T.

**Longitud de onda nominal**( $\lambda$ ) es la longitud de onda a la cual se alcanza el valor de t.

Los filtros son el sistema más barato para seleccionar la longitud de onda.

### Monocromadores

Un monocromador se define como un sistema que produce un haz de radiación de una gran pureza espectral (estrecho ancho de banda) y además permite la variación de este ancho de banda a lo largo del espectro.

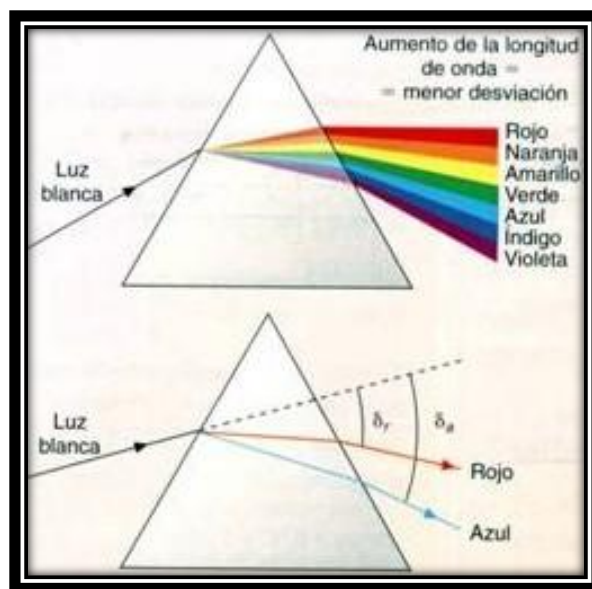
Los elementos esenciales de un monocromador son:

- Una rendija de entrada que atraviesa la radiación poli cromática de la fuente.
- Un sistema de colimación (lentes o espejos) que dirijan la radiación.
- Un sistema de dispersión (prisma o red de difracción) que divide a la radiación en zonas de longitudes de onda estrecha.
- Un sistema de concentración y enfoque (espejo o lente).
- Una rendija de salida.

Normalmente las rendijas de entrada y salida están fijas, mientras que se mueve el sistema monocromador (prisma o red de difracción) con el fin de que la zona de longitud de onda seleccionada salga por la rendija de salida.

## Prisma

Basado en el fenómeno de refracción, si la radiación atraviesa un material dieléctrico con caras paralelas, los rayos que emergen son paralelos a los rayos que inciden, pero si por el contrario, el material dieléctrico no tiene caras paralelas, la dirección del rayo refractado sufre una modificación. La velocidad de la luz, en un medio que no sea el vacío, depende de la longitud de onda (el índice de refracción varía con la longitud de onda), cada componente de una radiación seguirá su propia trayectoria y por tanto el grado de inclinación del rayo refractado final dependerá de la longitud de onda. (Pino y et al, 1997). Como se muestra en la figura No.5.



**Figura 5.** Dispersión óptica producida por un prisma.

Descomposición de un rayo incidente. (Recuperado de

<http://www.google.com.mx/imagenes./search?5848=326848/dispersión+de+un+rayo+564564=5644/>)

## Índice de refracción

La velocidad de la luz en el vacío es la misma para todas las longitudes de onda, pero cuando se propaga en un medio material es diferente para cada longitud de onda.

La frecuencia de una onda luminosa está determinada por la fuente y no varía al propagarse. Si la frecuencia variase al pasar la luz de un medio a otro medio, se

acumularía energía en la superficie de separación de los mismos, lo que no se observa que ocurra.

La velocidad de propagación de la luz en un medio es menor que en el vacío, mientras que su frecuencia no varía. Por lo tanto, la longitud de onda debe variar al cambiar de medio.

### **Red de difracción**

Se basa en el fenómeno de la difracción. Cuando ondas de radiación electromagnéticas pasan a través de una rendija o inciden en el filo de una sustancia opaca se despliegan en alguna extensión en las regiones que no están directamente expuestas a la radiación incidente. Este fenómeno se puede explicar por el principio de Huygens aplicado a la difracción a través de una rendija: cada punto de un frente de ondas puede ser considerado como una nueva fuente de ondas (ondas esféricas secundarias) las cuales, a su vez, se propagan en todas direcciones con la velocidad del frente de onda original.

### **Compartimiento de la muestra**

Las muestras regularmente son disoluciones, las cuales se colocan en unos recipientes llamados celdas o cubetas, el material con el que están hechas estas celdas debe de cumplir con el requisito de la transmisión de la radiación en la zona del espectro en que se trabaje. Por mencionar un ejemplo el cuarzo o sílice fundida es transparente en la zona UV de 200 a 350nm, y en la zona visible hasta 3000 nm, otro ejemplo es el cristal de sílice o vidrio en la zona visible es transparente en un rango de 350 a 1000 nm.

La forma que presentan estas celdas es la de un paralelepípedo, los cuales tiene dos caras transparentes del material antes indicado.

Para que el paso de luz o camino óptico sea adecuado, deben tener una medida de 1.0 cm, esta medida debe ser de una gran precisión, ya que la absorbancia es proporcional a ella.

Deben de colocarse en forma perpendicular a la dirección de propagación y se debe de tener un especial cuidado, al momento de utilizarse.

## Sistemas de detección

Un detector es un aparato que absorbe la energía de los fotones que inciden sobre él y convierte esta energía en una magnitud medible.

Se denomina ruido de un detector a la señal de fondo que genera cuando no incide sobre él la radiación.

Los requisitos indispensables de un detector son:

- ❖ Alta sensibilidad con un ruido de fondo bajo.
- ❖ Respuesta rápida.
- ❖ Respuesta estable, asegurando la medida cuantitativa.
- ❖ La señal eléctrica debe ser fácilmente amplificable.

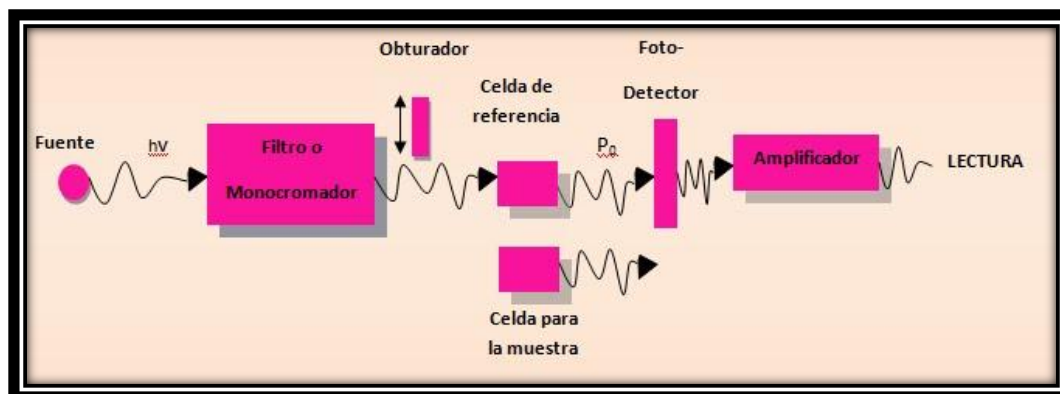
Existen tres montajes fotoeléctricos empleados para la detección de la radiación.

- a. **Células fotovoltaicas o de barrera.** En las cuales la energía radiante genera corriente en la interfase de un semiconductor y un metal.
- b. **Fototubos.** En los que la radiación origina la fotoemisión de electrones desde una superficie sólida.
- c. **Células fotoconductoras.** En las que la absorción de la radiación por un semiconductor origina un cambio en su resistencia eléctrica. Se emplean especialmente para detectar la radiación infrarroja. (Harvey, D, 2002)

### 4.1.6 Tipos de espectrofotómetros

#### Instrumentos de haz simple

Los instrumentos de haz simple son aquellos en los cuales el haz de luz sigue una única trayectoria entre la fuente y el detector. La banda de luz atraviesa la muestra que se halla contenida en una celda, la luz transmitida por la muestra pasa al detector originándose una corriente eléctrica que por medio de diferentes circuitos permite observar una señal, ya sea el movimiento de una aguja o señal digital o un registro gráfico. como se muestra en la figura No. 6.



**Figura 6.** Diagrama esquemático de una medida espectrofotométrica de haz simple.

Pasos por los que pasa una medición en un espectro de haz simple. (Recuperado de <http://www.google.com.mx/imagenes./search?diagrama+esquematico32458=584/51365454=456>)

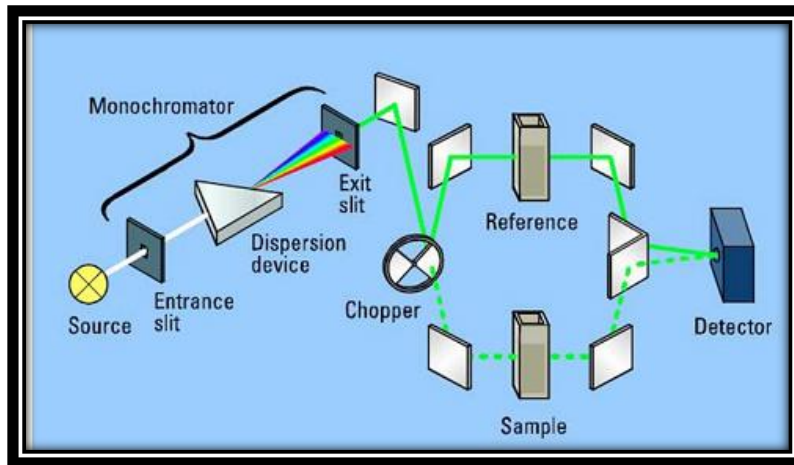
Los instrumentos de haz sencillo son adecuados para las mediciones cuantitativas de absorción a una sola longitud de onda. En este caso, las ventajas son la sencillez del instrumento, su bajo costo y la facilidad de mantenimiento. Algunos fabricantes de instrumentos ofrecen espectrofotómetros y fotómetros de haz sencillo de una sola longitud de onda.

En el esquema anterior, el monocromador atraviesa ya sea la celda de referencia o la celda de la muestra antes de llegar al fotodetector. Los ajustes a 0% y 100% T se deben hacer inmediatamente antes de cada medición de transmitancia o de absorbancia. Para que las mediciones de transmitancia sean reproducibles, es fundamental que la energía radiante de la fuente permanezca constante durante el tiempo en que se hace el ajuste a 100% T y se lee 0% T en el medidor. En el presente trabajo se utilizó un espectrofotómetro de haz simple.

### **Instrumentos de doble haz.**

En un instrumento de doble haz en el espacio se forman dos haces mediante un espejo en forma de V llamado divisor de haz. Un haz pasa a través de la solución de referencia y continúa hasta un fotodetector. En forma simultánea, el segundo rayo atraviesa la muestra hasta un segundo detector ajustado. Las dos señales de salida se amplifican y su cociente se determina de manera electrónica. (Skoog, et al. 2003). Como se muestra en la figura No. 7.





**Figura 7.** Diagrama esquemático de una medida espectrofotométrica de doble haz..Pasos por los que pasa una medición en un espectro de doble haz.(Recuperado de <http://www.google.com.mx/imagenes./search?diagrama+esquematico+de+una+mrdida32458=584/888/88=46548>).

## 4.2 Método Analítico

Un método analítico puede definirse, según la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico, en este caso el analito, de una muestra.

En este trabajo experimental se utilizó un método cuantitativo, estos métodos cuantitativos nos proporcionan información en forma numérica de la cantidad relativa que está presente en la muestra, ya sea de uno o más del o los componentes de estudio, en este caso conocidos como analito o analitos.

### 4.2.1 Clasificación de métodos analíticos

Varios autores difieren en la clasificación de los métodos analíticos, en este caso nos basaremos en dos clasificaciones, una de ellas es la que hace Skoog, en su libro de principios de análisis instrumental.

En esta clasificación se mencionan dos categorías los métodos analíticos clásicos y los métodos analíticos instrumentales

### 4.2.2 Métodos analíticos Clásicos

Los métodos analíticos clásicos, son aquellos métodos empleados en la química antigua, también llamados métodos de química húmeda, en los cuales se separaba a los componentes de interés, o analitos de una muestra a través de técnicas como la precipitación, la extracción o la destilación.

A su vez estos métodos se dividen en métodos de análisis cualitativo y métodos de análisis cuantitativo.

En los métodos de análisis cualitativos la identificación del analito se llevaba a cabo mediante técnicas de color, utilización de temperaturas de ebullición, puntos de fusión, solubilidad, olores, entre otros.

Por otro lado, en los métodos de análisis cuantitativo se utilizaba la gravimetría en donde se identificaba la masa del analito en cuestión, así como también se utilizaba la volumetría o titulometrias, en las cuales se identificaba el volumen o masa del analito mediante la utilización de un estándar.

#### **4.2.3 Métodos analíticos instrumentales**

Estos métodos son más recientes y cumplen con la función del método analítico, que es separar y determinar las especies químicas de los analitos. El desarrollo de estos métodos se dio a la par de la implementación de la electrónica y la computación como herramientas de apoyo. En estos métodos la utilización y medición de propiedades físicas del analito son de suma importancia para el análisis cuantitativo, algunas propiedades más utilizadas en estos métodos son la absorción de la luz, la emisión de la luz, la conductividad, el potencial de electrodo, relación masa- carga entre otras. (Skoog, 2008)

#### **4.2.4 Clasificación de métodos analíticos según la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.**

Según la guía de validación de métodos analíticos del colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, los métodos analitos se clasifican bajo los siguientes criterios:

- **En función de su estado regulatorio**
  - a. Métodos farmacopeicos
  - b. Métodos no farmacopeicos
  
- **En función de su aplicación (NOM-059-SSA1 y NOM-073-SSA1)**
  - a. Métodos para producto a granel
  - b. Métodos para producto terminado
  
- **En función de la naturaleza de la respuesta analítica**
  - a. Métodos físico-químicos.- cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de la luz, emisión de la luz, voltaje, entre otros.) o químicos (consumo de iones  $\text{-OH}$ , consumo de un acooplejante, entre otros.)
  - b. Métodos biológicos.- cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de microorganismos, protección, muerte, entre otros.)

- **En función de su propósito analítico**
  - a. Métodos para cuantificar al analito ( contenido o potencia)
  - b. Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.
  - c. Métodos para identificar el analito.

Esta clasificación, como lo menciona la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, se utiliza para establecer los parámetros de desempeño a estudiar en la validación del método analítico. Todos los métodos analíticos pueden estar constituidos por técnicas de separación, extracción, entre otros., y por técnicas de medición (espectrofotometría, volumetría, colorimetría, potenciometría, entre otros.) que permiten medir la respuesta del analito en la muestra. A esta técnica se le denomina sistema de medición.

- **En función de la naturaleza del sistema de medición:**
  - a. Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido (cromatógrafo de líquidos y de gases, espectrofotómetros, entre otros.)
  - b. Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido (buretas, medidor de halos, potenciómetros, entre otros.)

### **Instrumentos para análisis**

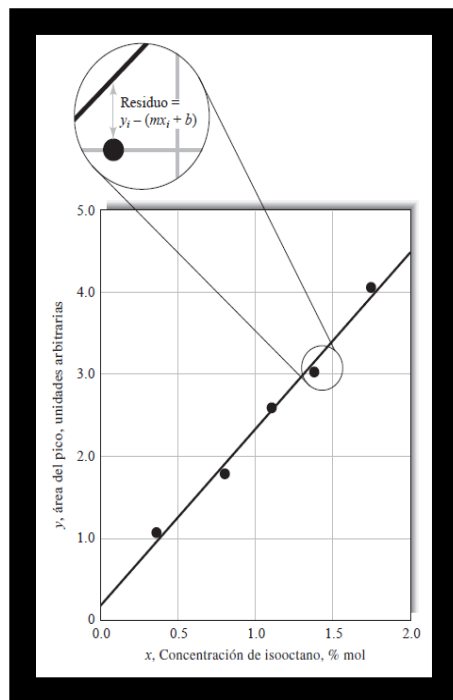
Un instrumento para análisis químico convierte la información que nos brindan las características físicas o químicas de un analito en datos que puede manipular e interpretar el ser humano. El instrumento para el análisis químico es, por así decirlo, un sistema de comunicación entre el sistema de estudio y el investigador. Hay un estímulo, siempre en forma de energía electromagnética, eléctrica, entre otros, el cual extrae una respuesta del sistema en estudio. La información resultante es debida a la interacción del estímulo con el analito. La información se codifica o representa mediante características físicas y químicas y en particular por medio de señales eléctricas.

#### **4.2.5.1 Calibración de métodos analíticos instrumentales**

La calibración es parte importante de todos los procedimientos analíticos ya que con ella se determina la relación entre la respuesta analítica y la concentración del analito.

#### **4.2.5.2 Calibración de un estándar externo**

Los estándares externos se usan para calibrar instrumentos y procedimientos cuando no hay efectos de interferencia de la matriz de componentes sobre la disolución del analito. El estándar externo se prepara por separado de la muestra. Para poder realizar la calibración mediante estándar externo, se prepara una serie de tales estándares externos que contienen el analito en concentraciones conocidas, se sugiere utilizar 3 o más disoluciones para cada concentración conocida en el proceso de calibración. El proceso de calibración se obtiene al conseguir la señal de respuesta dependiendo de la técnica y el instrumento que se utilice, la señal puede ser la absorbancia, la altura de un pico, área del pico, entre otros., la respuesta está en función de la concentración conocida del analito. Una curva de calibración es un gráfico en donde se muestran los datos ajustados a una ecuación matemática de la recta, ya que si recordamos una curva de calibración tiende a ser una línea recta. Como se muestra en la figura No. 8.



**Figura 8.** Ejemplo de una curva de calibración para determinar isooctano en una muestra de hidrocarburo. La curva de calibración tiende a ser una recta. La etapa de predicción en donde se obtiene la señal de respuesta de la muestra y esta se utiliza para predecir la concentración desconocida del analito  $C_x$ , (Recuperado de <http://www.google.com.mx/?curva+de+calibacion==456>)

#### 4.2.5.3 Errores en la calibración del patrón externo.

El supuesto de la calibración con estándares externos es que se obtendrán las mismas respuestas cuando la misma concentración del analito esté presente en la muestra y en el patrón. La relación funcional de calibración entre la respuesta y la concentración del analito se debe aplicar a la muestra de igual manera.

Cuando se usa un instrumento para determinar la medición de la respuesta, lo ideal es que no se utilice la respuesta original que éste otorga, sino que, se debe de corregir la respuesta original analítica con la medición de un blanco. Un blanco ideal es aquel que contiene los componentes de la muestra pero sin el analito. Hay diferentes tipos de blancos, con los cuales se puede corregir la respuesta analítica, dependiendo de los componentes o reactivos en los que se encuentre disuelta la muestra, o que vayan acompañando al analito. De este modo un blanco real, es aquel que contiene el mismo solvente en el cual esta disuelta la muestra. Así, un blanco reactivo es aquel que contiene

el disolvente y todos los reactivos que se usan en la preparación de la muestra. Uno de los errores más comunes en este tipo de calibración es que no se utiliza un blanco adecuado para corregir la respuesta analítica del instrumento de medición.

Algunos de los errores más frecuentes en este tipo de calibraciones por mencionar algunas, son los efectos en la matriz, debido a que muchas veces se encuentran en la muestra sustancias extrañas que no están presentes en los patrones o en el blanco, esto por lo general ocasiona que las concentraciones del analito en la muestra y en los patrones nos dé como resultado respuestas distintas.

La contaminación también es un factor de suma importancia a la hora de realizar las mediciones de la respuesta.

En primera instancia es importante recordar que durante las etapas de desarrollo del método analítico, es necesario mantener una limpieza adecuada de todos los materiales a utilizar, desde las áreas de trabajo, como de los mismos materiales de vidrio u otros que se utilicen en cada una de las etapas de desarrollo del método.

Muchas veces quedan residuos en los materiales de vidrio, como por ejemplo matraces aforados, de sustancias con las que se trabajó anteriormente, y por una mala limpieza o mal enjuague persisten en el material y causan contaminación, la cual se ve reflejada en la respuesta medida por el instrumento, así como cambios de concentración del analito en la muestra. (Pino, et al, 1997)

#### **4.2.6 Errores sistemáticos durante el proceso de calibración**

Otro de los errores muy comunes en las calibraciones, es la forma de preparación de la curva de calibración, desde el inicio la forma de preparación debe ser la misma, ya que aquí se verá afectado uno de los parámetros de validación del método analítico, la repetibilidad, más adelante se abordara acerca de estos parámetros de validación.

La forma química de los patrones debe ser idéntica a la del analito, así como el estado de oxidación, la isomerización o la complejidad del analito, pueden alterar la respuesta. Otros factores como la descomposición, la volatilización o la adsorción en las paredes del contenedor puede cambiar la concentración de los patrones.

Un error sistemático se puede presentar si hay algún sesgo en el modelo de calibración se obtiene sin usar suficientes patrones para lograr estimaciones estadísticas buenas de

los parámetros. Por otro lado los errores aleatorios también influyen en la exactitud de los resultados obtenidos a partir de las curvas de calibración. (Skoog y et al., 2008)

#### 4.2.7 Elección de un método analítico

Para poder elegir entre la gran variedad de métodos analíticos, es necesario responder ciertas preguntas, las cuales nos facilitaran la elección de un buen método, por ejemplo hay que pensar primeramente el definir el problema analítico, el cual queda definido como el desconocimiento de la composición de la muestra, dicho en otras palabras, nosotros no sabemos exactamente qué es lo que contiene la muestra y de alguna u otra forma nuestra intención es conocer los elementos que están conformando a la muestra.

Algunas de las interrogantes que podemos hacernos a la hora de elegir un método analítico son las siguientes ¿Qué exactitud requerimos?, ¿El tipo de muestra que se tiene?, ¿Cuál es el intervalo de concentración del analito? ¿Qué componentes de la muestra podrían causar interferencia?, ¿Cuáles son las propiedades físicas y químicas de la matriz de la muestra?, ¿Cuántas muestras se analizaran? ¿Se cuenta con los instrumentos necesarios para realizar el desarrollo de un método? , entre otras. Respondiendo estas preguntas podremos determinar el tiempo y la atención que se requerirá para la realización del análisis.

Otras características importantes que debemos de tomar en cuenta a la hora de elegir un método analítico son:

- ❖ Velocidad.
- ❖ Facilidad.
- ❖ Habilidades que requiere el operador.
- ❖ Costo y disponibilidad del equipo.
- ❖ Costo por muestra.

En la tabla 3 se observan algunas propiedades fisicoquímicas y los métodos instrumentales que se utilizan para medir dichas propiedades, esto también, nos da una idea de qué tipo de instrumentos se utilizara si deseamos medir una propiedad fisicoquímica.



**Tabla 3** Propiedades físicas y químicas usadas en los métodos instrumentales. (Skoog y et al, 2008).

Propiedades características	Métodos instrumentales
<b>Emisión de radiación</b>	Espectroscopia de emisión (rayos X, UV, luz visible, de electrones, de Auger); fluorescencia, fosforescencia y luminiscencia (rayos X, UV y luz visible)
<b>Absorción de radiación</b>	Espectrofotometría y fotometría (rayos X, UV, luz visible, IR); espectroscopia foto acústica; resonancia magnética nuclear y espectroscopia de resonancia de espín electrónico.
<b>Dispersión de radiación</b>	Turbidimetría, nefelometría, espectroscopia Raman.
<b>Refracción de radiación</b>	Refractrometría, interferometría.
<b>Difracción de radiación</b>	Métodos de rayos X y difracción electrónica
<b>Rotación de radiación</b>	Polarimetría, dispersión óptica rotatoria, dicroísmo circular.
<b>Potencial eléctrico</b>	Potenciometría, cronopotenciometría.
<b>Carga eléctrica</b>	Coulombimetría
<b>Corriente eléctrica</b>	Amperometría, polarografía
<b>Resistencia eléctrica</b>	Conductometría
<b>Masa</b>	Gravimetría (microbalanza de cristal de cuarzo)
<b>Razón masa/carga</b>	Espectrometría de masas
<b>Velocidad de reacción</b>	Métodos cinéticos
<b>Características térmicas</b>	Gravimetría térmica y titulometría; calorimetría de barrido diferencial, análisis térmicos diferenciales, métodos conductimétricos térmicos.
<b>Radiactividad</b>	Métodos de activación y de dilución de isótopos.

A continuación, en la tabla 4 se observa algunos de los criterios de desempeño cuantitativos de varios instrumentos que se utilizan para decidir si un método instrumental es adecuado para resolver un problema analítico.

**Tabla 4** Criterios numéricos para elegir métodos analíticos. (Skoog et al, 2008).

Criterio	Parámetros de calidad
<b>Precisión</b>	Desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa, coeficiente de variación, varianza.
<b>Sesgo</b>	Error sistemático absoluto, error sistemático relativo.
<b>Sensibilidad</b>	Sensibilidad de calibración, sensibilidad analítica.
<b>Límite de detección</b>	Blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.
<b>Intervalo dinámico</b>	Límite de cuantificación de la concentración (LOQ) a límite de la linealidad de la concentración (LOL).
<b>Selectividad</b>	Coeficiente de selectividad.

## 4.3 Parámetros de validación de un método analítico.

Según la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, la validación es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, esta actividad se justifica por los siguientes aspectos:

- ❖ Moral y ética
- ❖ Aseguramiento de la calidad
- ❖ Economía
- ❖ Regulatoria

Los parámetros de validación que se realizaran en este trabajo experimental son los siguientes, ya que se validara un sistema.

- ✓ **Precisión del sistema:** se define como el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea.
- ✓ **Linealidad del sistema:** es una propiedad del sistema de proporcionar una respuesta lineal analista en proporción a las concentraciones o cantidad del analito.
- ✓ **Exactitud:** se define como la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.
- ✓ **Repetibilidad:** es la capacidad que tiene un método para producir resultados semejantes cuando se introducen en su operación factores de los cuales no se espera que produzcan diferencia.

- ✓ **Reproducibilidad:** capacidad que tiene el método para dar respuestas semejantes aun cuando se han introducido factores con los cuales se esperaría que produjesen una diferencia.

## 4.4 Hipertensión Arterial y Fármacos Antihipertensivos

La hipertensión arterial (HTA), definida como el aumento mantenido de las cifras de presión arterial sistólica/diastólica (PAS/PAD) en valores superiores de 140/90 mmHg, es un trastorno que afecta a 100 millones de personas en todo el mundo y es el factor de riesgo de enfermedad cerebrovascular más frecuente en los pacientes mayores de 50 años. Con frecuencia la HTA coexiste con otros factores de riesgo, como obesidad, dislipidemias, diabetes mellitus, tabaquismo, sedentarismo, entre otros, lo que produce un incremento exponencial, no aditivo, del riesgo cardiovascular y hace necesaria la intervención simultánea sobre cómo alcanzar los beneficios terapéuticos deseados. Es por ello que debe de analizarse el riesgo cardiovascular del paciente en función de los valores de presión arterial, siempre y cuando se tome en cuenta que pueden existir otros factores de riesgo. La hipertensión arterial daña los vasos sanguíneos de los riñones, corazón y cerebro, y eleva la incidencia de insuficiencia renal, enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca, apoplejía y demencia. Se ha demostrado que la disminución eficaz de la presión sanguínea por medios farmacológicos previene el daño de los vasos sanguíneos y reduce de manera sustancial las tasas de morbilidad y mortalidad. (Guía de la práctica clínica ESH/ESC, 2013)

### 4.4.1 Clasificación de la hipertensión con base en la presión arterial.

En la tabla 5 podemos observar la clasificación de la hipertensión según los valores de presión arterial.

**Tabla 5** Clasificación de la hipertensión según los valores de presión arterial.

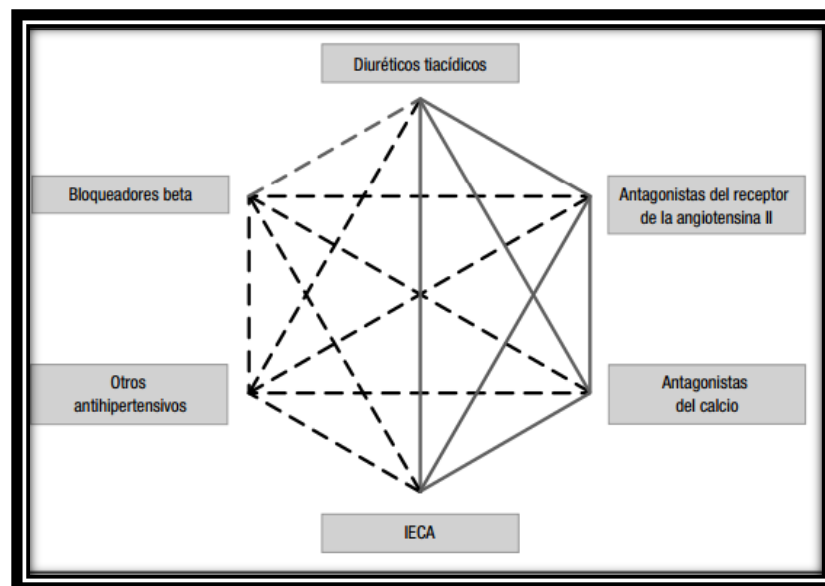
Presión arterial sistólica/diastólica (mmHg)	Categoría
< 120 / 80	Normal
120-135 / 80-89	Prehipertensión
≥ 140/90	Hipertensión
≥ 140-159/ 90-99	Etapas 1
≥ 160/100	Etapas 2

Del Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure, JAMA 2003; 289-2560.

En 2007, la sociedad europea de hipertensión y la sociedad europea de cardiología (ESH/ESC 2007) publicaron algunas recomendaciones para prescribir un tratamiento antihipertensivo, no sólo basándose en los valores de presión arterial, si no para tomar en cuenta la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular, con el objetivo de reducir el riesgo cardiovascular a largo plazo, con lo cual se requiere el tratamiento de la HTA, así como la modificación del estilo de vida.

#### 4.4.2 Fármacos antihipertensivos

Existen cinco clases de fármacos antihipertensivos, los cuales se consideran de primera línea: los antagonistas de calcio, los bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos, los IECA, los antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina II y los diuréticos. En la figura 8, se observan las combinaciones recomendadas en las guías de la ESH/ESC 2007. (Velázquez, 2009). Como se muestra en la figura No.9.



**Figura 9.** Combinaciones entre los principales fármacos antihipertensivos. Líneas continuas combinaciones preferidas, líneas discontinuas combinaciones útiles con algunas limitaciones.

(Velázquez, Farmacología básica y clínica, 2009).

#### 4.4.3 Fármacos bloqueadores $\beta$ -adrenérgicos.

Un bloqueador  $\beta$ -adrenérgico es un fármaco que se usa con frecuencia para tratar la presión arterial alta y los problemas del corazón. Algunos ejemplos son el atenolol, el metoprolol y el propranolol. Este tipo de fármaco bloquea los efectos nocivos que ejercen

sobre el corazón las hormonas que se producen en respuesta ante el estrés. Éste también disminuye la frecuencia de los latidos del corazón. Estos fármacos también pueden usarse para prevenir dolores de cabeza de tipo migrañas y en gotas para los ojos para el tratamiento del glaucoma. Además de la presión arterial elevada o frecuencia irregular en los latidos del corazón y en la insuficiencia cardiaca congestiva. Todos los bloqueadores B son útiles para disminuir la presión sanguínea en la hipertensión leve a moderada. En la hipertensión grave, los bloqueadores B son útiles para evitar la taquicardia refleja, que a menudo resulta del tratamiento con vasodilatadores directos. Los bloqueadores B han demostrado disminuir la mortalidad después de un infarto miocárdico y algunos también reducen la mortalidad en pacientes con insuficiencia cardiaca, son en particular adecuados para el tratamiento de la hipertensión en sujetos con estos padecimientos.

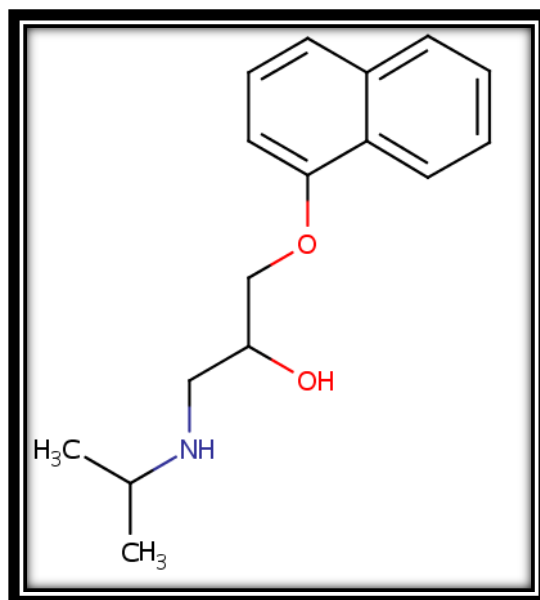
#### **4.4.4 Fármacos antagonistas de los receptores de angiotensina**

Los antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II (ARA-II) son un grupo de fármacos que antagonizan las acciones que la angiotensina II (A-II) ejerce por mediación de éstos, independientemente de cuál sea su vía de síntesis. En presencia de un ARA-II, la A-II estimula los receptores AT2, produciendo diversas acciones que contrarrestan aquellas mediadas por los receptores AT1. Los ARA-II han demostrado ser fármacos antihipertensivos efectivos y seguros, además, ejercen efectos benéficos en la hipertensión arterial en pacientes con insuficiencia cardiaca, diabetes mellitus tipo 2 y nefropatías. Sin embargo, existen diferencias en la estructura química, la afinidad receptiva y las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de estos fármacos. (Katzung, et al, 2013).

## 4.5 Propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas de Propanolol.

**Denominación:** Clorhidrato de propanolol.

**Estructura química**



**Figura 10.** Estructura química de Propanolol. (Recuperado de <https://www.google.com.mx/search?q=imagenes>)

**Grupos funcionales**

Los más importantes son los marcados en colores azul y rojo, en color azul se resalta la presencia de un grupo amino, en color rojo de abajo hacia arriba se observa un grupo hidroxilo y por ultimo un grupo éter.

**Naturaleza química**

Basándonos en un análisis de grupos funcionales que se presentara en la sección de análisis de resultados podemos mencionar que la naturaleza química de la molécula es básica.

**Peso molecular:** 295.81 g/mol



**Formula Molecular:**  $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$

#### 4.5.1 Propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas

**Estado físico:** solido

**Color:** Blanco

**Olor:** prácticamente inodoro

**Valor de pH solución acuosa 1%:** 5.0-6.0

**pka :**9.42

**Punto de fusión:** 163-166 °C

**Solubilidad en:**

Agua soluble (1:20)

Etanol soluble (1:20)

Cloroformo ligeramente soluble

Éter prácticamente insoluble

**Estabilidad y reactividad**

**Materias a evitar:**Agentes oxidantes fuertes. Ácidos fuertes.

**Productos de descomposición/combustión:**

Humos tóxicos de: monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrógeno, gas de cloruro de hidrogeno.

#### 4.5.2 Propiedades farmacológicas

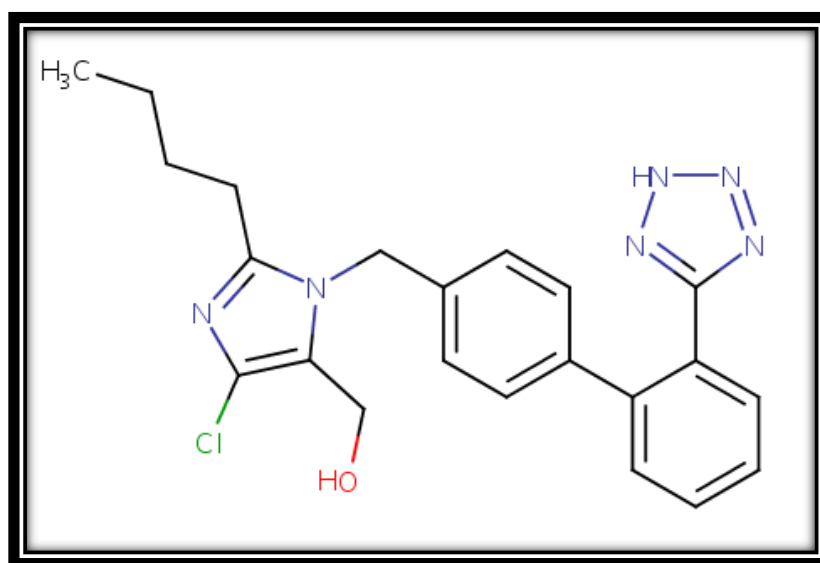
Propranolol es un antagonista de los receptores beta adrenérgicos

Reduce la frecuencia cardiaca en reposo, el gasto cardiaco, presión arterial sistólica y diastólica.

## 4.6 Propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas y farmacológicas de Losartán

**Denominación:** Losarón potásico

**Peso molecular:** 461 g/ mol



**Figura 11.** Estructura Química de Losartán (Recuperado de <http://www.google.com.mx/imagenes./search?estructura+de+quimeca+=584/51365454=456>).

**Formula molecular:** C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClKN<sub>6</sub>O

### Grupos funcionales

Los principales grupos son los que se encuentran marcados en colores azul, rojo y verde. En color azul de lado derecho encontramos al grupo tetrazol, en color rojo identificamos al grupo hidroxilo, en color verde a un halogenuro que en este caso es el cloro y por último en color azul del lado izquierdo se encuentran dos grupos amino.

### **Naturaleza química**

Para determinar la naturaleza química de la molécula se hizo un análisis de los grupos funcionales el cual se describe en la sección de análisis de resultados, de esta manera podemos mencionar que la molécula presenta una naturaleza básica al ser una sal potásica.

#### **4.6.1 Propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas**

**Estado físico:**Solido

**Color:**Blanco

**Olor:**Inodoro

**Punto de Fusión:** 260-270°C

**pka:**5.5

**Solubilidad en:**

Agua soluble

Metanol Soluble

Acetonitrilo poco soluble

#### **Estabilidad y reactividad**

**Estabilidad química:**

Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas.

**Productos de descomposición peligrosos:**

Óxidos de carbono, óxidos de nitrógeno (Nox), gas cloruro de hidrogeno, óxidos de potasio.

#### **4.6.2 Propiedades farmacológicas**

Es un bloqueador del receptor de angiotensina utilizado para tratar la hipertensión.

Disminuye resistencia vascular y la presión arterial.

# 5. Metodología

## 5.1 Materiales y método

16 Matraces aforados de 10 mL

2 Matraces aforados de 100 mL

2 vasos de precipitados de 50 mL

Agitador magnético

Barra magnética

Pipetas volumétricas de 3 mL, 5 mL, 6 mL, 8 mL, y 10 mL

Papel aluminio

Espátula

Puntillas para Micropipeta

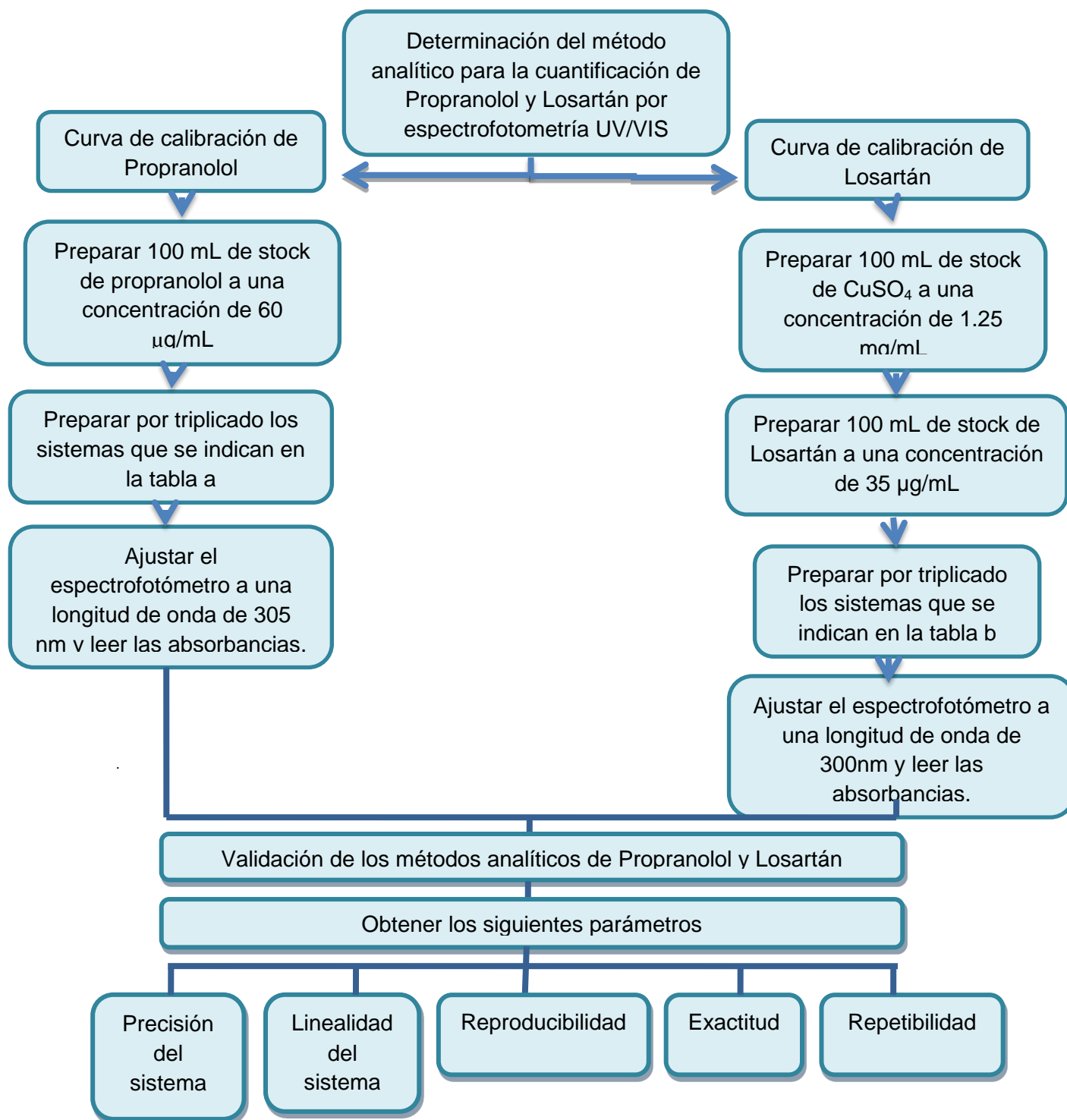
## 5.2 Equipos

- ❖ Espectrofotómetro Cole-parmer 2800 UV/Vis
- ❖ Balanza Analítica Sartorius

## 5.3 Reactivos y soluciones

- ❖ Losartán
- ❖ Propanolol
- ❖ Sulfato de cobre
- ❖ Aguardestilada.

## 5.4 Diseño experimental



**Tabla a.** Preparación de la curva de calibración de Propranolol.

Sistema	mL de stock de propranolol	Aforar con agua destilada a
1	3	10 mL
2	5	10 mL
3	6	10 mL
4	8	10 mL
5	10	10 mL

**Tabla b.** Preparación de la curva de calibración de Losartán.

Sistema	mL de stock CuSO <sub>4</sub>	mL stock de Losartán	Afora con agua destilada
1	3	2	10 mL
2	3	3	10 mL
3	3	4	10 mL
4	3	5	10 mL
5	3	6	10 mL

### 5.5 Preparación de la solución Stock de Propranolol.

Se pesa en un vaso pp cubierto con aluminio (vaso de precipitados) de 50mL 6mg de Propranolol en una balanza analítica calificada. Se agregan aproximadamente 10 mL de agua destilada al vaso pp y posteriormente colocar una barra magnética, se pone en agitación sobre un agitador magnético durante 3 minutos aproximadamente. Se retira del agitador el vaso pp y la solución resultante se agrega a un matraz aforado de 100 mL cubierto con papel aluminio, se realizan 3 enjuagues con agua destilada al vaso pp (aproximadamente 5 mL por enjuague) y verter al matraz aforado. Llevar al aforo la solución con agua destilada, tapar el matraz y agitar 10 veces aproximadamente para homogeneizar la solución.

#### 5.5.1 Preparación de la curva de calibración de Propranolol

Antes de realizar la curva de calibración se debe preparar el blanco con el cual se ajustara la lectura del espectrofotómetro. En este caso el blanco a utilizar será agua destilada, ya que es el medio en el que el analito se encuentra en solución, recordemos que un blanco es aquella solución que contiene todos los componentes que presenta la muestra, sin incluir al analito.

Para preparar la curva de calibración se lavan 16 matraces aforados de 10mL y secarlos perfectamente. Se cubren con papel aluminio, quedando descubierta la marca de aforo. Identificar los matraces según las concentraciones que se utilizaran para cada punto de la curva, ya que cada punto se realizara por triplicado. Realizar la aleatorización de la preparación de la curva de calibración. El llenado de los matraces se realizara de la siguiente manera al sistema uno se colocaran 3 mL de la solución stock de propranolol y se aforara a diez mL con agua destilada, al sistema dos se le colocan 5 mL de stock de propranolol y se afora a diez mL con agua destilada, al sistema 3 se le colocan 6 mL de stock de propranolol y se afora a diez con agua destilada, al sistema 4 se le colocan 8 mL de stock de propranolol y se afora a diez mL con agua destilada y por ultimo al sistema 5 se le colocan 10 ml de stock de propranolol. Se utiliza para la toma de los mL requeridos pipetas volumétricas de 3 mL, 5 mL, 6 mL y 8 mL, respectivamente. Cada punto de la curva de calibración se leerá a una longitud de onda de 305 nm en el espectrofotómetro Cole-Parmer 2800 UV/Vis. Una vez obtenidas las absorbancias se realizara un gráfico.

#### **5.5.2 Preparación del stock de Losartán**

Pesar en un vaso de precipitados de 50 mL 3.5 mg de Losartán en una balanza analítica calificada. Agregar aproximadamente 10mL de agua destilada al vaso pp y posteriormente colocar una barra magnética y poner en agitación sobre un agitador magnético durante 3 minutos aproximadamente. Retirar del agitador el vaso pp y verter la solución a un matraz aforado de 100mL, realizar 3 enjuagues con agua destilada (aproximadamente 5 mL por enjuague) al vaso pp y verter al matraz aforado. Llevar al aforo la solución con agua destilada, tapar el matraz y agitar 10 veces aproximadamente para homogeneizar la solución.

#### **5.5.3 Preparación del Stock de CuSO<sub>4</sub>**

Pesar en un vaso de precipitados (vaso pp) de 50 mL 125 mg de CuSO<sub>4</sub> en una balanza analítica calificada. Agregar aproximadamente 10 mL de agua destilada al vaso pp y posteriormente colocar una barra magnética y poner en agitación sobre un agitador magnético durante 3 minutos aproximadamente. Retirar del agitador el vaso pp y verter la solución a un matraz aforado de 100 mL. Realizar 3 enjuagues con agua destilada (aproximadamente 5 mL por enjuague) al vaso pp y verter al matraz aforado. Llevar al aforo la solución con agua destilada, tapar el matraz y agitar 10 veces aproximadamente para homogeneizar la solución.



#### 5.5.4 Preparación de la Curva de Calibración de Losartán.

Antes de realizar la curva de calibración se prepara el blanco de la siguiente manera, en un matraz aforado de 10 mL, agregar 3 mL de la solución stock de  $\text{CuSO}_4$  con ayuda de una Micropipeta de 1000 $\mu\text{L}$  y llevar al aforo con agua destilada, tapar el matraz y agitar 10 veces aproximadamente para homogeneizar la solución.

Para preparar la curva de calibración de Losartán se lavan 16 matraces aforados de 10mL y secarlos perfectamente. Identificar los matraces según las concentraciones que se utilizaran para cada punto de la curva, ya que cada punto se realizara por triplicado. Realizar la aleatorización de la preparación de la curva de calibración. El llenado de los matraces se realizara de la siguiente manera, a todos los sistemas se le colocaran 3 mL de la solución stock de sulfato de cobre, al sistema uno se le colocara 2 mL de stock de Losartán y se afora a 10 mL con agua destilada, al sistema 2 se le colocaran 3 mL de stock de Losartán y se afora a diez mL con agua destilada, al sistema 3 se le colocaran 4 mL de stock de Losartán y se afora a diez mL con agua destilada, al sistema 4 se le colocaran 5 mL de stock de Losartán y se afora a diez mL con agua destilada y por ultimo al sistema 5 se le colocan 6 mL de stock de Losartán y se afora a diez mL con agua destilada. Se utiliza para la toma de los mL requeridos una Micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$ . Cada punto de la curva de calibración se leerá a una longitud de onda de 300 nm en el espectrofotómetro Cole-Parmer 2800 UV/VIS. Una vez obtenidas las absorbancias se realizara un gráfico.

## 5.6 Validación de las Curvas de Calibración

### 5.6.1 Validación de la Curva de Calibración de Propranolol y Losartán

Para la validación de las ambas curvas de calibración (Propranolol y Losartán) se utiliza la misma metodología.

**Precisión del sistema:** este parámetro de validación se obtiene al realizar el cálculo del coeficiente de variación de cada una de las curvas de calibración mediante la ecuación 4:

$$CV = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{promedio}} \text{ (Ecuación 4)}$$

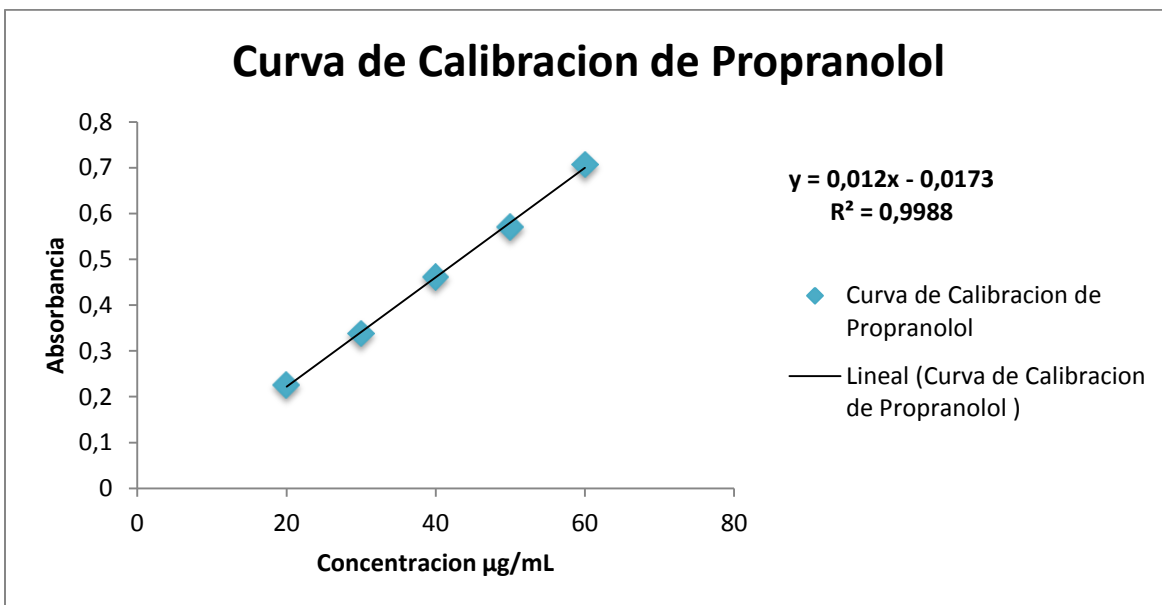
**Linealidad del sistema:** este parámetro se evalúa al preparar por triplicado 5 niveles de concentración. La concentración central debe ser igual a la que represente el 100% en la muestra procesada para su medición. Se procede a medir la absorbancia de las soluciones en el espectrofotómetro UV/Vis. Posteriormente se calcula el coeficiente de determinación, este debe ser mayor o igual a 0.98 para tomarlo como criterio de aceptación de la linealidad del sistema.

**Exactitud:** se prepara una solución stock de la cual se prepararan un sextuplicado de soluciones con una concentración que caiga dentro de las concentraciones a las cuales se preparó la curva de concentración, se prefiere que esta concentración se encuentre dentro de los puntos 3 y 4. Una vez preparadas estas soluciones se procede a leer las respectivas absorbancias utilizando el espectrofotómetro UV/Vis. Posteriormente se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación. El criterio de aceptación se establece cuando el CV es menor o igual a 1.5% en métodos fisicoquímicos.

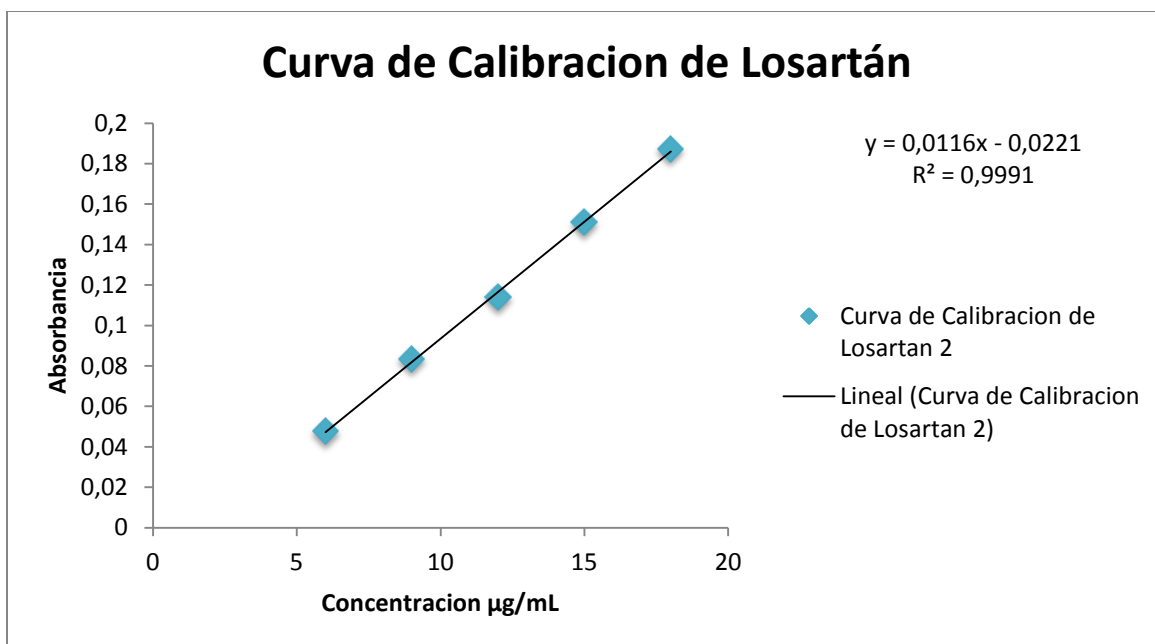
**Reproducibilidad:** La reproducibilidad se realiza, pidiendo a un segundo analista que realice las curvas de calibración de ambos fármacos por triplicado, exactamente como se menciona en la metodología de preparación de cada una, esperando obtener los mismos resultados de linealidad y precisión. Las variables a evaluar en este parámetro son analista y día de preparación.

**Repetibilidad:** este parámetro de validación lo realiza el primer analista, haciendo por triplicado las curvas de calibración de ambos fármacos exactamente como se menciona en la metodología de la preparación de las curvas, esperando resultados similares en cada una de ellas.

## 6. Resultados



Gráfica 1. Curva de Calibración de Propranolol.



Gráfica 2. Curva de Calibración de Losartán.

**Tabla 6.** Parámetros estadísticos de la curva de calibración de Propranolol.

Parámetros estadísticos de la Curva de Calibración de Propranolol					
Conc/Abs	20µg/mL	30µg/mL	40µg/mL	50µg/mL	60µg/mL
<b>A</b>	0.226	0.342	0.47	0.569	0.707
<b>B</b>	0.223	0.332	0.458	0.575	0.705
<b>C</b>	0.228	0.342	0.457	0.568	0.710
<b>Promedio</b>	0.225	0.338	0.461	0.570	0.707
<b>Des STD</b>	0.002	0.004	0.005	0.003	0.002
<b>CV</b>	0.910	1.391	1.279	0.541	0.290
<b>Promedio %CV</b>	<b>0.882</b>				

**Tabla 7.** Parámetros estadísticos de la curva de calibración de Losartán.

Parámetros estadísticos de la Curva de Calibración de Losartán					
Conc/abs	6µg/mL	9µg/mL	12µg/mL	15µg/mL	18µg/mL
<b>A</b>	0.045	0.082	0.115	0.150	0.187
<b>B</b>	0.049	0.085	0.113	0.152	0.189
<b>C</b>	0.049	0.083	0.114	0.151	0.186
<b>x</b>	0.047	0.083	0.114	0.151	0.187
<b>Desv. Est.</b>	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001
<b>CV</b>	3.955	1.496	0.716	0.540	0.665
<b>∑ %CV</b>	1.4750				

## 6.1 Validación de la Curva de Calibración de Propranolol.

### 6.1.1 Exactitud del sistema

**Tabla 8.** Parámetros estadísticos de validación para la exactitud de la curva de calibración de Propranolol.

Sistema	Peso (g)	Absorbancia	Concentración
1	0.01	0.628	53.775
2	0.01	0.635	54.358
3	0.01	0.638	54.608
4	0.01	0.637	54.525
5	0.01	0.638	54.608
6	0.01	0.631	54.025
<b>Desv. Est.</b>	0.3446		
$\bar{x}$	<b>54.316</b>		
<b>% CV</b>	<b>0.6344</b>		

### 6.1.2 Linealidad del sistema

Para obtener este parámetro se calcula el coeficiente de determinación el cual fue  $r^2=0.998$

**Tabla 9.** Análisis estadístico para obtener el mejor ajuste de la curva de calibración de Propranolol mediante el método de los mínimos cuadrados.

Método de los mínimos cuadrados para la curvas de calibración de Propranolol								
i	Concentración (µg/mL) (x)	Absorbancia (y)	XY	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	$(x_1 - x)(y_1 - y)$	$(x_1 - x)^2$	$(y_1 - y)$
1	20	0.225	4.5	400	0.0506	4.704	400	0.0553
2	30	0.338	10.14	900	0.1142	1.222	100	0.0149
3	40	0.461	18.44	1600	0.2125	0	0	0.0007
4	50	0.57	28.5	2500	0.3249	1.098	100	0.0120
5	60	0.707	42.42	3600	0.4998	4.936	400	0.0609
x	40	0.4602	20.8	1800	0.2404			
Σ						11.9	1000	0.1432

Una vez obtenidos los parámetros estadísticos de cada sistema se procedió a sustituir en las fórmulas que aparecen en la figura no. 13 los datos correspondientes y así obtener la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), los cuales se muestran en la tabla no. 10

**Tabla 10.** Comparación de los resultados de linealidad obtenidos por el método de los mínimos cuadrados y por el cálculo del coeficiente de correlación para la curva de calibración de Propranolol.

	Parámetros obtenidos por el método de mínimos cuadrados	Parámetros obtenidos por el cálculo de coeficiente de correlación
<b>Pendiente</b>	m= 0.0119	m= 0.012
<b>Ordenada al origen</b>	b= -0.182	b= -0.173
<b>Coeficiente de correlación</b>	$r^2=0.9993$	$r^2 = 0.9988$
<b>Recta de mejor ajuste</b>	$y= 0.0119x - 0.182$	$y=0.012x-0.173$

Como se observa en la tabla no.10, al comparar el coeficiente de correlación obtenido por ambos métodos, es evidente que la linealidad del sistema se confirma ya que, el valor que debe presentar el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) debe de ser mayor o igual a uno.

Recordemos que este parámetro define la relación que existe entre dos variables aleatorias.

### 6.1.3 Precisión del sistema

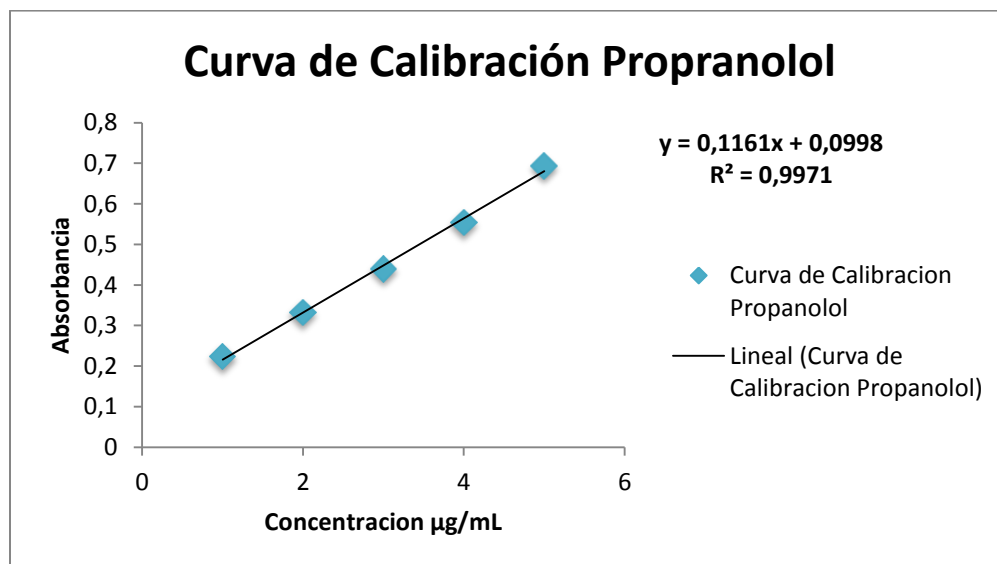
Para la obtención de este parámetro fue necesario calcular el coeficiente de variación con la ecuación 4:

$$\%CV = \frac{\text{desviacion estandar}}{\text{promedio}} \times 100$$

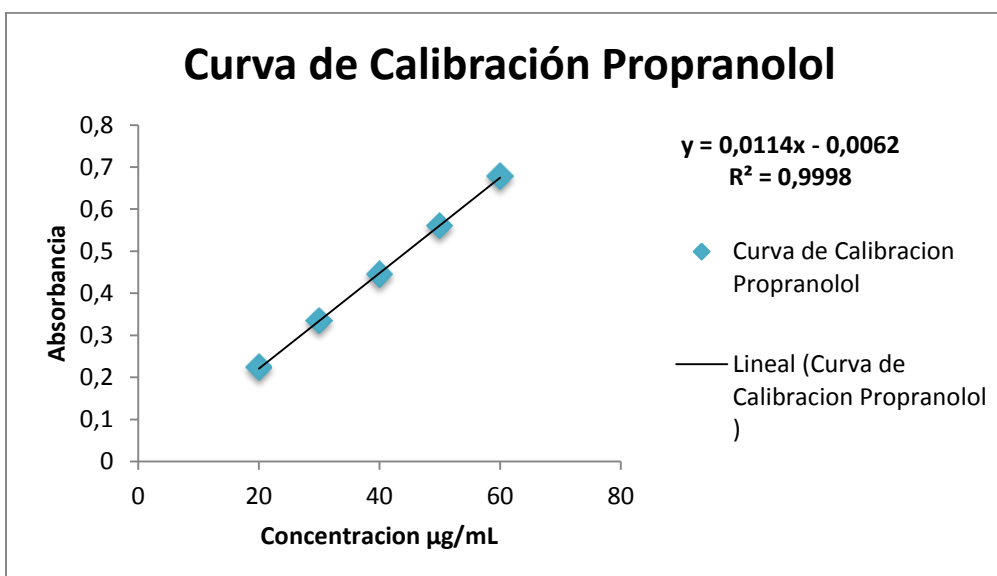
El resultado obtenido es igual a  $\%CV = 0.882$

### 6.1.4 Reproducibilidad

Curvas de calibración realizadas por el primer analista en un mismo día (7 de Julio de 2015)

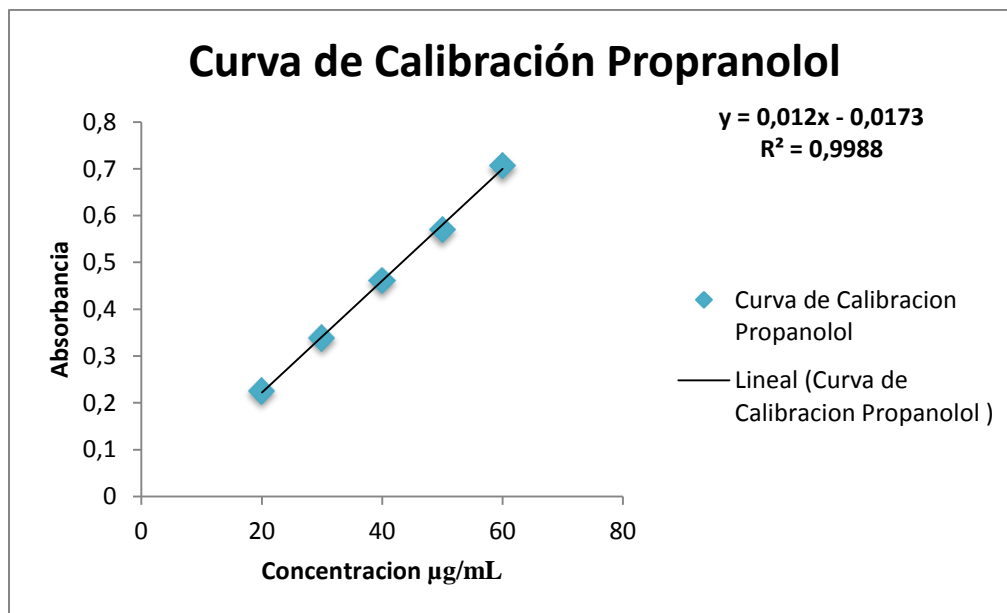


Gráfica 3. Primera curva de calibración realizada por el primer analista.



Gráfica 4. Segunda curva de calibración realizada por el primer analista.



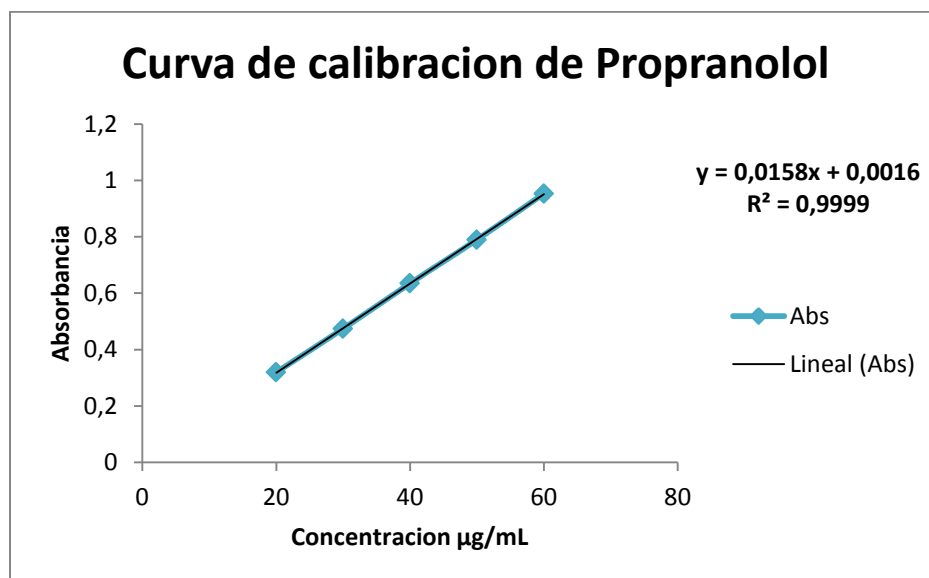


**Gráfica 5.** Tercera curva de calibración realizada por el primer analista.

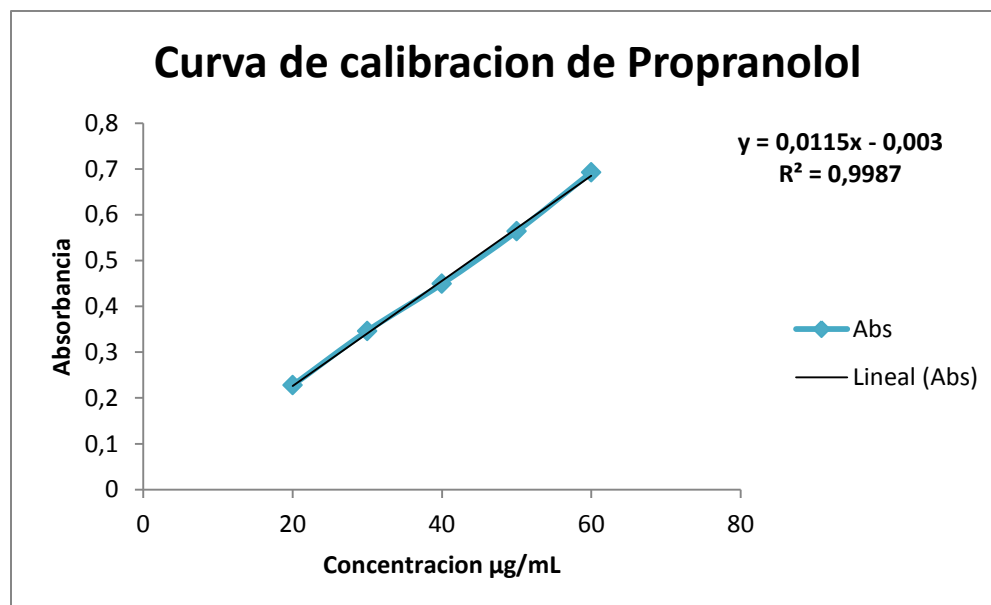
**Tabla 11.** Parámetros obtenidos al realizar las curvas de calibración de Propranolol por el primer analista en un mismo día.

Parámetros estadísticos	Resultado
<b>1° curva de calibración</b>	
%CV	0.6667
$R^2$	0.9971
<b>2° Curva de calibración</b>	
%CV	0.5848
$R^2$	0.9998
<b>3° Curva de calibración</b>	
%CV	0.8828
$R^2$	0.9988
	Promedio %CV=0.7114

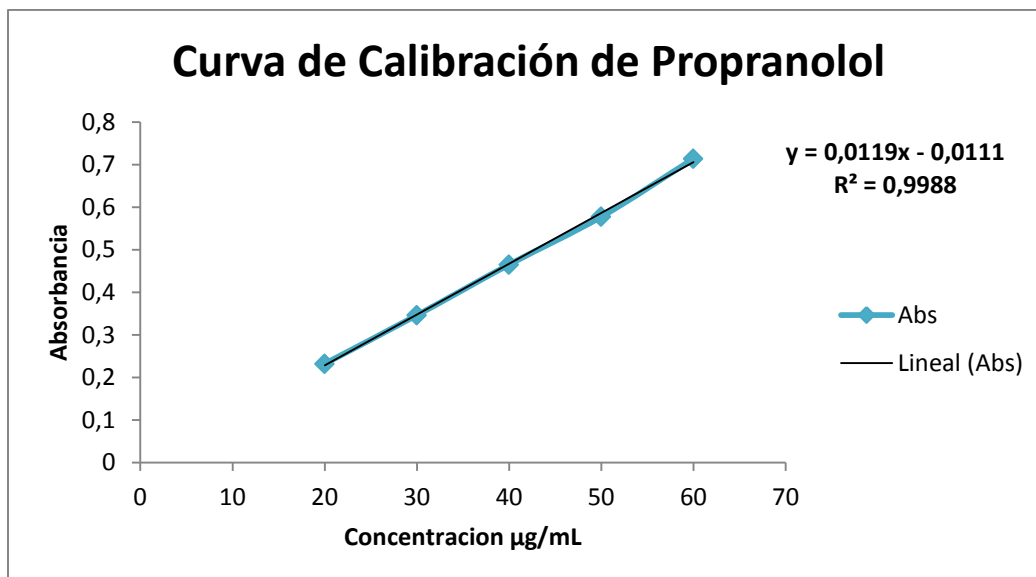
Curvas de Calibración realizadas por el segundo analista en diferente día. (09 de Julio de 2015)



Gráfica 6. Primera curva de calibración realizada por el segundo analista.



Gráfica 7. Segunda curva de calibración realizada por el segundo analista.



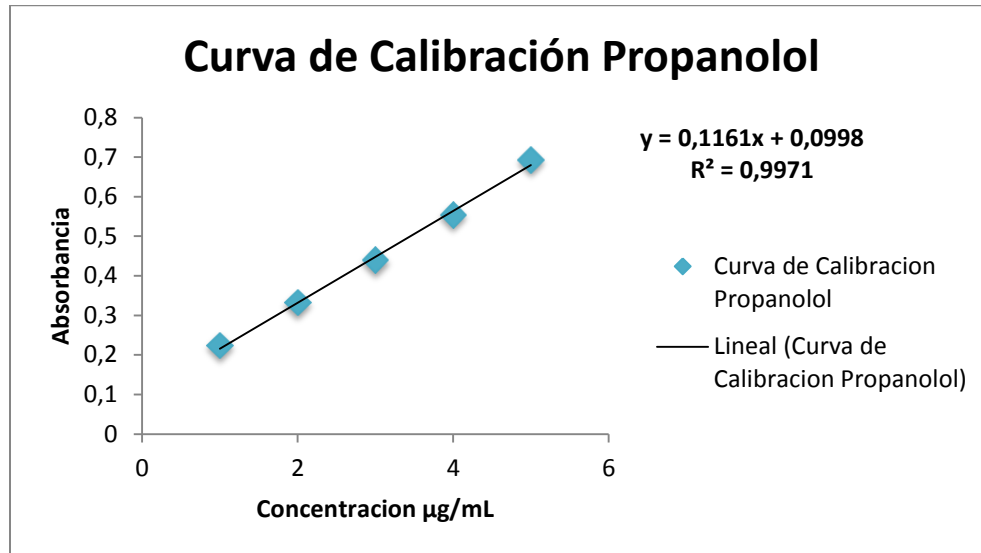
**Gráfica 8.** Tercera curva de calibración realizada por el segundo analista.

**Tabla 12.** Parámetros obtenidos al realizar las curvas de calibración de Propranolol por el segundo analista en un mismo día.

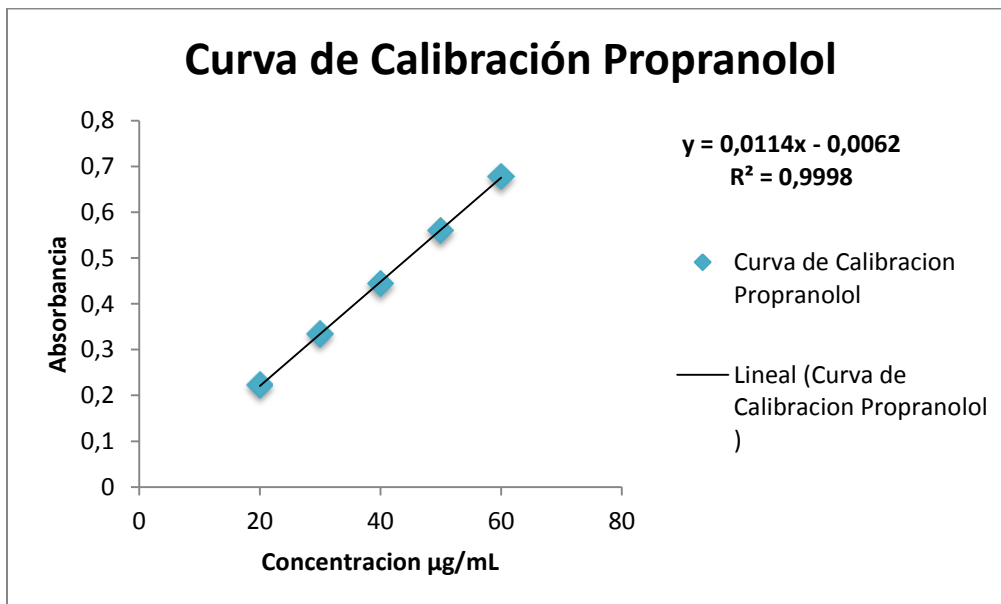
Parámetros estadísticos	Resultado
<b>1° curva de calibración</b>	
%CV	0.7872
R <sup>2</sup>	0.9999
<b>2° Curva de calibración</b>	
%CV	0.8894
R <sup>2</sup>	0.9987
<b>3° Curva de calibración</b>	
%CV	0.7000
R <sup>2</sup>	0.9988
	Promedio CV=0.7922

### 6.1.5 Repetibilidad

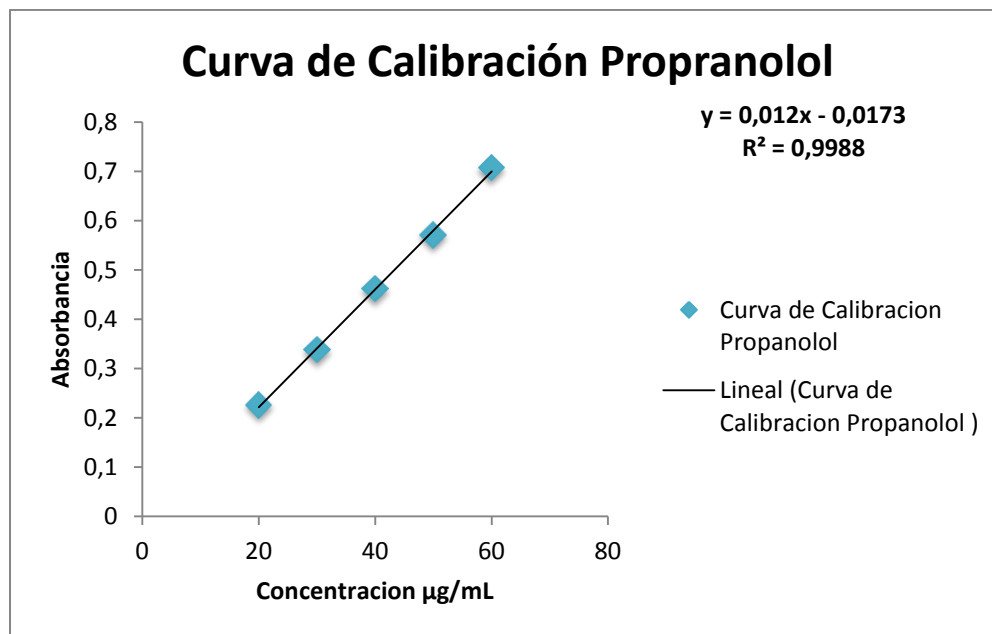
Curvas realizadas por el primer analista



**Gráfica 9.** Primera curva de calibración realizada por el primer analista.



**Gráfico 10.** Segunda curva de calibración realizada por el primer analista.



**Gráfica 11.** Tercera curva de calibración realizada por el primer analista.

**Tabla 13.** Parámetros obtenidos al realizar la curva de calibración de propranolol por el primer analista.

Parámetros estadísticos	Resultado
<b>1° curva de calibración</b>	
%CV	0.6667
R <sup>2</sup>	0.9971
<b>2° Curva de calibración</b>	
%CV	0.5848
R <sup>2</sup>	0.9998
<b>3° Curva de calibración</b>	
%CV	0.8828
R <sup>2</sup>	0.9988

**Tabla 14.** Resultados finales obtenidos en la validación de la curva de calibración de propranolol.

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>
Linealidad ( $r^2$ )	<b>0.9988</b>
Exactitud (%CV de las muestras interpoladas)	<b>0.6344</b>
Precisión (%CV de la curva )	<b>0.8828</b>
Repetibilidad ( %CV del primer analista)	<b>0.7114</b>
Reproducibilidad (%CV del segundo analista)	<b>0.7922</b>

## 6.2 Validación de la curva de calibración de Losartán

### 6.2.1 Exactitud del sistema

**Tabla 15.** Parámetros estadísticos de validación para la exactitud de la curva de calibración de Losartán.

Sistema	Peso (g)	Absorbancia	Concentración
1	0.0014	0.156	14.6535
2	0.0014	0.159	14.8897
3	0.0014	0.156	14.6535
4	0.0014	0.156	14.6535
5	0.0014	0.159	14.8897
6	0.0014	0.154	14.4960
<b>Desv. Est</b>	0.15483		
<b>x</b>	14.7060		
<b>%CV</b>	1.05285		

### 6.2.2 Linealidad del Sistema

Para obtener este parámetro se calcula el coeficiente de determinación el cual fue de 0.9991

#### 6.2.2.1 Linealidad del sistema por el método de los mínimos cuadrados

Para la comprobación de la linealidad en el método analítico desarrollado para Losartán, se realiza el método de los mínimos cuadrados, de la misma manera como se llevó a cabo en la comprobación de la linealidad para el método analítico de propranolol.

16. Análisis estadístico para obtener el mejor ajuste de la curva de calibración de Propranolol mediante el método de los mínimos cuadrados.

Método de los mínimos cuadrados para la curva de calibración de Losartán								
i	Concentración( $\mu\text{g/mL}$ ) (x)	Absorbancia (y)	XY	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	$(x_1 - x)(y_1 - y)$	$(x_1 - x)^2$	$(y_1 - y)$
1	6	0.047	0.282	36	0.0022	0.4164	36	0.0048
2	9	0.083	0.747	81	0.0068	0.1002	9	0.0011
3	12	0.114	1.368	144	0.0129	0	0	0.0057
4	15	0.151	2.265	225	0.0228	0.1038	9	0.0011
5	18	0.187	3.366	324	0.0349	0.4236	36	0.0049
$\bar{x}$	12	0.1164	1.6056	162	0.0159			
$\Sigma$						1.044	90	0.0121



Una vez obtenidos los parámetros estadísticos de cada sistema se procedió a sustituir en las fórmulas que aparecen en la figura no. 13 los datos correspondientes y así obtener la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), los cuales se muestran en la tabla no. 16

**Tabla 17.** Comparación de los resultados de linealidad obtenidos por el método de los mínimos cuadrados y por el cálculo del coeficiente de correlación para la curva de calibración de Losartán.

Parámetros obtenidos por el método de mínimos cuadrados		Parámetros obtenidos por el cálculo de coeficiente de correlación	
<b>Pendiente</b>	m= 0.0116		m= 0.0116
<b>Ordenada al origen</b>	b= -0.0228		b= -0.0221
<b>Coeficiente de correlación</b>	$r^2=0.9992$		$r^2 = 0.991$
<b>Recta de mejor ajuste</b>	y= 0.0116x-0.0228		y=0.0116x-0.0221

Como se observa en la tabla no. 16, al comparar el coeficiente de correlación obtenido por ambos métodos, es evidente que la linealidad del sistema se confirma ya que, el valor que debe presentar el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) debe de ser mayor o igual a uno.

Recordemos que este parámetro define la relación que existe entre dos variables aleatorias.

### 6.2.3 Precisión del sistema

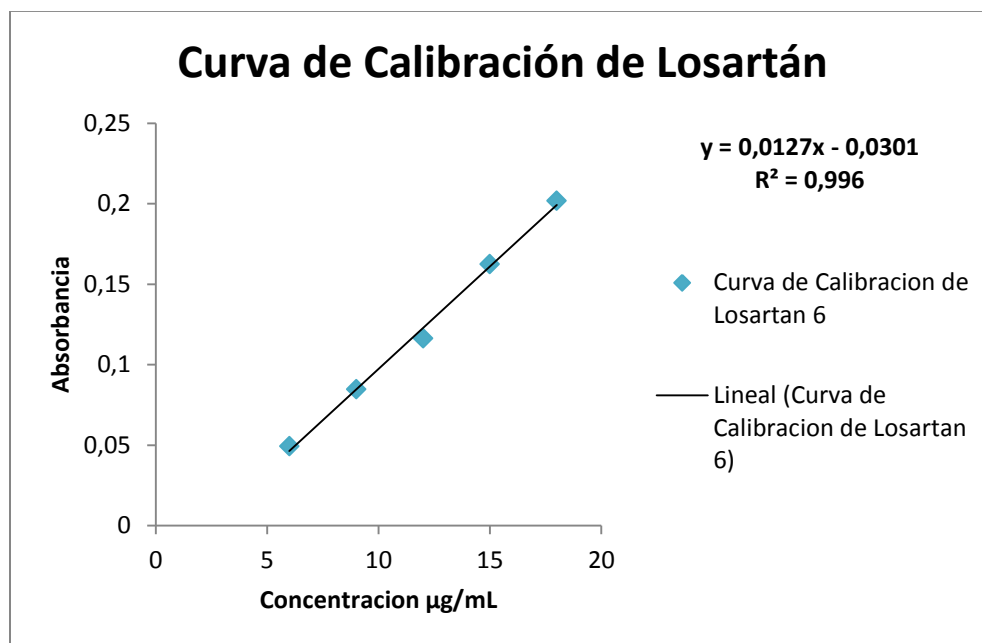
Para la obtención de este parámetro fue necesario calcular el coeficiente de variación con la ecuación 4:

$$\%CV = \frac{\text{desviacion estandar}}{\text{promedio}} \times 100 \text{(Ecuación 4)}$$

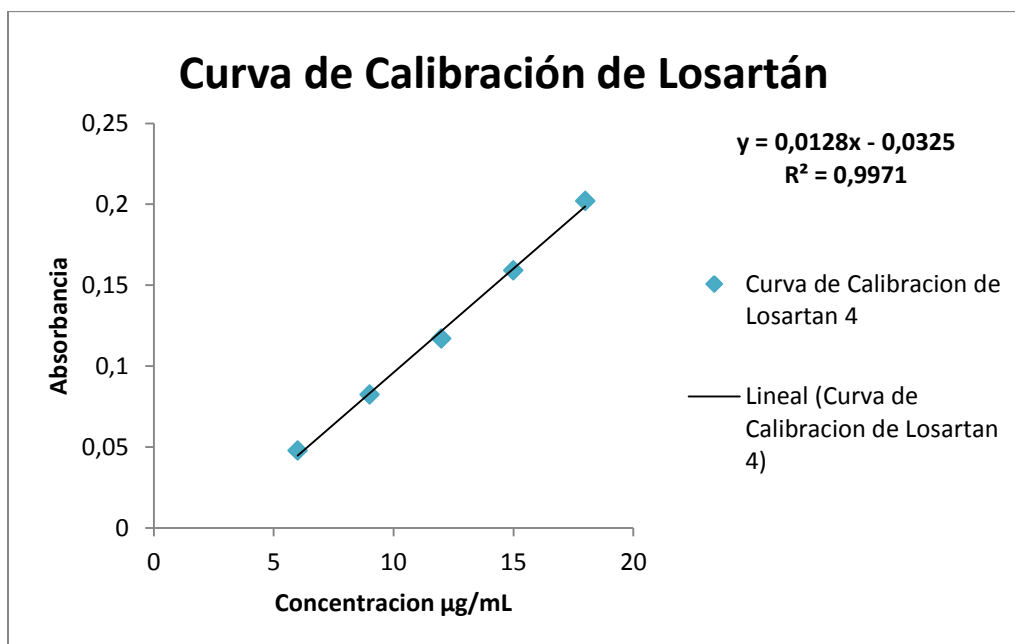
Obteniendo un resultado igual a CV= 1.4750

## 6.2.4 Reproducibilidad

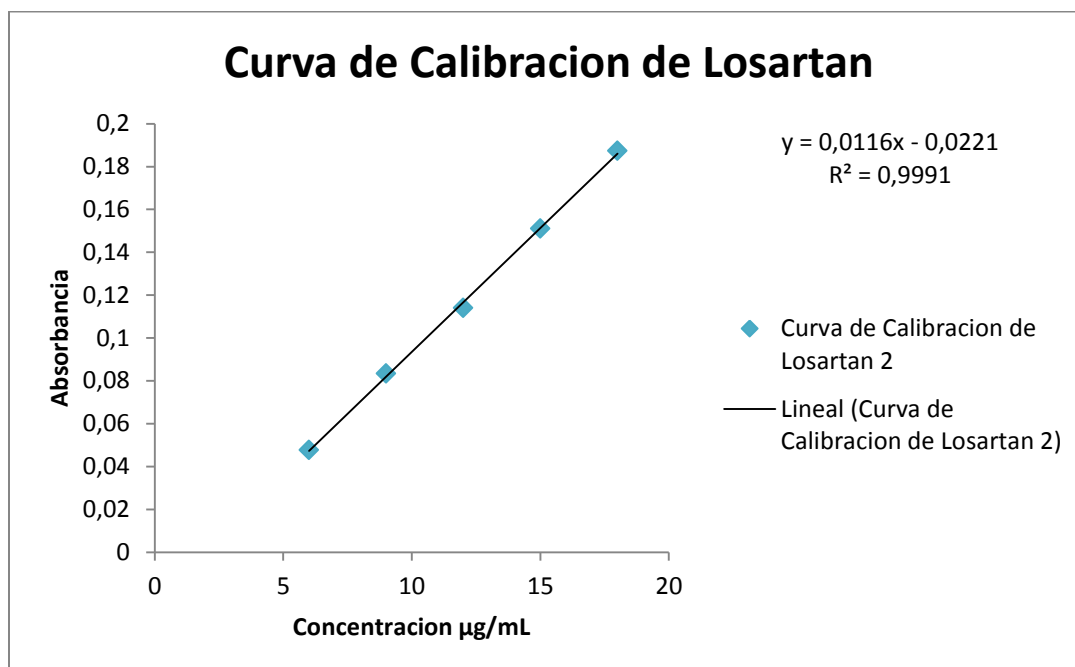
Curvas realizadas por el primer analista (09 de julio de 2015)



**Gráfica 12.** Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.



**Gráfica 13.** Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.

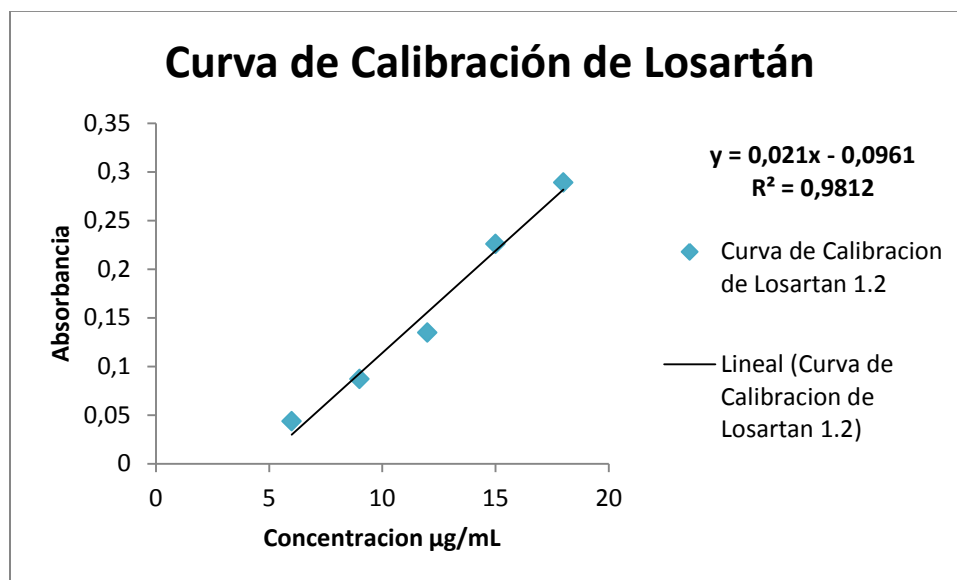


**Gráfica 14.** Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.

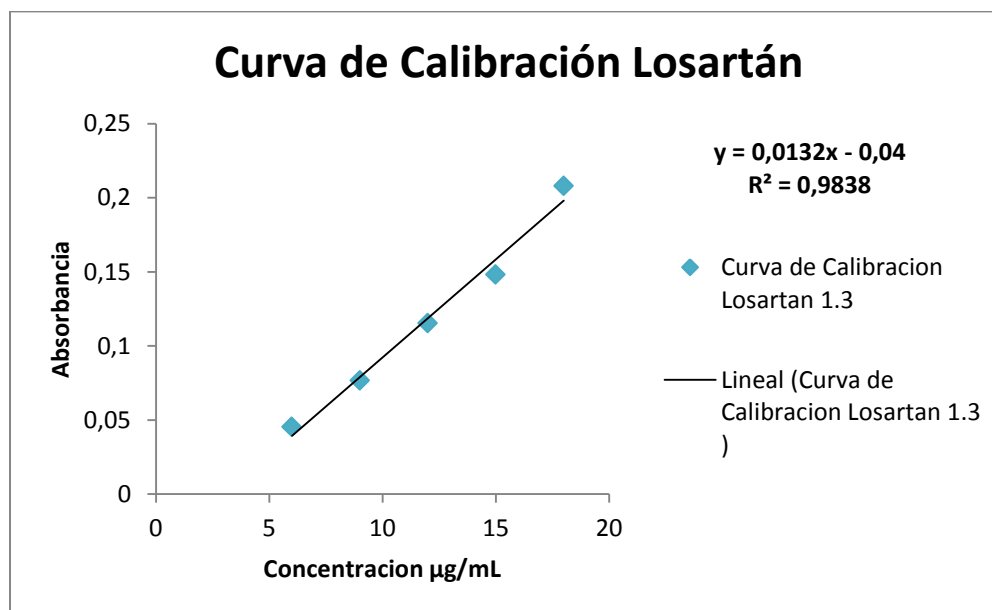
**Tabla 18.** Parámetros obtenidos al realizar la curva de calibración de Losartán por el primer analista.

Parámetros estadísticos	Resultado
<b>1° curva de calibración</b>	
%CV	1.190
R <sup>2</sup>	0.996
<b>2° Curva de calibración</b>	
%CV	1.435
R <sup>2</sup>	0.9971
<b>3° Curva de calibración</b>	
%CV	1.475
R <sup>2</sup>	0.999
	Promedio %CV= 1.3667

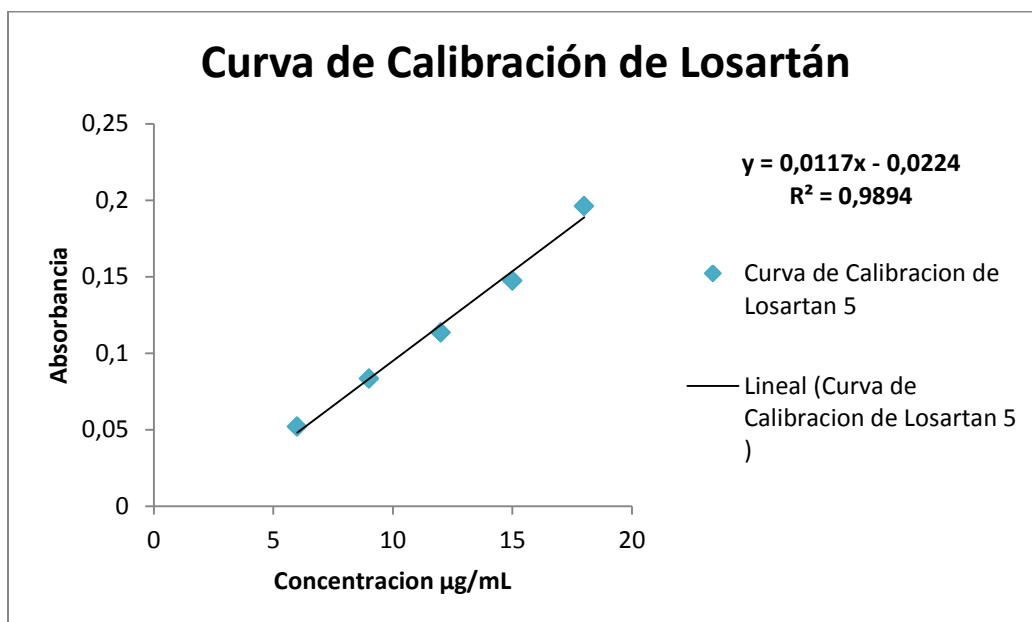
Curvas de Calibración realizadas por el segundo analista en diferente día. (09 de Julio de 2015)



Gráfica 15. Curva de calibración de Losartán realizada por el segundo analista.



Gráfica 16. Curva de calibración de Losartán realizada por el segundo analista.



**Gráfica 17.** Curva de calibración de Losartán realizada por el segundo analista.

**Tabla 19.** Parámetros obtenidos al realizar la curva de calibración de Losartán por el segundo analista.

Parámetros estadísticos	Resultado
<b>1° curva de calibración</b>	
%CV	1.2013
R <sup>2</sup>	0.9812
<b>2° Curva de calibración</b>	
%CV	1.5229
R <sup>2</sup>	0.9838
<b>3° Curva de calibración</b>	
%CV	1.3901
R <sup>2</sup>	0.9894
	Promedio CV=1.3714

## 6.2.5 Repetibilidad

Curvas realizadas por el primer analista (09 de Julio 2015)

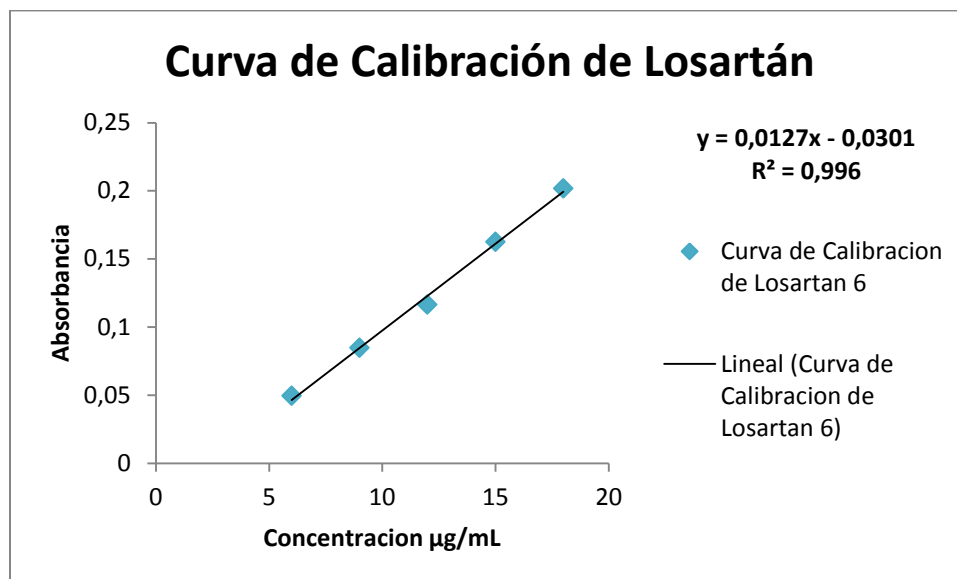
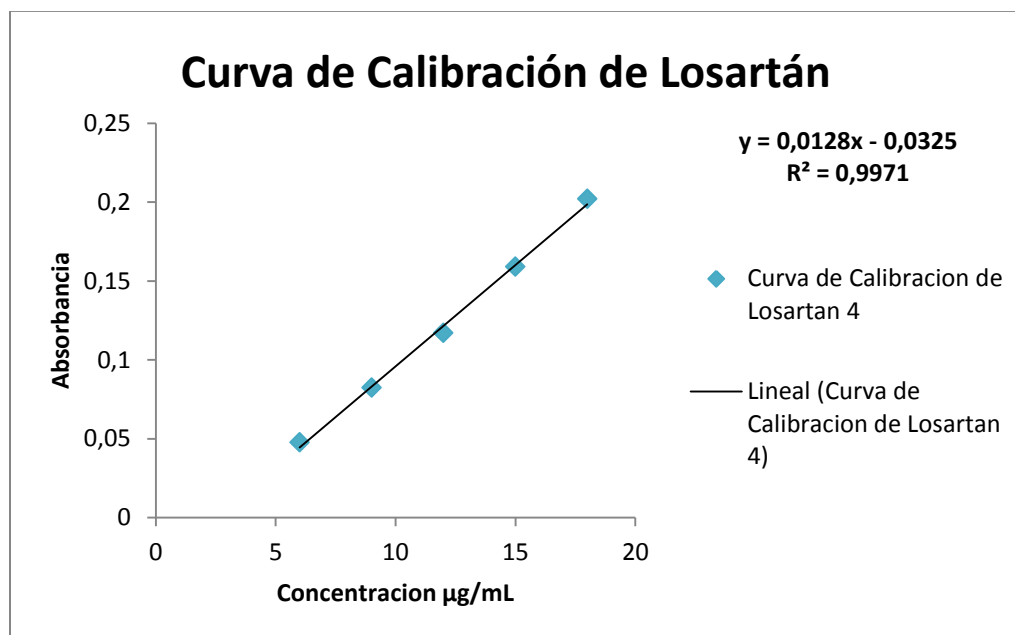
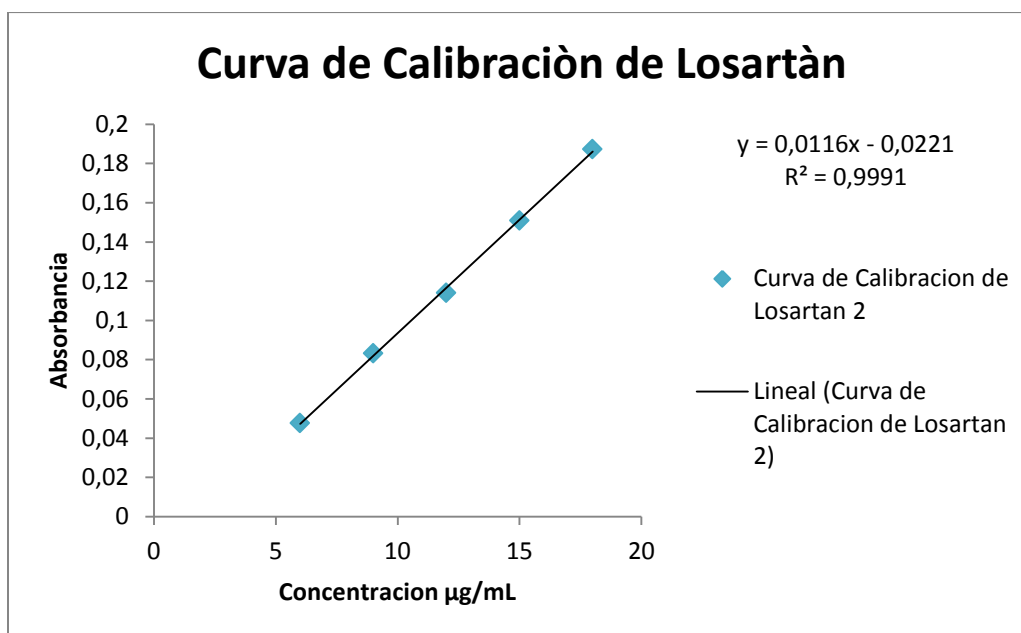


Gráfico 18 Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.



Gráfica19. Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.



**Gráfica 20.** Curva de calibración de Losartán realizada por el primer analista.

**Tabla 20.** Parámetros obtenidos al realizar la curva de calibración de Propranolol por el primer analista.

Parámetros estadísticos	Resultado
<b>1° curva de calibración</b>	
%CV	1.1901
R <sup>2</sup>	0.996
<b>2° Curva de calibración</b>	
%CV	1.4352
R <sup>2</sup>	0.9971
<b>3° Curva de calibración</b>	
%CV	1.4750
R <sup>2</sup>	0.9991

**Tabla 21.** Resultados finales obtenidos en la validación de la curva de calibración de Losartán.

<i>Parámetro</i>	<i>Resultado</i>
Linealidad ( $r^2$ )	<b>0.9991</b>
Exactitud (%CV de las muestras interpoladas)	<b>1.0528</b>
Precisión (%CV de la curva )	<b>1.4750</b>
Repetibilidad ( %CV del primer analista)	<b>1.3667</b>
Reproducibilidad (%CV del segundo analista)	<b>1.3714</b>

**Tabla 22.** Comparación de los resultados finales de la validación de los métodos analíticos de Propranolol y Losartán .

<i>Parámetro</i>	<i>Resultado de método Propranolol</i>	<i>Resultado de método Losartán</i>
Linealidad ( $r^2$ )	<b>0.9988</b>	<b>0.9991</b>
Exactitud (%CV de las muestras interpoladas)	<b>0.6344</b>	<b>1.0528</b>
Precisión (%CV de la curva)	<b>0.8828</b>	<b>1.4750</b>
Repetibilidad ( %CV del primer analista)	<b>0.7114</b>	<b>1.3667</b>
Reproducibilidad (%CV del segundo analista)	<b>0.7922</b>	<b>1.3714</b>

En la tabla no. 22 podemos observar los resultados de ambos métodos analíticos en donde observamos que estos métodos cumplen con lo establecido en la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos.



## 7. Análisis de Resultados

Este estudio tuvo la finalidad de determinar los métodos analíticos de dos fármacos antihipertensivos Propranolol y Losartán, mediante la técnica de espectrofotometría UV/Vis.

### 7.1 Análisis de grupos funcionales de propranolol

Ambos fármacos poseen en su estructura química un grupo funcional en común, este grupo funcional es denominado grupo amino, este grupo funcional resulta después de reemplazar uno o más átomos de hidrogeno en el amoniaco por grupos orgánicos. Las aminas primarias tienen un solo hidrogeno sustituido, y poseen el grupo funcional amino. Las aminas secundarias por el contrario tienen dos grupos orgánicos unidos al átomo de nitrógeno. Por ultimo las aminas terciarias tienen tres grupos funcionales unidos al nitrógeno. (Beyer, 1987)

En el caso de propranolol la amina presente en la estructura química es una amina secundaria, las aminas por lo general son un grupo funcional que confiere una naturaleza química básica a la molécula debido al nitrógeno presente, el cual tiene un par de electrones libre, que puede ser compartido. De igual manera en la molécula de propranolol se observan dos grupos funcionales más, el grupo hidroxilo y el grupo éter, ambos grupos funcionales por si solos no confieren a la molécula naturaleza química alguna por lo tanto, y enfatizando que el reactivo utilizado fue clorhidrato de propranolol, podemos afirmar que la naturaleza química de la molécula de Propranolol es básica. (Harris, 2001)

### 7.2 Determinación espectrofotométrica de Propranolol

La determinación por espectrofotometría se debe a los dos anillos aromáticos (bencenos) y al grupo amino, ya que los grupos éter y alcohol que poseen átomos de oxígeno, contienen electrones no implicados en enlaces que puedan ser excitados a niveles de energía superiores sin que se produzca la ruptura de los enlaces químicos. Estos compuestos por lo general, absorben a longitudes muy por debajo de los 200 nm en donde las lecturas no son muy confiables, a diferencia de los anillos de benceno y del grupo amino, ya que los compuestos aromáticos, en este caso los anillos de benceno,

absorben en el ultravioleta por encima de los 200nm, al ser compuestos con dobles anillos conjugados presentan una intensa absorción, así cuanto más larga sea la cadena conjugada, más intensa será la absorción, esto se atribuye a que existe una mayor área de la sección normal que presenta a la luz el sistema electrónico absorbente. La longitud de onda también aumenta, ya que la distancia existente entre los niveles de energía de los estados basal y excitado se hace menor. De igual manera adicionando la longitud del grupo amino, el cual al presentar un heteroátomo en este caso el nitrógeno, presenta transiciones de tipo  $n\pi^*$ , las cuales se ubican en la región cercana a los 200nm dando lugar a la denominada absorción final. Las características de absorción en esta región dependen de la naturaleza específica del heteroátomo y en particular de la energía del par electrónico libre que disminuye al aumentar la electronegatividad. Específicamente el grupo amino absorbe a una longitud máxima de entre 150 a 227 nm. (Atkins, 2005)

Para dicha determinación se hizo la preparación de diversas curvas de calibración para ambos fármacos.

### 7.3 Validación del método analítico de Propranolol

Para la curva de calibración de propranolol (grafica1), se determinó que la longitud adecuada para trabajar fuera de 305 nm basándonos en un espectro de absorción de dicho fármaco.

De este modo después de la realización por triplicado de la curva de propranolol, (**grafico 1 y tabla no. 18**) se logró encontrar la correlación lineal entre la absorbancia, que es la respuesta medida, y la concentración, en donde observamos que el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) tiene un valor de **0.9988**, el cual es una medida de la proporción de variabilidad total que existe entre la variable dependiente (y). Este parámetro define si el ajuste lineal es suficiente o se deben buscar modelos alternativos. Así, podemos afirmar que el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) utilizado para validar la curva de calibración de propranolol, basándonos en lo establecido por la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, indica que el sistema es lineal, ya que el valor del criterio de aceptación es  $r^2 \geq 0.98$ .

En cuanto a la exactitud del sistema podemos observar en la tabla no. 14 y tabla 18, que nuestro método es capaz de cuantificar cualquier concentración que se encuentre dentro de los límites inferiores y superiores de nuestra curva de calibración con una confiabilidad

alta, ya que se obtuvo un valor del coeficiente de variación (**CV**) de **0.6344**, lo cual indica, según la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, que nuestro sistema tiene una exactitud alta, ya que el criterio de aceptación que se encuentra en la guía es un valor de  $CV \leq 1.5\%$  para métodos fisicoquímicos y el método de Propranolol cumple con este parámetro.

En cuanto a la precisión, se procedió a la realización por triplicado de la curva de calibración de Propranolol, posteriormente se realizó el cálculo del coeficiente de variación de cada una de las curvas y del cual se obtuvo un promedio, el valor obtenido se observa en la tabla no. 15 el cual corresponde a un  $CV = 0.8820$ , este valor podemos interpretarlo como la diferencia absoluta entre los valores de CV's por cada curva de calibración de Propranolol y la media aritmética de todas las medidas. Básicamente este valor de CV indica que, basándonos en la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, el sistema es preciso, es decir que el sistema dará el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones, ya que el criterio de aceptación de la guía de validación es de un  $CV \leq 1.5$ , y el sistema cumple con dicho criterio al contar con un CV menor que el documentado.

La reproducibilidad se aplica a medidas hechas en distintas condiciones, es decir, con distintos analistas, distintos aparatos, distintos laboratorios, etc., en este caso la variable de cambio fue el analista, por lo tanto se procede a que cada analista realice por triplicado la curva de calibración de Propranolol, con lo que al calcular los coeficientes de variación de cada una de ellas y se obtenga un promedio, este coeficiente de variación no tenga cambios significativos. Por consiguiente los resultados obtenidos se pueden observar en las tablas no. 13 y 14, el coeficiente de variación de primer analista tiene un valor igual a **CV= 0.7114** y el valor de coeficiente de variación del segundo analista es **CV= 0.7922**, en este caso no hay una variación tan grande, y tomando como referencia la guía de validación de métodos analíticos del QFB, nuestro sistema se considera reproducible, ya que el criterio de aceptación menciona que para métodos fisicoquímicos o espectrofotométricos el valor del coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3%.

Consideramos que la repetibilidad de un sistema o de un método analítico se aplica a las medidas realizadas en condiciones lo más estables posible, con diferencias de tiempo, por el mismo analista y con el mismo equipo, para la evaluación de dicho parámetro se propuso realizar la curva de calibración por triplicado por el primer analista, y

posteriormente se calculó el coeficiente de variación de cada una de ellas, los resultados obtenidos se observan en la tabla no. 14 y 15, en donde el coeficiente de variación obtenido fue de  $CV= 0.7114$  con lo cual es sistema cumple con el criterio de la guía de validación de métodos analíticos del QFB, en la cual se menciona que el criterio de aceptación es igual o menor del 3% para métodos físico químicos o espectrofotométricos. Por lo tanto el sistema es reproducible.

Cabe mencionar que para el desarrollo del método analítico de Propranolol no fue necesaria la formación de ningún complejo colorimétrico, como en el caso de Losartán, el método analítico de Propranolol se llevó a cabo mediante la disolución de dicho fármaco en agua destilada.

Con lo que respecta al desarrollo del método analítico de Losartán, se decidió formar un complejo colorimétrico con  $CuSO_4$  ya que, por si solo el Losartán no daba una respuesta confiable con la técnica de espectrofotometría UV/Vis.

### **7.3.1 Linealidad del sistema por el método de mínimos cuadrados**

Para estudiar el comportamiento de una serie de datos obtenidos empíricamente, constituidos por puntos dados mediante pares ordenados de números, asociados con los valores, es necesario contar con una función que exprese analíticamente la relación funcional que guardan las variables en cuestión.

Para ello se realiza una interpolación de los datos, esta función de interpolación se caracteriza por suponer que los datos que intervienen en el problema son exactos, por lo cual en su construcción, se exige que satisfaga todos y cada uno de los valores que constituyen los datos.

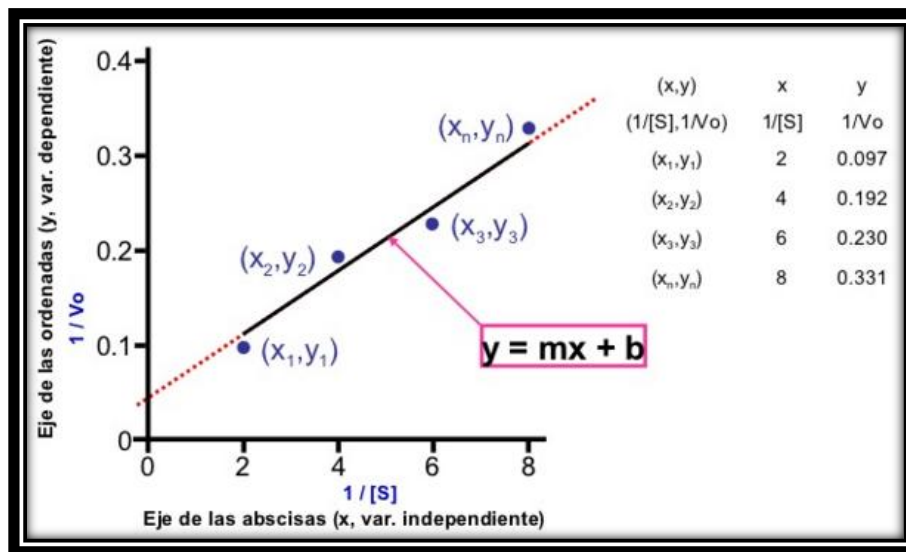
Se supone que los datos ingresados están afectados en cierto grado de errores debido al modelado, por lo que es indispensable realizar una curva de ajuste, en donde la aproximación sea óptima de acuerdo a un criterio de ajuste, es por ello que se utiliza el método de los mínimos cuadrados, esta técnica de análisis numérico en la que, dados un conjunto de pares, se intenta encontrar la función que mejor se aproxime a los datos, ósea un mejor ajuste.

En su forma más simple, este método intenta minimizar la suma de cuadrados de las diferencias ordenadas, llamadas residuos entre los puntos generados por la función y los correspondientes en los datos.

Algunas de las ventajas de este método, por mencionar algunas es que, es un método objetivo, ya que solo depende de los resultados experimentales. Es reproducible, ya que proporciona la misma ecuación, no importa quien realice el análisis. Otra de las ventajas de este método el proporcionar una estimación probabilística de la ecuación que representa a unos datos experimentales, y por ultimo proporciona intervalos pequeños de error.

Algunas de lo restricciones de este modelo es que solo sirve para ajustar modelos lineales, así como también los datos deben estar descritos por una distribución de probabilidad conocida. La más común es la distribución normal o gaussiana. (Day,1989).

Como se muestra en la figura No.12



**Figura 12.** Cálculo de la recta con mejor ajuste por el método de los mínimos cuadrados.

Se observan la linealidad del sistema, así como las ecuaciones para obtener los parámetros del método de los mínimos cuadrados. (Recuperado de <http://www.google.com.mx/imagenes./search?/jhgdg=calculo+de+recta=88>)

Las fórmulas que se utilizan en la obtención del método de los mínimos cuadrados se muestran a continuación en la figura no. 13.

$$m = \frac{n\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n\sum x^2 - (\sum x)^2} = \text{Pendiente, número de unidades que aumenta y por cada unidad de x.}$$

$$b = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n\sum x^2 - (\sum x)^2} = \text{Ordenada al origen; intersección de y; punto donde la recta corta el eje y; valor de y cuando x = 0.}$$

$$r = \frac{n\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n\sum x^2 - (\sum x)^2][n\sum y^2 - (\sum y)^2]}} = \text{Coeficiente correlación; varía de 0 a 1; nos dice qué tan bien la recta se ajusta a los puntos experimentales; entre más cerca de 1, mayor es la bondad de ajuste.}$$

**Figura 13.** Fórmulas para calcular la ecuación de la recta con mejor ajuste por el método de los mínimos cuadrados. (Recuperado de [http://www.google.com.mx/imagenes./search?/form\\_calc=6558/5561gf](http://www.google.com.mx/imagenes./search?/form_calc=6558/5561gf))

### Fórmulas para obtener el mejor ajuste lineal de la recta.

Para la curva de calibración de Propanolol se realizó el método de los mínimos cuadrados para comprobar la linealidad que presenta el sistema, y poder asegurar la veracidad de este parámetro de validación para un método analítico. En la tabla no. 9 podemos observar los parámetros estadísticos que se obtuvieron a partir del análisis de los datos obtenidos de las medidas de las absorbancias y las concentraciones de cada sistema.

### 7.4 Reacción de formación de complejo Losartán-Cobre.

La gran mayoría de iones inorgánicos en disolución acuosa absorben energía radiante en la región del visible, lo que permite que sean determinados directamente mediante espectrofotometría.

Muchos de los colores de los cationes inorgánicos simples, se pueden intensificar (en disolución) mediante la formación de complejos formados por muchos compuestos orgánicos y cationes en disolución acuosa.

Los complejos o compuestos de coordinación generalmente están formados por un átomo o ion central (la mayoría de los casos es un metal) que posee orbitales libres para aceptar

pares de electrones, el cual está rodeado por un grupo de iones o moléculas neutras capaces de compartir uno o más pares de electrones, unidos al ion central por un enlace coordinado y que se denominan ligandos. El complejo tiende a mantener su identidad, aun en disolución pero suele haber disociación parcial. La carga eléctrica del complejo depende de las cargas del ion central y de los iones o moléculas que lo rodean, pudiendo resultar un catión, un anión o una molécula neutra.

Es entonces, que, mediante una reacción de complejación, podemos apoyarnos y de cierta manera modificar al analito para detectarlo con mayor facilidad, posteriormente y según sea el caso de estudio, es factible realizar una determinación espectrofotométrica adecuada, y de la misma manera hay que tener en cuenta factores que son críticos en este tipo de reacciones de formación de complejos. (Day, 1989)

Algunos de estos factores son los siguientes:

#### **7.4.1 Selección de la longitud de onda analítica**

Se estudia la disolución en el espectro, para así, determinar un espectro de absorción, en donde se escoge la longitud de onda del máximo de absorción.

##### **7.4.1.2 Efecto del exceso de reactivo**

La adición de mayor cantidad de reactivo que desarrolla el color da lugar a pequeños incrementos de la absorbancia si es que la hace aumentar, es por ello que se recomienda que la cantidad de reactivo escogida para la normalización del procedimiento sea lo suficientemente grande para que diferencias minúsculas en la cantidad de reactivo en exceso no den lugar a diferencias, en la absorbancia, mayores que la precisión de la medida a realizar.

##### **7.4.1.3 Efecto del tiempo**

Algunas especies coloreadas experimentan desvanecimientos debido a la descomposición por la luz y/o por el calor, o aparentemente por reposo, lo ideal es que la reacción de formación de color sea rápida, de tal forma que los resultados analíticos puedan obtenerse con rapidez, y, que las especies coloreadas sean estables en el tiempo. Conforme a lo anterior se observó que el complejo colorimétrico entre Losartán y cobre era estable durante largos periodos, aproximadamente una hora después de su formación, debido a esto a la hora de obtener las mediciones de la absorbancia no se

observó ningún problema, y podemos afirmar con base a lo anterior que los resultados obtenidos son confiables. (Willard, 1978)

#### **7.4.1.4 Efecto del pH**

Un caso ideal sería que existiera un amplio margen de pH en el cual la absorbancia no variase, cuando el control de pH es muy crítico, se deben utilizar disoluciones adecuadas o buffer de gran capacidad reguladora. En el caso del complejo colorimétrico Losartán – Cobre no fue necesario controlar el pH, ya que la disolución se llevó a cabo a pH 7.

#### **7.4.1.5 Efecto de la temperatura**

En ciertas ocasiones es necesario mantener fija una temperatura para que pueda llevarse a cabo la reacción colorida, ya sea una temperatura arriba de la temperatura ambiente o bien, una disminución de la temperatura, esto depende de las características de cada compuesto, en el caso del complejo Losartán-cobre no fue necesario un cambio de temperatura, la reacción se llevó a cabo a 25 °C

#### **7.4.1.6 Conformidad con la Ley de Beer**

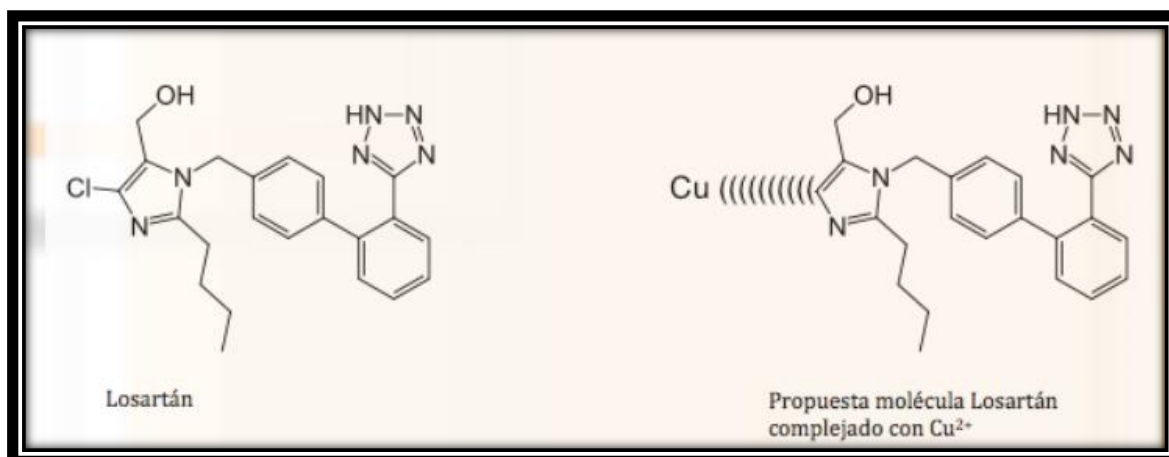
Debe de existir una relación lineal entre la concentración y la absorbancia lo que asegura que los resultados obtenidos han sido establecidos satisfactoriamente, cabe mencionar que esto se cumple ya que la respuesta obtenida en la curva de calibración de Losartán fue lineal, asegurando la confiabilidad de los resultados obtenidos. (Ayres, G, 1970)

El complejo formado presenta una coloración azul tenue. Dependiendo de su estado de oxidación, los complejos de cobre que se forman van desde las tonalidades azules a verdes. El cobre es el metal de transición más estudiado, y menos reactivo, por ello se decidió su utilización en esta metodología.

En la reacción se propone que el cobre y el Losartán forman un enlace coordinado, en el cual, cada par de electrones compartido por cada uno de los átomos es aportado por uno de ellos, el átomo que aporta el par de electrones se denomina dador, y el que lo recibe, receptor. Un enlace de coordinación se forma cuando una base de Lewis dona un par de electrones a un ácido de Lewis. Un ácido de Lewis, es una sustancia o un átomo que es capaz de compartir o aceptar un par de electrones, en este caso el Losartán tomara el papel de un ácido de Lewis, mientras que el cobre sería la base de Lewis, el cual comparte o dona un par de electrones. (Harris, 2001)



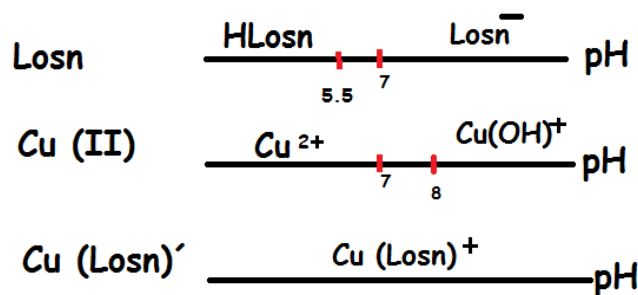
En la figura no. 14 se observa la propuesta de reacción entre el sulfato de cobre y el Losartán, para la formación del complejo cobre-Losartán.



**Figura 14.** Reacción propuesta para la formación del complejo Losartán-cobre.

#### 7.4.1.7 Análisis de la estabilidad del complejo mediante diagrama de zonas de predominio.

##### Equilibrio generalizado



##### Intervalos

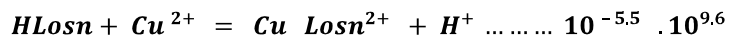
El pH utilizado fue de 7.0

Primer intervalo de  $0 \leq \text{pH} \leq 5.5$

Segundo intervalo  $5.5 \leq \text{pH} \leq 8.0$

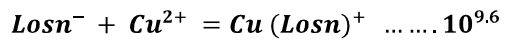
Tercer intervalo  $\text{pH} \geq 8.0$

**Si  $0 \leq \text{pH} \leq 5.5$**



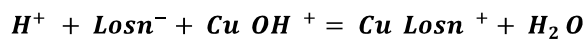
$$p\text{Losn} = 4.1 + 7 = 11.1$$

**Si  $5.5 \leq \text{pH} \leq 8.0$**



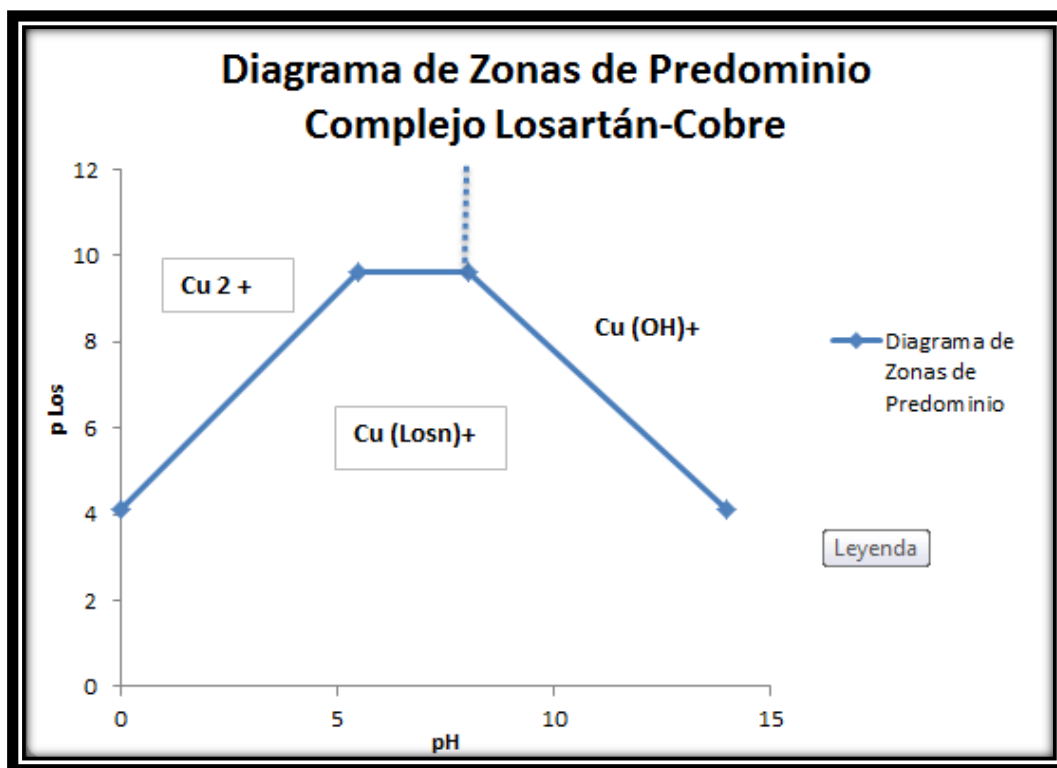
$$p\text{Losn} = 9.6$$

**Si  $\text{pH} \geq 8.0$**



$$p\text{Losn} = 17.6 - 7 = 10.6$$

#### 7.4.1.8 Diagrama de zonas de predominio



**Gráfico 21.** Diagrama de zonas de predominio del complejo Losartán-Cobre.

#### 7.5 Análisis de grupos funcionales de Losartán

La molécula de Losartán presenta dos grupos amino, un grupo halogenuro (cloro), dos anillos de benceno, y un grupo tetrazol, como ya se mencionó anteriormente el grupo amina confiere a la molécula de Losartán una naturaleza química básica, el grupo halogenuro y los anillos bencénicos no confieren ninguna naturaleza a la molécula de Losartán, y con respecto al grupo tetrazol consta de 4 átomos de nitrógeno y un átomo de carbono, que por ser derivado de los azoles, presenta propiedades anfóteras, es decir puede comportarse como una base o un ácido. La propiedad básica que pueden aportar los dos grupos amino, queda anulada debido a la cercanía de los nitrógenos, por efecto estérico, de este modo la molécula es ácida, característica dada por el grupo tetrazol y por ser una sal potásica. (Morrison, 1997)

Para determinar que longitud de onda era la adecuada para trabajar el complejo colorido de Losartán y sulfato de cobre se hizo un barrido utilizando la técnica de espectrofotometría UV/Vis, la cual fue 300nm.

#### **7.6 Determinación espectrofotométrica de Losartán**

Los responsables de la determinación espectrofotométrica de Losartán fueron, primeramente la reacción de complejacion con cobre lo que aumento la absorción de luz, ya que los implicados en la detección son los grupos amina , los dos anillos bencénicos y el grupo tetrazol, como anteriormente se menciona para Propranolol, las aminas y los anillos aromáticos absorben por arriba de los 200 nm para los anillos bencénicos y alrededor de los 200 nm para las aminas, para el grupo tetrazol la absorción se encuentra entre los 190-210 nm.

#### **7.7 Validación del Método Analítico de Losartán**

Para el análisis de los resultados obtenidos en el desarrollo del sistema de Losartán nos basamos en la obtención de los mismos parámetros de validación por lo que en este apartado solo se mencionaran los resultados obtenidos y si cumple o no con los criterios que la guía de validación de métodos analíticos estable para cada parámetro, ya que fundamentalmente, el análisis es el mismo. Estos resultados se observan en la tabla no. 20. En cuanto a la linealidad, como podemos observar en la curva de calibración de Losartán (grafico No. 2), al realizarse por triplicado se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9991, el cual indica que el sistema es lineal, ya que según lo establecido por la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de QFB, el criterio de aceptación para este parámetro debe ser igual o mayor a  $r^2 = 0.98$ , y el sistema cumple con el criterio.

El resultado que se obtuvo con respecto a la exactitud que presenta el sistema de Losartán, al realizar la interpolación de las 6 muestras de concentración conocida en la curva de calibración es de un CV= 1.0528 lo cual indica, según la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, que nuestro sistema tiene una exactitud alta, ya que el criterio de aceptación que se encuentra en la guía es un valor de  $CV \leq 1.5\%$  para métodos fisicoquímicos y el método de propranolol cumple con este parámetro.

En cuanto a la precisión se procedió a la realización por triplicado de la curva de calibración de Losartán, posteriormente se realizó el cálculo del coeficiente de variación de cada una de las curvas y del cual se obtuvo un promedio, el valor obtenido se observa en la tabla no.20 el cual corresponde a un valor de  $CV = 1.4750$  este valor podemos interpretarlo como la diferencia absoluta entre los valores de CV's por cada curva de calibración de propranolol y la media aritmética de todas las medidas. Básicamente este valor de CV indica que, basándonos en la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, el sistema es preciso, es decir que el sistema dará el mismo resultado en mediciones diferentes realizadas en las mismas condiciones, ya que el criterio de aceptación de la guía de validación es de un  $CV \leq 1.5$ , y el sistema cumple con dicho criterio al contar con un CV menor que el documentado.

El parámetro de reproducibilidad para el sistema de Losartán se aplica a medidas hechas en distintas condiciones, es decir, con distintos analistas, distintos aparatos, distintos laboratorios, etc., en este caso la variable de cambio fue el analista, por lo tanto se procede a que cada analista realice por triplicado la curva de calibración de Losartán, con lo que al calcular los coeficientes de variación de cada una de ellas y se obtenga un promedio, este coeficiente de variación no tenga cambios significativos. Por consiguiente los resultados obtenidos se pueden observar en las tablas no. 17 y 18, el coeficiente de variación de primer analista tiene un valor igual a  $CV = 1.3667$  y el valor de coeficiente de variación del segundo analista es  $CV = 1.3714$  en este caso no hay una variación tan grande, y tomando como referencia la guía de validación de métodos analíticos del QFB, nuestro sistema se considera reproducible, ya que el criterio de aceptación menciona que para métodos fisicoquímicos o espectrofotométricos el valor del coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3%. La repetibilidad de un sistema o de un método analítico se aplica a las medidas realizadas en condiciones lo más estables posible, con diferencias de tiempo, por el mismo analista y con el mismo equipo, para la evaluación de dicho parámetro se propuso realizar la curva de calibración de Losartán por triplicado por el primer analista, y posteriormente se calculó el coeficiente de variación de cada una de ellas, los resultados obtenidos se observan en la tabla no. 19 y 20, en donde el coeficiente de variación obtenido fue de  $CV = 1.3667$  con lo cual el sistema cumple con el criterio de la guía de validación de métodos analíticos del QFB, en la cual se menciona que el criterio de aceptación es igual o menor del 3% para métodos físico químicos o espectrofotométricos. Por lo tanto el sistema es reproducible.

## 8. Conclusiones

Se logró la determinación de dos métodos analíticos de los fármacos antihipertensivos Losartán y Propranolol, en donde, se utilizó para el método analítico de Losartán la reacción con sulfato de cobre, para formar un complejo colorido y poder obtener una señal adecuada utilizando la técnica de espectrofotometría UV/Vis. Una vez realizada la validación de los parámetros como precisión, linealidad por el cálculo del coeficiente de correlación y por el método de los mínimos cuadrados, exactitud, reproducibilidad y repetibilidad, basándonos en los criterios de aceptación de la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos, se puede afirmar que ambos métodos analíticos son lineales, precisos, exactos, repetibles y reproducibles, por lo tanto su confiabilidad es alta, con lo cual pueden ser utilizados en estudios posteriores. Cabe mencionar que para obtener parámetros estadísticos confiables, los cuales permiten la correcta validación de un método analítico, se debe buscar las mejores condiciones de desarrollo para la determinación de dichos métodos analíticos, como condiciones ambientales, de higiene y limpieza, capacitación y validación del analista, calificación y calibración de los equipos a utilizar, etc.

## 9. Futuras Perspectivas

El presente trabajo es la pauta para poder iniciar futuras investigaciones con estos fármacos y poder determinar sus concentraciones en diferentes medios, para ello, se sugiere el desarrollo de los métodos analíticos de Losartán y Propranolol en plasma sanguíneo, modificando las condiciones de trabajo que sean necesarias para su aplicación en estudios farmacocinéticos.

Así mismo se propone que se haga un ajuste en las concentraciones que se pretenden determinar en el medio sugerido, para poder obtener parámetros pertinentes y confiables, los cuales aseguren la veracidad de ambos métodos.

Con respecto al complejo formado con cobre y Losartán se sugiere realizar una investigación a fondo a cerca de sus características físicas, químicas y fisicoquímicas, sus  $pK_a$ 's, así como todos los parámetros necesarios para poder determinar si en condiciones distintas a las que presenta en medio acuoso, el complejo es estable.

## 10. Referencias

### Bibliografía

- Albaladejo, B. D. (2002). *Principios de Farmacología Clínica*. Barcelona, España: Masson .
- Alfonso Mendez, M. d. (s.f.). *Desarrollo de Metodos para el aislamiento y la deteccion de toxinas marinas en productos de la pesca y la agricultura*.
- Allinger. (1984 ). *Quimica Organica* . En Allinger, *Quimica Organica* (págs. 70-73). New York : Reverte .
- Atkins, P. (2005 ). *Principios de Quimica, los caminos del descubrimiento* . En P. Atkins, *Principios de Quimica, los caminos del descubrimiento* (págs. 704- 705 ). Panamericana .
- Ayres, G. (1970). *Análisis Químico Cuantitativo* . En G. Ayres, *Análisis Químico Cuantitativo* (págs. 475-481). Madrid : Harla.
- Biologos, C. N. (2012). *Guia de Validacion de Metodos Analiticos* . Mexico, D.F.
- Cardiología, S. E. (2013). *Guia de practica clinica de la ESH/ ESC para el manejo de la hipertension* . Barcelona, España .
- Charlot, G. (1977). *Curso de Quimica Analitica General* (Vol. II). Barcelona, España: Toray Masson.
- Daniel, H. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo* (3 ed.). Barcelona, España : Reverte .
- Day, R. J. (1989). *Química Analítica Cuantitativa* . México: Hispanoamericana .
- Devlin, M. T. (2004). *Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas* . En M. T. Devlin, *Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas* (pág. 1170). Barcelona : Reverte .
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. (2012). Mexico .
- FDA. (2000). *Guideline for Industry Analytical Procedures and Methods Validation*.
- Florez, J. (2003). *Farmacología Humana* (4 ed.). Barcelona, Española: Masson.
- Geissman, T. (1974 ). *Principios de Quimica Organica* . En Geissman, *Principios de Quimica Organica* (pág. 147). Barcelona, España : Reverte .



- Goodman, L. y. (2007). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (11 ed.). Mexico: Mc Graw Hill.
- Harris, D. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo*. Barcelona : Reverte .
- Harvey, D. (2002). *Química Analítica Moderna* (259-282 ed.). Mexico : Mc Graw Hill .
- Morrison, R. (1997 ). *Química Organica* . En R. Morrison, *Química Organica* (pág. 166). New York : Pearson Educacion .
- Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de Medicamentos*. (s.f.).
- Norma Oficial Mexicana NOM-177-1998 "Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable"*. (s.f.).
- PLM. (2012). *Informacion Para Prescribir Amplia Losartan* .
- PLM. (2012). *Informacion Para Prescribir Amplia Propranolol* .
- Salud, S. d. (2012). *ENSANUT Encuesta Nacional de Salud y Nutricion 2012* . Recuperado el 7 de Agosto de 2015, de <http://ensanut.insp.mx/>
- Skoog, D. H. (2001). *Principios de analisis instrumental* (8 ed. ed.). Mexico, D.F.: International Thomson.
- Skoog, D. W. (2005). *Fundamentos de Química Analítica* (8 ed.). Mexico, D.F.: International Thomson .
- Skoog, W. H. (2003). *Química Analítica* (7 ed.). Mexico: Mc Graw Hill.
- Willard, H. H. (1978). *Métodos Instrumentales de Análisis* . México: Continental .

