



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización y cuantificación de medicamentos de utilidad al
tratamiento de coronavirus mediante Espectroscopía de Infrarrojo y
Cromatografía de líquidos de alta resolución**

TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

Juan Carlos Morán Lara



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX MARZO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: González Chávez José Luz**

VOCAL: **Profesor: Rodríguez de San Miguel Guerrero Eduardo**

SECRETARIO: **Profesor: Reyes López Elizabeth**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Camacho Frías Evangelina**

2° SUPLENTE: **Profesor: Peña Álvarez Araceli Patricia**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Elizabeth Reyes López

SUSTENTANTE:

Juan Carlos Morán Lara

“Se necesitan tres cosas para ganar; la disciplina, el trabajo duro y, por encima de todo, el compromiso. Nadie va a lograr ganar sin esos tres, y el deporte te enseña eso”

Haile “El emperador” Gebrselassie

“No te puede poner ningún límite, no hay nada imposible”

Usain Bolt

“No lo intentes, hazlo o no lo hagas, pero no lo intentes”

Maestro Yoda

“Seguir cuando crees que no puedes más, es lo que te hace diferente a los demás”

Rocky Balboa.

A MI MADRE

Gracias por todo tu amor y apoyo incondicional en todo momento de mi vida, que desde pequeño me enseñaste a nunca rendirme y siempre ser una buena persona, por siempre decirme que le eche ganas aun cuando yo ya no podía.

Gracias mamá por siempre cuidarme y estar ahí cuando más te he necesitado, sabes que te amo y eso nunca cambiará, te dedico estas páginas con todo mi corazón.

A MI PADRE

Gracias papá que desde niño me has enseñado muchísimo y tu junto a mi madre me han hecho llegar hasta donde estoy ahora, gracias por ser como eres, tu carácter, tú temple y tu sabiduría, me han hecho la persona que soy ahora. Espero que estés orgulloso de esta meta que estoy cumpliendo y que también te dedico con todo mi corazón, porque yo siempre he estado orgulloso de tenerte como mi papá y como siempre me dijiste, “nunca seas uno más del montón” y gracias a ti no lo soy. Te amo papá.

A MI HERMANA

Hermanita, cuantas veces no jugamos y peleamos de pequeños, nunca olvidaré como rompiste mi álbum de dragon ball jaja. Te agradezco que también me has apoyado para poder terminar esta meta, que junto a tu familia siempre me siento apoyado y que los tres angelotes que tienes de hijos me llenan de mucha paz. Thalia, David, Diego, Sofía y Gaelito, muchas gracias por todo.

A DIANA

Flaquita hermosa, sin ti no hubiera terminado este logro, no tengo palabras ni letras para describir lo agradecido que estoy contigo, tú que me impulsaste para retomar el tema para titularme, que me levantaste cuando ya no podía, que me has regañado por no echarle ganas jaja, pero más importante que me has demostrado tu amor incondicionalmente apoyándome para terminar. Gracias mi vida, no puedo decir lo logré, lo correcto es decir LO LOGRAMOS. Y de aquí para adelante con todo, porque para atrás ni para echar vuelo. Te amo Flaquita.

A LOBITO

No hubo mejor compañía que un amigo fiel en todo este recorrido, mi amiguito, mi hermanito, mi compañero y la mejor mascota del mundo.

Gracias a mis amigos y compañeros que me enseñaron lo que se del área farmacéutica y de la química analítica, quienes a base de tolerancia y regaños me enseñaron esta rama de la Química, Alfredo Rivera, Mario López, Javier Huitrón, Gabriela Cano, Diana Licon, Giovani Alanís, Edith Prado, Sara Gil, Carlos Arellano, Ivonne Domínguez, Mario Palacios, Noé Rivera y a todos los demás compañeros que conocí en el laboratorio ARJ, muchas gracias por sus enseñanzas y buenos momentos.

A mis amigos que siempre han estado ahí apoyándome desde lejos y que desde el primer semestre de la carrera he tenido su apoyo y amistad, pero sobre todo siempre han creído en mí, gracias Viridiana Zurita, Joel Chávez y Susy Carmona por siempre estar ahí.

A la Dra. Elizabeth Reyes mi asesora de trabajo para titulación, gracias por el apoyo para poder terminar este logro, por alentarme y orientarme para realizar de la mejor manera este trabajo y por sus buenos deseos.

Al Dr. José Luz González Chávez y al Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero por el apoyo y asesorías para que pudiera terminar este escrito y lograr esta meta.

A la Facultad de Química por ser mi refugio y segunda casa durante todo este trayecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas desde inicios de mi formación como universitario, que sin temor a mentir ha sido la mejor experiencia de mi vida y la más grata satisfacción en mi vida como estudiante.

A todos y cada uno de ustedes que con su cariño, apoyo, confianza, orientación y asesoría pude concluir uno de los objetivos más importantes en mi vida, la culminación de un sueño que marca el fin de una trayectoria escolar y el inicio de una vida como profesionista.

Con el corazón, ¡Muchas Gracias!

Juan Carlos.

Índice General

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	2
1. Paracetamol.	2
1.1. Importancia clínica	2
1.2. Síntesis y estructura del Paracetamol	2
1.3. Paracetamol ante Covid	4
2. Cloroquina e Hidroxicloroquina.	5
2.1. Importancia clínica	5
2.2. Estructura química de la Cloroquina y la Hidroxicloroquina.....	5
2.3. Cloroquina e Hidroxicloroquina ante Covid	6
3. Química Analítica, métodos de cuantificación.....	6
3.1. Espectroscopía	7
3.1.1. Definición	7
3.1.2. Importancia de la Espectroscopía	7
3.1.2.1. Espectro electromagnético	8
3.1.2.2. Espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)	10
3.1.2.3. Espectro infrarrojo	12
3.2. Cromatografía	13
3.2.1. Introducción	13
3.2.2. Historia	13
3.2.3. Fundamentos de la cromatografía	14
3.2.4. Clasificación de los tipos de cromatografía.....	14
3.2.5. Clasificación por su fase móvil	15
3.2.6. Clasificación por mecanismo de separación.	15
3.2.7. Clasificación por su forma de separación.....	16
3.2.8. Parámetros cromatográficos.....	17
3.2.9. Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC).....	20
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	23

CAPÍTULO IV. OBJETIVO	24
CAPÍTULO V. HIPÓTESIS.....	25
CAPÍTULO VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS	26
1. Paracetamol	26
1.1. Cuantificación y caracterización mediante cromatografía líquida de alta resolución.....	26
1.1.1. Descripción de artículos reportados	26
1.1.2. Análisis comparativo entre metodologías.....	31
1.2. Cuantificación y caracterización mediante espectroscopía FTIR.....	34
1.2.1. Descripción de artículos reportados	34
1.2.2. Análisis comparativo entre metodologías.....	37
2. Cloroquina.....	38
2.1. Cuantificación y caracterización mediante cromatografía líquida de alta resolución.....	38
2.1.1. Descripción de artículos reportados	38
2.1.2.- Análisis comparativo entre metodologías.....	42
2.2 Caracterización mediante espectroscopía FTIR de la Cloroquina.....	46
3. Hidroxicloroquina.....	48
3.1. Cuantificación y caracterización mediante cromatografía líquida de alta resolución.....	48
3.1.1 Descripción de artículos reportados.....	48
3.1.2 Análisis comparativos entre metodologías.	53
3.2 Caracterización mediante espectroscopía FTIR de la Hidroxicloroquina.	55
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES.....	57
Bibliografía	58

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

En diciembre del 2019, en la provincia de Hubei, China la Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan informa de una serie de casos de neumonía desconocida. No es hasta el 7 de enero del 2020 cuando las autoridades chinas identificaron como agente causante del brote un nuevo virus de la familia Coronaviridae, denominado como SARS-CoV.2, o también llamado COVID-19 (por sus siglas en Inglés de Coronavirus Disease 2019). (Rohilla, 2020) (Hin Fung Tsang, 2020)

El coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV -2) se ha extendido alrededor del mundo orillando a la Organización Mundial de la Salud a declarar una pandemia. (Rohilla, 2020)

El SARS-CoV-2, enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) presenta síntomas similares a los de una gripe; sin embargo, estos síntomas pueden agravarse en personas de alto riesgo, perjudicando a la salud pública con una morbilidad y mortalidad considerables debido a la falta de vacunas y tratamiento eficaz. Esta grave enfermedad perjudicó principalmente a los adultos con comorbilidades médicas predisponentes (como cardiopatías, hipertensión y enfermedades pulmonares crónicas), aunque puede darse también en individuos sanos que pueden ser asintomáticos. Los síntomas comunes de la enfermedad son fiebre, tos, fatiga, leve disnea, dolor de cabeza y conjuntivitis. (Hin Fung Tsang, 2020)

Científicos, médicos, ingenieros e incluso sociedades enteras han tomado conciencia de la gravedad de la infección por COVID-19 y están actuando rápidamente, utilizando todas las herramientas, desde la protección hasta el tratamiento contra el coronavirus SARS-CoV-2. (Hin Fung Tsang, 2020)

En la actualidad, no se recomienda algún fármaco antiviral específico para la enfermedad por COVID-19; sin embargo, algunos de los fármacos sugeridos como tratamiento para los síntomas ocasionados por la enfermedad son: paracetamol (Acetaminofén), Hidroxicloroquina y Cloroquina. (Hin Fung Tsang, 2020)

En este trabajo nos centraremos en el interés de cuantificación de los tres fármacos antes mencionados por dos de los métodos más utilizados para identificar y cuantificar en el área de la industria farmacéutica, los cuales son Cromatografía de líquidos de alta resolución y Espectrofotometría Infrarroja (HPLC y FT-IR por sus siglas en inglés, respectivamente).

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

1. Paracetamol.

1.1. Importancia clínica

Paracetamol, acetaminofén (o N-(4-hidroxifenil)-etanamida, (Figura 1) nombre sistemático recomendado por la IUPAC desde 1993), es un fármaco con propiedades analgésicas, pero sin que sean clínicamente significativas, conteniendo también propiedades antiinflamatorias. Como no interactúa con la mayoría de los medicamentos y se considera bastante seguro, es uno de los analgésicos más utilizados en la actualidad. El paracetamol tiene efectos antipiréticos y actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, mediadores celulares responsables de la aparición del dolor. El paracetamol forma parte de la composición de una serie de medicamentos utilizados contra el resfriado común y la gripe. Las dosis recomendadas son bastante seguras, no afectan a la mucosa gástrica, no alteran la coagulación de la sangre. (Ellis, 2002).

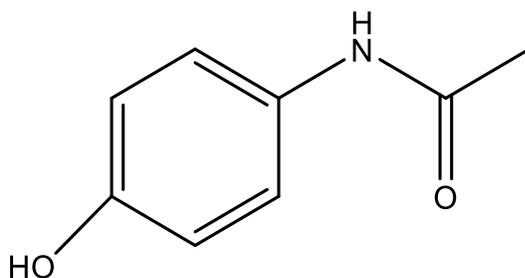
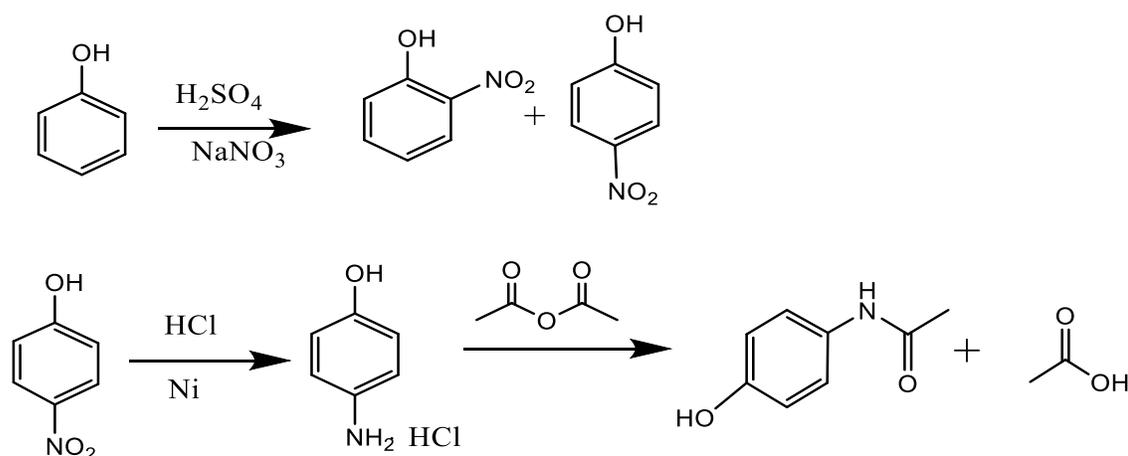


Figura 1. Estructura Química del Paracetamol (Acetaminofén)

1.2. Síntesis y estructura del Paracetamol

La síntesis del paracetamol fue realizada por primera vez por J. Von Mering a finales de 1800, reportando con una actividad analgésica, pero no es hasta mitad del siglo XX que llegó a ser ampliamente utilizado y comercializado. (Ellis, 2002)

A continuación, se presenta la síntesis del Acetaminofén a partir del fenol (Esquema 1):



Esquema 1. Síntesis del Paracetamol.

La Síntesis del paracetamol se comprende en tres etapas. En la primera etapa con una mezcla sulfonítrica, se añade lentamente el fenol para poder nitrarlo y obtener los isómeros 4-nitrofenol y 2-nitrofenol.

En la etapa dos se reduce el grupo nitro hasta un amino. La reducción de un nitrocompuesto a amina procede suavemente cuando se agita una disolución del nitrocompuesto con níquel o platino.

La tercera y última etapa consiste en la acetilación de una amina, es una reacción de sustitución nucleofílica sobre carbono insaturado, siendo el nucleófilo la amina. El mecanismo de la acetilación consiste en una adición de la amina al carbono del carbonilo anhídrido acético, formando un intermediario tetraédrico. Se forman cristales sólidos de acetaminofén, dejando en disolución el ácido acético, el cual puede ser removido mediante métodos de purificación adecuados, mediante el cual sería como primer paso una filtración para retirar el ácido acético líquido. A continuación, se realizaría un lavado con agua destilada a la cristalización obtenida. Para obtener una purificación del acetaminofén se pueden disolver estos últimos cristales en agua caliente y se realiza una recristalización. (Ellis, 2002) (J. Chem. Educ., 2022)

1.3. Paracetamol ante Covid

Es el fármaco de elección en pacientes que no pueden ser tratados como antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como personas con asma bronquial, niños menores de 12 años, embarazadas, o mujeres lactantes. De acuerdo con la OMS el paracetamol debe ser el fármaco recomendado como analgésico y antipirético, tratamiento de elección para el control de la temperatura y dolor provocado por los síntomas del COVID-19. (Rohilla, 2020).

2. Cloroquina e Hidroxicloroquina.

2.1. Importancia clínica

La Cloroquina y la Hidroxicloroquina son dos sustancias utilizadas en el tratamiento de paludismo humano. Está autorizado su uso en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide con moderada a elevada actividad de la enfermedad, debido a que poseen actividad inmunodepresora. Sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción. (Axfors, 2021)

2.2. Estructura química de la Cloroquina y la Hidroxicloroquina

La Hidroxicloroquina (HCQ) es una molécula de la familia de las quinolinas, en concreto de las que presentan un grupo amino (-NH₂) en el carbono 4 de ese anillo (4- aminoquinolinas). El nombre sistemático de la IUPAC es el (RS)-N-(7-cloroquinolin-4-il)- N, N-dietil-pentano-1,4-diamina. (Axfors, 2021)

Similar a la Cloroquina, pero que presenta en cadena lateral un grupo hidroxilo (-OH), así, su nombre sistemático de la IUPAC es (RS)-2-[(4-[(7-cloroquinolin-4-il) amino] pentil) (etil)amino]-etanol.

En la siguiente Figura se presenta la estructura química de la Cloroquina y la Hidroxicloroquina.

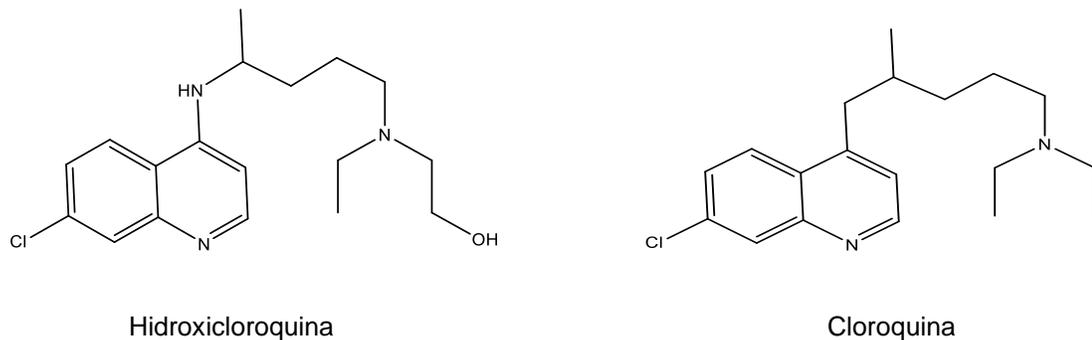


Figura 2. Estructura química de la Hidroxicloroquina y la Cloroquina

2.3. Cloroquina e Hidroxicloroquina ante Covid

En marzo de 2020 la FDA emitió una autorización de uso de emergencia de la Hidroxicloroquina y la Cloroquina como tratamiento para el COVID-19, incluyendo este tratamiento en varios países como China, Irlanda y Estados Unidos. Sin embargo; la FDA revocó la autorización de uso de emergencia el 15 de junio de 2020, debido a que se realizaron ensayos clínicos demostrando que la Hidroxicloroquina y la Cloroquina no mostraron ningún beneficio en la mortalidad, y estos pueden tener efectos adversos potencialmente graves especialmente relacionados con la arritmia cardíaca. Aun así, debido a que varias personas continúan con su uso, en el presente trabajo se comentarán los detalles de su caracterización y cuantificación de los fármacos, para asegurar su pureza. (Axfors, 2021)

3. Química Analítica, métodos de cuantificación

La Química Analítica trata de la detección de la naturaleza (análisis cualitativo) y de la medida de las cantidades (análisis cuantitativo) de las diversas sustancias presentes en un material. Comprende no solo técnicas manipulativas, sino también las consideraciones teóricas en que se fundamentan las separaciones, detecciones y medidas. Aunque la Química Analítica constituye una rama ya antigua de la Química, ha tenido lugar un desarrollo rapidísimo de nuevos métodos de análisis a partir de la tercera o cuarta década del siglo anterior. Este desarrollo ha sido motivado en gran parte por las necesidades inherentes a la rápida expansión de la economía industrial y también al desarrollo intenso de programas de investigación en diversos campos. (Ayres, 1970)

En el presente trabajo se verá la importancia de la Química Analítica y los métodos de cuantificación por la técnica analítica de Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), así como su caracterización por la técnica analítica de Espectroscopía infrarroja (FTIR).

3.1. Espectroscopía

3.1.1. Definición

La Espectroscopía es considerada como una herramienta para estudiar la absorción de energía radiante en sustancias químicas, con resultados de caracterización y cuantificación detallados. Por lo tanto, la espectroscopía puede definirse como la medición de la energía radiante que puede absorber un sistema químico en función de una determinada longitud de onda de la radiación. (Underwood, 1995).

3.1.2. Importancia de la Espectroscopía

La espectroscopía se puede considerar como la extensión de la inspección visual, en donde un estudio más detallado de la absorción de energía radiante por las especies químicas, permite una mayor precisión en su caracterización y en su cuantificación, por lo tanto, se le considera como uno de los métodos de análisis más usados. La espectroscopía se utiliza en muchas de las ramas de la Química donde sea necesario realizar determinaciones analíticas a sustancias o materias primas, esto es debido a que hay muchas sustancias que pueden convertirse en derivados coloridos de forma selectiva. Otra de las ventajas de la Espectroscopía es que es un método donde los instrumentos se consiguen con facilidad y son sencillos de usar, aparte que es un método no destructivo en alguno de los casos. (Underwood, 1995) (Christian, 2009)

Durante mucho tiempo esta rama de la Química se ha basado en utilizar el color como ayuda para la identificación de las sustancias químicas, siendo un factor muy importante para la espectroscopía, pues esto depende si el analito presenta un color o se puede convertir en algún derivado colorido, si éste contiene grupos funcionales que absorban en las regiones de ultravioleta o infrarroja o si en la disolución existen otras sustancias absorbentes. En los métodos espectroscópicos, la muestra a analizar absorbe la radiación electromagnética que proviene de una fuente o instrumento adecuado y la cantidad absorbida de radiación es relacionada a la concentración del analito en la disolución analizada. (Underwood, 1995) (Harris, 2006) (Christian, 2009)

Un ejemplo de un análisis de Espectroscopía es cuando en una disolución se encuentra con iones cobre (II), esta disolución presenta un color azul, al analizarlo con las condiciones adecuadas esta disolución absorbe el color complementario, el cual sería el color amarillo, de la luz blanca proveniente de un instrumento que es utilizando para el análisis; cuanto más concentrada se encuentre la disolución absorbe más luz amarilla, la cual provoca que la disolución presente un color azul más intenso, en este caso la espectroscopía es la que mide la cantidad de luz amarilla absorbida, con esto se llega a una relación de concentración de la disolución azul. (Christian, 2009)

Una mejor forma de entender la Espectroscopía es entendiendo que es el espectro electromagnético y cómo es que las moléculas absorben la radiación.

3.1.2.1. Espectro electromagnético

El espectro electromagnético se debe considerar como una energía de radiación electromagnética, que es un tipo de energía radiante, la cual se propaga en forma de ondas transversales. Estas vibraciones se presentan de forma perpendicular a la dirección de su propagación. (Figura 3).

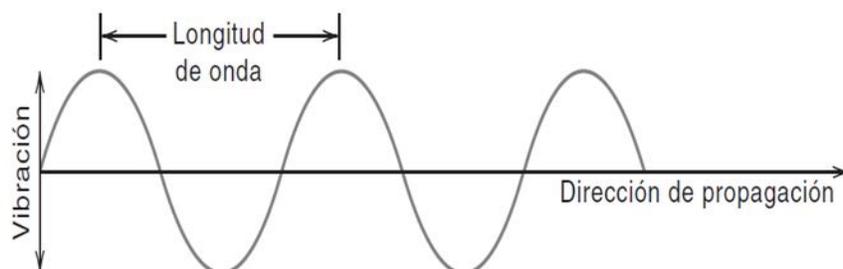


Figura 3. Movimiento Ondulatorio de la radiación electromagnética. (Christian, 2009)

Todas las ondas poseen la misma velocidad, pero presentan una variación en su longitud y frecuencia; y es sabido que la variación de estas dos últimas propiedades de las ondas, hacen que varíe la energía de las mismas ($E = hv$), y dependiendo el tipo de onda que se irradie, se obtiene información importante sobre la materia a estudiar.

Se define a la longitud de onda como la distancia entre las crestas de dos ondas; la frecuencia como el número de ondas que pasan por un punto fijo por unidad de tiempo y por último, el número de onda corresponde al recíproco de la longitud de onda y se define como la cantidad de ondas que hay en una longitud unitaria. (Underwood, 1995) (Christian, 2009)

Con estas propiedades se encuentra la siguiente relación matemática:

$$\frac{1}{\lambda} = \bar{\nu} = \frac{\nu}{C}$$

Donde:

λ = Longitud de onda

$\bar{\nu}$ = Número de onda

ν = Frecuencia

C = Velocidad de la luz. (Donde aproximadamente es de 3×10^{10} cm/ s. (Underwood, 1995) (Harris, 2006)

Una imagen cualitativa de la absorción de la radiación puede concebirse al considerar la absorción de la luz en la región visible. Los objetos pueden verse con colores por que transmiten o reflejan solo una parte de luz en esa región. Cuando una luz policromática, o luz blanca atraviesa cierto objeto, este último absorberá ciertas longitudes de onda y proporciona las longitudes de onda que no absorba. Estas longitudes de onda que no fueron absorbidas por el objeto y transmitidas son percibidas como un color. Este color es complementario a los colores absorbidos.

De tal forma que toda longitud de onda que no sea absorbida es reflejada y transmitida como un color. (Coates, 2000) (Smith, 1996). En la figura 4 se puede observar las regiones del espectro electromagnético que son utilizadas para los análisis espectroscópicos. En ella se puede observar que la interacción de un analito con la radiación electromagnética puede resultar en los tipos de cambios mostrados. Se observa también que los cambios en la distribución de los electrones ocurren en la región UV/Visible. (Banwell, 1983)

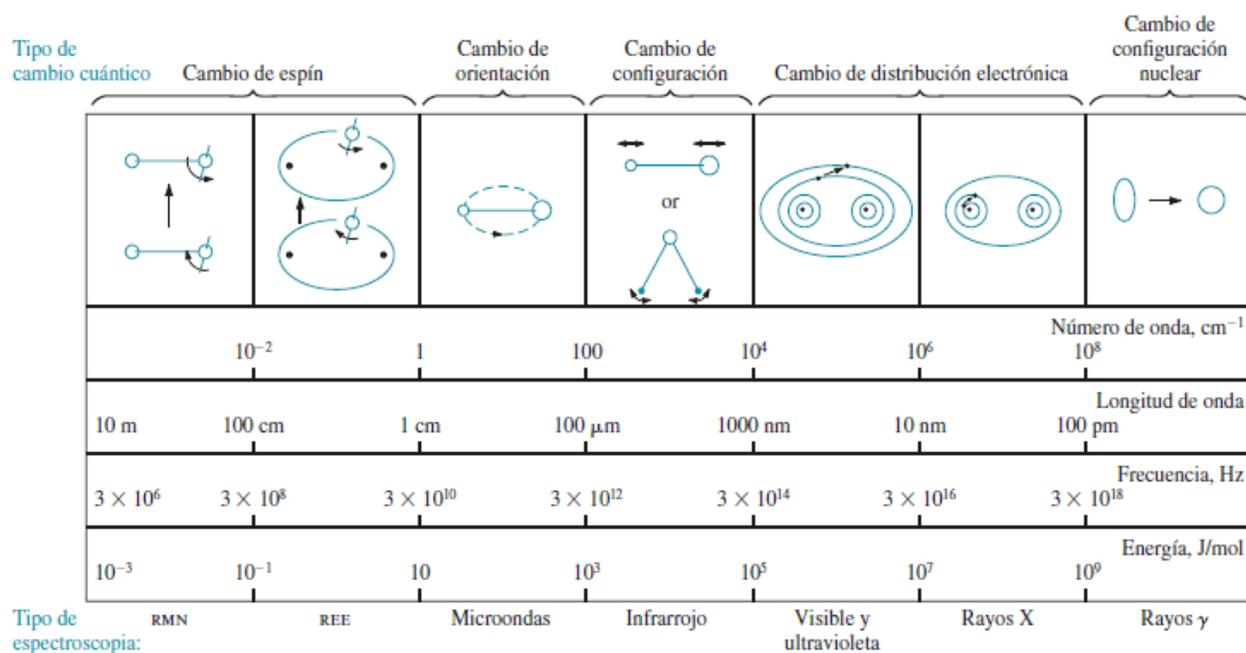


Figura 4. Regiones del espectro electromagnético. (Banwell, 1983)

3.1.2.2. Espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)

En la Química moderna es importante la Espectroscopía, particularmente en el área orgánica. Es una herramienta cotidiana para detectar grupos funcionales, identificar compuestos y analizar un sinnúmero de mezclas. Esto antes mencionado son características que registran y cuantifican los espectros de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR), los cuales son instrumentos fáciles de manejar, muy comerciales y poco costosos.

La espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica rápida y accesible, que proporciona una gran cantidad de información tanto cuantitativa como cualitativa acerca de la composición de las muestras. En los últimos años se ha demostrado que es una herramienta muy práctica para realizar análisis cuantitativos de muestras realmente complejas, sin la necesidad de realizar algún tratamiento previo. La Espectroscopía infrarroja se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran; es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen un tanto de

nivel de energía. Las frecuencias de las vibraciones pueden ser asociadas con un tipo particular de enlace, fuerza y masa atómica. (Schindler, 1999)

Para que los enlaces atómicos de una molécula puedan absorber radiación infrarroja éstos deben tener un momento dipolar de enlace activo. El momento dipolar se define como la fuerza de polaridad en los enlaces de una molécula. Esto quiere decir que cuando dos átomos se encuentran enlazados, éstos presentan una electronegatividad diferente. El átomo que presenta una electronegatividad mayor atraerá con mayor fuerza los electrones presentándose dos cargas opuestas entre estos dos átomos dando lugar a un momento dipolar. Cuando se presenta una molécula con más de dos átomos se observan varios momentos dipolares. Cuando una molécula presenta un momento dipolar es “activa” a la radiación infrarroja. (Coates, 2000) (Smith, 1996)

En la figura 5 se muestran ejemplos de manera general de una molécula activa, la cual muestra tipos de estiramiento, los cuales presentan un momento dipolar.

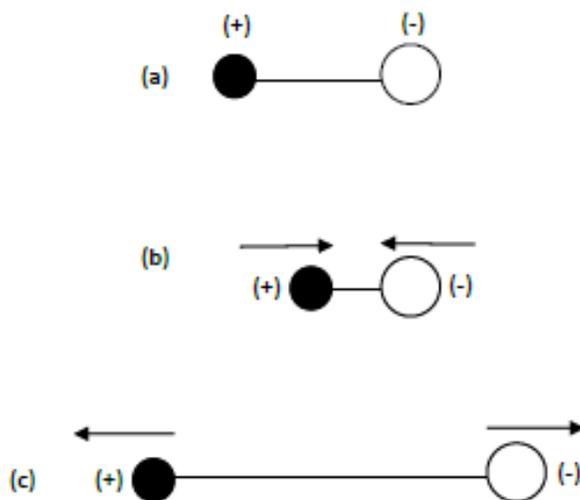


Figura 5. En la imagen (a) se observan los cambios del momento dipolar de una molécula diatómica. En la imagen (b y c) se observa la misma molécula bajo la influencia de radiación infrarroja.

Además del momento dipolar, otro requisito para que una molécula absorba radiación infrarroja es la resonancia, la cual se presenta cuando hay una compatibilidad entre la frecuencia de vibración basal y la frecuencia de la radiación infrarroja absorbida del enlace en cuestión. Entonces, al presentarse esta compatibilidad de frecuencias el enlace atómico aumenta su nivel de vibración, lo cual se presenta en un espectro como la formación de un pico de absorción. (Coates, 2000) (Smith, 1996)

El resultado obtenido de un análisis de espectroscopía infrarroja es un espectro de infrarrojo de la muestra analizada. Un espectro es una secuencia de bandas o picos de absorción en un intervalo de frecuencias dentro del infrarrojo. Cada pico representa una vibración que ocurre dentro del enlace atómico cuando interacciona el haz infrarrojo con la muestra. Estas vibraciones provienen de enlaces químicos específicos que tienen las moléculas de las muestras analizadas. (Coates, 2000)

3.1.2.3. Espectro infrarrojo

La información obtenida de un ensayo de FTIR se presenta en la forma de un espectro de infrarrojo. Este espectro en el eje X (abscisas) representa el número de onda (cm^{-1}) o longitud de onda (μm) y en el eje de las Y (ordenadas) representa la absorbancia o % de transmitancia. Un espectro se puede obtener tanto en absorbancia como en transmitancia. En la siguiente figura (Figura 6) se observa una comparación de espectros tanto de absorbancia como de % de transmitancia, donde se observa que las bandas obtenidas no cambian de frecuencia, el único cambio es que sus picos se invierten, hacia arriba en absorbancia y hacia abajo en transmitancia. (Smith, 1996) (Banwell, 1983)

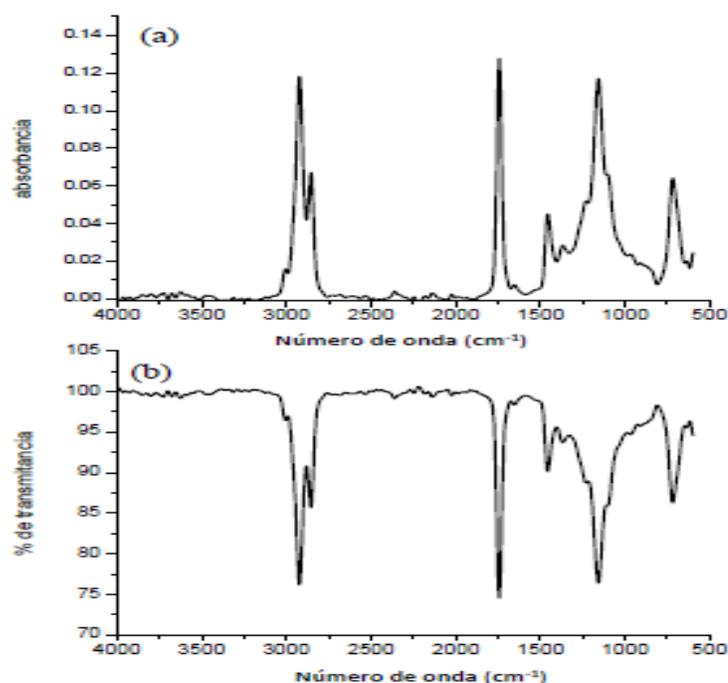


Figura 6. El espectro infrarrojo de una muestra en la imagen (a) absorbancia y (b) % de Transmitancia.

3.2. Cromatografía

3.2.1. Introducción

La cromatografía es una técnica o método físico de separación excepcionalmente versátil que, en una o varias de sus formas, es usada por casi todos los químicos en investigación. Entre los métodos analíticos modernos ocupa un lugar destacado debido a su facilidad para la separación, identificación y cuantificación de diversas especies químicas, ya sea por si sola o asociada a otras técnicas instrumentales de análisis, como por ejemplo, la espectroscopía. (Underwood, 1995)

3.2.2. Historia

Esta técnica fue creada por el botánico ruso Michael Tswett en 1906 (figura 7), el cual llamó a su método cromatografía, palabra griega, que significa escritura a color, la cual fue utilizada por el mismo para separar compuestos coloreados. Tswett llevó a cabo una extracción de una mezcla de pigmentos de hojas verdes utilizando éter petróleo, un disolvente no polar y descubrió que era capaz de separar los pigmentos al hacer pasar a través de una columna, un tubo de vidrio relleno con carbonato de calcio (tiza). Tswett utilizó como detector del experimento la simple observación, debido a que los compuestos que separó presentaban color y era posible detectar bandas o zonas de distintas materias por su color en la columna, demostrando que la clorofila es solo uno de los muchos pigmentos que se encuentran en las hojas de las plantas. (Underwood, 1995)



Figura 7. Michael Semenovich Tswett. (1872-1906) Botánico Ruso. Considerado como el padre de la cromatografía.

3.2.3. Fundamentos de la cromatografía

La cromatografía es esencialmente un método de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una fase estacionaria y otra fase móvil, la cual filtra a través de la primera.

La separación se debe a la influencia de dos efectos contrapuestos; el primero sería la retención, el cual es un efecto producido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria. El otro efecto sería el desplazamiento, el cual obtiene un efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil.

(Corzo, 2019) (Christian, 2009)

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido que se queda fijo en la misma posición. La fase móvil puede ser un líquido o un gas que corre a través de una superficie y de la fase estacionaria. Las sustancias que están en un sistema de cromatografía interactúan tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil. La naturaleza de estas interacciones depende de las propiedades de las sustancias, así como también de la composición de la fase estacionaria. La rapidez con que viaja una sustancia a través del sistema de cromatografía depende directamente de la interacción relativa entre las sustancias, las fases móviles y estacionarias. En el caso de una mezcla, si cada componente interactúa diferente con la fase móvil y la fase estacionaria cada uno de ellos se moverá diferente. (Christian, 2009) (Corzo, 2019)

3.2.4. Clasificación de los tipos de cromatografía

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase que consiste en un fluido (gas o líquido) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Aunque los principios fundamentales son los mismos, se acostumbra a clasificar los métodos cromatográficos: (Corzo, 2019) (Underwood, 1995)

- Por su tipo de fase móvil.
- En función del mecanismo de separación
- Por su forma de separación

3.2.5. Clasificación por su fase móvil

Cromatografía líquida. En este método la fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes y la fase estacionaria es un sólido que interactúa con las sustancias que se desea separar (cromatografía líquido-sólido), o bien un líquido inmiscible con la fase móvil, depositado en la superficie de un sólido (cromatografía líquido-líquido). Esta forma de cromatografía puede realizarse con diferentes arreglos experimentales: en columna, en capa delgada o en papel y HPLC. (Underwood, 1995) (Christian, 2009)

Cromatografía de gases.

En este caso la fase móvil es un gas inerte (helio o nitrógeno) y la fase estacionaria es un sólido (Cromatografía gas-sólido) o un líquido "sostenido" por un sólido inerte (Cromatografía (gas-líquido)). Este tipo de cromatografía siempre es en columna, ya que es la única manera de que la fase móvil gaseosa se mantenga fluyendo confinada dentro del sistema. (Christian, 2009) (Underwood, 1995)

Cromatografía de fluidos supercríticos.

La fase móvil es un fluido (Lopez, 2007) supercrítico, la fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido absorbido en un soporte sólido o una capa adherida a un soporte sólido. (Corzo, 2019)

3.2.6. Clasificación por mecanismo de separación.

De acuerdo con el mecanismo de separación, la cromatografía se puede clasificar en los siguientes tipos:

Cromatografía de adsorción.

Adsorción-desorción de los compuestos dependiendo de su polaridad y de la actividad de las fases. (Christian, 2009)

Cromatografía de reparto.

Separación de los compuestos mediante el reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria. (Christian, 2009)

Intercambio iónico.

Separación en función de la carga y tamaño de los iones. (Christian, 2009)

Exclusión.

Separación por tamaño de partícula. (Christian, 2009)

3.2.7. Clasificación por su forma de separación**Análisis por desplazamiento**

El frente del disolvente avanza hasta el final del lecho estacionario. (Christian, 2009)

Cromatografía en papel.

Tiene como soporte un papel de celulosa. Es una técnica sencilla y presenta la ventaja de poder utilizar cantidades pequeñas de muestra. (Underwood, 1995)

Cromatografía en capa fina.

Lograron separar mezclas de tinturas farmacéuticas. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria se extiende sobre un soporte inerte (sílica). (Underwood, 1995)

Cromatografía de análisis por elusión.

En la cromatografía es la migración de los compuestos de una mezcla, a través de la fase estacionaria, impulsados por la fase móvil. También se denomina de esta manera a la acción por la cual se “recuperan” los compuestos retenidos por la fase estacionaria, ya sea en el papel, placa o en la columna, por medio del arrastre de los mismos con algún disolvente adecuado para su posterior identificación.

3.2.8. Parámetros cromatográficos

El término parámetro se emplea para referirse a una cantidad que toma diferentes valores y caracteriza a un proceso, operación o resultado. Los parámetros cromatográficos nos permiten tabular y comunicar los datos con mayor facilidad. Los parámetros cromatográficos que describen al cromatograma se correlacionan exitosamente con las descripciones de los procesos moleculares que ocurren en el curso de las separaciones. Los analitos separados que son transportados por la fase móvil son registrados como picos de señal por la unidad detectora. La cantidad total de todos los picos se denomina cromatograma. Cada pico individual proporciona información cualitativa y cuantitativa del analito. La información cualitativa viene dada por el propio pico (por ejemplo: forma, intensidad de la señal, tiempo de aparición en el cromatograma). Además, el área de un pico es proporcional a la concentración de la sustancia. Por lo tanto, el software de gestión de datos cromatográficos puede calcular la concentración de la muestra por integración. Esto proporciona información cuantitativa. Lo ideal es que los picos se registren como una curva gaussiana en forma de campana. (Lopez, 2007) (Christian, 2009). (Underwood, 1995)

A continuación, se analizan los parámetros básicos de una separación cromatográfica.

Tiempo muerto. (t_0).

Tiempo que tarda un compuesto no retenido en recorrer el sistema cromatográfico. Durante este tiempo, todas las moléculas de la muestra se encuentran exclusivamente en la fase móvil. En general, todas las moléculas de la muestra comparten el mismo tiempo muerto. (Underwood, 1995) (Agilent, 2016)

Tiempo de retención. (t_R).

El tiempo de retención se refiere al tiempo que necesita un compuesto desde el momento de la inyección hasta el momento de la detección. En consecuencia, representa el tiempo que el analito está en la fase móvil y estacionaria. El tiempo de retención es específico de cada sustancia y debe proporcionar siempre los mismos valores en las mismas condiciones. (Underwood, 1995) (Agilent, 2016)

Ancho a la base del pico (W).

La anchura del pico abarca el periodo que va desde el inicio de la pendiente de la señal hasta alcanzar la línea de base tras la caída repetida de la señal del detector. (Underwood, 1995) (Agilent, 2016)

Factor de Coleo

En la práctica, los picos perfectamente simétricos son muy raros. En un cromatograma suelen mostrar cierto grado de cola. Este factor de coleo describe la asimetría de los picos, es decir, hasta qué punto la forma se aproxima a la curva gaussiana perfectamente simétrica. El factor de coleo se mide como $T = b/a$ (como se presenta en la Figura 8), donde “a” representa la anchura de la mitad delantera del pico, “b” es la anchura de la mitad trasera del pico. Los valores se miden al 10 % de la altura del pico desde el borde anterior o posterior del mismo hasta una línea que cae perpendicularmente desde el vértice del pico. (Underwood, 1995) (Agilent, 2016)

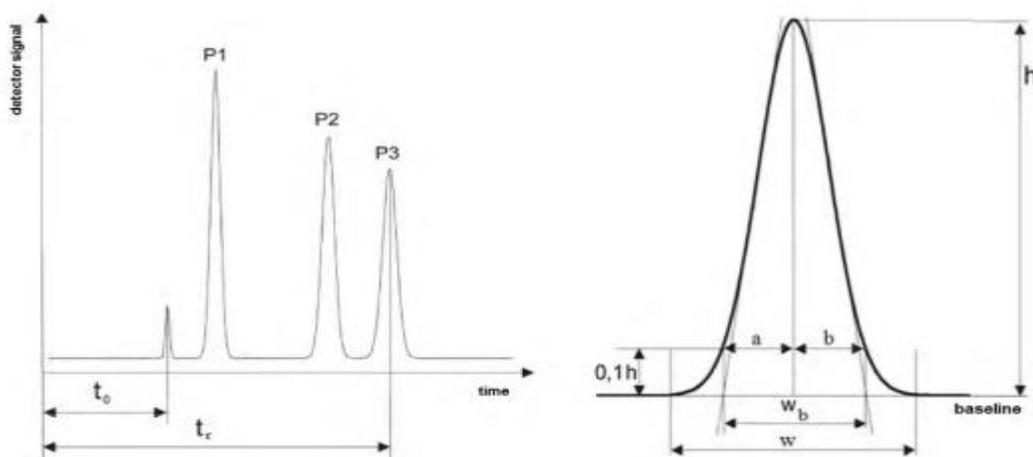


Figura 8. Ejemplo de un cromatograma con sus parámetros identificados.

Platos teóricos.

Los platos teóricos se definen como la sección teórico-transversal en la cual se realiza el equilibrio de partición durante el flujo de fase móvil. Cuanto mayor sea el número de platos teóricos mayor será la eficiencia de una columna cromatográfica.

El número de platos teóricos mide la capacidad de la columna para separar los componentes, no la retención de éstos. La eficiencia o el número de platos se puede observar directamente a partir del cromatograma, observando la agudeza de los picos. (Underwood, 1995) (Agilent, 2016)

$$N = 16 x \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2$$

Donde:

N = Numero de platos teóricos

t_r= Tiempo de retención de un componente

W_b = Ancho del pico cromatográfico

Las columnas con un número alto de platos son más eficientes. Una columna con un valor N alto generará picos más estrechos para un determinado tiempo de retención que una columna con un valor N más bajo.

Resolución.

Es el parámetro que expresa el grado de separación que se puede obtener en un sistema cromatográfico para dos componentes dados. Relaciona la capacidad separadora de un sistema cromatográfico para dos componentes. La resolución puede observarse directamente sobre el cromatograma de picos. Se tendrá una buena resolución si los picos no se solapan, y está perfectamente delimitado cada pico, sin que coincida el final de uno con el principio del siguiente. Algunos puntos importantes de la resolución son:

- Debe tener como mínimo un valor igual a 1 para que se produzca una separación medible y se pueda realizar una cuantificación adecuada.
- Se necesita un valor igual a 0.6 para que se pueda distinguir un valle entre dos picos de la misma altura.
- Para métodos más robustos normalmente se requieren valores iguales o superiores a 1.7.

- Se considera que un valor igual a 1.5 se corresponde con una separación en línea de base y garantiza unos resultados cuantitativos de precisión máxima. Un ejemplo es la Figura 9. (Underwood, 1995)

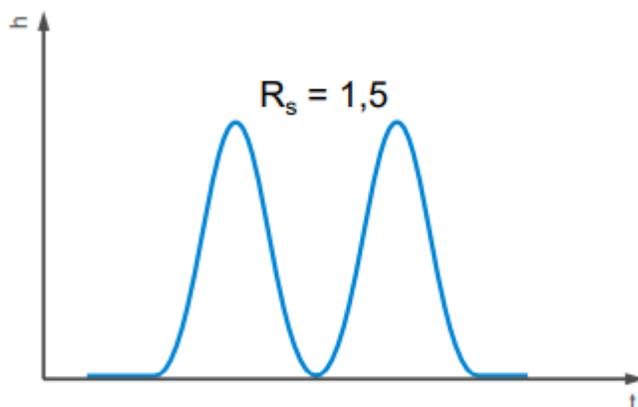


Figura 9. Ejemplo de un cromatograma presentado una resolución de 1.5 donde se observa que los picos se encuentran separados adecuadamente.

3.2.9. Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC)

La Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromatography), es una técnica en el campo de la química analítica utilizada para separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla. Es incuestionable que la cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de tal popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y, principalmente su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, plaguicidas, antibióticos, esteroides y una gran variedad de sustancias inorgánicas. (Underwood, 1995) (Corzo, 2019)

El principio de separación de la HPLC se basa en la distribución del analito (muestra) entre una fase móvil (eluyente) y una fase estacionaria (material de relleno de la columna). Dependiendo de la estructura química del analito, las moléculas se retrasan al pasar por la fase estacionaria. Las interacciones intermoleculares

específicas entre las moléculas de una muestra y el material de relleno definen su tiempo en la columna. Por lo tanto, los diferentes componentes de la muestra se eluyen en tiempos diferentes. De este modo, se consigue la separación de los componentes de la muestra.

Una unidad de detección (por ejemplo, un detector de rayos ultravioleta) reconoce los analitos tras abandonar la columna. Las señales convertidas y registradas por un sistema de gestión de datos (software informático) y luego se muestran en un cromatograma. En la figura 12 se observa un ejemplo de un sistema cromatográfico. (Underwood, 1995)

Tras pasar por la unidad de detección, la fase móvil puede ser sometida a otras unidades de detección, a una unidad de recogida de fracciones o a los residuos. En general, un sistema de HPLC contiene los siguientes módulos: un depósito de disolvente, una bomba, una válvula de inyección, una columna, una unidad de detección y una unidad de procesamiento de datos. El disolvente (eluyente) es suministrado por la bomba a alta presión y velocidad constante a través del sistema. Para mantener la deriva y el ruido de la señal del detector lo más bajo posible, es crucial un flujo constante y sin pulsaciones de la bomba. El analito (muestra) es suministrado al eluyente por la válvula de inyección. (Underwood, 1995) (Harris, 2006)

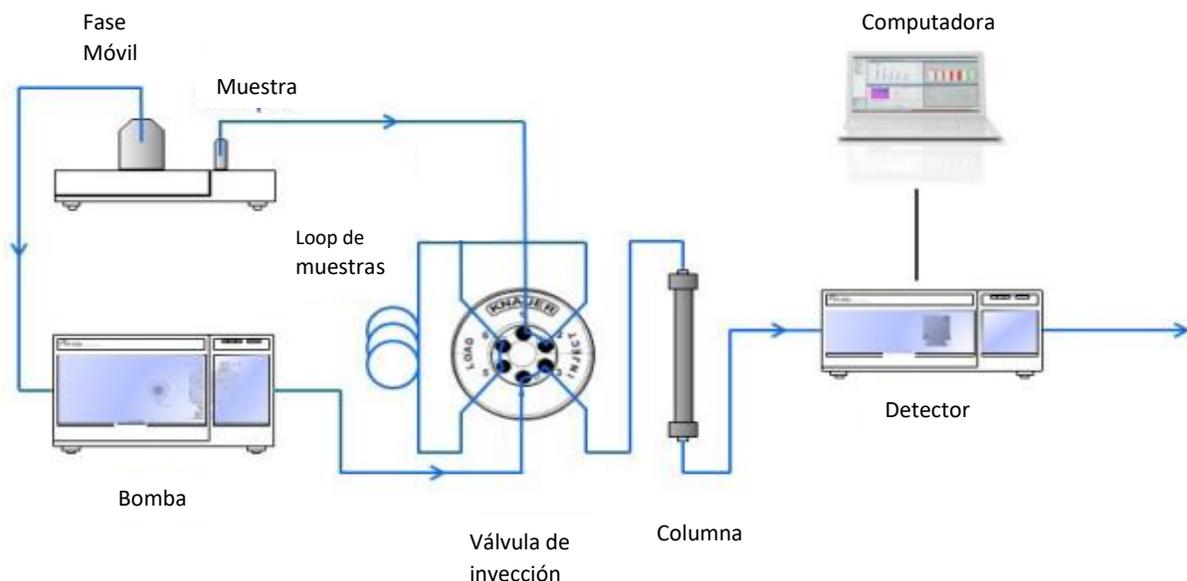


Figura 10. Esquema de un sistema de HPLC.

Detector

La tarea de la unidad detectora es registrar el tiempo y la cantidad de una sustancia que se eluye de la columna. El detector percibe el cambio en la composición y convierte esta información en una señal eléctrica que se evalúa con la ayuda de un ordenador. Existe una gran variedad de detectores en función de las características estructurales del analito. Los detectores más comunes son los refractométricos, los UV/VIS, los electroquímicos y los de fluorescencia. (Agilent, 2016) (Corzo, 2019)

Sistema cromatográfico Gradiente Vs Isocrático

Dependiendo de la composición de la fase móvil, suelen aplicarse dos modos diferentes. Si la composición de la fase móvil permanece constante durante el proceso de separación, el sistema de HPLC se define como un sistema de elución isocrática. Cuando la composición de la fase móvil se modifica durante la separación, el sistema HPLC se define como un sistema de elución gradiente. (Corzo, 2019) (Christian, 2009) (Underwood, 1995)

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

Considerando la reciente y sensible pandemia que ocasionó millones de muertes en todo el mundo y para la cual los tratamientos y vacunas siguen siendo motivo de investigación en el mundo de la ciencia, los principios activos que se redactan en este trabajo son los que más fueron utilizados no solo durante la pandemia, sino también para la vida diaria; se tomaron en cuenta para este trabajo debido a que estos medicamentos fueron de suma importancia para los tratamientos contra los síntomas generados por el Corona –virus H₁N₁ (COVID-19). Estos medicamentos deben ser regulados por normas establecidas para su consumo, las cuales exigen pruebas analíticas que den soporte a su eficacia. Estas pruebas analíticas son realizadas de acuerdo con diferentes métodos que requieren instrumentos analíticos: la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y Espectroscopía infrarroja.

CAPÍTULO IV. OBJETIVO

Comparar la eficiencia y efectividad entre dos de los métodos de identificación y cuantificación analítica de mayor uso en la industria farmacéutica: la cromatografía y la espectroscopía. La comparación será mediante los reportes de resultados realizados a través de artículos científicos de tres de los fármacos sugeridos como principales medicamentos para el tratamiento contra el Coronavirus: Paracetamol, Cloroquina e Hidroxicloroquina.

Definir cuál de los dos métodos analíticos presenta mejores resultados tomando en cuenta la accesibilidad, los costos, la sensibilidad de los resultados, al igual que sea específico y reproducible para el estudio, cuantificación y caracterización del Paracetamol, Cloroquina e Hidroxicloroquina; se compararán resultados reportados en artículos científicos y se tomará la elección sobre cual pueda ser la técnica más eficaz y de mayor uso por la industria farmacéutica.

CAPÍTULO V. HIPÓTESIS

Si la cromatografía líquida de alta resolución es un método analítico sensible, específico y reproducible para el estudio y cuantificación de paracetamol, Cloroquina e Hidroxicloroquina, es altamente probable que, tras comparar los resultados reportados en artículos científicos, resulte ser la técnica de mayor uso y elección por la industria farmacéutica que el uso de la espectroscopía FTIR, siendo esta última, una técnica que requiere menores volúmenes de disolventes y favorece a los principios de la química verde.

CAPÍTULO VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Paracetamol

1.1. Cuantificación y caracterización mediante cromatografía líquida de alta resolución

1.1.1. Descripción de artículos reportados

En este capítulo se comparan los resultados cromatográficos obtenidos y reportados en artículos científicos para la determinación de paracetamol a través de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

(Ibrahim, 2020) en su artículo Simultaneous Determination of Paracetamol, Propyphenazone and Caffeine in Presence of Paracetamol Impurities Using Dual-Mode Gradient HPLC and TLC Densitometry Methods, presenta un método analítico por CLAR para cuantificar el tratamiento combinado de tres activos contra el dolor y la fiebre presentes durante la sintomatología de COVID: paracetamol con cafeína y propifenazona en presencia de dos de las impurezas del paracetamol con mayor importancia clínica: el 4-aminofenol y 4-nitrofenol. De acuerdo con la literatura, se sabe que el 4-aminofenol es una impureza de carácter estrictamente controlado por considerarse un compuesto farmacológicamente activo que posee efectos nefrotóxicos y teratogénicos y que el 4-nitrofenol es el precursor del 4-aminofenol y es considerado como una impureza potencial del paracetamol.

El objetivo principal del artículo fue desarrollar dos metodologías para la determinación de la mezcla ternaria de activos farmacológicos en presencia de impurezas a partir de las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía en capa fina. Cabe mencionar que, aunque nuestro enfoque analítico se dará únicamente a los resultados para paracetamol obtenidos únicamente por CLAR, resulta interesante destacar que la cromatografía en sus múltiples modalidades resulta ser una técnica eficiente y adaptable a las características fisicoquímicas de los analitos aportando ventajas económicas y rápidas al analizar de forma rutinaria en los laboratorios farmacéuticos de control de calidad.

A continuación, se presenta el cromatograma tipo resultante de utilizar la metodología de fase reversa descrita en el artículo, usando como fase estacionaria una columna Zorbax Eclipse XDB C18 250X4.6 mm 5 µm, a 25 °C, con una longitud de onda de 220 nm y un gradiente de elución (Ver tabla 1) con Acetonitrilo: Metanol: Agua a un flujo inicial de 2 mL/min durante 15 min de corrida.

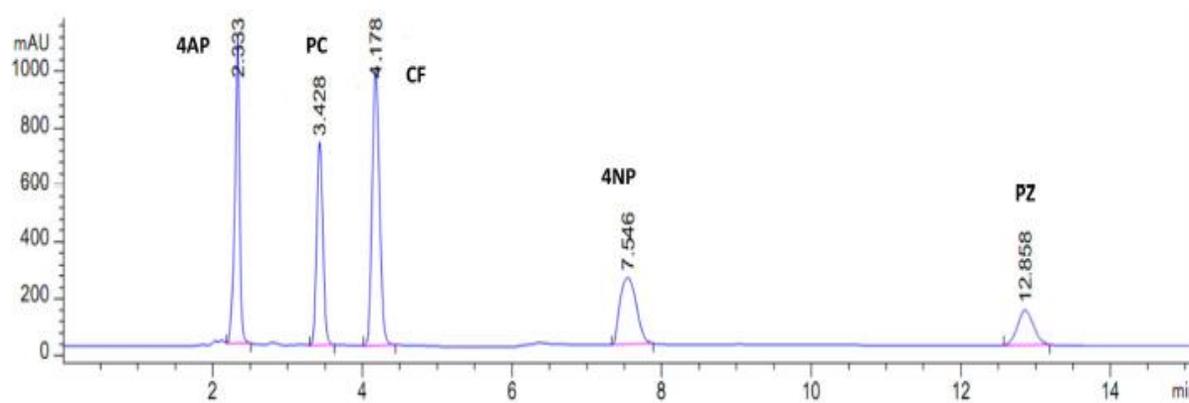


Figura 11. Cromatograma tipo de los activos en estudio (Ibrahim, 2020)
 TR Paracetamol (PC)=3.390 min, TR Cafeína (CF)=4.107 min, TR Propifenazona (PZ)=12.583 min

Tabla 1. Gradiente de elución en la determinación de paracetamol, cafeína y propifenazona (Ibrahim, 2020)

Tiempo (min)	Acetonitrilo %	Metanol %	H ₂ O %	Velocidad de flujo (mL / min)
0-2.3	25	25	50	2
2.3 – 2.7	15	15	70	2
2.7 – 6	15	15	70	2
6-6.2	20	30	50	2.5
6.2 – 8.4	20	30	50	2.5
8.4 – 9.4	0	50	50	2
9.4 – 14	0	50	50	2

Como resultado de la determinación analítica bajo las condiciones cromatográficas de cuantificación y determinación de los activos y sus impurezas, se concluyó que la metodología de cromatografía líquida de alta resolución fue específica para cada uno de los analitos, la separación de los componentes de la mezcla fue buena, logrando valores de resolución, número de platos teóricos, coeficiente de los picos y factor de

selectividad dentro de los límites sugeridos por la guía de validación de métodos cromatográficos para la evaluación de fármacos emitida por la FDA (ver Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de adecuabilidad resultantes de la metodología cromatográfica propuesta para la determinación de paracetamol, cafeína y propifenazona. (Ibrahim, 2020)

Parameter	Obtained value							Recommended value ^a
	CF	PZ	PC	4AP and PC	PC and CF	CF and 4NP	4NP and PZ	
Tailing factor (<i>T</i>)	1.2	1.1	1.1					≤2
Number of theoretical plates (<i>N</i>)	3,247	2,460	2,950					>2000
Resolution (<i>R_s</i>)				4.38	2.30	7.48	10.08	>2
Selectivity factor (<i>α</i>)				1.47	1.218	1.81	1.84	>1

^aValues defined by FDA Center of Drug Evaluation and Research's reviewer guidance on validation of chromatographic methods (November 1994) (19).

Los resultados de la validación de la metodología de cromatografía líquida de alta resolución propuesta en este artículo, guiada a través de la regulación internacional de las ICH, reveló que la metodología fue exacta, precisa, lineal, específica y robusta bajo las condiciones cromatográficas evaluadas y se concluyó que la técnica resultó precisa y selectiva para la determinación de paracetamol, cafeína y propifenazona en presencia y sin interferencia del 4-aminofenol y el 4-nitrofenol.

Por otro lado, (Cañinescu, 2011) en su artículo llamado HPLC Separation of Acetaminophen and its Impurities Using A Mixed-mode Reversed-Phase/Cation Exchange Stationary Phase, describe la búsqueda de un perfil cromatográfico adecuado para reducir tiempos de análisis y separar al paracetamol de sus impurezas más conocidas: el 4-aminofenol, el 4-nitrofenol y la 4'-cloroacetanilida; así como de los productos de degradación del 4-aminofenol: la p-benzoquinona y la hidroquinona.

Los autores hacen referencia a que durante su investigación se realizaron diferentes perfiles basados en lo hasta entonces reportado en la literatura, pero ninguno resultaba tan satisfactorio, pues comentan que uno de los sistemas propuestos requirió una duración de corrida de hasta 55 minutos aproximadamente, mientras que otro no permitió realizar la separación de las sustancias relacionadas que deseaban cuantificar.

Tras la optimización del sistema cromatográfico donde sus impurezas y el paracetamol presentaron un buen perfil cromatográfico y una duración de corrida menor a los 15 minutos, describen la implementación de una combinación de fases estacionarias que permitió jugar con las formas neutras y ionizadas de los analitos para así conseguir una separación adecuada.

La columna Hypersil Duet C₁₈/SCX que utilizaron es una fase estacionaria de modo mixto que contiene tanto octadecilsilano como una fase de intercambiador catiónico fuerte que permite separar compuestos hidrófobos e iónicos en una sola ejecución de análisis.

A continuación, se muestra el cromatograma tipo resultante de utilizar la metodología descrita en el artículo, usando como fase estacionaria una columna Hypersil Duet C₁₈/SCX de 250 x 4.6 mm de dimensión y 5 µm de tamaño de partícula. El volumen de inyección fue de 5 µL. El método de separación final utilizó un gradiente de elución con fase móvil que contenía una mezcla de buffer de fosfato pH 4.88 –metanol que inició de 0 a 8 min con una composición variable de metanol que iba de 20 a 50 %, permaneciendo constante durante 2 minutos y aumentando a 60 % por los siguientes 2 min. El flujo se fijó en 0.8 mL/min para los primeros 12 min de la separación y luego aumentó a 1.2 mL/min entre 12 –14 min. La detección se realizó a 230 nm a 25°C de temperatura de la columna.

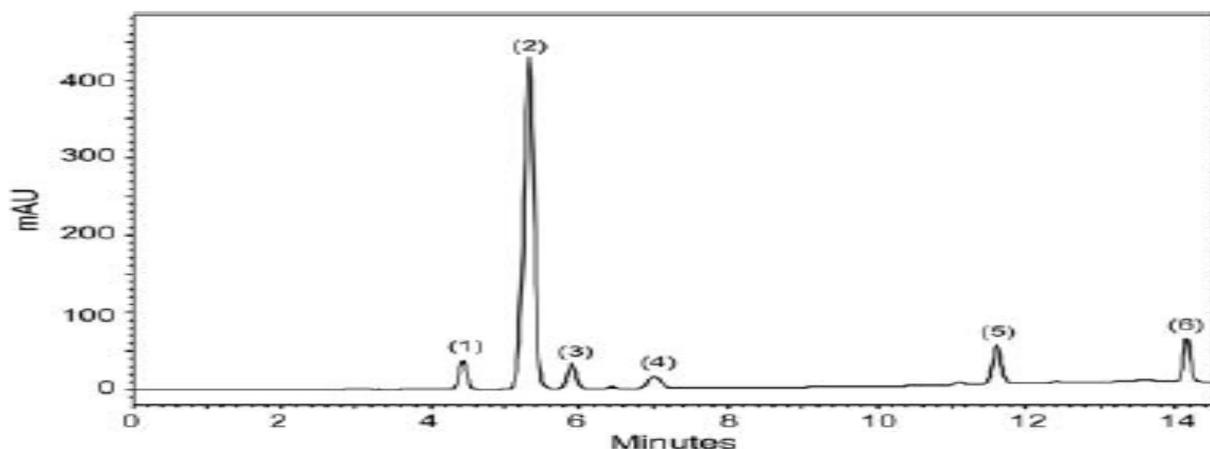


Figura 12. Cromatograma tipo de las sustancias relacionadas del paracetamol (Cañinescu, 2011)
TR Hidroquinona (1)=4.45 min, TR Paracetamol (2)=5.29 min, TR p-Benzoquinona (3)=5.89 min,
TR 4-Aminofenol (4)=6.99 min, TR 4-Nitrofenol (5)=11.52 min y TR 4-Cloroacetanilida (6)=14.07 min.

Con el fin de establecer la distribución de las especies ácido/base conjugadas en función del pH establecido para la fase móvil, fue necesario calcular el valor de pKa para cada uno de los analitos. Y tras analizar su

comportamiento ácido base, se llegó a la conclusión que a un pH entre 4 y 5, cinco compuestos de los seis analizados (acetaminofén, 4-nitrofenol, 4'-cloroacetanilida, hidroquinona y p-benzoquinona) están en una forma no ionizada, mientras que el 4-aminofenol está en una forma catiónica.

Bajo este razonamiento las condiciones cromatográficas fueron seleccionadas y permitieron la separación eficiente de los analitos en un tiempo de corrida menor a los 15 min con valores de resolución significativos para su buena separación.

Los resultados de la validación revelaron que la metodología fue exacta, precisa y lineal bajo las condiciones cromatográficas evaluadas y se concluyó que la metodología de cromatografía líquida de alta resolución desarrollada fue simple y fiable, selectiva y eficiente para la determinación simultánea de sustancias relacionadas del paracetamol y productos de degradación del 4-aminofenol de mezclas farmacéuticas comerciales.

1.1.2. Análisis comparativo entre metodologías

A continuación, se comparan las condiciones cromatográficas (Ver Tabla 3) de las metodologías mencionadas con anterioridad incluyendo un breve análisis respecto a las condiciones cromatográficas seleccionadas por cada autor.

Tabla 3. Comparativa de las condiciones cromatográficas empleadas por (Ibrahim, 2020) y (Cañinescu, 2011)

Título del artículo	Simultaneous Determination of Paracetamol, Propyphenazone and Caffeine in Presence of Paracetamol Impurities Using Dual-Mode Gradient HPLC and TLC Densitometry Methods	HPLC Separation of Acetaminophen and its Impurities Using A Mixed-mode Reversed-Phase/Cation Exchange Stationary Phase
Autores	(Ibrahim, 2020)	(Cañinescu, 2011)
Columna	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈ 250X4.6 mm 5 µm	Hypersil Duet C ₁₈ /SCX 250X 4.6 mm 5 µm
Fase Móvil	Acetonitrilo: Metanol: Agua	Buffer de fosfato pH 4.88 : Metanol
Tiempo de Corrida	15 min	14 min
Equipo	Agilent technologies	Thermo electron
Área de Detección	220 nm	230 nm
Volumen de Inyección	20 microlitros	5 microlitros
Temperatura de Columna	25 °C	25 °C
Tipo de Elución	Gradiente	Gradiente

Se puede observar en la tabla anterior como hay una similitud en algunas de las condiciones como por ejemplo el tiempo de corrida de análisis, la longitud de onda del área de detección y temperatura de la columna. En algunos otros parámetros los cambios son mínimos, como el tipo del equipo, en el artículo de (Ibrahim, 2020) se trabaja con un cromatógrafo de marca Agilent, mientras que en el artículo de (Cañinescu, 2011) utilizan un cromatógrafo de marca Thermo, la diferencia entre ambos equipos es mínima, debido a que se debe calcular e integrar de manera idéntica los resultados obtenidos, por lo que no es algo que pueda afectar a los resultados.

Tabla 4. Resultados obtenidos de los artículos para el fármaco de Paracetamol

Títulos de los Artículos	Simultaneous Determination of Paracetamol, Propyphenazone and Caffeine in Presence of Paracetamol Impurities Using Dual-Mode Gradient HPLC and TLC Densitometry Methods			HPLC Separation of Acetaminophen and its Impurities Using A Mixed-mode Reversed-Phase/Cation Exchange Stationary Phase		
Autores	(Ibrahim, 2020)			(Cañinescu, 2011)		
Principio Activo	Paracetamol	4 aminofenol	4-nitrofenol	paracetamol	4 aminofenol	4-nitrofenol
Tiempo de retención (min)	3.39	2.33	7.54	5.29	6.99	11.52
Porcentaje de recuperación	101.08 ± 1.31			99.90± 0.03		
Linealidad (coeficiente correlación) R ²	0.999 1			0.999 8		

En la tabla anterior (Tabla 4) se observan los resultados obtenidos que se pueden comparar de cada método cromatográfico utilizados en los artículos en discusión para el Paracetamol. Podemos comparar que los porcentajes de recuperación se encuentran cerca del 100 %, cada uno con su porcentaje de error, menor al 2 %. También su coeficiente de correlación presenta resultados adecuados y aceptables dentro de una validación, lo cual nos indica que los métodos utilizados son confiables.

Haciendo una comparación de ambos métodos de estos dos artículos podemos observar que cada uno tiene sus ventajas y desventajas, en el caso del artículo del autor Ibrahim los tiempos de retención son más cortos, también algo que se observa como una ventaja es que la fase móvil con la que se trabaja es con un gradiente de combinación de disolventes y agua, lo cual podría provocar un impacto pequeño en gastos de insumos para la realización de este método, algo que también se une a esto es que la columna utilizada para este método es una columna comercial, de fácil acceso y de uso común para un sin fin de análisis cromatográficos y no necesitan algún cuidado o lavado especial antes y después de su uso.

Para el artículo del autor Cañinescu se presenta un método cromatográfico dirigido principalmente al paracetamol, en éste se cuantifica no solo las impurezas principales del paracetamol, si no también otras tres impurezas, las cuales se presentan degradando el fármaco cierto tiempo, donde también describe que se tuvo que perfeccionar y realizar varios análisis para realizar este método analítico. Una de las pequeñas desventajas que encuentro en este método es que la fase móvil es preparada mediante un Buffer de pH = 4.88; el preparar este tipo de disolventes con base en buffers con ajuste de pH genera un poco de riesgo,

ya que la fase móvil debe realizarse cuidadosamente, pues ésta necesita prepararse primero con el reactivo que comúnmente es una sal, posteriormente disolverse a las cantidades adecuadas y filtrarse con el filtro adecuado, para después ajustar el pH del buffer indicado. Si se presenta algún pequeño error en cualquiera de estos pasos podría provocar un resultado erróneo como un tiempo de retención incorrecto, que algún pico cromatográfico no se defina adecuadamente, que los picos que se buscan cuantificar no se reproduzcan o se presenten unidos a algún otro pico importante, sin nombrar que si no se realiza adecuadamente la fase móvil puede precipitarse y provocar algún malfuncionamiento en el equipo. Otro punto de desventaja que se presenta en este método es que utiliza una columna cromatográfica especial, la cual ésta constituida por dos fases estacionarias mixtas, esto nos indica que no es una columna que pueda ser rentable y necesite de algún cuidado o limpieza en especial.

Uno de los puntos críticos a considerar, es que ambos autores utilizan fases móviles de naturaleza polar para sus determinaciones, es decir, ambos artículos describen las condiciones cromatográficas de una fase reversa. Dicha selección puede justificarse al considerar la alta solubilidad de la molécula de paracetamol en agua (1.4 g/100 mL a 20 °C) seguida de etanol y metanol, disolventes muy polares. Por consecuencia, el tipo de fase estacionaria seleccionada en ambos casos fue una columna con grupos silanoles unidos a cadenas largas de 18 carbonos (C₁₈). La diferencia por destacar hasta este punto entre ambos artículos es la propuesta que hace (Cañinescu, 2011) al utilizar una fase estacionaria mixta combinando el soporte C18 con el intercambio catiónico, permitiendo la separación de compuestos hidrofóbicos e iónicos en una sola ejecución de análisis. La optimización de la separación se logró calculando los pKa's del paracetamol y de las impurezas y productos de degradación propuestos en el estudio y ajustando el pH y proporción del componente orgánico en el gradiente de elución, metanol.

Ambas metodologías cumplieron con los lineamientos de validación demostrando que las condiciones propuestas son adecuadas para la separación del paracetamol y sus impurezas.

1.2. Cuantificación y caracterización mediante espectroscopía FTIR

1.2.1. Descripción de artículos reportados

El artículo titulado A rapid Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopic method for direct quantification of paracetamol content in solid pharmaceutical formulations, (Mallah, 2015) describe el desarrollo de una metodología simple, de fácil preparación, económica, rápida y amigable para el ambiente al utilizar pocos volúmenes de disolventes desarrollada por espectroscopía FTIR para la cuantificación e identificación del paracetamol en formas farmacéuticas sólidas.

El estudio consistió en comparar los espectros generados del estándar de paracetamol, el de una muestra sólida farmacéutica y el de una mezcla de excipientes Como se presenta en la Figura 13.

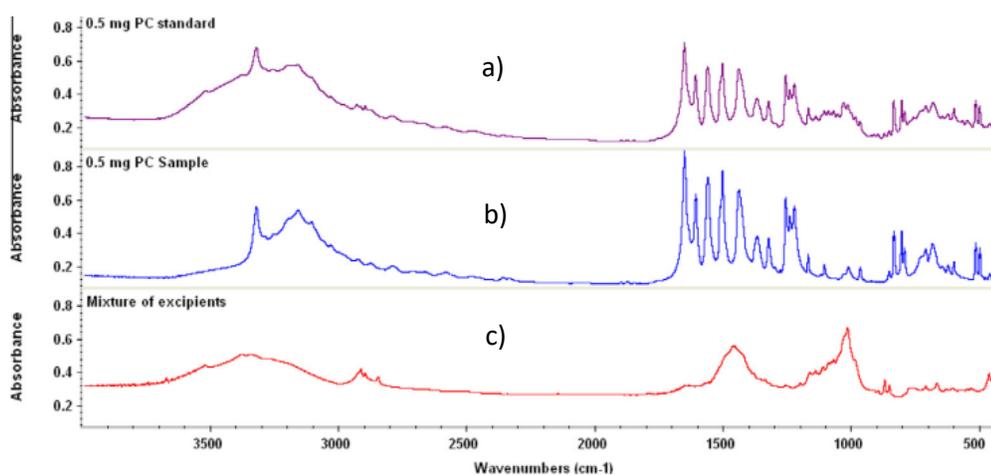


Figura 13. Espectros generados en el estudio a) estándar de paracetamol, b) muestra sólida, c) mezcla de excipientes.

Los autores concluyen que la presencia de otros componentes que pudieran estar presentes en la formulación de una forma farmacéutica como lo son los excipientes, no representan interferencia significativa entre las señales que arrojan los espectros.

Los grupos funcionales presentes en la molécula del paracetamol son -N-H, -O-H, anillo aromático con dobles enlaces C=C y C=O. De acuerdo con el análisis, la banda generada por C=O fue seleccionada para evaluar la interferencia ocasionada por la presencia de excipientes.

Para la cuantificación del paracetamol, los autores decidieron que, en lugar de seleccionar una sola banda, seleccionarían diferentes regiones para adaptarse a un modelo de calibración lineal aplicando la Ley de Lambert-Beer que permitiera la obtención de resultados exactos y precisos en la región de 1800-750cm⁻¹.

Los resultados generados al considerar criterios como la altura del pico, el área del pico, la línea base con corrección a dos puntos o sin corrección, se registraron en la tabla 5, concluyendo que la región entre 1800–1000 cm^{-1} con la corrección basal a dos puntos y el área del pico, eran la mejor región para la recuperación exacta y precisa de hasta el 99,96 % mediante el uso del modelo simple de la ley de Beer con un coeficiente de correlación del 0.999 4 (R^2).

Tabla 5. Selección de la región de FTIR para la aplicación de la Ley de Lambert-Beer

Region selected (cm^{-1})	Measurement mode	Baseline criteria (cm^{-1})	Regression line (a)	Correlation coefficient (b)	Recovery (%)
750–850	Peak area	750–850	$16.3x + 0.34$	0.9862	96.12
750–850	Peak area	None	$0.001x + 0.02$	0.9783	94.79
750–850	Peak height	750–850	$0.87x + 0.001$	0.9832	97.05
750–850	Peak height	None	$0.789x + 0.00$	0.9935	93.74
1190–1280	Peak area	1190–1280	$12.27x + 0.057$	0.9918	97.55
1190–1280	Peak area	None	$27.35x + 0.081$	0.9896	96.72
1190–1280	Peak height	1190–1280	$0.323x + 0.00$	0.9983	96.98
1190–1280	Peak height	None	$0.475x + 0.87$	0.9977	95.95
1402–1605	Peak area	1402–1605	$3.43x + 0.04$	0.9992	95.03
1402–1605	Peak area	None	$8.34x + 0.00$	0.9985	93.06
1402–1605	Peak height	1402–1605	$0.27x + 4.06$	0.9987	97.42
1402–1605	Peak height	None	$3.87 + 0.00$	0.9975	92.11
1610–1750	Peak area	1610–1750	$42.2x + 0.00$	0.9983	98.12
1610–1750	Peak area	None	$0.0001x + 0.00$	0.9983	93.98
1610–1750	Peak height	1610–1750	$0.432x + 0.00$	0.9970	96.37
1610–1750	Peak height	None	$0.578x + 0.00$	0.9981	94.76
1000–1800	Peak area	1000–1800	$42.2x + 0.00$	0.9994	99.96
1000–1800	Peak area	None	$0.0001x + 0.00$	0.9983	97.82
1000–1800	Peak height	1000–1800	$0.432x + 0.00$	0.9980	98.07
1000–1800	Peak height	None	$0.578x + 0.00$	0.9981	97.62

La validación del método se realizó al cuantificar el porcentaje de recobro de la concentración del estándar de paracetamol añadido a muestras farmacéuticas sólidas mediante la ecuación de la regresión lineal obtenida en la región 1000-1800 cm^{-1} . Obteniendo porcentajes entre 98-100 %, cumpliendo con lo estipulado en el compendio farmacéutico que indica una especificación que va de 90-108 %.

Los autores concluyeron que la metodología de espectroscopía FTIR resulta ser una técnica sensible, precisa, exacta, rápida, económica, amigable con el ambiente y de fácil tratamiento de las muestras.

Por otro lado, el artículo Synthesis and characterization of acetaminophen: an experimental and theoretical laboratory for the undergraduate curriculum, (Pasquarella, 2022); describe el uso y la aplicación de la metodología FTIR en los laboratorios de enseñanza, para la caracterización molecular de la síntesis de paracetamol como parte de sus prácticas en el aula. El tratamiento con etanol permitió la extracción del activo para formar posteriormente pastillas con KBr y realizar su identificación.

Para comprender las bases de la espectroscopia infrarroja, los estudiantes calcularon los espectros infrarrojos de cada especie involucrada en la síntesis del paracetamol, tanto reactivos como productos, empleando herramientas computacionales de apoyo al modelo molecular.

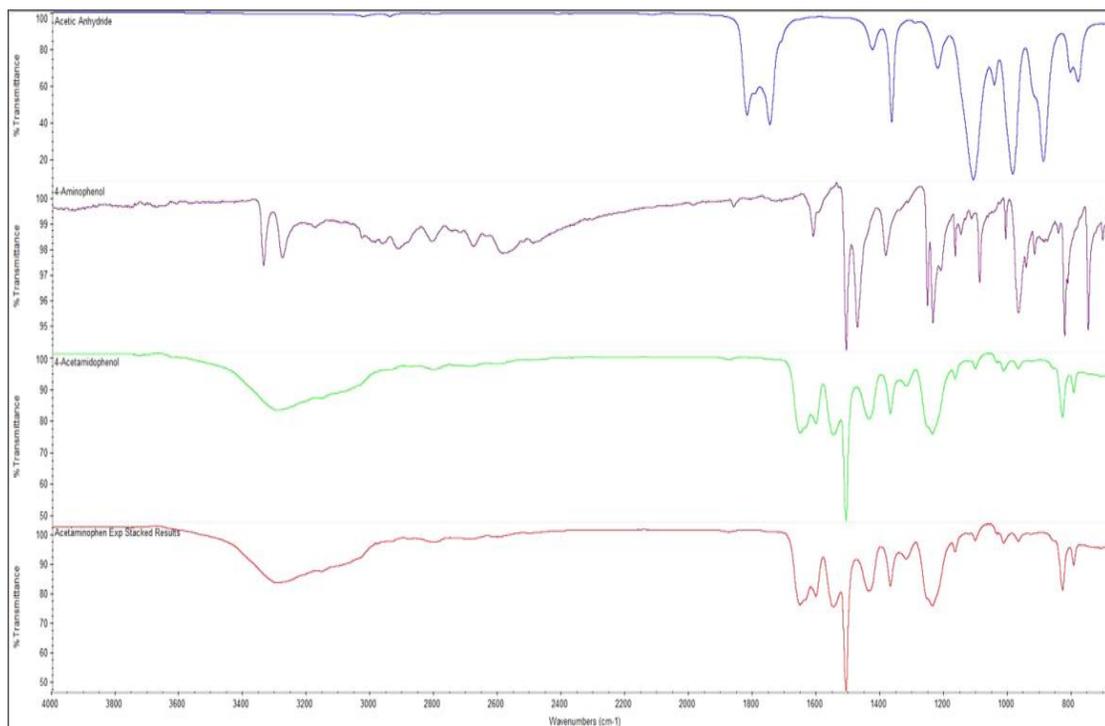


Figura 16. Espectros infrarrojo de todas las especies participantes en la síntesis del paracetamol.

Los alumnos comprendieron que los enlaces de las moléculas de la muestra absorben la radiación infrarroja en longitudes de onda características de los grupos funcionales. Por tanto, cada sustancia va a generar un espectro de absorción característico y único que va a permitir la identificación del material a través de un análisis infrarrojo, mismo que confirmaron tras su análisis con herramientas computacionales.

1.2.2. Análisis comparativo entre metodologías

Ambos autores refieren el uso de espectroscopía FTIR como una metodología que parece tener el potencial de reemplazar métodos laboriosos y costosos existentes para el análisis de paracetamol gracias a su practicidad de análisis a partir de la muestra sin ningún tratamiento, su alta sensibilidad al analizar concentraciones bajas y la no interferencia del paracetamol con los excipientes.

Su utilidad en la industria farmacéutica radica en la información que aportan las huellas espectrales representativas de los grupos funciones que poseen las moléculas, generando información única para los analitos en cuestión. Su fácil acoplamiento matemático a un modelo lineal, permiten que la Ley de Lambert-Beer aplicada a la regresión lineal sea utilizada para la cuantificación de analitos.

2. Cloroquina

2.1. Cuantificación y caracterización mediante cromatografía líquida de alta resolución

2.1.1. Descripción de artículos reportados

En este apartado, como indica el título, se analizarán y compararán artículos científicos reportados en la cuantificación y caracterización de la Cloroquina. Como se había mencionado antes, este fármaco fue utilizado como tratamiento para contrarrestar los síntomas ocasionados por el virus SARS-COV2 (COVID-19). También es el fármaco en primera elección para el tratamiento de la malaria. Las causas por las cuales se realizan estos tipos de análisis para cuantificar y validar los métodos analíticos para los medicamentos, es para saber su estabilidad y su tiempo de degradación a las condiciones donde se encuentran almacenadas; un claro ejemplo es la Cloroquina, la cual su mayor consumo ha sido en países como África y Sudamérica (países donde se ha presentado con mayor frecuencia la enfermedad de la malaria), donde se presenta un ambiente demasiado cálido y húmedo, y al estar en estas condiciones el medicamento podría degradarse de tal forma que pueda ser peligroso para quien lo consuma. La finalidad de estos análisis que consiste en poner en prueba los medicamentos a condiciones similares al lugar donde se consume y almacena para ver su comportamiento y verificar si es correcta la fórmula de preparación para aguantar dichas condiciones. (Coelho, 2017).

El artículo llamado "A comprehensive stability-indicating HPLC method for determination of chloroquine in active pharmaceutical ingredient and tablets: Identification of oxidation impurities" (Coelho, 2017) se basa en la cuantificación y validación de la Cloroquina y la identificación de las impurezas provocando una degradación forzada del principio activo utilizando diferentes agentes para esta degradación.

Los autores de este artículo hacen referencia a las diferentes variantes que utilizaron para realizar esta degradación del principio activo Cloroquina, sin embargo, en algunos resultados presentaban degradación y en otros no, utilizando un método cromatográfico, el cual ya había sido validado para la Cuantificación de este fármaco.

En el método establecido en este artículo los autores hacen referencia a la fase estacionaria utilizando una columna tipo Symmetry C₁₈ 250 x 4.6 mm de dimensión, 5 µm de tamaño de partícula. La columna fue

utilizada a una temperatura de 40 °C. Se realizó con una fase móvil de Buffer de fosfatos de pH =3.0 10 mM, con 0.5 % de trietilamina y metanol (25:75) haciendo una elusión de tipo isocrática y utilizando un flujo de 1.0 mL/ min. Se utilizó un equipo cromatográfico HPLC de la marca Agilent con un detector de UV programado a 250 nm para el análisis, donde el volumen de inyección utilizado fue de 10 µL. En las siguientes Figuras (Figura 17 y Figura 18) se presentan los cromatogramas tipo de los resultados obtenidos con el método analítico que se mencionó anteriormente.

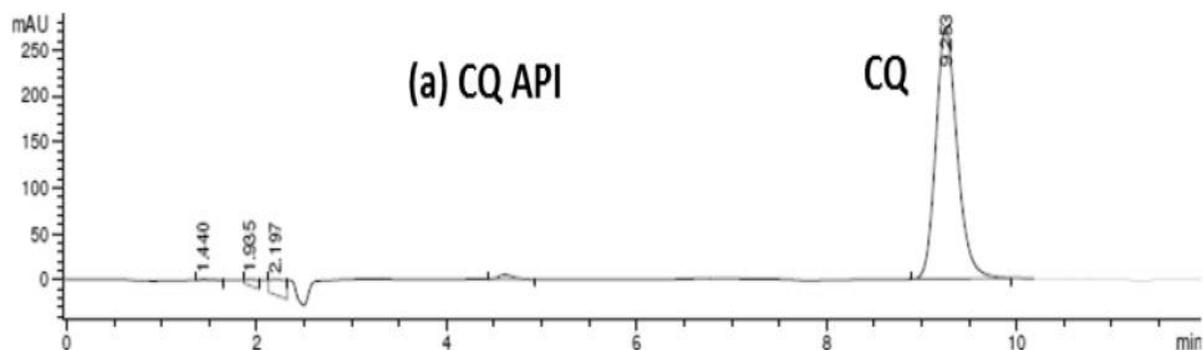


Figura 17. Cromatograma tipo de los resultados obtenidos para de la Cloroquina. (Coelho, 2017) Cloroquina (CQ = 9.263 min).

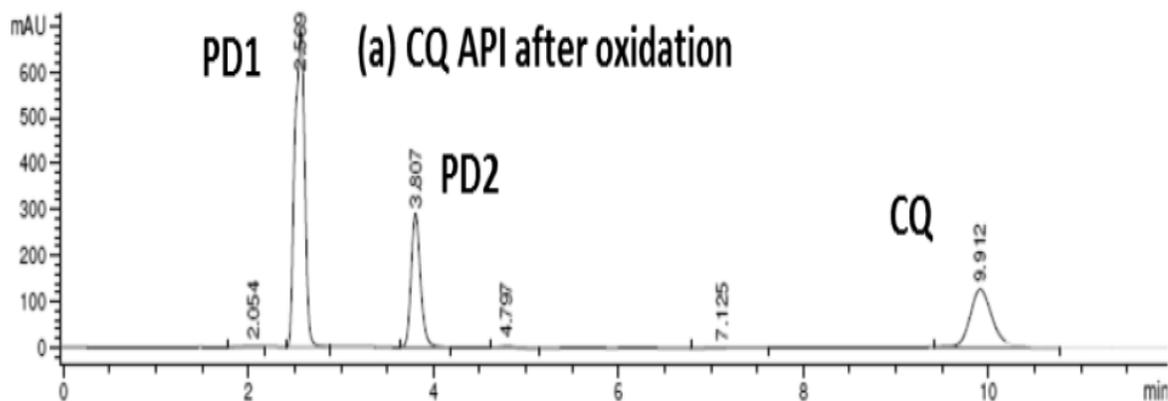


Figura 18. Cromatograma tipo de los resultados obtenidos para la cuantificación de la Cloroquina y sus Productos de degradación. Producto Degradado 1 (PD1 = 2.559 min), Producto degradado 2 (PD2 = 3.777 min) y Cloroquina (CQ = 9.912 min).

Los resultados que se presentan en los cromatogramas tipo fueron por un estudio exhaustivo de estabilidad, donde sometieron las muestras a diferentes técnicas de degradación, las cuales fueron hidrolisis ácida,

alcalina y neutra, oxidación, iones metálicos, calor y luz. La Cloroquina fue susceptible a la degradación en ambientes alcalinos y de oxidación. Para optimizar este método de estabilidad se utilizaron muestras de oxidación, las cuales generaron más productos de degradación. Los autores indican que para poder optimizar también el sistema hicieron pruebas con diferentes proporciones de fase móvil, utilizando de forma definitiva una elusión isocrática con 75 % de metanol y 25 % de buffer de fosfatos con un tiempo de corrida de 12 minutos. Los autores comentan que realizaron las mismas pruebas con la longitud de onda, primero utilizando la de 210 nm para detectar en lo posible los productos de degradación, sin embargo, el ruido de la línea base dificultaba la determinación de la Cloroquina, por lo tanto, probaron otras longitudes de onda dando como mejor resultado la longitud de onda de 250 nm en términos de relación señal/ruido.

El método cromatográfico reveló ser exacto, preciso y lineal bajo las condiciones utilizadas para la cuantificación de la Cloroquina en presencia de productos de degradación. Fue desarrollado y validado demostrando ser capaz de determinar la Cloroquina en presencia de sus productos de degradación.

Otro de los artículos reportados de interés para este trabajo se llama **“HPLC and HPTLC Assays for the antimalarial agents Chloroquine, Primaquine and Bulaquine”** (Dwivedi, 2003); el artículo mencionado está basado en la cuantificación de tres de los principios activos para combatir la malaria (Cloroquina, Primaquina y Bulaquina), debido a que saldrá al mercado un nuevo medicamento que los contiene y que se han encontrado varios trabajos cuantificando de diferentes formas cada fármaco por sí solo y con diferentes técnicas, sin embargo, los autores trabajan en cuantificar los tres fármacos en el mismo análisis y con la misma técnica (HPLC), aunque en este escrito nos inclinaremos solo por la cuantificación de la Cloroquina.

Los autores presentan un método analítico de HPLC sin algún punto crítico en especial; ellos nombran que fue usada una columna de fase estacionaria tipo Lichrospher C8 select – B RP con dimensiones de 250 mm x 4 mm y 5 µm de tamaño de partícula, se utiliza una longitud de onda de 265 nm. La fase móvil es una preparación de un buffer de acetato de sodio 0.01 M de pH=5.6 y Acetonitrilo (45:55 v/v). La temperatura a

la que se trabaja la columna es de 27 ± 3 °C y un flujo de 1.0 mL/min. En la siguiente figura se presenta el cromatograma tipo del análisis en cuestión. (Figura 19).

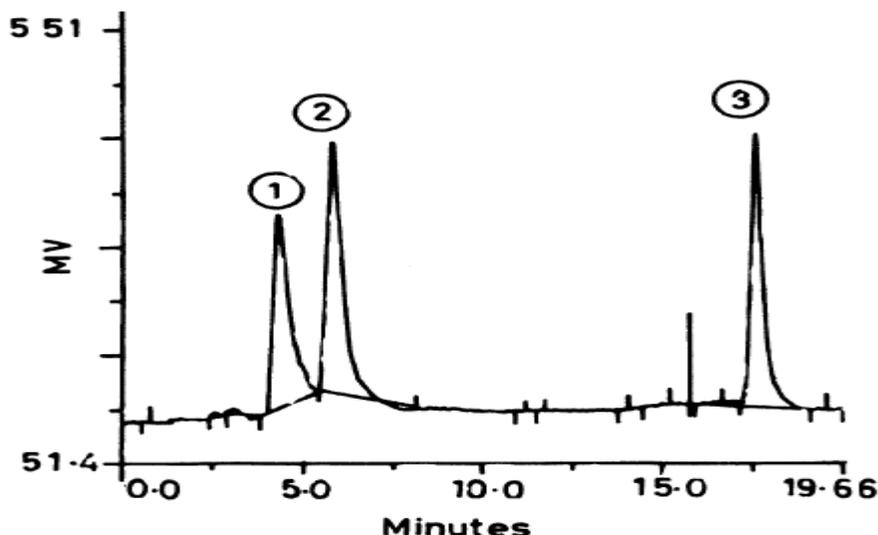


Figura 19. Cromatograma tipo de los resultados obtenidos para el análisis cromatográfico donde se observa la cuantificación de la Cloroquina (1) TR = 4.22 min, Primaquina (2) TR = 5.22 min. Y Bulaquina (3) TR = 17.26 min.

Los autores indican que estuvieron analizando con diferentes tipos de columnas como C18 (250 x 4 mm 5 μ m) y CN (C18 (250 x 4 mm 5 μ m)), también con diferentes tipos de fases móviles variando el tipo de disolventes, probando también diferentes tipos de buffers, pero ningún sistema presentó la resolución y resultados necesarios y adecuados; hasta encontrar el método de HPLC sugerido en el escrito, presentando un resultado adecuado donde se observa una buena separación entre la Cloroquina, Primaquina y Bulaquina.

Con este método analítico los autores presentan una forma sencilla de poder cuantificar no solo a la Cloroquina con los otros dos fármacos nombrados anteriormente, sino que también se podría utilizar para cuantificar el fármaco en cuestión, pues durante el análisis y la preparación de las muestras, la Cloroquina es preparada de forma individual con tabletas que son conseguidas en su forma comercial, donde después se realiza una preparación con los otros dos fármacos creando una disolución mixta de la muestra para poder analizar con el sistema cromatográfico ya seleccionado. Esto indica que, si no se realiza la disolución mixta con los otros dos fármacos, la Cloroquina se podría cuantificar e identificar sin ningún problema y

donde los resultados que obtienen de precisión, exactitud y linealidad serían similares a los mostrados en el artículo cumpliendo correctamente con los criterios de validación donde fue realizado dicho análisis.

2.1.2.- Análisis comparativo entre metodologías

En este apartado de trabajo se compararán ambos métodos descritos en el apartado anterior, presentando los sistemas cromatográficos y resultados obtenidos por parte de los autores de cada artículo.

Tabla 6. Comparativa de las condiciones cromatográficas empleadas por Coelho (A) y Dwivedi (B)

Título del artículo	A comprehensive stability-indicating HPLC method for determination of chloroquine in active pharmaceutical ingredient and tablets: Identification of oxidation impurities”	HPLC and HPTLC Assays for the antimalarial agents Chloroquine, Primaquine and Bulaquine
Autores	A	B
Columna	Symmetry C18 250 x 4.6 mm 5 µm	Lichrospher C8 select – B RP 250 mm x 4 mm 5 µm
Fase Móvil	Buffer fosfatos pH =3.0 10 mM, con 0.5% de trietilamina y metanol (25:75)	buffer de acetato de sodio 0.01 M pH=5.6 Acetonitrilo (45:55 v/v)
Tiempo de Corrida	12 min	20 min
Equipo	Agilent technologies	No indica
Área de Detección	250 nm	265 nm
Volumen de Inyección	10 µL	10 µL
Temperatura de Columna	40 °C	27 °C
Tipo de Elución	Isocrático	Isocrático
tiempo de retención (min)	9.263 min	4.22 min
porcentaje de recuperación	99.72 %	99.56 %
Linealidad (coeficiente correlación) R ²	0.999 4	0.999 47

En la Tabla 6 podemos observar una comparación de las condiciones cromatográficas entre cada artículo mencionado para la cuantificación de la Cloroquina. Como nos indica la tabla hay una diferencia entre tipo de columnas; una es tipo C18 para el método de (Coelho, 2017), mientras que para el otro artículo de (Dwivedi, 2003) se utiliza una columna con fase estacionaria de C8, esto puede ser que se vea reflejado en los tiempos de retención, pues en el último artículo mencionado, se presenta un tiempo de retención menor al que se presenta donde se utilizó una columna de tipo C18 y esto puede ser por que la Cloroquina puede ser una molécula poco polar, por lo que al usar una columna de 8 carbonos, se presenta en un tiempo de retención corto. La fase móvil también es un punto crítico para esta comparación, pues usan un tipo de Buffer de diferente pH, aunque son dos buffers de pH ácido, pues eso puede ayudar al fármaco a cuantificarse de una manera adecuada. La diferencia de disolventes en la fase móvil puede ser un punto crítico en los resultados pues las polaridades de cada uno son diferentes, aunque esto puede aclarar el uso de diferentes tipos de columnas.

Los demás criterios no presentan una diferencia importante como los dos nombrados anteriormente, a pesar de que alguna modificación de estos criterios (Temperatura, Tipo de elusión, volumen de inyección, flujo, tiempo de corrida y Área de detección) podría generar un resultado diferente a los mostrados en los artículos.

En el método analítico de (Coelho, 2017) se puede ver que los autores están enfocados en crear y validar un nuevo método analítico por HPLC, donde se pueda observar los productos de degradación del fármaco Cloroquina, sus resultados son aceptables cumpliendo con todos los requisitos de una validación y dar con unos resultados interesantes, pues logra su cometido, no solo en cuantificar e identificar la Cloroquina, si no también encontrar todos los productos de degradación que se pudieran presentar en el medicamento con este principio activo, esto realizando una degradación forzada a estos últimos.

En el artículo de los autores (Dwivedi, 2003) se observa un método sencillo donde solo se busca poder cuantificar tres fármacos que como indica en su trabajo, saldrá a la venta en la India y que no hay ningún escrito científico donde explique cómo cuantificar estos tres fármacos al mismo tiempo, sin embargo, los resultados obtenidos del fármaco Cloroquina con su método pudo ser cuantificable y se pudo identificar sin problemas.

En la siguiente tabla (Tabla 7) se presenta los resultados obtenidos de cada artículo.

Tabla 7. Resultados obtenidos de los artículos para el fármaco la Cloroquina

Títulos de los Artículos	A comprehensive stability-indicating HPLC method for determination of chloroquine in active pharmaceutical ingredient and tablets: Identification of oxidation impurities ⁷	HPLC and HPTLC Assays for the antimalarial agents Chloroquine, Primaquine and Bulaquine
tiempo de retención	9.263 min	4.22 min
porcentaje de recuperación	99.72 %	99.56 %
Linealidad (coeficiente correlación) R ²	0.999 4	0.999 47

En la tabla anterior se puede ver la comparación de algunos de los resultados obtenidos entre ambos métodos, si bien la única diferencia que hay entre estos resultados son los tiempos de retención, pero como comentamos anteriormente, este criterio tiene mucho que ver con el tipo de columna, preparación de fase móvil, condiciones de la columna y también qué tratamiento se realizó al fármaco para poder analizarlo.

Si bien las dos metodologías son buenas para poder cuantificar e identificar la Cloroquina, ambas tienen una finalidad diferente, como vemos en el artículo de Coelho, su metodología es más completa, debido a que su investigación ayuda a poder cuantificar los productos de degradación de la Cloroquina, con esto genera poder investigar qué tipo de productos de degradación son, cómo pueden afectar a la salud humana en caso de ser consumidos y de qué forma se podría contrarrestar, solo por dar algunos ejemplos.

Sin embargo, el tratamiento que lleva la muestra para poder realizar su análisis es demasiado exhaustivo, ya que para poder llegar a esos productos de degradación se necesita realizar una degradación forzada de hasta 60 días a la muestra, lo que provoca que debería tener las mismas preparaciones de fases móviles, los mismos equipos y columnas a las mismas condiciones y a disposición, lo cual lo vuelve un poco complicado.

A diferencia del Artículo del autor Coelho, el artículo de Dwivedi tiene otra finalidad, como lo nombra en su trabajo es para poder cuantificar de manera rápida un nuevo medicamento que se venderá en la India con los tres fármacos nombrados en su escrito. El autor presenta un método sencillo y rápido que solo sirva para cuantificar, claro pasando todos los criterios de una validación, lo cual se logra sin ningún problema. Como lo había mencionado anteriormente, si en esta metodología se descarta el realizar una preparación con los tres fármacos y solo cuantificar la cloroquina con el mismo sistema cromatográfico, no se vería afectado y proporcionaría los mismos resultados que se presentan en el artículo. La ventaja de este procedimiento es que la preparación de las muestras es muy rápida y sencilla, al igual que su metodología, aunque el autor nombra que les costo trabajo poder encontrar esta metodología debido a que cambiaban el sistema y puntos críticos, tales como la columna y la fase móvil, sin embargo, pudieron encontrar un sistema adecuado. Una desventaja que veo en este método es que es tan sencillo que solo tendría la función de cuantificar la clorofina, no presenta alguna otra forma de proporcionar más información mas que la concentración de algún medicamento con este fármaco o materia prima, sin embargo, creo que si se trabajara mas con este método para poder generar más información sobre la Cloroquina como sus productos de degradación sin un procedimiento exhaustivo, sería una metodología perfecta para que la industria de la farmacia pudiera utilizarlo.

2.2 Caracterización mediante espectroscopía FTIR de la Cloroquina.

Debido a que aún no se reportan trabajos de cuantificación de la Cloroquina mediante el método de FTIR, nos enfocaremos en la caracterización de las bandas principales obtenidas por esta técnica espectroscópica. Para ello se coloca en la Figura 20 el espectro reportado de la Cloroquina (Mendez, 2014).

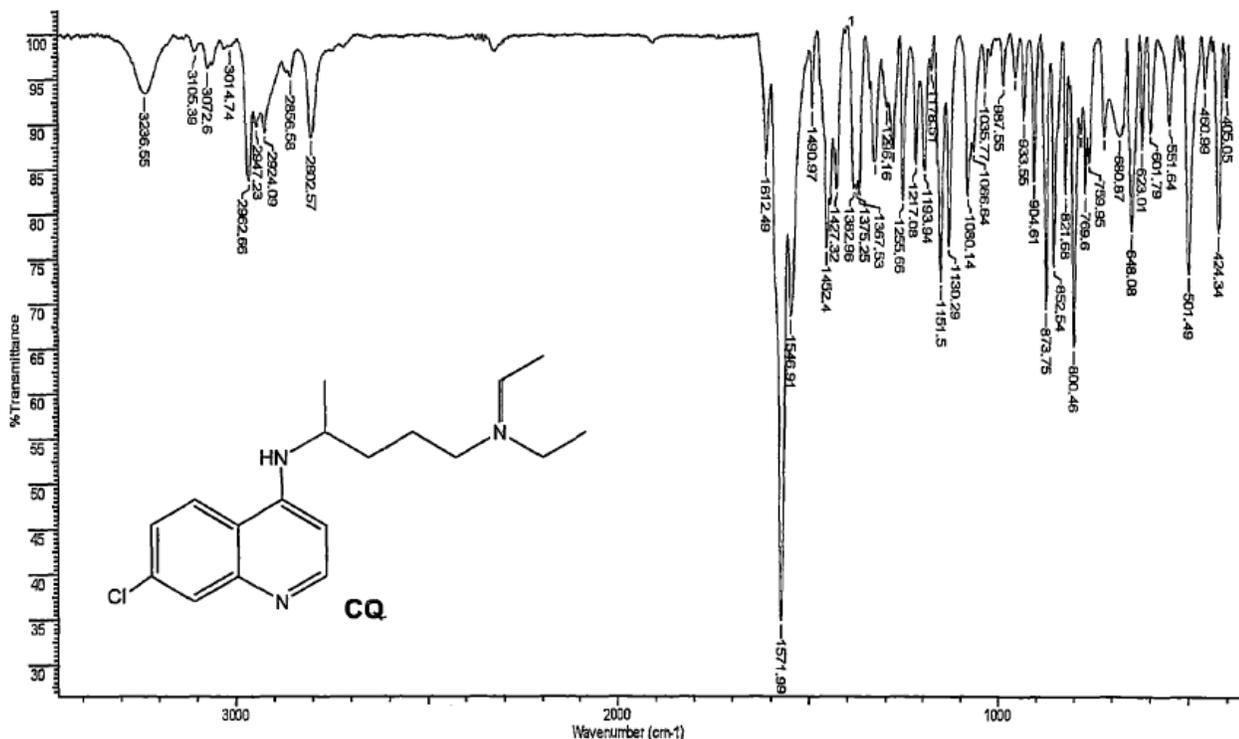


Figura 20. Espectro infrarrojo de la Cloroquina obtenida en pastillas de KBr.

De lo anterior, se presenta en la Tabla 8, la asignación de bandas de flexión y tensión características de cada grupo funcional que conforman la molécula del fármaco de la Cloroquina.

Tabla 8. Bandas de los grupos funcionales que se presentan en el espectro IR del fármaco de la Cloroquina.

Tipo de Vibración	Tensión / Flexión	Número de Onda (cm ⁻¹)
N-H	Tensión	3236
C-H sp ²	Tensión	3014.7 – 3105.30
C-H sp ³	Tensión	2802 - 2962
C = C aromático	Tensión	1612, 1571
C-H	Flexión	1452 - 1357
C-N	Tensión	1151, 1130
C=C combinaciones	Resonancia	1900
C-Cl	Tensión	501

Comenzaremos describiendo la zona de los enlaces O-H, N-H o S-H, en donde se presenta una banda característica del grupo amino N-H del tipo anilina secundaria, ya que es una banda ancha y poco intensa, debido al puente de hidrógeno y el dipolo de este grupo funcional. También se observan bandas de los enlaces C-H de hibridación sp², los cuales corresponden a los anillos aromáticos, los cuales se confirman por los enlaces en 1612 y 1572 cm⁻¹ debido al doble enlace carbono-carbono aromático. Es de importancia notar que la zona de combinaciones aromáticas es casi nula, lo cual se puede deber al tipo de sustituyentes unidos al anillo aromático.

Siguiendo con la descripción del espectro, se presentan las bandas que van desde los 2802 a 2962 cm⁻¹, las cuales son características de la tensión C-H sp³; presentes en la cadena hidrocarbonada lateral y así mismo se enciman con las C-H_{Flex} de la zona 1350 a 1460 cm⁻¹, corroborando así su presencia.

Para confirmar la presencia de los enlaces C-N es necesario observar toda la zona de 1000 – 1200 cm⁻¹ y efectivamente se ven 3 bandas intensas correspondientes a las 3 aminas presentes en la molécula y para finalizar este análisis, se corrobora el enlace C-Cl como tensión en los 501 cm⁻¹, lo cual se debe al efecto peso del enlace. Todas las demás bandas de menor intensidad se saben, son debidas a las flexiones fuera del plano de los enlaces mencionados en este análisis o mejor conocidos como huellas digitales.

3. Hidroxicloroquina

3.1. Cuantificación y caracterización mediante cromatografía líquida de alta resolución

3.1.1 Descripción de artículos reportados

Continuando con los fármacos que fueron utilizados inicialmente para el tratamiento del Coronavirus SARS-COV2 (COVID-19), ahora nos enfocaremos en la Hidroxicloroquina. La Hidroxicloroquina fue sintetizada mediante la adición del grupo hidroxilo al compuesto original, la Cloroquina, en un esfuerzo por reducir la toxicidad de esta última. La Cloroquina resultó ser 2-3 veces más tóxica que la Hidroxicloroquina en estudios experimentales con animales. Aunque la Hidroxicloroquina se desarrolló como agente antipalúdico, también posee otras propiedades farmacológicas como lo es ser un efectivo antiinflamatorio, el cual fue uno de los puntos importantes para poder ser usado para el tratamiento a los síntomas del SARS-COV2 (COVID-19), aunque también este medicamento se ha usado para otras enfermedades como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico. (Singh, 2015)

En la investigación de reportes científicos se encontró el reporte llamado “Development and Validation of Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Hydroxychloroquine Sulphate” (Singh, 2015), donde presentan un método de cuantificación en muestras biológicas para la Hidroxicloroquina. Los autores presentan un nuevo método cromatográfico, validado y sencillo de fase inversa para la determinación de la Hidroxicloroquina en plasma sanguíneo.

Los autores del artículo indican que el método estuvo bajo diferentes condiciones experimentales antes de optimizarlo, realizando diferentes relaciones de fase móvil, temperatura de la columna, flujo y pH de la fase móvil inorgánica. Estos puntos se fueron variando hasta encontrar las condiciones necesarias para poder realizar el análisis.

Las condiciones utilizadas, como indican los autores para la determinación por HPLC de fase inversa, se realizaron con tecnología Agilent, trabajando con una longitud de onda de 343 nm, utilizando una temperatura de 30 °C para la columna de tipo C₁₈ Inertsil ODS-3 con medidas de 250 mm x 6 mm y un tamaño de partícula de 5µm, con un flujo de trabajo de 2.0 mL y una elución de tipo isocrática.

La fase móvil fue preparada con agua inorgánica y una disolución orgánica compuesta por Acetonitrilo: Metanol (50:50 v/v), usando una proporción de 75:25 v/v con 1-pentanosulfato de sodio (96 mg/1 000 mL de fase móvil). Esta fase móvil se ajustó el pH a 3.0 con ácido orto fosfórico y disolución de hidróxido de sodio.

En la siguiente figura (Figura 21) se presenta el cromatograma obtenido en el análisis con las condiciones cromatográficas antes mencionadas.

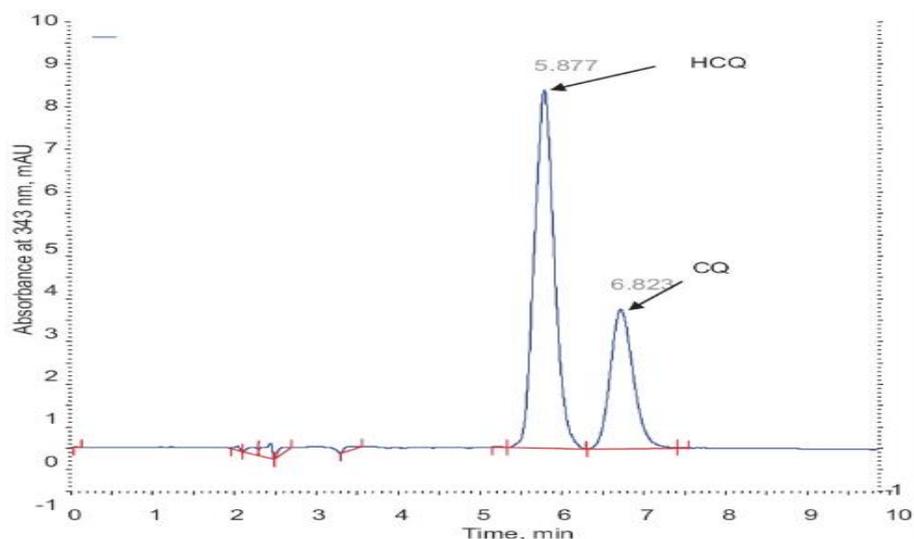


Figura 21. Cromatograma tipo de los resultados obtenidos para el análisis cromatográfico donde se observa la cuantificación de la Hidroxicloroquina (HCQ) TR= 5.87 min, Cloroquina (CQ) TR = 6.823 min.

Como se observa en el cromatograma se presenta el fármaco de Cloroquina, el cual fue agregado como estándar interno. Algunas veces en los análisis estos estándares internos son utilizados solo para verificar algunos criterios como la resolución, tiempos de retención, factor de retención o hasta se utilizan para poder cuantificar el pico principal que se está analizando, que en este caso sería el pico de la Hidroxicloroquina.

Otro punto importante que mencionar de este método es que se realiza bajo la preparación de muestras con plasma, los autores mencionan el tratamiento realizado para poder obtener plasma libre de proteínas, esto para evitar algún tipo de señal no deseada al ser analizado por el equipo cromatográfico y no se presentara

algún tipo de anomalía o afectara la cuantificación del fármaco en investigación. Un ejemplo puede ser que el equipo cromatográfico detecte el pico de una impureza que llegue a afectar la cuantificación de los fármacos en cuestión. Ya realizado el tratamiento al plasma, podía ser utilizada para las preparaciones finales del fármaco Hidroxicloroquina con el estándar interno de Cloroquina, las cuales son inyectadas al equipo cromatográfico.

A pesar de ser un método laborioso por la parte de preparar el plasma libre de proteína, los autores de este reporte científico presentaron resultados que cumplen con los intervalos establecidos en una validación, demostrando que su metodología cumple siendo lineal, exacta y precisa, y puede ser utilizada para poder cuantificar e identificar con buenos resultados el fármaco de la Hidroxicloroquina.

Durante la búsqueda de métodos analíticos para la cuantificación del fármaco de la Hidroxicloroquina por HPLC se encontró el artículo llamado "In Vitro and *In Vivo* Evaluation of Two Hydroxychloroquine Tablet Formulations: HPLC Assay Development" (Emami, 2020). En este artículo se busca la evaluación de dos productos de la Hidroxicloroquina, tanto In Vitro como In vivo. Los estudios In vitro incluyeron los análisis de ensayos, uniformidad de contenido como la prueba de Disolución. Mientras que por el Método In Vivo se recogieron muestras de sangre a intervalos adecuados y se midieron los niveles de HCQ mediante un método validado de Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase inversa. Como en el artículo anterior, aquí también se trabaja con una sustancia de referencia interno, la cual es la Cloroquina. Para este trabajo se analizarán los resultados obtenidos por la metodología In vivo, debido a que sus resultados In vitro los autores indican haber sido exitosos, sin embargo, no presentan cromatogramas tipo en su trabajo, algo que se toma en cuenta en este escrito y nos basamos en ver que fueron buenos resultados.

Para la preparación de este análisis In Vivo se tomaron muestra de sangre a 12 voluntarios que se encontraban en óptimas condiciones de salud, haciéndolos tomar una tableta de Hidroxicloroquina y realizándoles la toma de sangre a diferentes tiempos.

La separación cromatográfica se realizó en una Columna micro-bondapack C₁₈ (250 mm x 46 mm 5 μ de partícula. La fase móvil estaba preparada con Acetonitrilo:Metanol:KH₂PO₄ (10:10:80) conteniendo 0.01 % de trietilamina pH 3.5 ajustado con ácido ortofosfórico. La fase se eluye en un flujo de 1.5 mL/ min a una

longitud de onda de 340 nm. La cuantificación se logró mediante la medición de las relaciones de área de pico del fármaco con el estándar interno Cloroquina.

En la Figura 22 que se muestra a continuación se presentan los cromatogramas de los resultados obtenidos por el método HPLC in Vivo.

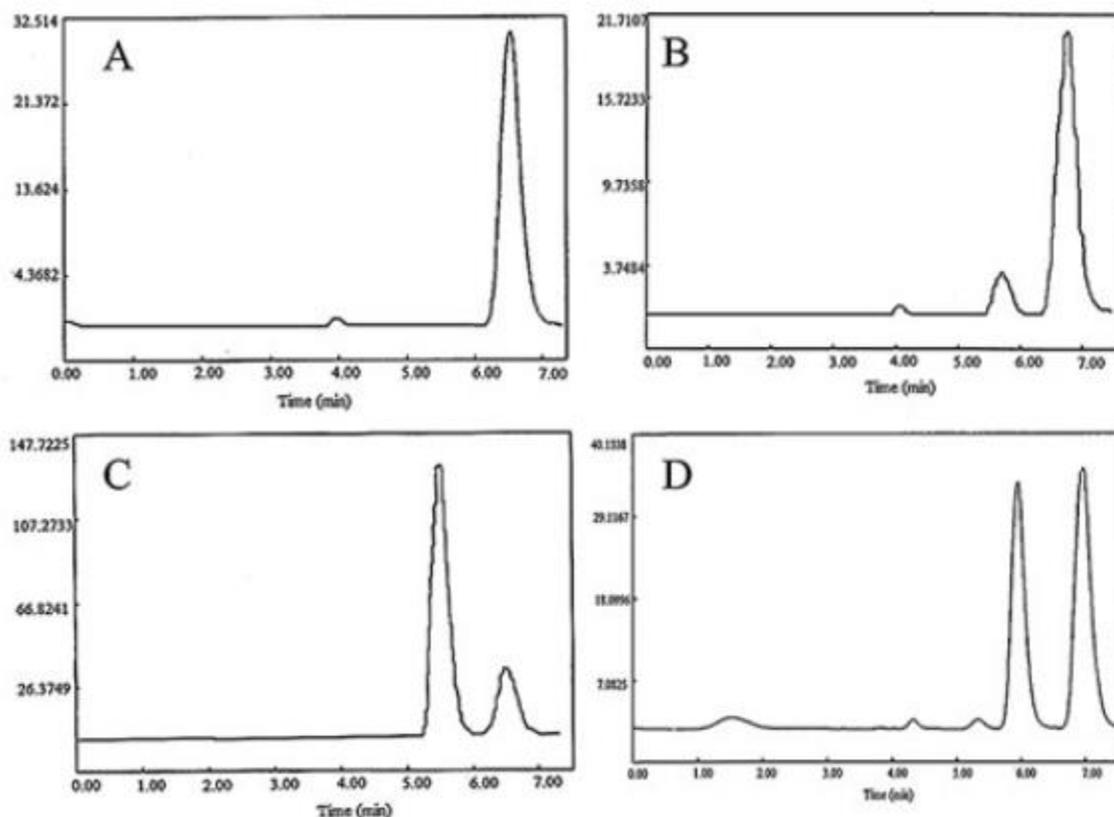


Figura 22. Cromatogramas tipo de resultados obtenidos por el método HPLC In Vivo donde los tiempos de retención para Hidroxicloroquina y Cloroquina (estándar interno) son de 5.7 min y 6.7 min.

Respectivamente. Cromatograma:

- (A) Sangre en blanco adicionada con estándar interno Cloroquina.
- (B) Concentración más baja de Hidroxicloroquina en sangre total.
- (C) Concentración más alta de Hidroxicloroquina en sangre total.
- (D) Concentración más alta de Hidroxicloroquina en sangre total de sujeto sano 8 horas después de ingestión de tableta.

Este método descrito fue aplicado en un estudio de bioequivalencia de dos productos genéricos de Hidroxicloroquina de 200 mg en 12 personas sanas (Figura 21). Los tiempos de retención para la Hidroxicloroquina y la Cloroquina fueron de 5.7 y 6.7 minutos, respectivamente, lo cual se debe a la polaridad de éstas. Es importante mencionar esto dado que si alguno de los voluntarios no se encontraba con buena

salud se hubieran encontrado algunos resultados erróneos, como también poner en riesgo la salud del voluntario, sin embargo, los autores indican que no se presentó ningún tipo de anomalía con los voluntarios, esto se observa en los cromatogramas debido a que se encuentran libres de interferencias en los tiempos de retención de la Cloroquina y la Hidroxicloroquina y ambos compuestos eluyen completamente apareciendo como dos picos resueltos por separado sin colas de picos, lo que permitió el cálculo de las alturas o áreas de los picos.

En los resultados obtenidos para el Método de HPLC demostró tener una excelente linealidad en las concentraciones de Hidroxicloroquina en la sangre humana. Los errores porcentuales y el CV indican que este método es reproducible. El uso del estándar interno aumenta la precisión de los análisis, cuya disponibilidad es un tema importante en los ensayos de HPLC.

Esta investigación describe su método de PLC simple, sensible y selectivo. Para el análisis de Hidroxicloroquina en sangre total con detección de UV, el poder trabajar con una mezcla ternaria de Acetonitrilo:Metanol:KH₂PO₄ en una proporción de 10:10:80 v/v se consideró a la fase móvil eficaz para este análisis, esto se ve reflejado en la resolución más eficiente de los eluyentes y la ausencia de colas. El método cumple los requisitos de linealidad, precisión y exactitud. El método desarrollado es lo suficientemente sensible para los estudios de farmacocinética, farmacodinámica y bioequivalencia de las formulaciones de Hidroxicloroquina. Este método validado se utilizó con éxito para la cuantificación de la Hidroxicloroquina en sangre humana tras una única administración oral de 200 mg de comprimidos de Hidroxicloroquina.

3.1.2 Análisis comparativos entre metodologías.

Como se ha realizado en este escrito, se comparan algunos de los criterios de las metodologías utilizadas para la cuantificación de la Hidroxicloroquina por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución que fueron revisados en el apartado anterior, estas comparaciones se observan en la Tabla 9.

Tabla 9. Comparativa de las condiciones cromatográficas empleadas por Singh (A) y Emami (B)

Título del artículo	“Development and Validation of Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Hydroxychloroquine Sulphate	“In Vitro and <i>In Vivo</i> Evaluation of Two Hydroxychloroquine Tablet Formulations: HPLC Assay Development”
Autores	A	B
Columna	C ₁₈ Inertsil ODS-3 250 mm x 46 mm y tamaño partícula de 5µm	micro-bondapack C ₁₈ (250 mm x 46 mm) 5 µ de partícula
Fase Móvil	Acetonitrilo:Metanol (50:50 v/v), con una proporción (75:25) v/v con 1-pentanosulfato de sodio pH: 3.0	Acetonitrilo:Metanol:KH ₂ PO ₄ (10:10:80) conteniendo 0.01 % de trietilamina pH 3.5
Tiempo de Corrida	10 min	8 min
Equipo	Agilent	Younglin HPLC
Área de Detección	343 nm	340 nm
Flujo	2.0 mL /min	1.5 mL / min
Temperatura de Columna	30 °C	30 °C
Tipo de Elución	Isocrático	Isocrático
tiempo de retención (min)	5.8 min	5.7 min
porcentaje de recuperación	99.75 %	99.53 %
Linealidad (coeficiente correlación) R ²	0.999 1	0.999 6

En la Tabla 9 se realiza la comparación de los parámetros de los métodos analizados para este escrito. Podemos observar que son realmente muy similares ambas metodologías, algún pequeño cambio que se presenta en todos los análisis es el tipo de columna, sin embargo, presentan de alguna forma la similitud en que ambos métodos se favorecen el uso de una columna del tipo C₁₈, aunque cabe mencionar que no deberían dar los mismos resultados por tener una diferencia en la fase estacionaria de las columnas, esto puede llegar a corregirse con la fase móvil utilizada, ya que ambos utilizan una mezcla de disoluciones orgánicas de Acetonitrilo con metanol, sin embargo, el cambio está en sus disoluciones Buffer, aquí varía el tipo de sal que fue usado en cada fase móvil, también donde estas disoluciones presentan un ajuste de pH diferente, este cambio puede ser la parte importante del por qué se presentan los mismos resultados en tiempos de retención.

Los parámetros de ambas metodologías no presentan cambios sobresalientes entre uno y otro, con esta comparación podemos determinar que donde hay mayor importancia en un método de HPLC es en la fase estacionaria, que en este caso sería el tipo de columna y también en la fase móvil utilizada.

Si analizamos los resultados entre los métodos, las diferencias son mínimas, ambos autores trabajaron con métodos validados, presentando que son métodos lineales, sensibles y precisos, esto se puede observar simplemente en el resultado del coeficiente de correlación, donde ambos presentan pendientes de 0.999 1 y 0.999 6, donde la diferencia entre ambos es mínima y cumplen perfectamente el intervalo establecido.

En el porcentaje de recuperación hay una pequeña diferencia, pero los dos están dentro del intervalo de aceptación; los tiempos de retención son casi los mismos, esto es importante porque se ocuparon diferentes tipos de columnas, una pequeña variación en los parámetros cromatográficos y un buffer con diferente pH.

En el caso del método del autor (Singh, 2015) cabe descartar que ellos trabajaron con plasma libre de proteínas para la cuantificación de la Hidroxicloroquina, esto para evitar cualquier tipo de interferencia durante el análisis y los resultados, mientras que los autores de (Emami, 2020), utilizaron voluntarios para la toma de muestra de sangre, sin embargo, en ambos artículos describen cómo es que se preparan las muestras y de alguna forma las preparaciones son similares, esto se refleja en sus cromatogramas tipo y resultados de sus análisis validados.

Otro punto a tomar en cuenta es que ambos métodos usan un estándar interno, el cual es la Cloroquina para ambos análisis, en el artículo de (Singh, 2015) no dan alguna información del por qué lo agregan para su análisis, sin embargo en el artículo de (Emami, 2020) si indican que es para poder sensibilizar el cálculo para los resultados de su validación, concluyendo que también en el primer artículo realizan lo mismo, ya que al agregar un estándar interno a un análisis sirve para verificar otros resultados cromatográficos como el ver el coleo de los picos, la resolución y más importante, poder calcular el factor respuesta para mejorar y como indica el artículo de (Emami, 2020), sensibilizar y optimizar el resultado.

Para concluir esta comparación, ambos métodos son eficientes para poder cuantificar correctamente la Hidroxicloroquina, sus resultados se encuentran dentro de los intervalos establecidos. La única ventaja del método de los autores de (EMAMI, 2020) es que también se realiza su trabajo In Vitro, esto facilita el tener que realizar preparaciones con plasma o sangre de voluntarios, ya que reportan que sus resultados In vitro también cumplen con las especificaciones que debe cumplir el análisis de lo intervalos aceptables para la validación de un método.

3.2 Caracterización mediante espectroscopía FTIR de la Hidroxicloroquina.

Debido a que aún no se reportan métodos de cuantificación para las Cloroquinas de interés mediante la técnica de IR, se procede a caracterizar las bandas características de la Hidroxicloroquina, como se realizó en el capítulo anterior y la Cloroquina (Figura 23). (NMIJ, 2011)

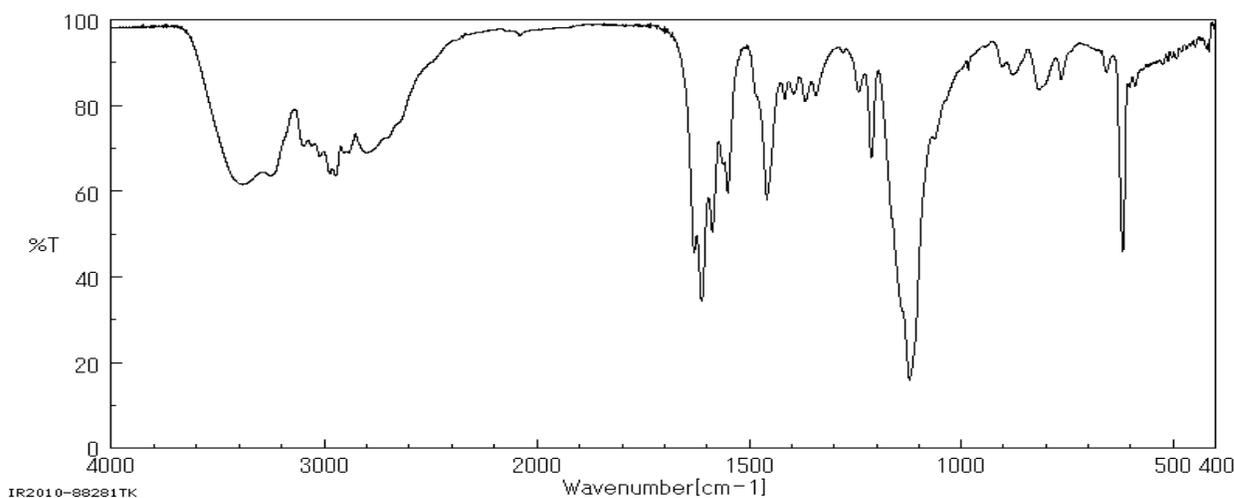


Figura 23. Espectro IR de la Hidroxicloroquina proporcionado por el NMIJ.

Con base en la estructura de Hidroxicloroquina mostrada a continuación (Figura 24), comenzaremos el análisis de las bandas características de la misma, colocando un resumen en la tabla 10.

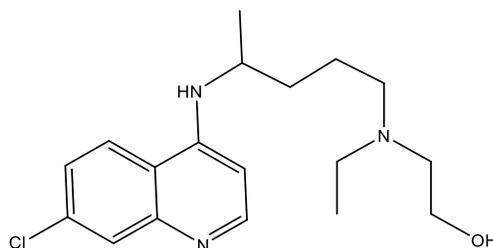


Figura 24. Molécula de la Hidroxicloroquina.

Tabla 10. Bandas de los grupos funcionales que se presentan en el espectro IR del fármaco de la Hidroxicloroquina.

Vibración molecular	Flexión / Tensión	Número de Onda (cm ⁻¹)
N-H; O-H	Tensión	3380- 3249
C-H sp ²	Tensión	3095-3019
C-H sp ³	Tensión	2945-2799
C=C aromático	Tensión	1610-1590
C-N	Tensión	1200
C-O	Tensión	1130
C-H	Flexión	1400 -1342
C-Cl	Tensión	600

Como se puede notar, prácticamente se observan las mismas bandas que la Cloroquina, sin embargo, el hecho de existir el grupo alcohol en la cadena hidrocarbonada lateral, se confirma la presencia del mismo por la banda intensa en 1130 cm⁻¹ de la tensión C-O debido al dipolo fuerte. Así mismo, en la zona de 3300 cm⁻¹, se corrobora el enlace O-H del alcohol, encimado a la amina secundaria unida al anillo aromático. Las otras bandas corresponden a lo descrito con anterioridad al anillo aromático y enlace C-Cl.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

Se logró la comparación entre dos de los métodos de identificación y cuantificación analítica de mayor uso en la industria farmacéutica: la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y la espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR). De acuerdo con los resultados reportados en los artículos científicos consultados se concluye que el método con mayor uso y de mayor elección para el estudio, cuantificación y caracterización del paracetamol, Cloroquina e Hidroxicloroquina fue la cromatografía líquida de alta resolución. A pesar de ser una técnica más costosa y generadora de volúmenes mayores de disolventes orgánicos, permite el estudio de moléculas tanto sencillas como el paracetamol como moléculas complejas como la Hidroxicloroquina y permite la obtención de resultados con mayor sensibilidad, reproducibilidad y de mayor accesibilidad para la industria farmacéutica. Aunado a que es una metodología que favorece la obtención simultánea de impurezas o sustancias relacionadas del analito en la misma corrida cromatográfica, permitiendo eficientar tiempos y recursos analíticos.

Debido a lo anterior, la hipótesis propuesta se confirma.

Bibliografía

- Agilent, T. (abril de 2016). *Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC): Fundamentos y teoría*. Obtenido de https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/5991-5411ES_Agilent_LC_Theory_Spanish.pdf
- Axfors, C. S. (2021). Mortality outcomes with hydroxychloroquine and chloroquine in COVID-19 from an international collaborative meta-analysis of randomized trials. *Nature Communications*.
- Ayres, G. H. (1970). *Análisis Químico Cuantitativo*. Austin, Texas: Harla.
- Banwell, C. (1983). *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. Nueva York: McGraw-Hill.
- Cañinescu, O. (2011). HPLC Separation of Acetaminophen and its Impurities Using A Mixed-mode. *Journal of Chromatographic Science*, 335- 342.
- Christian, G. D. (2009). *Química Analítica, 6ta. Edición*. University of Washington: McGraw Hill.
- Coates, J. (2000). *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. Newtown, USA: R.A. Meyers.
- Coelho, A. S. (2017). A comprehensive stability-indicating HPLC method for determination of chloroquine in active pharmaceutical ingredient and tablets: Identification of oxidation impurities. *Journal of Pharmaceutical*, 1-19.
- Corzo, A. (2019). Técnicas de análisis en Química Orgánica. Cromatografía. *UNSE*.
- Dwivedi, A. K. (9 de June de 2003). HPLC and HPTLC assays for the antimalarial agents Chloroquine, Primaquine and Bulaquine. *Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, págs. 851 -858.
- Ellis, F. (2002). Paracetamol - a curriculum resource. *Royal Society of Chemistry*.
- Emami, J. (22 de Octubre de 2020). In Vitro and In Vivo Evaluation of Two Hydroxychloroquine Tablet Formulations: HPLC Assay Development. *Journal of Chromatographic Science*, págs. 71-78.
- Harris, D. C. (2006). *Análisis Químico Cuantitativo*. China Lake, California: Reverté.
- Hin Fung Tsang, L. W. (2020). An Update on COVID-19 Pandemic: The Epidemiology, Pathogenesis, Prevention and Treatment Strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*.
- Ibrahim, H. (2020). Simultaneous Determination of Paracetamol, Propyphenazone and Caffeine in Presence of Paracetamol Impurities Using Dual-Mode Gradient HPLC and TLC Densitometry Methods. *Journal of Chromatographic Science*, 1-8.
- J. Chem. Educ. (2022). Synthesis and Characterization of Acetaminophen: An Experimental and Theoretical Laboratory for the Undergraduate Curriculum. *Journal of chemical Education*, 910-916.
- Lopez, J. A. (2007). Introducción a la HPLC. Fundamentos del análisis cromatográfico. Cromatografía líquida de alta resolución. *Grupo de investigación QUIMYTEC*.

- Mallah, M. A. (2015). A rapid Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopic method for direct quantification of paracetamol content in solid pharmaceutical formulations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 64 - 70.
- Mendez, L. D. (2014). *“Síntesis, caracterización estructural y actividad biológica de la Metaclorequina AgCQNO3*. Lima - Peru.
- NMIJ. (05 de mayo de 2011). *Spectral Database for Organics Compounds SDBS*. Obtenido de https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
- Pasquarella, K. (2022). Synthesis and Characterization of Acetaminophen: An Experimental and Theoretical Laboratory for the Undergraduate Curriculum. *Journal of Chemical Education*, págs. 910- 916.
- Rohilla, S. (2020). Designing therapeutic strategies to combat severe acute respiratory syndrome Coronavirus - 2 disease: COVID-19. *Drug Dev Res.*, 1-15.
- Schindler, R. (5 de marzo de 1999). FTIR spectroscopy as detection principle in aqueous flow analysis. *Analytical Chemistry*, págs. 123-126.
- Singh, A. (septiembre de 2015). Development and Validation of Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Hydroxychloroquine Sulphate. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, págs. 586-591.
- Smith, B. C. (1996). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Underwood, A. (1995). *Química Analítica Cuantitativa, 5a. Edición*. Londres: Prentice-Hall Hispanoamerica S.A.