



**Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Laboratorio de Espectroscopia Molecular
Mérida – Venezuela**

**Desarrollo de una metodología para la cuantificación de Maleato de Enalapril en
productos farmacéuticos antihipertensivos (tabletas y comprimidos) por
Espectroscopia de Absorción Molecular en la región del infrarrojo**

www.bdigital.ula.ve

Br. Antonella Baldeón Ruiz

Tutor: Dr. Carlos Ayala

Mérida, 2022

Reconocimiento-No comercial-Compartir igual

Dedicatoria

A mis padres

Marco Antonio y María Eulalia

Por ser las personas que más creyeron en lo que podría lograr.

Quienes con su fe, apoyo y comprensión equilibraron mi vida impulsándome para alcanzar esta meta.

Antonella Baldeón Ruiz

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por darme la salud, fortaleza y entendimiento para lograr todo en mi vida.

A la Universidad de Los Andes por abrirme las puertas a una oportunidad única y ser mi casa de estudios por muchos años.

A la Facultad de Ciencias, la cual me acogió durante el desarrollo de mi carrera, brindándome profesores y demás personas que formaron parte importante en mi evolución como persona y como profesional.

Al Laboratorio de Espectroscopia Molecular y todo su equipo, por hacerme sentir parte de ellos y brindarme las herramientas necesarias para culminar esta etapa de mi vida.

A mi tutor Dr. Carlos Ayala por su sabiduría, comprensión, gran paciencia y su constante apoyo durante todo este proceso.

A mis padres, Marco Antonio Baldeón y María Eulalia Ruiz por ser los pilares fundamentales en mi desarrollo, brindándome todo su amor y apoyo en cada fase de mi vida.

A mi tía Odelia Ruiz , quien con todo su cariño siempre supo como aconsejarme y orientarme para encaminarme hacia mi meta.

A mi hermanita Marianella Baldeón Ruiz por ser mi motivación y quien me inspira a ser cada vez mejor. Quien me brindo toda su paciencia, su amor y su apoyo incondicional en cada parte de esta etapa.

A mis amigos y demás personas que hasta donde pudieron aportaron su granito de arena para este logro.

Índice de Contenido

1. Resumen	12
2. Introducción	13
3. Marco Teórico.....	15
3.1. Hipertensión	15
3.2. Antihipertensivos	16
3.2.1. Clasificación de antihipertensivos.....	17
3.3. Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA)	18
3.4. Maleato de Enalapril	20
3.5. Farmacocinética del Maleato de Enalapril	22
3.6. Farmacodinámica del Maleato de Enalapril	23
3.7. Usos y aplicaciones	24
3.8. Interacciones del fármaco.....	25
3.9. Métodos para la determinación del Maleato de Enalapril.....	26
3.10. Fundamentos de la técnica de la Espectroscopia Infrarrojo (IR)	31
3.11. Espectro Electromagnético	32
3.12. Absorción de Radiación.....	33
3.13. Absorción en el infrarrojo.....	35
3.14. Espectro Infrarrojo	37
3.15. Técnica de Espectroscópica de Absorción Molecular por Infrarrojo (IR)	38
3.16. Instrumentación espectrométrica.....	39
3.16.1. Fuentes	40
3.16.2. Selectores de longitud de onda	42
3.16.3. Contenedor de Muestra.....	43
3.16.4. Detectores de Radiación	45

3.16.5. Procesadores de señal y lectura	48
3.17. Tipos de Instrumentos en infrarrojo	48
3.18. Medidas en la región del infrarrojo.....	51
3.19. Transmitancia y absorbancia	52
3.20. Aplicaciones de la Espectroscopia Infrarroja	54
4. Justificación	56
5. Hipótesis.....	57
6. Objetivos.....	58
6.1. Objetivo General.....	58
6.2. Objetivos específicos.....	58
7. Procedimiento General	59
7.1. Metodología:.....	59
7.2. Materiales y reactivos	59
7.3. Soluciones a emplear en el análisis de Maleato de Enalapril.....	60
7.4. Análisis de muestras.....	61
8. Resultados y discusiones.....	62
8.1. Selección de solvente.....	62
8.2. Caracterización espectral del sistema.....	64
8.3. Estudio de la factibilidad de la propuesta metodológica	67
8.4. Criterio de medida	68
8.5. Optimización de los parámetros experimentales.....	69
8.5.1. El proceso de extracción-Preparación de la solución-muestra.....	70
8.5.2. Parámetros espectroscópicos-instrumentales	72
8.6. Validación del Método propuesto.....	74
8.6.1. Características analíticas del método propuesto	75

8.6.2. Precisión del método propuesto	77
8.6.3. Estabilidad de las soluciones de trabajo	78
8.6.4. Curva de calibración por adición de estándar (CCAET) y análisis de significancia entre las pendientes de la curva de calibración sencilla	78
8.6.5. Exactitud de la metodología propuesta.....	81
8.7. Análisis de significancia entre la metodología propuesta y el método validado por UV-Vis:	83
8.7.1. Correlación del método propuesto y el método de referencia	84
8.8. Análisis de los productos farmacéuticos adquiridos en la ciudad de Mérida	85
9. Conclusiones	87
10. Bibliografía	88

www.bdigital.ula.ve

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación de la Hipertensión basada en mediciones de presión arterial (PA). (16)	15
Tabla 2. Métodos de análisis para el Maleato de Enalapril	27
Tabla 3. Aplicación de las regiones del infrarrojo. (45).....	39
Tabla 4. Pruebas de Solubilidad para el Maleato de Enalapril.	62
Tabla 5. Bandas principales de los grupos funcionales del Maleato de Enalapril. 66	
Tabla 6. Valores de la altura de pico de curva sencilla y de la primera derivada.. 69	
Tabla 7. Condiciones experimentales de la metodología propuesta.	74
Tabla 8. Características analíticas de la curva de calibrado normal.....	76
Tabla 9. Estudios de precisión para la metodología propuesta.	77
Tabla 10. Parámetros analíticos de las curvas de calibración de adición estándar.	79
Tabla 11. Estudio correspondiente al estadístico “t” de Student.	81
Tabla 12. Estudio de recuperación de muestra.....	82
Tabla 13. Resultados obtenidos de a comparación de los métodos oficiales y la metodología alternativa.	84
Tabla 14. Análisis de las muestras farmacéuticas para la determinación de Maleato de Enalapril.	85

Índice de Figuras

Figura 1. Niveles de bloqueo del sistema renina-angiotensina. ARA-II: antagonistas de los receptores de la angiotensina II; AT ₁ -R: receptor de tipo AT ₁ ; AT ₂ -R: receptor de tipo AT ₂ ; ECA: enzima convertidora de la angiotensina; IECA: inhibidores de la ECA.....	18
Figura 2. Diagrama molecular del Maleato de Enalapril.	20
Figura 3. Síntesis del Maleato de Enalapril	21
Figura 4. Mecanismo de acción del Maleato de Enalapril.....	24
Figura 5. Movimiento ondulatorio de la radiación electromagnética.....	31
Figura 6. Espectro electromagnético dividido en sus respectivas regiones	32
Figura 7. Regiones del espectro electromagnético con sus respectivos tipos de cambios al interactuar con la radiación	34
Figura 8. Diagrama de niveles de energía. (A) cambios rotacionales; (B) rotacionales y vibracionales; (C) rotacionales, vibracionales y electrónicas; E ₀ estado electrónico fundamental y E ₁ estado electrónico excitado.	34
Figura 9. Tipos de vibraciones moleculares. El signo positivo indica movimiento afuera de la página; el signo negativo indica movimiento dentro de la página	36
Figura 10. Diagrama estándar para mediciones de absorción.....	40
Figura 11. Partes de una celda IR desmontable para líquidos.....	44
Figura 12. Troquel de prensa para hacer pastillas con KBr. Cuerpo principal (a), soporte (b), cilindro grande o émbolo (c), cilindros pequeños con una cara pulida a espejo (d), soporte para pastilla final (e)	45
Figura 13. Celdas de IR para muestras líquidas (a, b) y gaseosas (c, d).....	45

Figura 14. Partes de un infrarrojo no dispersivo para análisis de gases.	49
Figura 15. Esquema de un infrarrojo dispersivo.	49
Figura 16. Esquema de un interferómetro para espectrometría FT-IR.....	50
Figura 17. Tipos de interacción radiación-materia. P_0 es la potencia de la radiación incidente, P_T es la potencia de la radiación transmitida, P_R es la potencia de radiación reflejada y S es la muestra.....	51
Figura 18. Espectrómetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 2000 Explorer FT-IR.	60
Figura 19. Espectro infrarrojo del Cloroformo como blanco en el sistema propuesto en transmitancia (a) y absorbancia (b).	63
Figura 20. Espectro infrarrojo de patrón de Maleato de Enalapril (a) y una muestra comercial (b) en fase sólida.	65
Figura 21. Espectro infrarrojo de: (a) patrón de Maleato de Enalapril en fase sólida, (b) muestra comercial de Enalapril en fase sólida, (c) blanco, (d) patrón de Maleato de Enalapril en cloroformo, (e) muestra comercial de Enalapril en cloroformo.....	67
Figura 22. Comportamiento espectral de las soluciones: (a) Blanco, (b) patrón de Maleato de Enalapril, (c) muestra y (d) la solución muestra fortificada con patrón de Maleato de Enalapril.	68
Figura 23. (A) Altura de pico en la banda $1735,52 \text{ cm}^{-1}$ entre $1690,79 - 1785,72 \text{ cm}^{-1}$. (a) Blanco (CHCl_3), (b) Solución patrón de Maleato de Enalapril. (B) Primera Derivada en la banda $1735,52 \text{ cm}^{-1}$. (a) Blanco (CHCl_3), (c) Solución patrón de Maleato de Enalapril.	69
Figura 24. Optimización del proceso de extracción. (A) Efecto del tiempo de tratamiento ultrasónico (t_{Son}) sobre la eficiencia del proceso de extracción (t_{Son} : 0-60 min; [maleato de enalapril] Muestra (M1 y M9) $\approx 1000 \text{ mg/L}$). (B) Espectros FTIR	

correspondientes a: a) blanco (CHCl_3); b) estándar de Maleato de Enalapril 1000 mg/L en CHCl_3 y c) solución-muestra de concentración equivalente. 71

Figura 25. Gráfico de Absorbancia vs Resolución. 72

Figura 26. Espectros a diferentes resoluciones con su tiempo respectivo: (a) Blanco a $R 4 \text{ cm}^{-1}$, (b) $R 2 \text{ cm}^{-1}$, (c) $R 4 \text{ cm}^{-1}$, (d) $R 8 \text{ cm}^{-1}$, (e) $R 16 \text{ cm}^{-1}$, (f) $R 32 \text{ cm}^{-1}$, (g) $R 64 \text{ cm}^{-1}$ 73

Figura 27. Gráfico de Absorbancia vs Numero de Espectros acumulados. 73

Figura 28. Comportamiento espectral de patrones de Maleato de Enalapril (a) blanco, (b) 200 mg/L, (c) 400 mg/L, (d) 800 mg/L, (e) 100 mg/L, (f) 1200 mg/L, (g) 1400 mg/L. Criterio de medida para cuantificación: Altura de pico, rango entre: $1785,72 - 1690,79 \text{ cm}^{-1}$. Máximo de absorción en $1735,52 \text{ cm}^{-1}$ 76

Figura 29. Estudio de la estabilidad de la metodología propuesta. 78

Figura 30. Gráfico de correlación entre los resultados obtenidos por el método propuesto y el de UV-Vis. 85

1. Resumen

El maleato de enalapril es una pro-droga ampliamente usada en el tratamiento de hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca, para su determinación cuantitativa se desarrolló una metodología por espectroscopía de absorción molecular en la región del infrarrojo utilizando cloroformo como solvente. La técnica propuesta presentó buena reproducibilidad y repetibilidad con rango lineal entre 200-1400ppm, además demostró ser efectivo para el análisis del maleato de enalapril en productos antihipertensivos de diferentes marcas con presentaciones de 5, 10 y 20 mg obteniendo resultados confiables con una alta precisión y exactitud. La técnica se considera más rentable al compararse con la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), el cual se encuentra reportado como método oficial en la USP.

Palabras clave: Hipertensión arterial, Espectroscopia, Maleato de Enalapril, HPLC.

www.bdigital.ula.ve

2. Introducción

En la actualidad a nivel mundial, la hipertensión arterial (HTA) es uno de los trastornos con mayor relevancia e interés, que puede afectar a uno de cada cuatro adultos, con un elevado factor de riesgo en personas mayores de 65 años. Su control es de gran importancia ya que la presencia de altas cifras tensionales en un paciente puede generar riesgo de múltiples problemas renales, cardíacos y cerebrovasculares. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la tasa de mortalidad es cerca de 9,4 millones de personas al año. (1) En el continente americano, la HTA afecta al 30% de la población y en algunos países ese porcentaje puede llegar hasta un 48%. (2)

Actualmente, para el tratamiento de la HTA se recomienda efectuar cambios en el estilo de vida de los pacientes y, si persiste el trastorno, en la mayoría de casos, se propone la administración de algún fármaco antihipertensivo dirigido a la tensión de la pared ventricular, al eje renina-angiotensina-aldosterona y al sistema nervioso simpático, con el fin de disminuir la remodelación ventricular patológica, atenuar la progresión de la enfermedad y mejorar las estadísticas en pacientes con insuficiencia cardíaca grave.

Es importante destacar que el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) puede ser considerada como fuente principal en el avance de la HTA, insuficiencia cardíaca y cardiopatía isquémica, por ello se han desarrollado múltiples fármacos capaces de inhibir este sistema. Clínicamente se utilizan tres grupos de medicamentos que cumplen esa función: los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA-II) y los antagonistas de la aldosterona. (3)

Entre los fármacos que pertenecen a los IECA se encuentra el maleato de enalapril, el cual es un antihipertensivo no sulfhídrico de acción prolongada, activo por vía oral que suprime el SRAA, regulando la presión arterial y la homeostasis de líquidos y electrolitos. Este inhibidor reduce la resistencia vascular periférica sin aumentar relativamente el gasto cardíaco, la frecuencia y la contractilidad.

Todos los grados de hipertensión esencial, especialmente en pacientes con diabetes y otras enfermedades renales crónicas, pueden tratarse con enalapril. A su vez es utilizado en casos particulares para el tratamiento de insuficiencias cardíacas. (4)

Al ser un medicamento de amplio uso, la regulación y control de calidad del maleato de enalapril es de gran importancia, por ello se pueden encontrar diversos métodos para la determinación de este compuesto. Con respecto, al método oficial para el análisis de este principio activo farmacéutico, el mismo se fundamenta en el uso de la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), tanto en la Farmacopea de los Estados Unidos de América, como en la Farmacopea Británica. (5) (6)

Una revisión de la literatura revela diferentes métodos para la determinación cuantitativa de Maleato de Enalapril tanto en preparaciones farmacéuticas como en fluidos biológicos, estos incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (7) (8), métodos potenciométricos (9) (10), métodos quimioluminiscencias (11), espectroscopía de resonancia magnética ($^1\text{H-NMR}$) (12) y espectroscopia por UV-Vis. (13) (14)

Además de las técnicas antes mencionadas, se encuentran muy pocos estudios del Maleato de Enalapril por Espectroscopia Infrarroja (IR). Debido a esto, es de interés desarrollar un método cuantitativo haciendo uso de dicha técnica. Estas metodologías pueden ser utilizadas en el control de calidad en la industria farmacéutica permitiendo tener productos seguros y eficaces.

3. Marco Teórico

3.1. Hipertensión

La hipertensión es la enfermedad cardiovascular más frecuente entre adultos mayores de 60 años, con cifras que aumentan conforme a la edad del individuo. Esta es definida habitualmente como el incremento sostenido de la presión arterial (PA), la cual es el producto del gasto cardíaco y de la resistencia vascular periférica.

El control de la hipertensión arterial constituye uno de los pilares esenciales en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Los patrones de presión arterial van cambiando conforme la edad aumenta y la incidencia de hipertensión incrementa hasta el punto que aproximadamente el 75% de los mayores de 70 años son hipertensos. (15)

Conforme a las pautas prácticas Globales de Hipertensión de la Sociedad Internacional de Hipertensión 2020, es recomendable diagnosticar hipertensión en una persona cuando su presión arterial sistólica (PAS) es ≥ 140 mm Hg o su presión arterial diastólica (PAD) es ≥ 90 mm Hg con valores obtenidos después de un examen repetido. En la tabla 1, se encuentra la clasificación de la PA basada en la medición realizada en un centro médico; criterio que se aplica a toda persona > 18 años.

Tabla 1. Clasificación de la Hipertensión basada en mediciones de presión arterial (PA). (16)

Categoría	Sistólica (mmHg)		Diastólica (mmHg)
PA Normal	<130	y	<85
PA Normal-Alto	130-139	o	85-89
Grado 1 Hipertensión	140-159	o	90-99
Grado 2 Hipertensión	≥ 160	o	≥ 100

Dentro del tratamiento para todo hipertenso, la terapia no farmacológica constituye un componente importante, debido a que algunos cambios en el estilo de vida pueden facilitar el control de la presión arterial. A pesar de esto, un grupo de pacientes presentan un riesgo suficientemente grande de enfermedades cardiovasculares proveniente de la hipertensión por lo que requieren el uso de un tratamiento farmacológico con antihipertensivos eficaces, que puedan disminuir dichas cifras de morbilidad, así como el peligro de apoplejía, insuficiencia cardíaca e insuficiencia renal por hipertensión. (17)

3.2. Antihipertensivos

Se asigna el término antihipertensivo a toda sustancia o procedimiento que se aplica para el control de la HTA. En específico, los agentes antihipertensores son un grupo de diversos fármacos que tienen la cualidad de controlar la presión arterial en niveles adecuados y son utilizados en medicina para disminuir el riesgo cardiovascular (RCV) en pacientes con cuadros de hipertensión de distintos grados. (18)

Estos medicamentos actúan sobre diferentes mecanismos fisiopatológicos situados en el sistema nervioso y cardiocirculatorio influyendo sobre el funcionamiento renal, el equilibrio hidroeléctrico y también operan por vía enzimática. Por ello, para la elección del fármaco ideal también se deben tomar en cuenta otros elementos como la edad del paciente, las comorbilidades (enfermedad arterial coronaria, diabetes, evento cerebrovascular, insuficiencia renal crónica, etc.), los efectos específicos tisulares y la tolerancia a los medicamentos.

Considerando los múltiples factores que influyen en el control de la HTA, el tratamiento antihipertensivo se inicia en pacientes con hipertensión grado 1 estableciendo una cifra de PA ideal que se pueda controlar con el efecto de productos farmacéuticos. Generalmente, se recomienda el uso de un producto de acción prolongada administrado en una única dosis diaria que puede ser de uno o

dos medicamentos por comprimido; ambas estrategias terapéuticas generan un control de PA efectivo, rápido, eficiente y consistente.

3.2.1. Clasificación de antihipertensivos

Es posible clasificar los antihipertensivos según su sitio primario o mecanismo de acción que posee, ordenándolos de la siguiente manera: (19)

- Diuréticos:
 - Tiazidas y agentes similares
 - Diuréticos de asa
 - Diuréticos ahorradores de potasio
- Fármacos simpaticolíticos:
 - Antagonistas del receptor β
 - Antagonistas del receptor α
 - Antagonistas mixtos del receptor α - β
 - Agentes adrenérgicos con acción central
 - Bloqueantes de neuronas adrenérgicas
- Antagonistas del Calcio
- Vasodilatadores
 - Arteriales
 - Arteriales y venosos
- Inhibidor directo de la renina
- Antagonistas del receptor de la angiotensina II
- Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA)

Entre los antihipertensivos mencionados, uno de los más considerados en el tratamiento de HTA son los que actúan sobre el Sistema Renina Angiotensina (SRA), en especial los inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina (IECA), grupo al cual pertenece el fármaco a estudio.

3.3. Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA)

El sistema renina-angiotensina (SRA) interviene de manera muy importante tanto en las funciones renales como cardiovasculares y desempeña un papel esencial en la homeostasis de la presión arterial y en el equilibrio hidroelectrolítico. Debido a que su participación en el organismo causa diversos efectos perjudiciales, el interés clínico se centra en el desarrollo de inhibidores del mismo como los inhibidores directos de la renina (IDR), IECA y antagonistas de los receptores de la Angiotensina II (ARAII), los cuales actúan en diferentes partes del SRA (figura 1) regulándolo eficientemente.

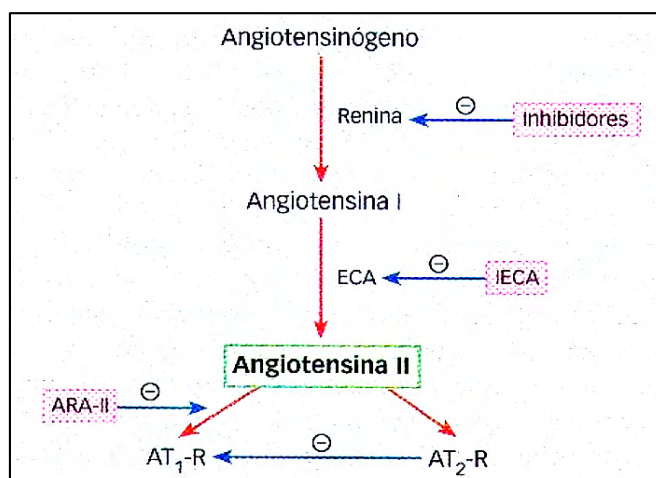


Figura 1. Niveles de bloqueo del sistema renina-angiotensina. ARA-II: antagonistas de los receptores de la angiotensina II; AT₁-R: receptor de tipo AT₁; AT₂-R: receptor de tipo AT₂; ECA: enzima convertidora de la angiotensina; IECA: inhibidores de la ECA. (3)

Parte importante de este sistema es la enzima convertidora de angiotensina (ECA), aislada en 1956, es una dipeptidil carboxipeptidasa responsable del metabolismo de pequeños péptidos. Además de producir la inactivación de la bradiquinina, a esta enzima se le atribuyen dos acciones principales: catálisis de la transformación de angiotensina I (decapéptido) en angiotensina II (octapéptido) y el cambio de la angiotensina 1-9, que es inactiva, en angiotensina 1-7 que es vasodilatadora. (20)

De ambos actos destaca la formación de Angiotensina II ya que es un potente vasoconstrictor e induce la secreción de aldosterona por las glándulas

suprarrenales estimulando la reabsorción de sodio y agua. (21) Todo esto eleva la presión arterial y genera diferentes problemas vasculares en el individuo, por ello se planteó el control de la misma al frenar los procesos del SRA.

En los años sesenta, se observó que a partir del veneno de serpiente de la familia de los crótalos (*Bothrops jararaca*) se podía aislar diversos péptidos que inhibían con intensidad variable la enzima convertidora de Angiotensina (ECA). En 1977, Ondetti y Cushman, estudiaron un nonapéptido denominado teprótido, (3) su análisis condujo a la síntesis de una serie de potentes inhibidores que demostraron actividad en la hipertensión y la insuficiencia cardíaca congestiva, siendo el captoprilo el más activo de estos.

Los IECA tienen como principal objetivo la interferencia del SRA mediante el bloqueo de la ECA, esta acción disminuye los valores de aldosterona y angiotensina II activa. Por otro lado, impide la descomposición de bradiquinina y eleva sus niveles. Todo esto desencadena una serie de acciones vasodilatadoras arteriovenosas que regulan la presión arterial y la resistencia vascular.

Actualmente se encuentran una gran variedad de compuestos activos por vía oral basados en el captopril (dipéptido D-3-mercaptopetilpropionil-L-prolina). Estos se pueden clasificar fundamentalmente en función a la composición química del ligando que se encuentre fijo al átomo de zinc en la molécula de la ECA.

Según esto, se encuentran tres grupos (3):

- a) Grupo sulfhídrico: están estructuralmente relacionados con el captopril.
- b) Grupo dicarboxilo: estructuralmente relacionados con el enalapril.
- c) Grupo fosforado: estructuralmente relacionados con el fosinopril.

Entre los IECA no existen diferencias significativas en cuanto a su eficacia clínica, sin embargo, difieren en la farmacocinética y duración del efecto hipotensor. (15) Algunos de ellos son profármacos que contienen un grupo éster el cual es activado a nivel hepático por acción de una esterasa y, aunque se consideran

menos potentes que sus metabolitos activos, poseen mayor biodisponibilidad oral que las moléculas activas.

Los IECA son considerados los principales medicamentos en el tratamiento de la HTA, reducen la hipertrofia ventricular izquierda, la insuficiencia cardiaca, riesgo de accidentes cerebrovasculares y demás complicaciones aun asociándolo a la diabetes. Pueden ser eficientes tanto en monoterapia como combinados con diuréticos tiazídicos, de asa o con antagonistas de calcio. En este grupo de fármacos destaca el Maleato de Enalapril, como el segundo IECA aprobado en EEUU.

3.4. Maleato de Enalapril

El Maleato de Enalapril (EM), éster etílico del enalaprilato, se describe químicamente como (Z)-2-Butenodiato (1:1) de (S)-1-[N-[1-(etoxicarbonil)-3-fenilpropil]-L-alanil]-L-prolina. Su fórmula Molecular es $C_{20}H_{28}N_2O_5$. $C_4H_4O_4$ y su masa molecular es de 492,52 g/mol. (5)

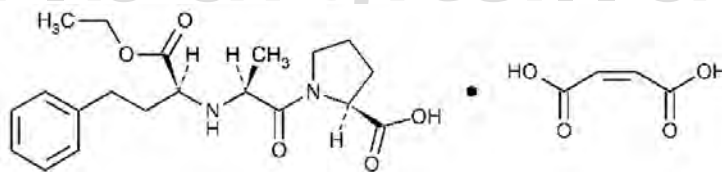


Figura 2. Diagrama molecular del Maleato de Enalapril.

Es un profármaco que se bioactiva al hidrolizarse rápidamente por esterasas en el hígado después de la administración oral, produciendo el ácido dicarboxílico original activo, enalaprilato, el cual actúa como un inhibidor muy potente de la ECA.

El EM se presenta como un polvo cristalino casi blanco y funde aproximadamente a 144 °C. Fácilmente soluble en dimetilformamida y metanol; soluble en alcohol; moderadamente soluble en agua; poco soluble en solventes orgánicos medianamente polares; prácticamente insoluble en solventes orgánicos no polares. Presenta polimorfismo. (22)

Este fármaco es un derivado de dos aminoácidos, L-alanina y L-prolina. Al igual que el captopril, también contiene un “sustitutivo prolina”, pero difiere de este último debido a que es un análogo de un tripéptido, más que de un dipéptido. (19). La ruta de formación del EM se muestra en la figura 3: (23)

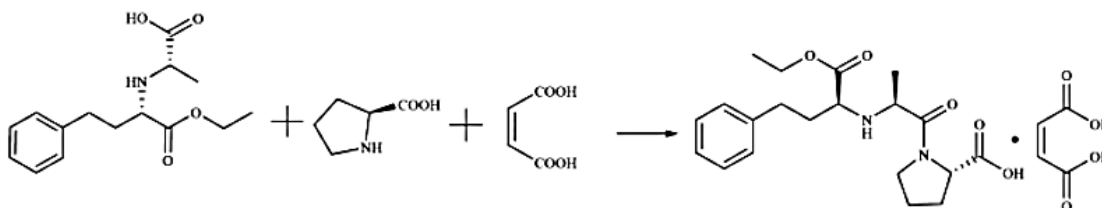


Figura 3. Síntesis del Maleato de Enalapril. (23)

La molécula de enalapril posee dos grupos con funciones ionizables, el primero es un ácido carboxílico con pKa de 2,97 y el segundo una amina alifática con pKa de 5,35. Por otro lado, su ácido activo original enalaprilato, tiene dos grupos carboxílicos con pKa de 1,60 y 3,10 cada uno; y un grupo amina de pKa igual a 8,02. (24)

Existen 2 modificaciones polimórficas para el Maleato de Enalapril, I y II, donde la forma II se considera termodinámicamente más estable. Estas sustancias que existen en dos fases cristalinas presentan similar solubilidad, espectros IR, Raman y termogramas de calorimetría diferencial de barrido. Ambos polimorfos generan una formación del derivado dicetopiperazina, pero se estima que la forma II presenta mayor tasa de degradación, esta se puede controlar al añadir en la preparación del comprimido ciertas cantidades de bicarbonato de sodio o algún estabilizador. Ante esto es posible encontrar aplicaciones de nuevas formas farmacéuticas de Maleato de Enalapril sin especificaciones en su forma polimórfica. (24)

El maleato de enalapril está indicado terapéuticamente en el tratamiento de todos los grados de hipertensión esencial, hipertensión renovascular e insuficiencia cardíaca, reduciendo en aproximadamente un 15% las presiones sistólica y diastólica. Los efectos adversos de este medicamento se presentan de manera leve en menos del 10% de los pacientes tratados, algunos de estos pueden ser

visión borrosa, mareos, debilidad, mareos, palpitaciones, somnolencia y dolor abdominal.

De acuerdo con la base farmacológica de la terapéutica Goodman & Gilman, las dosis de maleato de enalapril varían desde los 2,5 mg hasta una única dosis administrada de 40 mg por día. (19)

Según la OMS, en su lista de medicinas esenciales, las concentraciones reportadas para este compuesto son de 2,5 y 5 mg. (25) En algunos países como Canadá, también es posible encontrar este medicamento comercialmente como Vasotec y aparece como enalapril sódico de 4, 8 o 16 mg que corresponden a 5, 10 o 20 mg de maleato de enalapril respectivamente. (26)

Siguiendo este orden, en el libro naranja de la FDA, este fármaco se presenta como ingrediente farmacéutico activo (API) reportando concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20 mg de maleato de enalapril. (27)

En la actualidad, los antihipertensivos prescritos pueden ser administrados con un único principio activo o una combinación de dos o más medicamentos para una mayor efectividad. Debido a esto, el maleato de enalapril se puede encontrar en diferentes presentaciones, tanto solo como en combinación con otras drogas.

3.5. Farmacocinética del Maleato de Enalapril

El Maleato de Enalapril se administra por vía oral, tiene una rápida absorción por el tracto gastrointestinal y no presenta alguna interferencia en su biodisponibilidad por parte de los alimentos. Ingresa al organismo como un profármaco, el cual sufre una biotransformación convirtiéndose en su metabolito activo enalaprilato con un potencial de acción mayor, su absorción es aproximadamente de 60% a diferencia del enalaprilato que se encuentra entre un 3-12%.

El maleato de enalapril presenta un comportamiento farmacocinético lineal puesto que al aumentar la dosis aplicada su concentración sérica aumenta proporcionalmente. Su actividad hipotensora inicia 1 hora después de su

administración que es cuando llega a la concentración máxima. Las cifras de enalaprilato alcanzan su máximo en 3 o 4 horas, tiempo aproximado en el cual el antihipertensivo logra su efecto óptimo. La vida media plasmática del enalapril es de 1,3 horas y en el caso del enalaprilato el tiempo es de 11 horas debido a la fuerte interacción que tiene con la ECA. (28)

Este compuesto se ve afectado por la humedad e incrementos de la temperatura, lo cual genera una degradación a enalaprilato mediante hidrólisis y a dicetopiperazina a través de una ciclación intramolecular. Presenta un aclaramiento renal, es decir, es excretado por la orina, con un 40% de recuperación como enalaprilato y el resto como enalapril inalterado dando un total de aproximadamente 94%.

3.6. Farmacodinámica del Maleato de Enalapril

El Maleato de Enalapril es un profármaco que al interactuar con las esterasas hepáticas en el hígado, sufre una transformación donde es convertido en su compuesto activo enalaprilato.

Este medicamento produce vasodilatación arteriovenosa al bloquear el SRA, sistema clave en la regulación de la presión arterial. Cuando el organismo detecta baja presión de sangre, una enzima denominada renina es liberada por el riñón y actúa sobre el angiotensinógeno sintetizado en el hígado convirtiéndolo en angiotensina I, sustancia que luego pasa por el pulmón donde se encuentra con la ECA. Esta enzima, además de inactivar la bradiquinina vasodilatadora, también transforma la angiotensina I en angiotensina II, la cual al unirse con su receptor provoca vasoconstricción y aumento de la presión arterial. (29)

Como IECA, el EM interviene en la función de la ECA ya que posee un grupo funcional carboxilo que se une directamente al sitio del ion Zinc de la enzima generando un bloqueo de la misma y restringiendo su efecto sobre la formación de la angiotensina II. Además de esto, mantiene activa la acción de la bradiquinina como vasodilatador. Ambos hechos contribuyen a la reducción del tono vascular

disminuyendo la resistencia vascular sistémica y la presión sanguínea, tanto sistólica como diastólica, sin afectar la frecuencia cardiaca. (30)

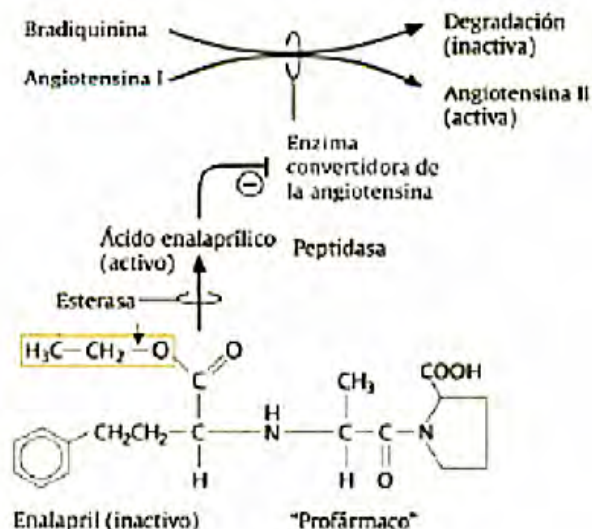


Figura 4. Mecanismo de acción del Maleato de Enalapril. (30)

El inicio de la acción del Maleato de Enalapril suele tardar, la mayoría de pacientes hipertensos presentan un resultado antihipertensivo luego de una hora de haber administrado la dosis correspondiente y tiene un alcance máximo en 4 a 6 horas. La duración de cada toma es de aproximadamente 24 horas y su efecto dependerá de la cantidad de dosis administrada. No se observa aumento de la presión arterial luego de interrumpir la medicación de forma repentina.

3.7. Usos y aplicaciones

El maleato de Enalapril está indicado para el tratamiento de la hipertensión esencial o renovascular, al tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva sintomática y la prevención de la insuficiencia cardiaca en pacientes con disfunción ventricular izquierda asintomática, generalmente es suministrado en combinación con diuréticos tiazídicos, antagonistas de aldosterona, β -bloqueadores o bloqueadores de canales de calcio.

Para pacientes con presión arterial alta se recomienda una dosis inicial de 5mg en adultos que no tomen diuréticos. Según la respuesta del organismo se mantiene

un rango habitual entre 10 y 40 mg por día, con esta última como dosis máxima. Si el efecto antihipertensivo disminuye hacia el final del intervalo de dosificación es necesario considerar la administración dos veces al día, un aumento de la dosis o la adición de un diurético. En caso de personas tratadas anteriormente con algún diurético, este se debe suspender por dos o tres días antes de iniciar el tratamiento con Maleato de Enalapril para evitar una depleción de volumen y riesgo de hipotensión. De no suspender el mismo, la dosis inicial recomendada es de 2,5mg. (26)

En niños con presión arterial elevada se establece una dosis según su peso y la respuesta ante el medicamento. Para un peso entre 20 a 50kg se comienza de 2,5 a 20mg máximos por día y en niños mayores de 50kg la dosis va desde 5mg a un máximo de 40mg. Este medicamento no debe ser administrado a bebés o niños con problemas renales. (31)

En pacientes con insuficiencia cardíaca sintomática o disfunción ventricular izquierda se inicia el tratamiento bajo estrecha supervisión médica con 2,5mg una vez al día aumentándola gradualmente hasta alcanzar una dosis habitual de 20mg en un periodo de 2 a 4 semanas según la respuesta del paciente. La dosis máxima diaria es de 40mg. (32) Es importante reducir la dosis de diurético y controlar el potasio sérico antes de iniciar el tratamiento para evitar riesgos de hipotensión. El uso de Maleato de Enalapril, en este caso, se usa acompañado de diuréticos, digital o betabloqueantes.

3.8. Interacciones del fármaco

Este medicamento no es recomendado en pacientes que demuestren hipersensibilidad al Maleato de Enalapril, a cualquier otro IECA o alguno de los ingredientes en su fórmula. También se considera poco adecuado para quienes tengan antecedentes de angioedema hereditario o idiopático relacionados previamente a un tratamiento con IECA.

Se debe tener un seguimiento adecuado del uso de este medicamento en pacientes que sufran de alguna enfermedad del hígado. Si presenta ictericia o

elevaciones importantes de las enzimas hepáticas, se suspenderá su administración.

El Maleato de Enalapril presenta interacciones con diversos medicamentos, el uso análogo de este con diuréticos puede generar reducción excesiva de la presión arterial causando hipotensión, por ello es de precaución en pacientes con diabetes, insuficiencia renal, cardiopatía isquémica o enfermedad cerebrovascular. Para un ARAll, fármaco que contenga aliskiren o que aumente el potasio sérico se le asocian mayor incidencia de hipotensión grave, insuficiencia renal e hipopotasemia. Se han presentado reacciones nitritoides en pacientes que reciben inyecciones de aurotiomalato de sodio. En combinación con litio aumentan los niveles séricos de este último y potenciar el riesgo de toxicidad por litio. La ingesta de un inhibidor de neprilisina concomitante causa mayor riesgo de angioedema. El efecto antihipertensivo del medicamento puede verse disminuido por el uso simultaneo de simpaticomiméticos o antiinflamatorios no esteroideos, incluidos los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2. Determinados vasodilatadores, anestésicos, antidepresivos tricíclicos y antipsicóticos pueden reducir más la presión arterial. El Maleato de Enalapril puede administrarse sin peligro con ácido acetilsalicílico (a dosis cardiológicas), trombolíticas y betabloqueantes. Este medicamento está contraindicado en caso de embarazo o lactancia, ya que puede causar daño al feto o al recién nacido. (26)

3.9. Métodos para la determinación del Maleato de Enalapril

Siguiendo la USP, el método oficial para la determinación cuantitativa del Maleato de Enalapril es mediante el análisis por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC). Donde se utiliza una fase móvil compuesta por acetonitrilo y solución amortiguadora de pH 2,2 a una proporción 250:750, también una columna cromatográfica de 4,6 mm por 25 cm con relleno L7 de 5 μ m, la cual se encuentra a una temperatura constante de 50 °C. Para la valoración se utilizan soluciones de enalapril dicetopiperazina en acetonitrilo, de enalaprilato en agua, estándar de Maleato de Enalapril y enalaprilato en solución amortiguadora y la muestra de Maleato de Enalapril en solución amortiguadora. Cada solución preparada se

inyecta a un volumen de 50 μL , eluye a una velocidad de flujo de 2 mL / min y es detectado por un espectrofotómetro UV a 215 nm midiendo los picos de respuesta. Presenta un criterio de aceptación de 90,0 – 110 %.

Además del método ya descrito, existen reportes en la literatura sobre diversos métodos de análisis para el Maleato de Enalapril, bien sea en formulaciones farmacéuticas solo, en mezcla con otros fármacos o en fluidos biológicos. Entre ellos se pueden encontrar el uso de técnicas como fluorimetría, potenciometría con electrodos selectivos de membrana, amperometría, voltametría, conductimetría, método de electroforesis de zona capilar, polarografía, y entre las más destacadas se encuentran una gran variedad por HPLC y espectroscopia de Absorción Molecular por UV-Visible. En la siguiente tabla, se describen algunos reportes encontrados donde se hace uso de las técnicas mencionadas.

Tabla 2. Métodos de análisis para el Maleato de Enalapril

Autores	Técnica	Muestra	Características Analíticas
Logoyda, Liliya; Abdel-Megied, Ahmed; Kondratova, Yuliya; Trofimenko, Olena; Korobko, Dmytro; Dakhym, Iryna (2018) (7)	HPLC	Tabletas de EM Enalozid 10 mg	Linealidad = 0,10 - 1,20 % $R^2 = 0,9998$ LOD = 0,021 % LOQ = 0,062 %
Gherman, Simona; Zavastin, Daniela; Şpac, Adrian; Panainte, Alina Diana (2021) (33)	HPLC	Tabletas de EM 10 y 20 mg (solvente acetoniitrilo, buffer KH_2PO_4 , pH 3)	Linealidad = 1 - 100 $\mu\text{g/mL}$ $R^2 = 0,9998$ LOD = 0,31 $\mu\text{g/mL}$ LOQ = 0,94 $\mu\text{g/mL}$ RSD = 1,63 %, 1,27 % Recuperación = 99,83 %, 100,35 %
Danafar, Hossein; Mehrddad, Hamidi (2015) (34)	LC-MS	Muestra de sangre (plasma) (solvente metanol agua y ácido fórmico)	Linealidad = 0,1-20 ng/mL $R^2 = 0,999$ LOD = 0,08 ng/mL LOQ = 0,1 ng/mL Recuperación = 85-115 %

Prasad, Neelkant; Kumar, Rajeev; Kumar, Vipin; Kumar Roy, Ram (2016) (14)	UV	Tabletas EM (KMnO ₄ y H ₂ SO ₄)	Linealidad = 250-500 µg/mL R ² = 0,999 LOD = 2,19 µg/mL LOQ = 6,65 µg/mL RSD < 0,75 % Recuperación = 100,01-101,16 % Longitud de onda = 267 nm
Sakur, Amir Alhaj; Balid, Bayan. (2021) (35)	UV-Vis Formación de complejo con ácido de sulfonftaleína y verde bromocresol	Tabletas EM y Perindopril (solvente cloroformo, buffer fosfato pH 4)	Linealidad = 8-44 µg/mL LOD = 0,230 µg/mL LOQ = 0,697 µg/mL R ² = 0,9994 Recuperado = 98,84-100,05 % Longitud de onda = 415 nm
Oliva, María de los A.; Sombra, Lorena L.; Olsina, Roberto A.; Masi, Adriana (2005) (36)	Fluorimetría	Tabletas EM Lotrial 5, Renitec 5 y Glioten 10 mg (buffer fosfato pH 7)	Linealidad = 0,004-0,5 µg/mL R ² = 0,9883 RSD < 0,0157 Recuperado = 98,84-100,05 % Longitud de onda = 284-260 nm
Khaleel, Ali Ibraheem; Abdoon, Fadam Muteb (2012) (37)	Potenciometría Electrodos selectivos de membrana con ftalato de dibutilo, ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolíbido	Tabletas EM Enapril 20 mg EnaHexal 20 mg (solvente metanol y agua, pH 2,2-3,8 y 2,5-3)	Linealidad = 1x10 ⁻⁵ -1x10 ⁻¹ M R ² = 0,9991, 0,9979 LOD = 1,3x10 ⁻⁷ M, 4,3x10 ⁻⁷ M RSD = 2,01 %, 1,64 % Recuperación ≥ 98 % Tiempo de vida = 33,51 días Pendiente = 57,2 mV/década, 52,2 mV/década
Rossi Salamanca-Neto, Carlos Alberto; Hatamura, Pedro Henrique; Teixeira Tarley, César Ricardo; Sartori, Elen Romão (2014) (38)	Voltametría Electrodo de pasta de nanotubos de carbono de paredes múltiples	Tabletas EM 10 y 20 mg (metanol 30%v/v, buffer Britton- Robinson pH 5, vs. Ag/AgCl, 3.0 M KCl)	Linealidad = 5x10 ⁻⁶ - 8,3x10 ⁻⁵ M R ² = 0,9977 LOD = 4,1x10 ⁻⁸ M RSD = 1,9 %, 4,9 % RE = 0,99 %, 2 % Recuperación = 93,1-106 % Pico = +1,24 V

Mehmeti, Eda; Stanković, Dalibor M.; Kalcher, Kurt (2017) (10)	Amperometría (electrodo serigrafiado)	Tableta EM 10 mg (buffer Britton-Robinson pH 5, vs. Ag/AgCl, 3.0 M KCl)	Linealidad = 2,5-90 μ M $R^2 = 0,9977$ LOD = 0,9 μ M RSD = 1,5% Recuperación = 98-104 % Pico = +1,05 V
Abdel-Monem, Afafaboul-Khier; Bahgat Assaf, Eman Ahmed (2018) (9)	Conductimetría	Tabletas EM October Pharma 20 mg (titulación con ácido fosfotúngstico)	Rango concentración = 7-20 mg $R^2 = 0,999$ RSD = 1,347 % RE = 0,692 %
Gherman, Simona; Zavastin, Daniela; Spac, Adrian; Mircea, Cornelia; Stefanache, Alina; Pascu, Luoana Florentina; Dorneanu, Vasile (2015) (39)	Electroforesis capilar sensible Capilar de sílice fundida	Tabletas EM 10 y 20 mg (0,067M buffer fosfato pH 7, 25 kV, 35 mbar)	Linealidad = 10-100 μ g/mL $R^2 = 0,9997$ LOD = 2,43 μ g/mL LOQ = 7,38 μ g/mL RSD = 0,3864 % RE = 0,64 %, 0,38 % Longitud de onda = 214 nm
Elmali, Fikriye; Alpdogan, Güzin; Aycan, Sule; Sungur, Sidika (2003) (40)	Polarografía de Pulso Diferencial	Tabletas EM (solvente metanol)	Pico = -1,4 V Linealidad = 20-100 μ g/mL $R^2 = 0,9999$ LD = 5 μ g/mL RSD = 1,16
Logoyda, L. S.; Korobko, D. B. (2017) (41)	TLC	Tabletas EM Enalozid mono	$R_f = 0,55$ Fase móvil = Amoniaco (25%)- Propanol (30:70) Límite de detección = 0,2 mcg Luz UV = 254 nm

Como se puede observar en la tabla expuesta, existe gran variedad de métodos para el análisis del fármaco bajo estudio. Seguidamente se describen los antecedentes encontrados haciendo uso de la técnica de Espectroscopia de Absorción Molecular en la región del infrarrojo, para el estudio del Maleato de Enalapril, considerando que está es la técnica de detección a utilizar para el desarrollo de este trabajo experimental.

Ahmadi, Seyyed Hamid; Tavakoli, Hassan; Amirzadeh, Majid; Sangi, Mohammad Reza (2014), en el artículo titulado: Determinación simultánea de Hidroclorotiazida y Maleato de Enalapril en formulaciones farmacéuticas usando espectrometría infrarroja por Transformada de Fourier, propusieron una metodología para el análisis de formulaciones farmacéuticas constituidas por hidroclorotiazida y maleato de enalapril simultáneamente, utilizando como solvente de extracción acetonitrilo. Esto mediante un método espectrométrico infrarrojo por Transformada de Fourier y el método de mínimos cuadrados parciales multivariados (PLS) para la calibración de los datos espectrales en el rango entre 1550–1800 cm^{-1} . Los coeficientes de correlación fueron 0,9990 y 0,9995, las desviaciones estándar relativas (RSD) de 1,97% y 1,35% ($n=5$), y los límites de detección de 0,54 y 0,99 mg/mL para HCT y EM, respectivamente Este método reportó una adecuada exactitud, precisión, repetibilidad y es comparable con los métodos de referencia.

Bhattarai, P.; Katuwal, T. (2021), en el artículo titulado: Estudio por espectroscopia del Maleato de Enalapril e Hidroclorotiazida, los autores proponen un método cualitativo de análisis de dos tipos de tabletas donde una contiene Maleato de Enalapril y otra Hidroclorotiazida como compuestos activos, haciendo uso de las técnicas espectroscópicas de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) y Raman. Los espectros obtenidos presentan bandas de absorción principales dentro del rango de 1000-1700 cm^{-1} en Raman y 500-1800 cm^{-1} en FTIR, donde se observó que los grupos funcionales de cada compuesto estaban presentes en los espectros obtenidos de las tabletas analizadas, confirmando la fiabilidad de los productos disponibles en el mercado.

En los artículos expuestos se describe el uso de la Espectroscopia Infrarroja para un análisis cualitativo del compuesto y una determinación cuantitativa usando como solvente Acetonitrilo, donde ambos trabajos hacen uso de tabletas de Maleato de Enalapril en conjunto con Hidroclorotiazida.

Tras realizar la revisión bibliográfica correspondiente, se puede detallar que existen muy escasos reportes para el análisis del Maleato de Enalapril mediante esta técnica. Por esta razón es de interés el desarrollo de una metodología

alternativa para la cuantificación del Maleato de Enalapril, lo cual hace necesario exponer todos los conceptos básicos sobre la técnica a utilizar.

3.10. Fundamentos de la técnica de la Espectroscopia Infrarrojo (IR)

En el transcurso del tiempo, la espectroscopia se ha convertido en una pieza importante en el avance de los análisis cualitativos y cuantitativos de compuestos orgánicos e inorgánicos, ya que se encarga de estudiar las interacciones existentes entre la radiación y la materia.

La radiación electromagnética es una forma radiante que se propaga a través del espacio; se dice que posee un comportamiento dual, en ocasiones se comporta como partícula (fotón) y en otras como onda. En este último caso, se presenta como ondas transversales con una vibración perpendicular a la dirección de propagación y se puede describir mediante sus características principales como la longitud de onda, frecuencia y amplitud.

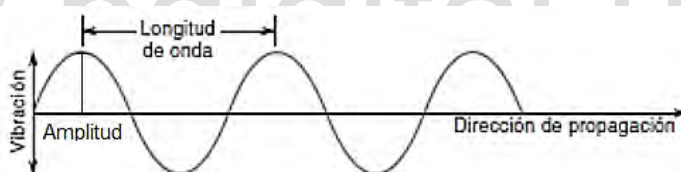


Figura 5. Movimiento ondulatorio de la radiación electromagnética. (42)

Otra forma de describir la radiación es con el número de onda $\tilde{\nu}$ y está definido como el número de ondas por centímetro. Tiene unidades de cm^{-1} y es igual al inverso de la frecuencia. (43)

Desde el punto de vista de la energía, los fenómenos de interacción radiación/materia no son explicados de manera adecuada por el modelo de onda, por ello la radiación, al igual que la materia, es descrita como cantidades discretas de energía llamadas cuantos o fotones. Cada cuanto o fotón transporta una cantidad de energía E , a una frecuencia ν dada que se relaciona con la ecuación de Planck de la siguiente manera:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

Donde h es la constante de Planck y es igual a $6,62 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s} = 1,58 \times 10^{-34} \text{ cal}\cdot\text{s}$. Esta ecuación indica que la energía de un fotón es directamente proporcional a su frecuencia e inversa a su longitud de onda, por ello una radiación de alta energía se presentara al tener frecuencias altas y longitudes de onda cortas. (44)

3.11. Espectro Electromagnético

Existen diferentes tipos de radiaciones electromagnéticas, esta variedad constituye lo que se conoce como espectro electromagnético, el cual se divide arbitrariamente en distintas regiones de acuerdo a su longitud de onda y por lo tanto su frecuencia. En la figura 6 se pueden detallar las principales divisiones del espectro, sus nombres respectivos con los rangos de ν y λ asociados. (42)

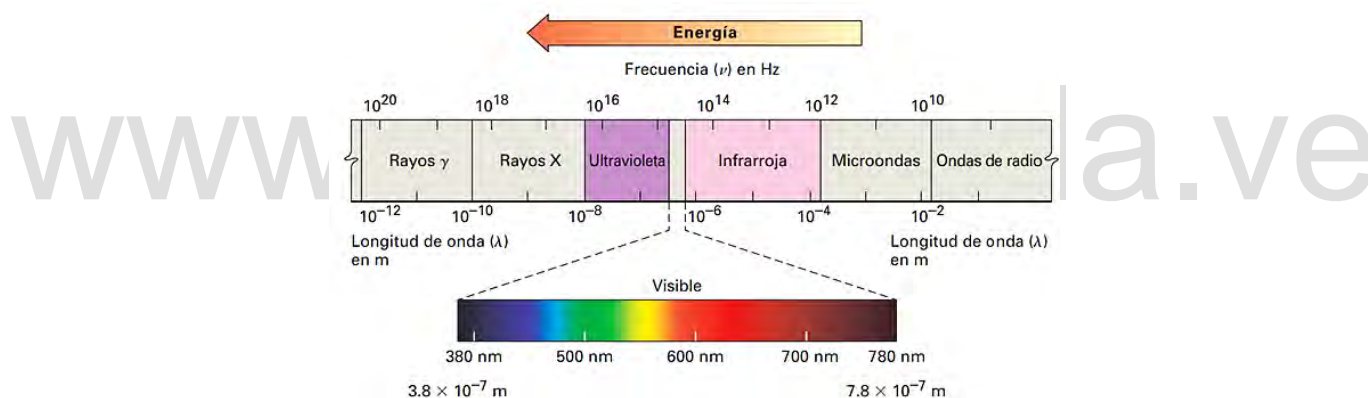


Figura 6. Espectro electromagnético dividido en sus respectivas regiones. (44)

El rango de mayor utilidad del espectro va desde frecuencias menores de 10^{20} Hz que corresponden a los rayos γ , siguiendo los rayos X, ultravioleta (UV), visible (Vis), infrarrojo (IR), microondas hasta las ondas de radio a frecuencias de 10^3 Hz. Es de considerar que al pasar de una región de alta frecuencia a otra menor, la energía de los fotones emitidos por región aumenta. (43)

Un caso a destacar es la región visible, donde la luz aparece como color. Esta comprende solo una pequeña fracción del espectro electromagnético, se encuentra entre longitudes de onda que puede percibir el ojo humano y va aproximadamente desde 380 a 780nm.

Según la región del espectro electromagnético a la que una muestra pueda ser expuesta, su interacción con la radiación puede generar algún tipo de cambio o transición. En base a esto se desarrollan diferentes métodos de análisis espectroscópicos que son utilizados como herramienta factible para diversos estudios.

3.12. Absorción de Radiación

La absorción de radiación puede apreciarse cualitativamente considerando la región visible. Los colores que observa el ojo humano son debido a que se trasmite o refleja solo una parte de la luz policromática. Cuando esta atraviesa un objeto, ciertas longitudes de onda son absorbidas y las demás transmitidas las cuales se perciben como el color del mismo, aunque este no sea más que el complementario de los colores absorbidos. (42)

Cuando la materia interactúa con la radiación, las moléculas de esta son excitadas mediante el suministro de energía como luz, energía eléctrica, calor, partículas o reacción química. La absorción o emisión de un fotón genera un cambio de energía igual a la energía del fotón.

Las moléculas del analito se encuentran esencialmente en un nivel de mínima energía llamado estado basal o fundamental, cuando son estimulados, en algunas especies ocurre una transición a un nivel de mayor energía o estado excitado para luego regresar al estado basal emitiendo cierta cantidad de radiación electromagnética. Estos cambios de energía permiten obtener la información necesaria sobre el compuesto estudiado.

La figura 7, ilustra diferentes tipos de transiciones atómicas y moleculares que resultan de la interacción muestra-radiación según la región del espectro utilizado para un análisis espectroscópico. (43)

Tipo de cambio cuántico	Cambio de espín	Cambio de orientación	Cambio de configuración	Cambio de distribución electrónica		Cambio de configuración nuclear	
	10^{-2}	1	100	10^4	10^6	Número de onda, cm^{-1} 10^8	
	10 m	100 cm	1 cm	100 μm	1000 nm	10 nm	Longitud de onda 100 pm
	3×10^6	3×10^8	3×10^{10}	3×10^{12}	3×10^{14}	3×10^{16}	Frecuencia, Hz 3×10^{18}
	10^{-3}	10^{-1}	10	10^3	10^5	10^7	Energía, J/mol 10^9
Tipo de espectroscopia:	RMN	REE	Microondas	Infrarrojo	Visible y ultravioleta	Rayos X	Rayos γ

Figura 7. Regiones del espectro electromagnético con sus respectivos tipos de cambios al interactuar con la radiación. (43)

De estos cambios, destacan tres procesos básicos de transición por los cuales una molécula puede absorber radiación. Cada uno se encuentra cuantizado en base a sus niveles discretos de energía interna, normalmente estos siguen el siguiente orden: electrónica > vibracional > rotacional. Las transiciones poseen varios niveles diferentes de energía y cada una solo puede ocurrir a longitudes de onda definidas con una energía equivalente al incremento cuantizado de cada nivel, debido a esto, es posible que se absorban diversas longitudes de onda. (42)

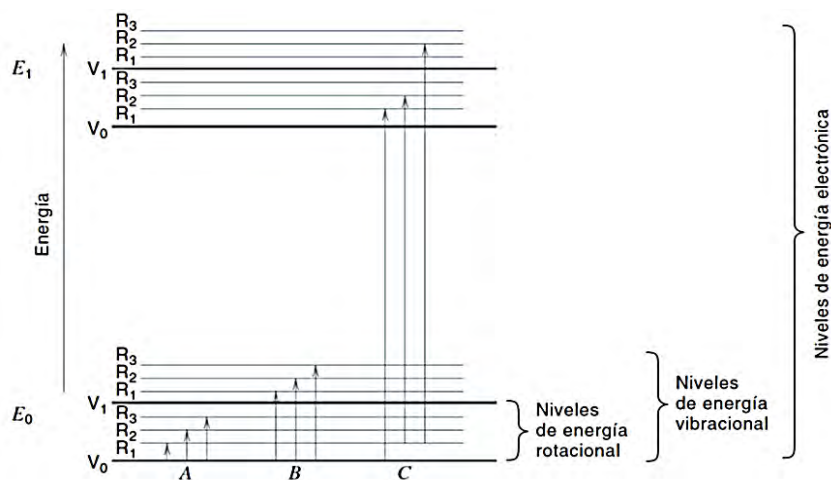


Figura 8. Diagrama de niveles de energía. (A) cambios rotacionales; (B) rotacionales y vibracionales; (C) rotacionales, vibracionales y electrónicas; E_0 estado electrónico fundamental y E_1 estado electrónico excitado. (42)

La energía relacionada a las diferentes transiciones tiene una diferencia significativa de aproximadamente un orden de magnitud entre los niveles de la molécula. Para energías altas, las transiciones producidas son electrónicas sobrepasando las rotacionales y vibracionales; como son muchas las transiciones probables y los niveles particulares se encuentran bastante cercanos, las longitudes de onda que se absorben no pueden expresarse en líneas o máximos individuales por ello son presentadas como espectros extendidos de bandas anchas.

Disminuyendo un poco la energía, en un mismo nivel electrónico se alcanzan transiciones discretas de un modo vibracional a otro, donde cada uno contiene varios niveles rotacionales; debido a esto, en la molécula se presentan transiciones vibracionales y combinaciones vibracional-rotacional produciendo espectros de máximos de estructuras finas no diferenciadas. En caso de trabajar con menos energía, ésta solamente es suficiente para generar transiciones rotacionales dentro de un mismo estado bien sea basal o excitado, por ello las rayas de absorción se presentan como espectros de líneas nítidas correspondientes a cada transición rotacional.

En general, las transiciones electrónicas se llevan a cabo en la región del visible y ultravioleta. Los cambios en los estados vibracionales son efectuadas en la región del infrarrojo medio y lejano; y las transiciones rotacionales de la molécula alrededor de su centro de gravedad se asocian a las zonas del infrarrojo cercano y la región de microondas. (42)

3.13. Absorción en el infrarrojo

Las especies que presentan absorción en la región del infrarrojo son solo de tipo molecular debido a que los átomos aislados no giran ni vibran y solo experimentan cambios electrónicos los cuales se muestran como líneas nítidas correspondientes a transiciones definidas. Es importante destacar que no todas las moléculas pueden absorber en esta región, ya que deben tener un dipolo permanente o inducido y presentar un cambio en su momento dipolar.

Al ser expuestas a ciertas longitudes de onda y frecuencias en niveles energéticos específicos, cada molécula interactúa de manera diferente y mantiene un continuo movimiento donde sus enlaces se alargan, contraen y flexionan constantemente. Como la energía asociada a estos movimientos se encuentra cuantizada, la radiación electromagnética solo será absorbida si la frecuencia emitida es igual a la frecuencia de las vibraciones. En el caso de la absorción de luz infrarroja, se produce un incremento en la amplitud por la vibración de los enlaces generando movimientos particulares. (44)

Los tipos de vibraciones que presentan las moléculas al ser excitadas se pueden agrupar en dos clases básicas. La primera clase son las vibraciones de tensión, estas conllevan un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. La segunda son las vibraciones de flexión, estas implican un cambio en el ángulo entre dos enlaces vibrando alrededor de sus valores de equilibrio, se caracterizan en 4 tipos: balanceo, tijereteo, aleteo y torsión. Todos los movimientos mencionados se ilustran en la figura 9. (45)

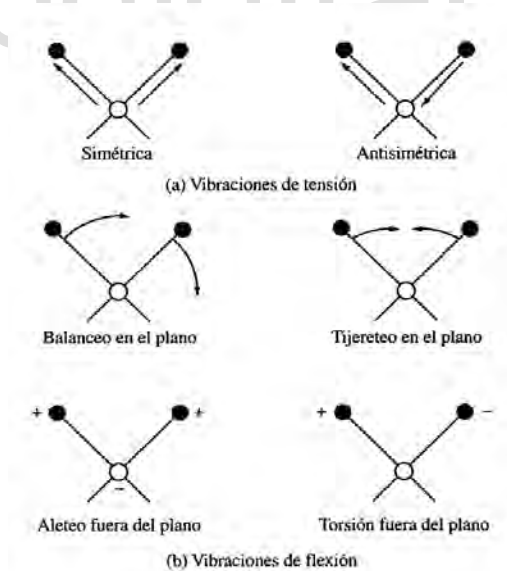


Figura 9. Tipos de vibraciones moleculares. El signo positivo indica movimiento afuera de la página; el signo negativo indica movimiento dentro de la página. (45)

La energía vibratoria de las moléculas y su frecuencia vibratoria también dependerán de la masa de los átomos y la rigidez de sus enlaces. (46) Para especies poliatómicas las variaciones serán difíciles de diferenciar debido a la

gran cantidad de centros de vibración y las interacciones entre ellos, pero en moléculas diatómicas o triatómicas es sencillo apreciarlos al ser estructuras simples.

Cuando se trata de una molécula poliatómica no lineal con n átomos, generalmente, cumple con $3n - 6$ grados de libertad que indican la cantidad de modos vibracionales fundamentales que posee la misma. (46) En estas moléculas se pueden presentar todos los tipos de vibraciones, además de interacciones o acoplamientos entre sí. Estas frecuencias de vibración son particulares para cada compuesto, debido a ello cada uno posee un espectro de infrarrojo exclusivo, exceptuando a los enantiómeros.

3.14. Espectro Infrarrojo

En el espectro electromagnético, la región infrarroja cubre un intervalo de longitudes de onda superiores a 780 nm. Esta se constituye de 3 partes llamadas infrarrojo cercano, medio y lejano, las cuales se encuentran a longitudes de onda de 780 nm (12800 cm^{-1}) – 2500 nm (4000 cm^{-1}), 2500 – 50000 nm (200 cm^{-1}) y 50 μm – 10000 μm (10 cm^{-1}) respectivamente. (47)

Cuando una especie es expuesta a alguna de estas divisiones mencionadas, se adquiere un espectro infrarrojo característico correspondiente a la región utilizada, donde se pueden observar diversas bandas de absorciones posicionadas según la longitud de onda a la que se presenta, generalmente estas se especifican por su frecuencia y se expresan en números de onda, cm^{-1} . A lo largo de cada espectro obtenido se encuentran distribuidas las bandas de absorción producidas, las cuales son características para cada grupo funcional.

Las vibraciones de tensión más representativas del compuesto son las más simples, estas se ubican en la región entre 1600 a 3500 cm^{-1} y las vibraciones de flexión usualmente aparecen entre 600- 1400 cm^{-1} . (46) A esta última zona se le conoce como región de la huella dactilar del espectro y en ella se encuentran bandas particulares de la molécula que permiten diferenciarla de las demás.

Ambas partes permiten obtener información útil de la estructura de diferentes sustancias.

Realizar una interpretación adecuada del espectro infrarrojo requiere del reconocimiento de ciertas bandas de absorción, las cuales pueden verse afectadas por el solapamiento de otras o algún desplazamiento por conjugaciones, atracción de electrones por algún grupo próximo, tensión angular o Van der Waals, puentes de hidrógeno, entre otros. Los efectos de estas interacciones pueden llevar a incertidumbres en la identificación de los grupos funcionales, pero esto mismo confiere al espectro sus características únicas e importantes para la determinación del compuesto.

3.15. Técnica de Espectroscópica de Absorción Molecular por Infrarrojo (IR)

Cada parte en la que se encuentra dividida la región del infrarrojo tienen un uso especial en el análisis cualitativo y cuantitativo de muestras. Partiendo desde el extremo visible del espectro, se encuentra la región del infrarrojo cercano, (región NIR, de sus siglas en inglés "near infrared") donde están presentes sobretonos o bandas combinadas vibracionales de tensión que usualmente se deben a movimientos de grupos funcionales del tipo carbono-hidrógeno, oxígeno-hidrógeno y nitrógeno-hidrógeno. Todas estas bandas de absorción son débiles y poco distintivas, pero bastante útiles para mediciones cuantitativas no destructivas. (42)

Adyacente a la región mencionada se encuentra la del infrarrojo medio (MIR), en esta se presentan vibraciones de tensión y flexión bastante características de los compuestos, permitiendo así una cantidad bastante amplia de aplicaciones en diversos estudios cualitativos y cuantitativos. (45) En general, la técnica de análisis haciendo uso del MIR se considera una herramienta importante para la determinación de numerosas especies orgánicas e inorgánicas, ya que posee un alto grado de especificidad comparado con algunos métodos analíticos.

De último está ubicada la región del infrarrojo lejano, de este se obtienen espectros bastante específicos y útiles donde se pueden distinguir bandas de ciertos grupos a frecuencias particulares. En esta región destaca el estudio de sustancias inorgánicas debido a la presencia de absorciones correspondientes a vibraciones de tensión y flexión entre átomos metálicos y ligandos orgánicos o inorgánicos. También brindan especial información acerca de energías reticulares de los cristales y energías de transición en materiales semiconductores. (45)

Tabla 3. Aplicación de las regiones del infrarrojo. (45)

Regiones Espectrales	Tipo de medida	Tipo de análisis	Tipo de muestras
Infrarrojo cercano	Reflectancia difusa	Cuantitativa	Materiales comerciales sólidos o líquidos
	Absorción	Cuantitativa	Mezclas gaseosas
Infrarrojo Medio	Absorción	Cualitativa	Compuestos sólidos, líquidos o gaseosos puros
		Cuantitativa	Mezclas complejas de gases, líquidos o sólidos
	Cromatográfico		
	Reflectancia	Cualitativa	Compuestos sólidos puros o líquidos
Infrarrojo lejano	Emisión	Cuantitativa	Muestras atmosféricas
	Absorción	Cualitativa	Especies inorgánicas puras u organometálicas

3.16. Instrumentación espectrométrica

Un espectro puede ser registrado empleando muestras líquidas, sólidas o gaseosas mediante un espectrofotómetro el cual mide las frecuencias de luz que absorbe el compuesto expuesto a la radiación.

La mayoría de estos instrumentos espectroscópicos los conforman 5 componentes principales: (43)

- Una fuente estable de energía radiante
- Un selector de longitud de onda para aislar una región limitada del espectro
- Uno o más contenedores de muestra
- Un detector de radiación que convierta la energía radiante en una señal eléctrica medible
- Una unidad de procesamiento y lectura.

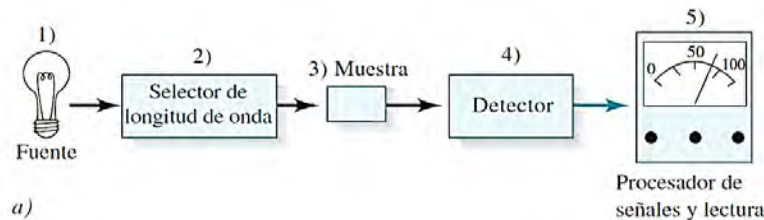


Figura 10. Diagrama estándar para mediciones de absorción.

3.16.1. Fuentes

Como característica principal, una fuente debe producir radiación con bastante potencia para detectarlo y medirlo de manera sencilla, así como también debe tener una potencia de salida estable en lapsos razonables de tiempo, por ello se debe regular bien su alimentación.

Las fuentes pueden ser continuas que emiten radiación con intensidad variable de manera gradual en función de la longitud de onda y de línea que emiten un número limitado de bandas de radiación donde cada una abarca un intervalo reducido de longitudes de onda. (45)

La radiación infrarroja es esencialmente calor, sus fuentes son sólidos inertes calentados, generalmente focos luminosos, cerámicas incandescentes o alambres calientes. La energía de las mismas alcanza un máximo en el IR cercano entre 100 a 2000 nm y presenta un declive en el IR medio, este rango operativo se encuentra entre 2 a 15 μm . En esta región la radiación tiene una intensidad baja debido a esto las rendijas que se usan son suficientemente grandes para un flujo de luz mayor, en algunos casos, se usa un interferómetro para evitar el degrade de la resolución y aumentar la capacidad.

Entre las fuentes más utilizadas se pueden describir las siguientes:

- **Emisor de Nernst:** Es un cilindro formado por una mezcla de óxidos de tierras raras que tiene un diámetro de 1 a 2 mm y longitud de 20mm; al calentarse alcanza temperaturas entre 1200 a 2200 K. (43) Posee un coeficiente térmico de resistencia negativa. No es conductor a temperatura ambiente por ello es necesario someterlo a una corriente eléctrica que logre calentarlo para así volverlo conductor y que produzca radiación con máximo a $1,4 \mu\text{m}$ o 7100 cm^{-1} .
- **Fuente Globar:** Consiste en una varilla de carburo de silicio sinterizado de 5mm de diámetro y 50 mm de longitud. Se puede calentar de manera eléctrica hasta 1300-1700 K y tiene un coeficiente térmico positivo. Alcanza un máximo de radiación a $1,9\mu\text{m}$ o 5200 cm^{-1} y es importante mantenerla enfriada con agua para no formar un arco. (42)
- **Fuente de filamento incandescente:** Es un espiral de alambre de nicromo muy apretado calentado hasta aproximadamente 1100 K con corriente eléctrica. En comparación con el emisor de Nernst o la fuente Globar, esta posee menor intensidad, pero una vida más larga.
- **Arco de Mercurio:** Se compone de un tubo de cuarzo con mercurio, gas inerte y dos electrodos. Es usado en la región del infrarrojo lejano por debajo de 400 cm^{-1} ; la radiación necesaria es generada por una descarga de plasma formada debido al paso de electricidad por la lámpara vaporizando el mercurio a una presión mayor de 1 atmósfera. (48)
- **Lámpara de filamento de wolframio:** Posee un fino alambre de wolframio enrollado como un espiral dentro de un bulbo de cuarzo lleno de un gas inerte y pequeñas cantidades de yodo o bromo. Una corriente eléctrica lo calienta hasta la incandescencia y se usa para la región del infrarrojo cercano entre 12800 a 4000 cm^{-1} .

- **Fuente láser de dióxido de carbono:** Este laser utilizado en infrarrojo presenta una banda de radiación entre 900 a 1100 cm^{-1} generada debido a los modos de tensión del CO_2 . Cada línea discreta que forma la banda tiene una potencia radiante mayor a la del emisor de Nernst o la fuente Globar. (45)

3.16.2. Selectores de longitud de onda

Algunos instrumentos espectroscópicos poseen un dispositivo para restringir la radiación a un grupo limitado de longitudes de onda. Este estrecho rango brinda una mayor selectividad, sensibilidad y linealidad entre la señal y concentración. Se utilizan dos tipos de selectores:

- **Monocromadores:** Permiten variar de manera continua la longitud de onda de la radiación mediante un barrido del espectro. Habitualmente están constituidos por un espejo o lente colimador, una red o prisma que dispersa la radiación y un focalizador que forma de nuevo la imagen de entrada hasta una rendija de salida que limita la banda seleccionada. Existen dos clases de dispersores lineal y no lineal:
 - **Prisma:** La radiación es refractada dependiendo del material o las longitudes de onda utilizadas, las longitudes cortas refractan más que las grandes. Presenta una dispersión no lineal, por ello tiene mejor eficacia en longitudes de onda menor. Según lo necesario, el prisma puede ser de diversos materiales, para la región infrarroja están hechos con cristales de halogenuros alcalinos o alcalinotérreos, destaca el uso de cloruro de sodio (sal gema), KBr o Csl. Es descartado el vidrio y sílice debido a su baja transmisión. (42)
 - **Rejillas:** Consta de una superficie dura, ópticamente plana y pulida, la cual tiene surcos paralelos entre sí hechos con una herramienta de diamante; para la región infrarroja se tienen entre 10 a 200 líneas por mm. La resolución será igual a la cantidad de surcos, cada uno funciona como centro de dispersión lineal y esta dispersión no depende de la

longitud de onda, debido a ello son bastante eficientes en la región infrarroja. Se pueden encontrar las rejillas tipo escalerilla, cóncavas y holográficas. (42)

- **Filtros:** Su función principal es aislar bandas específicas bloqueando o absorbiendo el resto de radiación. Son usados frecuentemente en instrumentos para análisis en la región infrarroja. Existen dos tipos:
 - **Filtros de absorción:** Entre ambos tipos estos son los más rentables, consisten en dos placas de vidrio transparente con un vidrio o suspensión coloreada en medio que solo transmite la longitud de onda deseada y absorbe el resto de radiación. Habitualmente se usan filtros de vidrio en la región visible, tienen anchuras de banda entre 30 y 250 nm, con una transmitancia de 10%. Algunos filtros son de corte fino, los cuales dejan paso a longitudes de onda mayores.
 - **Filtros de interferencia:** Presenta un dieléctrico transparente (de KBr, NaCl, KCl, CaF₂, etc.) que ocupa el espacio entre dos películas metálicas semitransparentes ubicada entre dos placas de un material transparente. La longitud de onda transmitida dependerá del grosor del dieléctrico, una parte atravesará y el resto de radiación será reflejada. Por esto, las interferencias ópticas generan bandas de radiación estrechas con una anchura efectiva de aproximadamente 1,5% de la transmitancia de la longitud de onda. Para la región del infrarrojo, mayormente se utiliza un interferómetro en conjunto con una técnica llamada Transformada de Fourier para la adquisición de información adecuada. (45)

3.16.3. Contenedor de Muestra

Estos contenedores son llamados cubetas o celdas, son recipientes donde se ubica la muestra para realizarle el respectivo análisis. Existen celdas de múltiples longitudes de paso y volumen, cada una con un espesor fijo y como principal

característica, debe poseer un intervalo de transparencia en la región espectral que se requiera.

En la región del infrarrojo se suelen usar una serie de celdas más estrechas que poseen ventanas comúnmente elaboradas con cristales de sales como: NaCl cristalino, KBr, ZnSe, KCl, CsI, CsBr, Si fundida, entre otros. (45) Se selecciona la ventana ideal según los intervalos de transparencia dentro de la región requerida, la solubilidad respecto al solvente usado y cualquier posible reactividad con las muestras. Es importante destacar que con el tiempo las superficies de los cristales absorben humedad y es necesario pulirlas para recuperar su condición.

Algunas celdas presentan una longitud de trayectoria fija y otras permiten variar su paso óptico mediante separadores de teflón de diferentes tamaños, estas últimas son fácilmente desmontables como se ve en la figura 11. (43)

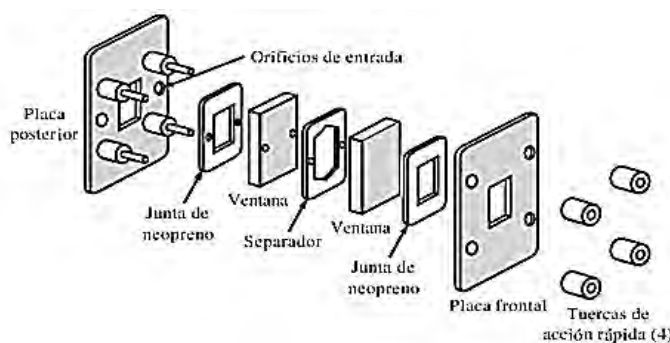


Figura 11. Partes de una celda IR desmontable para líquidos. (45)

Cuando se analizan líquidos puros, generalmente orgánicos, estos se pasan sin diluir y se utiliza una celda con longitud de trayectoria muy pequeña como de 0,01 a 0,05 mm o una película muy delgada formada por una gota de líquido que es presionada entre las dos ventanas unidas por capilaridad. Si son muestras en solución es recomendable trabajar a concentraciones altas y celdas con longitudes menores de 0,1 mm, esto debido a que los solventes no son completamente transparentes en la región infrarroja.

En el caso de sólidos que no se logran tratar en solución, estos pueden medirse utilizando una mezcla con aceite mineral pesado refinado llamado nujol o grasas

de clorofluorocarbono. También se puede analizar con KBr prensando una pastilla traslúcida con pocos milímetros de grosor que se ubica en un soporte especial.

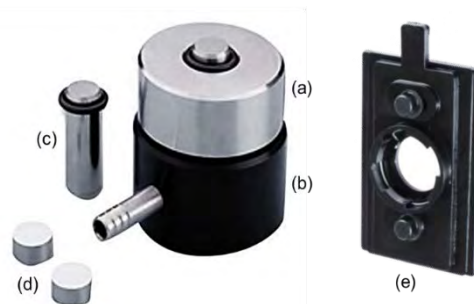


Figura 12. Troquel de prensa para hacer pastillas con KBr. Cuerpo principal (a), soporte (b), cilindro grande o émbolo (c), cilindros pequeños con una cara pulida a espejo (d), soporte para pastilla final (e). (49)

Por último, en muestras gaseosas se usa celdas de larga trayectoria frecuentemente de 10 cm y utilizan solventes gaseosos que presentan ventanas de transparencia amplias disminuyendo la señal de fondo. En la figura 13 se pueden apreciar algunas celdas características para análisis en infrarrojo. (42)

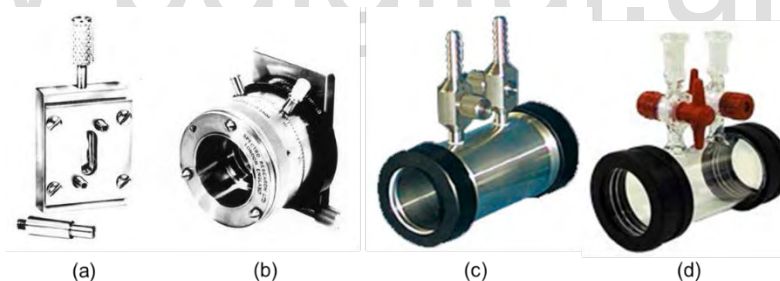


Figura 13. Celdas de IR para muestras líquidas (a, b) y gaseosas (c, d).

3.16.4. Detectores de Radiación

Un detector es un instrumento que reconoce un cambio en una de los factores de su entorno y mediante un transductor, las registra y procesa como una señal eléctrica. Con frecuencia la sensibilidad del instrumento se ve limitada por una serie de fluctuaciones denominadas ruido, estas se presentan aleatoriamente en las señales producidas debido a la gran cantidad de variables que no se pueden

controlar como los cambios de temperatura o variaciones en el voltaje de la corriente eléctrica.

El transductor se encarga de convertir las cantidades químicas y físicas en señales eléctricas con valores proporcionales a los originales. Este dispositivo debe reaccionar ante niveles bajos de energía en amplios intervalos de longitudes de onda, un tiempo de respuesta rápido y generar una señal amplificada con escasos niveles de ruido.

Los detectores se pueden clasificar en dos grupos, uno que responde a los fotones y otro al calor, ambos se describen a continuación: (43)

- **Detectores fotoeléctricos o cuánticos:** Están constituidos por una superficie activa que interactúa con la radiación causando emisión de electrones y una fotocorriente, o también promover electrones a otros estados energéticos aumentando su conductividad. Sus señales eléctricas derivan de la descripción estadística de las absorciones individuales de fotones. Se utilizan para medir radiaciones UV, visible e infrarrojo cercano.
 - **Células fotovoltaicas:** Consiste de un semiconductor como el PbS, telururo de cadmio y mercurio (TCM) o InSb, depositado sobre una superficie de vidrio y sellada al vacío. (43) Se utiliza para medir la energía radiante mediante la caída de voltaje de un resistor de carga conectado en serie al fotoconductor, esto debido a una disminución en la resistencia del semiconductor.
 - **Fototubos:** Consta de un fotocátodo semicilíndrico cubierta de un fotoemisor y de un ánodo de alambre, ambos dentro de una cubierta de cuarzo o vidrio transparente. (43) El potencial aplicado a través de los electrodos emite electrones que van hacia el ánodo provocando una fotocorriente que a veces es diez veces menor que la de una célula fotovoltaica.
 - **Tubos fotomultiplicadores:** Son similares a los fototubos en estructura y funcionamiento, la superficie emite electrones al ser expuesto a la radiación. Presentan mejor sensibilidad y rapidez en el tiempo de

respuesta. Son ideales para casos de radiaciones pequeñas pues contienen unos electrodos adicionales llamados dinodos, mediante los cuales se amplifica la corriente.

- **Fotodiodos en serie:** Es un grupo de diodos de silicio ubicados en un chip de silicio, donde cada diodo posee una unión pn polarizada inversamente. Al exponerlo a la radiación, se genera una corriente proporcional a esta debido al movimiento de electrones en el chip. Su sensibilidad se encuentra entre los fototubos y los tubos fotomultiplicadores. (42)
- **Detectores de fotoconductividad:** Están constituidos por una placa de vidrio o cuarzo con una capa fina de un semiconductor como InSb, Hg-Cd-Te o PbS. Su resistencia disminuye al absorber radiación dentro de un intervalo determinado, esto provoca una variación de conductividad que puede ser medida. Estos detectores son utilizados en la instrumentación de las regiones del infrarrojo. (45)
- **Detectores térmicos:** Se emplean mucho en la detección infrarroja ya que responde a las diferencias de temperatura de un material sensible generada por la radiación incidente. Su sensibilidad es menor que la de los fotoeléctricos e independiente de la longitud de onda. La radiación incide sobre un cuerpo negro siendo absorbida y provocando un aumento de la temperatura; al tener cambios mínimos de temperatura, el dispositivo debe tener una capacidad calorífica muy pequeña para detectarlos. Es importante que se encuentren sellados al vacío debido a que el ruido térmico del ambiente es uno de los grandes problemas al trabajar con radiación infrarroja.
 - **Termopares:** Se basa en la medición del potencial generado al tener una diferencia de temperatura entre dos alambres de diferente material conectados en dos puntos distintos que son oscurecidos para mejorar la absorción de calor respondiendo hasta cambios de 10^{-6} K de

temperatura. Para una mejor sensibilidad se pueden alinear seis termopares en serie para formar una termopila.

- **Bolómetros:** También llamados termistores, están compuestos por óxidos de Co, Mn y Ni, con una resistencia alta que varía con la temperatura y posee un tiempo de respuesta menor que los termopares. (42)
- **Detectores piroeléctricos:** Consta de un cristal de material piroeléctrico como BaTiO_3 o sulfato de triglicina deuterada ubicada entre dos electrodos que generan una corriente dependiente de los cambios de la temperatura. Estos detectores presentan un tiempo de respuesta con una rapidez acorde a la variación de señal con un interferómetro.

3.16.5. Procesadores de señal y lectura

Son aparatos electrónicos encargados de amplificar las señales captadas del detector, convertirla de corriente directa a alterna y a su vez logra cambiar y filtrar la fase de la señal. Estos procesadores son capaces de realizar diferentes operaciones que permitan la interpretación de los datos, tales como diferenciación, integración o resolución de logaritmos. (43) En cuanto a los dispositivos para lectura se encuentran varios tipos como monitores de computadora o medidores digitales, los cuales permiten controlar diversos parámetros, procesar datos, almacenar y comparar resultados.

3.17. Tipos de Instrumentos en infrarrojo

Los espectrofotómetros permiten medir la relación existente entre la energía radiante de dos rayos por medio de la absorbancia. Se encuentran muchas variantes de estos instrumentos y dependerán de diversas cualidades necesarias para las mediciones adecuadas. Para la región del infrarrojo hay tres tipos de instrumentos:

- **Instrumentos no dispersivos:** Son desarrollados para la determinación cuantitativa de especies orgánicas de la atmósfera por absorción, emisión y

reflectancia. Utilizan filtros de cuña y algunos no poseen elementos para la selección de longitud de onda. Son más resistentes, económicos y fáciles de mantener. (45)

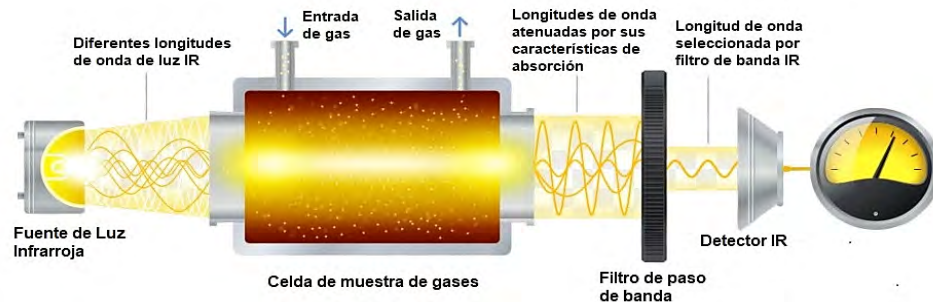


Figura 14. Partes de un infrarrojo no dispersivo para análisis de gases. (50)

- **Espectrofotómetros dispersivos:** Se usan generalmente para análisis cualitativo. Sus diseños son bastante similares a los de UV/visible, pero debido a la baja energía de la radiación infrarroja, no se genera fotodescomposición de la muestra y por lo tanto su celda es ubicada entre la fuente y el monocromador. Además, posee un cortador de baja frecuencia que diferencia la señal de la fuente con las de radiación extraña. Trabaja con fuentes de luz intensas, un tiempo de barrido de 2 a 10 minutos y utilizan redes de reflexión para dispersar la radiación luz en diferentes frecuencias y las mide individualmente. Estos instrumentos están siendo reemplazados por los de transformada de Fourier (FT-IR).

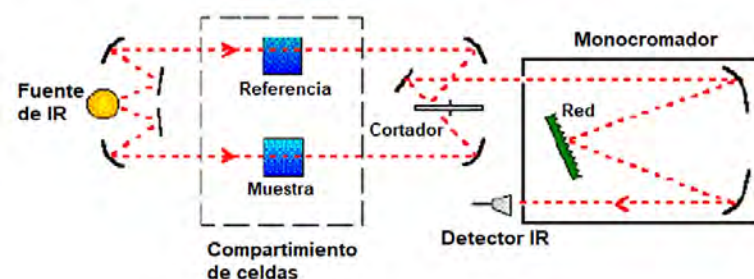


Figura 15. Esquema de un infrarrojo dispersivo. (51)

- **Espectrómetros de transformada de Fourier:** Se emplean para mediciones cualitativas y cuantitativas. Poseen pocos elementos ópticos, requieren fuentes de menor energía, menor tiempo de barrido y presentan rendijas que atenúan la radiación con una potencia alta. Además, al captar toda la

radiación transmitida, se obtiene una relación señal/ruido mayor que en los dispersivos, lo que permite la obtención de espectros complejos y el análisis de características espectrales de difícil determinación. Un detalle importante de estos espectrómetros es el uso de un interferómetro donde existe un divisor de radiación hecho de Ge o Si con un sustrato transparente de KBr para la región de estudio.

Parte de la luz infrarroja, al atravesar el interferómetro, incide y llega a un espejo móvil mientras que otra es reflejada en un espejo fijo, luego ambos rayos se recombinan formando un patrón de interferencia que pasa por la muestra alcanzando el detector. La señal obtenida se denomina interferograma, el cual es un espectro en el dominio del tiempo correspondiente a la intensidad de absorción en función de la diferencia de longitud entre los dos rayos. La operación matemática llamada Transformada de Fourier lo convierte al dominio de frecuencia. (46) Estos instrumentos usan gas inerte para purgarlos y bajar la absorción de fondo del CO_2 y vapor de agua. En su mayoría destacan por su rapidez, comodidad, alta resolución, sensibilidad, reproducibilidad y mayor relación señal/ruido que los espectrómetros dispersivos.

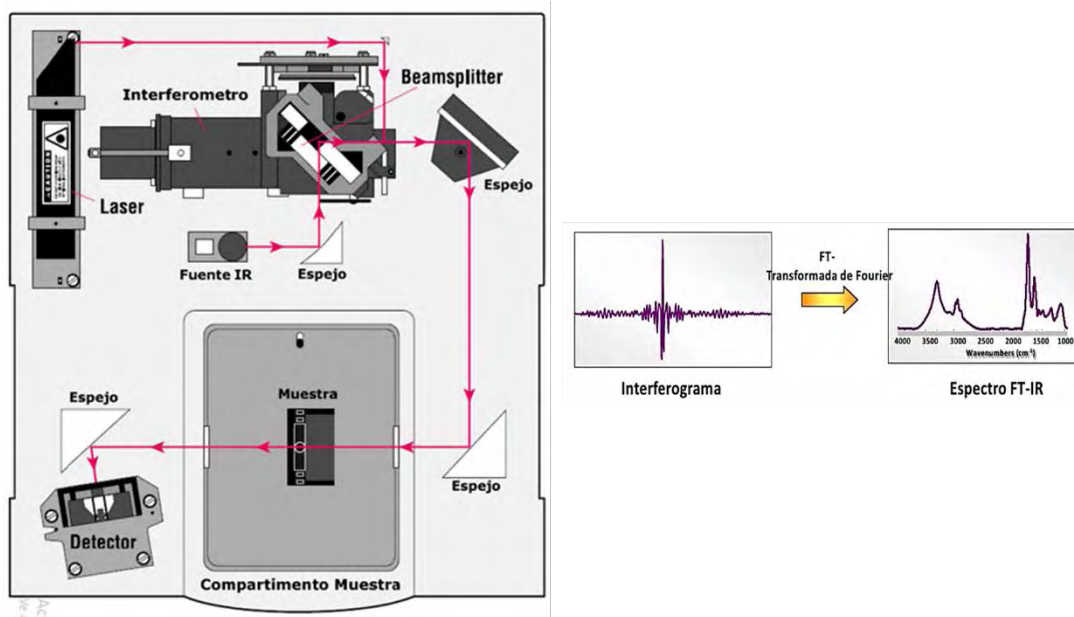


Figura 16. Esquema de un interferómetro para espectrometría FT-IR. (52)

3.18. Medidas en la región del infrarrojo

El análisis estructural de un analito es uno de los usos más destacados en la espectroscopia del infrarrojo; sin embargo, es posible obtener información sobre la muestra de manera cualitativa y cuantitativamente. Para adquirir los datos necesarios existen diversos fenómenos por los cuales la materia interactúa con la radiación, estos son ilustrados en la figura 17.

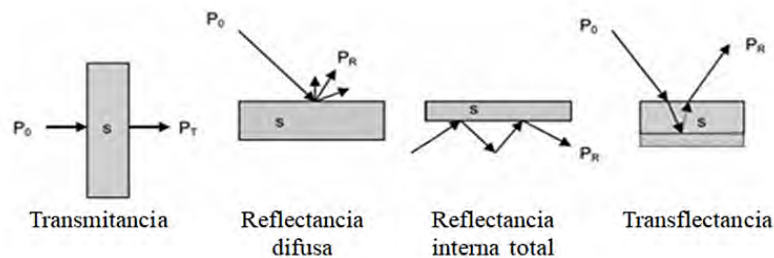


Figura 17. Tipos de interacción radiación-materia. P_0 es la potencia de la radiación incidente, P_T es la potencia de la radiación transmitida, P_R es la potencia de radiación reflejada y S es la muestra.

- **Transmisión:** Para este caso, el haz de luz infrarrojo traspasa completamente la muestra, donde parte de radiación es absorbida en el camino, el haz restante es captado por el detector para luego establecer una relación entre la radiación incidente y la transmitida. (53)
- **Reflectancia difusa:** La reflexión de radiación puede ser de dos tipos: especular y difusa. La primera involucra medidas de reflectancia superficiales donde el ángulo del haz reflejado es similar al ángulo incidente, con un índice de refracción variable según la frecuencia de radiación. En el segundo caso la radiación choca con la superficie del analito y es reflejada en diferente dirección involucrando diversas reflexiones externas e internas. La intensidad de radiación reflejada es independiente del ángulo de incidencia. (54)
- **Reflectancia interna total:** La reflexión ocurre al pasar de un medio a otro menos denso. Durante este proceso, el haz penetra cierta distancia en el

medio antes de reflejarse, esta dependerá del índice de refracción de los materiales, la intensidad de la radiación, la longitud de onda y el ángulo de incidencia. Es de considerar que, al aumentar el ángulo, la intensidad del haz reflejado aumentara. En caso de que el medio absorba parte de la radiación, su intensidad se verá atenuada y se tiene una variante llamada reflectancia total atenuada. (48)

- **Reflectancia total atenuada (ATR):** Tiene como fundamento la interacción de radiación infrarroja con una distancia pequeña en la muestra tras atravesar un cristal de ATR que puede ser de ZnSe, Ge o diamante. En algunos casos rebota o se refleja múltiples veces dependiendo de la densidad del medio, su índice de refracción, el ángulo del haz incidente, longitud de onda, etc. (55)
- **Transflectancia:** Consiste en una mezcla de reflexión y transmisión. Cuando una película fina es depositada sobre una superficie reflectiva, una parte de la radiación es reflejada por la parte superior de la muestra y otra penetra el interior de la misma y se refleja en la superficie reflectante. Sus espectros son similares a los de transmitancia. (56)

Según lo descrito, las mediciones pueden llevarse a cabo en la mayoría de tipos de muestras y cada una de diferentes maneras. Es de gran relevancia destacar el uso de la transmisión como medida frecuente para los análisis necesarios en la región del infrarrojo. Haciendo uso de este tipo de medida, las muestras pueden analizarse en estado líquido, sólido y gaseoso.

3.19. Transmitancia y absorbancia

En la mayoría de soluciones, los analitos son capaces de absorber cierta cantidad de radiación a frecuencias particulares, como resultado de la interacción, luego de atravesar la muestra la intensidad del haz de luz incidente disminuirá. Esta fracción de cambio en la potencia radiante de P_0 a P es conocida como transmitancia (T) y generalmente es expresada en porcentaje. (57)

$$T = \frac{P}{P_0} \quad , \quad \%T = \frac{P}{P_0} \times 100\%$$

Otra expresión por la cual se pueda definir el cambio en la intensidad de radiación es la absorbancia (A) y se encuentra relacionada con la transmitancia de manera logarítmica. (45)

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P}$$

$$\text{Como } T = \frac{\%T}{100} \text{ , entonces } A = -\log \%T + \log 100 = 2 - \log \%T$$

El cambio en la potencia radiante P_0 depende del medio que atraviesa el haz de luz y de la trayectoria donde se efectúa la absorción. Partiendo de esto, es posible relacionar la atenuación de radiación con la concentración de una solución, lo cual ocurre con la absorbancia mediante la ley de absorción conocida como ley de Beer - Lambert y se puede describir mediante la siguiente ecuación:

$$A = (a \cdot \text{PM}) \cdot b \cdot c = \epsilon \cdot b \cdot c$$

La absorbancia es una medida adimensional y es directamente proporcional a la concentración c expresada en mol/L, el camino óptico b usado en cm y la absorptividad a con unidades de L/cm.g. Esta última cantidad es un coeficiente de proporcionalidad característica de cada sustancia y depende tanto de material que lo conforma como de la longitud de onda de la luz monocromática determinada. Al multiplicar a con el peso molecular (PM) de la especie analizada se obtiene la absorptividad molar ϵ representada por L/cm.mol. (57)

Cada espectro correspondiente a un compuesto particular, presenta máximos de absorción a longitudes de onda definidas con intensidades proporcionales a su concentración. Sin embargo, debido al ancho de las bandas de absorción seleccionadas para la cuantificación es frecuente observar ciertas desviaciones reales respecto a esta relación lineal generando así limitaciones reales en la ley de Beer. En algunos casos, es posible encontrar desviaciones químicas originadas

por alguna interacción entre las moléculas presentes o también ciertas desviaciones instrumentales por el método de análisis.

Para una determinación adecuada es importante tomar en cuenta cualquiera de estas desviaciones. Además, es esencial corregir cualquier efecto de radiación dispersada y absorbida por el disolvente y la celda; para ello es frecuente el uso del método de línea base, técnica con la cual se disminuyen errores relativos proporcionales a la muestra. Como instrumentos más utilizados, destacan los trabajos con Espectrómetros de transformada de Fourier, ya que con estos es posible obtener medidas con mayor precisión y exactitud, otorgando mejores resultados para un análisis apropiado.

3.20. Aplicaciones de la Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopía infrarroja es una técnica muy utilizada en investigación e industria; su sensibilidad, especificidad y rapidez lo califican como una herramienta analítica eficiente para múltiples estudios como control de calidad y análisis dinámicos.

Entre los campos de estudio donde se aplica esta técnica se pueden mencionar:
(48)

- Industria Farmacéutica.
- Industria Petroquímica.
- Industria Alimentaria.
- Medioambiente
- Biomedicina
- Cosmética
- Toxicología forense
- Agricultura
- Procesos químicos

Debido al amplio campo en que se puede aplicar la espectroscopia de absorción molecular por infrarrojo, esta se considera como una técnica eficiente y con gran potencial respecto a los análisis cualitativos y cuantitativos de una gran variedad de muestras líquidas, sólidas y gaseosas.

Es de relevancia destacar que los análisis por absorción en IR, al ser altamente sensibles, versátiles, selectivos y rápidos, se establecen como herramientas óptimas e importantes cumpliendo con las normas y requerimientos que demandan muchas dependencias para su desarrollo en diferentes áreas. A su vez el avance de nuevos métodos le otorga un gran potencial como grandes ventajas respecto a otros métodos analíticos.

www.bdigital.ula.ve

4. Justificación

El maleato de enalapril es una pro-droga que se bioactiva por hidrólisis del éster etílico formando el enalaprilato, siendo un inhibidor activo de la enzima convertidora de angiotensina. Este medicamento es utilizado ampliamente para el tratamiento de hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca y se considera de gran demanda en la población, por tanto, el control de calidad del mismo es de relevante importancia. Considerando que un fármaco se puede falsificar de diferentes formas como lo son: principio activo farmacéutico incorrecto, concentración incorrecta del PAF, excipientes ilegítimos y fechas de caducidad falsificadas. Y que, aunado a esto, los métodos de control establecidos por las farmacopeas, para el estudio de este antihipertensivo, involucran la técnica de HPLC, dichos métodos implican una cantidad importante de reactivos en comparación de otras técnicas, generando altos costos, además de tiempos largos de análisis. Si bien es cierto que existen otros antecedentes para el análisis del fármaco en cuestión, ~~sin embargo~~, son pocos los reportes de estudios del Maleato de Enalapril por Espectroscopía de Absorción Molecular en la región del infrarrojo (IR). Por tanto, es por demás interesante proponer una metodología alterna para la determinación cuantitativa del contenido de maleato de enalapril mediante esta técnica, la cual podrá ser utilizada para realizar los distintos controles de calidad relacionados con la determinación de uniformidad de contenidos en los laboratorios de la rama farmacéutica.

5. Hipótesis

Se propone la hipótesis de investigación teniendo presente las siguientes premisas:

- El maleato de enalapril es un fármaco de alta demanda entre la población con un control de calidad riguroso.
- El fármaco se encuentra a concentraciones relativamente elevadas, entre 5,10 y 20 mg para diferentes marcas comerciales.
- Este compuesto presenta bandas de absorción en la región del infrarrojo medio.
- La técnica de espectroscopia de absorción molecular infrarroja proporciona importante información cualitativa y cuantitativa.

Considerando lo antes expuesto, se plantea la siguiente hipótesis:

Haciendo uso de la técnica de espectroscopía de Absorción Molecular en la región del infrarrojo se podría desarrollar un método de análisis alternativo y sencillo que permita determinar la concentración de Maleato de Enalapril en tabletas o comprimidos de diferentes marcas comerciales con una alta precisión y exactitud.

6. Objetivos

6.1. Objetivo General

Desarrollar una metodología para la cuantificación de Maleato de Enalapril en productos farmacéuticos antihipertensivos (tabletas y comprimidos) por Espectroscopia de Absorción Molecular en la región del infrarrojo.

6.2. Objetivos específicos

- Presentar una metodología alternativa para la determinación del maleato de enalapril utilizando espectroscopia en la región del infrarrojo medio.
- Optimizar las condiciones experimentales relacionadas con la metodología propuesta.
- Validar la metodología propuesta
- Determinar la uniformidad de contenido de maleato de enalapril en diferentes marcas comerciales.

7. Procedimiento General

7.1. Metodología:

La sección experimental de este trabajo especial de grado se realizó haciendo uso de los servicios e implementos del Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM) el cual forma parte del Departamento de Química en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

7.2. Materiales y reactivos

- **Materiales:**

- Balanza analítica
- Espátula
- Pesa sustancia
- Balón aforado de 10mL
- Soporte universal
- Nueces
- Pinzas
- Papel de filtro N°2, diámetro 9,0 cm, lote 50316095
- Soporte para embudos
- Embudos tallo corto
- Vaso de precipitado

- **Reactivos:**

- Cloroformo (ClCH_3).
- Maleato de Enalapril

- **Muestras:**

Las muestras fueron recolectadas de los diversos centros de salud y comercios farmacéuticos disponibles del estado Mérida. Las formas farmacéuticas obtenidas se presentaron como comprimidos de 5, 10 y 20 mg.

- **Especificaciones del equipo:**

Espectrómetro Perkin Elmer modelo Spectrum 2000 Explorer FT-IR, fuente de radiación: MID-IR ($10000-200\text{ cm}^{-1}$), Detector DTGS, Divisor óptico (beamsplitter) KBr, Intervalo espectral de trabajo $4000-370\text{ cm}^{-1}$, Resolución $4,00\text{ cm}^{-1}$, Número de espectros acumulados (n) 5.



Figura 18. Espectrómetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 2000 Explorer FT-IR.

7.3. Soluciones a emplear en el análisis de Maleato de Enalapril

- **Patrón Concentrado de Maleato de Enalapril:**

Solución preparada a 2000 mg/L de Maleato de Enalapril (materia prima patronizada) utilizando Cloroformo como solvente. De esta se realizaron las diluciones correspondientes para los patrones necesarios.

- **Preparación de la curva de calibrado:**

Se realizó una curva de calibración sencilla para la determinación de Maleato de Enalapril partiendo del patrón de 2000 mg/L , llevándolo a diferentes concentraciones en ppm ($200, 400, 800, 1000, 1200$ y 1400 mg/L), cubriendo el intervalo de concentraciones de las muestras de las diferentes casas comerciales.

- **Preparación de la muestra:**

Fueron pesadas individualmente 3 pastillas de Maleato de Enalapril por casa comercial para luego pulverizarlas juntas manualmente con un mortero de Agatta.

Se pesó nuevamente un equivalente al promedio de las 3 pastillas en un frasco ámbar añadiendo 10 mL de cloroformo como disolvente. Para mejorar la extracción del principio activo, la disolución de la muestra fue asistida por ultrasonido haciendo uso de un sonificador durante 20 minutos. Como último paso, las soluciones fueron filtradas por gravedad, recolectando el filtrado en otro frasco ámbar. De allí, a cada muestra se le realizó el respectivo análisis.

7.4. Análisis de muestras

Las condiciones experimentales para el análisis de todas las soluciones fueron las siguientes:

- Resolución $4,00\text{cm}^{-1}$
- Paso óptico: 2,00mm
- Número de escaneo: 5
- Intervalo de medida: $4000 - 370\text{ cm}^{-1}$

Las soluciones se inyectaron en una celda circular desmontable para líquidos con una ventana de ZnSe y se procesaron con el espectrómetro bajo las condiciones instrumentales establecidas para la operación de este equipo. Tomando inicialmente una señal de fondo (background), luego se midió la curva de calibrado y por último las muestras. También se determinaron las distintas figuras de mérito (límite de detección, límite de cuantificación, reproducibilidad, repetibilidad y rango lineal). Todos los espectros obtenidos se registraron en la base de datos del programa Spectrum v2.00, del cual se extrajo la información pertinente relacionada a la banda de estudio para su cuantificación.

8. Resultados y discusiones

8.1. Selección de solvente

La técnica de espectroscopia de absorción molecular permite el análisis de distintos tipos de muestras; en este caso, la determinación del analito en cuestión se realizó en fase líquida, donde el solvente a utilizar juega un papel muy importante en el análisis.

Con el fin de obtener unas soluciones adecuadas que brinden la información necesaria para el estudio, se consideraron solventes que cumplan con ciertas características, como: presenten ventanas espectrales transparentes en la región del infrarrojo medio y que tengan el mínimo de interferencias posibles entre este y las señales del analito. Además, fue necesario tomar en cuenta la solubilidad tanto del principio activo como de los excipientes de las muestras para así realizar una extracción solio-líquido efectiva.

De las propiedades del Maleato de Enalapril, se conoce que este compuesto es moderadamente soluble en agua y solventes orgánicos polares. Por tanto, se realizaron pruebas de solubilidad en diferentes solventes apropiados para análisis por Espectroscopia infrarroja. En la tabla 4 se resumen los ensayos realizados.

Tabla 4. Pruebas de Solubilidad para el Maleato de Enalapril.

SOLVENTE	MALEATO DE ENALAPRIL ($\pm 0,0001$ g)	CANTIDAD DE SOLVENTE (mL)	SOLUBILIDAD
Agua Desionizada	0,0502	10	Soluble
Etanol 98%	0,0504	4	Soluble
Metanol 99.3%	0,0501	1	Soluble
Diclorometano 99,5%	0,0502	10	Insoluble
Cloroformo	0,0503	25	Soluble
Acetonitrilo	0,0503	15	Soluble
HCl 0,1 M	0,0500	4	Soluble
NaOH 0,1 M	0,0501	3	Soluble

De los solventes estudiados, el agua y los alcoholes no se utilizaron puesto que presentan fuertes bandas de absorción en la región infrarroja que comprometen el espectro del analito. Adicionalmente, con estos solventes solo se puede trabajar con pasos óptico menores a 0,050 mm, y el analito en estudio presentaba bandas de baja intensidad que no eran adecuadas desde el punto de vista analítico. Por tanto, se decidió probar con los solventes orgánicos, ya que esto permiten trabajar con paso ópticos mayores, lo que se traduce en mejoras en la figuras de mérito, principalmente de la sensibilidad.

Por otra parte, entre los solventes orgánicos probados, destacó el Cloroformo al tener mayor rango espectral limpio, en zonas donde el analito presenta bandas características para el análisis. A continuación (Figura 19) se puede apreciar el registro del cloroformo como blanco en absorbancia y transmitancia.

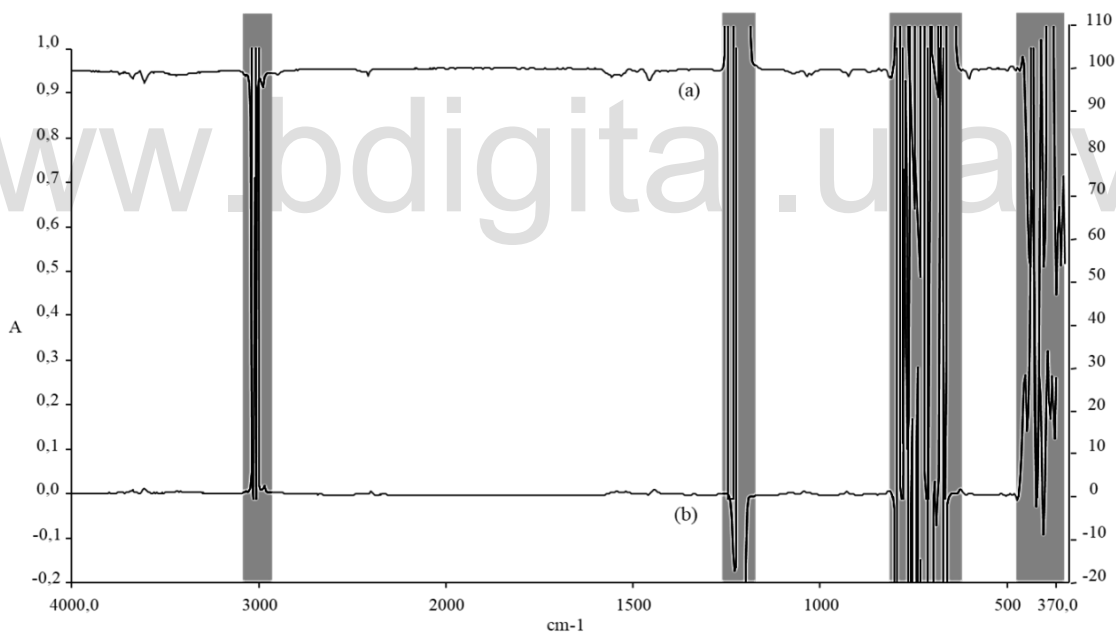


Figura 19. Espectro infrarrojo del Cloroformo como blanco en el sistema propuesto en transmitancia (a) y absorbancia (b).

Detallando la figura 19, es evidente que el solvente seleccionado absorbe en la región estudiada, pero éste presenta ventanas de transparencia que pueden ser utilizadas para el análisis cuantitativo del analito en estudio. De estas se resalta el intervalo más amplio que se encuentra entre 1450 cm⁻¹ y 2000 cm⁻¹, por tanto será

utilizado como el intervalo espectral de trabajo, y adicionalmente en esta zona aparecen algunas absorciones de interés del PAF, que abordaremos en secciones posteriores.

8.2. Caracterización espectral del sistema

Entre los usos más importantes de la espectroscopía infrarroja se encuentra el análisis de identificación y estructura, siendo una herramienta que nos permitirá identificar al analito mediante sus espectros de absorción infrarrojos, otorgando información relacionada a la composición general del compuesto que se desea analizar. Sumado a esto, esta técnica es útil para análisis cuantitativo a determinar algunos máximos de absorción presentados a longitudes de ondas definidas y selectivas con intensidades proporcionales a la concentración de la especie absorbente.

Para dar inicio al estudio del Maleato de Enalapril en productos farmacéuticos, se realizó un análisis cualitativo tanto al patrón sólido como a una muestra obtenida de una farmacia local, con la finalidad de encontrar las bandas principales y asegurar la presencia del principio activo en las tabletas o comprimidos. Para ello, se tomó 1mg de patrón sólido y se mezcló con 100 mg de KBr, para preparar una pastilla a presión con un troquel; cada una fue analizada con el Espectrómetro de infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) en la región del infrarrojo medio comprendido entre los $370 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. Este procedimiento se repitió tomando muestra sólida con KBr para la pastilla correspondiente.

Cuando la sustancia analizada absorbe radiación infrarroja, el incremento en la amplitud de la vibración de los enlaces genera movimientos particulares que se pueden relacionar a un grupo funcional específico. Esta absorción se da a ciertas longitudes de onda y también está influida por la interacción entre los grupos vecinos.

En base a lo expuesto, es posible asociar algunas bandas observadas a intervalos de frecuencia dentro del cual se puede encontrar el pico de absorción de los

grupos funcionales presentes en la molécula. Haciendo uso de una tabla de correlación de frecuencias de grupo (58), se pudo identificar las bandas principales del espectro obtenido para el patrón sólido como se observa en la Figura 20.

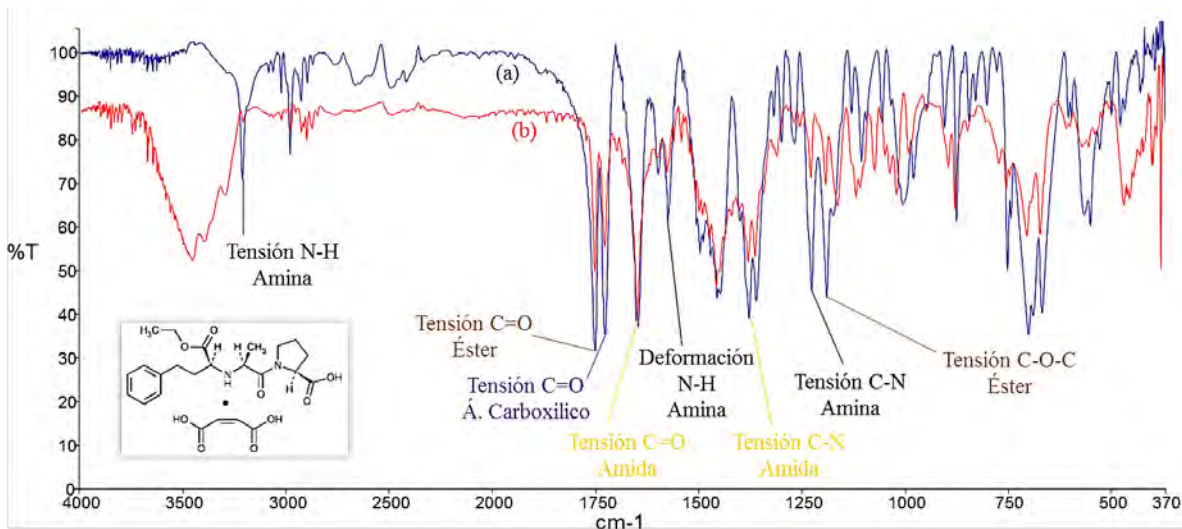


Figura 20. Espectro infrarrojo de patrón de Maleato de Enalapril (a) y una muestra comercial (b) en fase sólida.

Entre los grupos funcionales principales que contiene la molécula de Maleato de Enalapril se encuentran los grupos amino (R_2NH), carbonilo ($C=O$), carboxilo ($COOH$) y alcoxi (ROR), los cuales pertenecen a compuestos como las aminas, amidas, ésteres y ácidos carboxílicos. Entonces, a frecuencias determinadas, cada uno de estos grupos presenta ciertas absorciones que los caracterizan, siendo observados en la figura 20, donde se identifican algunos de ellos. De manera complementaria, en la tabla 5 se encuentran descritas las bandas principales encontradas en el espectro estudiado. Asimismo, es importante señalar, que en los espectros mostrados, se pueden observar la concordancia de algunas bandas presentes en el patrón, y en las muestras, estas absorciones pueden ser de interés para el análisis cuantitativo. Así como también, algunas diferencias entre los espectros, que se deben a la presencia de los excipientes utilizados en la preparación de las pastillas.

Tabla 5. Bandas principales de los grupos funcionales del Maleato de Enalapril.

GRUPO FUNCIONAL		BANDA (cm ⁻¹)		
●	Amina R-NH-R	3214,63	1575,13	1226,14
●	Amida -CO-N<	1651,89	1377,82	
●	Éster -CO-O-	1727,22	1189,76	
●	Ácido Carboxílico -COOH	1750,76	875,33	

Posterior a la caracterización del espectro sólido, se procedió a medir en el mismo rango espectral, las soluciones acuosas en Cloroformo de: un patrón de Maleato de Enalapril a 1000 mg/L y una muestra farmacéutica de ≈ 1000 mg/L. En la Figura 21, se muestra de forma comparativa los espectros obtenidos (sólidos y líquidos), donde se puede apreciar, que el espectro en fase líquida presenta un menor número de bandas y algunos desplazamientos por parte de algunas absorciones, esto puede deberse a posibles interacciones del analito con el solvente, y que algunos de los excipientes no son solubles en cloroformo, esto se traduce en una mejora de la selectividad, debido a la extracción sólido-líquido. Adicionalmente, se pudo observar que los espectros en fase líquida (ver figura 21d y 21e), de la solución patrón y la muestra presentan buena concordancia, condición que la hace potencialmente útil desde el punto de vista analítico. Adicionalmente, vale indicar que en el espectro en fase líquida se presentan un conjunto de bandas, que puede ser utilizada para la cuantificación del principio activo farmacéutico. Sin embargo algunas de ella, están muy cercanas a la zona de absorción del solvente y otras no arrojaron buenos resultados en cuanto a reproducibilidad. Por tanto, se decidió evaluar las absorciones centradas en $1735,52 \text{ cm}^{-1}$ y $1663,39 \text{ cm}^{-1}$, considerando que estas eran reproducibles desde punto de vista cualitativo.

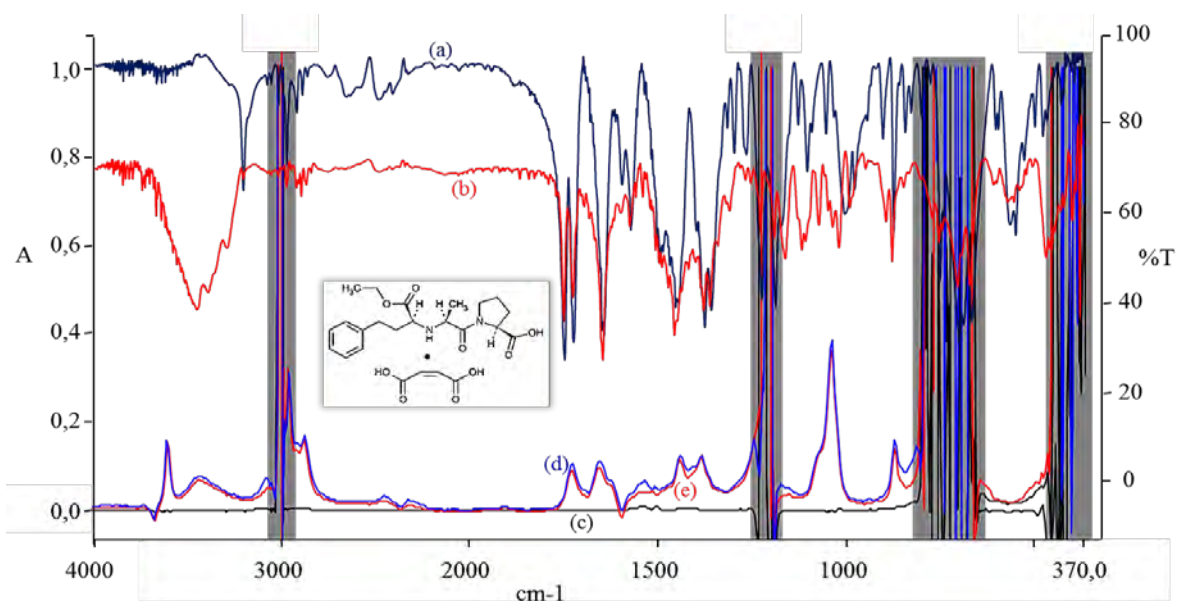


Figura 21. Espectro infrarrojo de: (a) patrón de Maleato de Enalapril en fase sólida, (b) muestra comercial de Enalapril en fase sólida, (c) blanco, (d) patrón de Maleato de Enalapril en cloroformo, (e) muestra comercial de Enalapril en cloroformo.

8.3. Estudio de la factibilidad de la propuesta metodológica

Para establecer la viabilidad de la propuesta de trabajo, se estudió el comportamiento espectral de una solución estándar, una solución-muestra y la misma muestra fortalecida con el principio activo, en el intervalo espectral comprendido entre 1450 y 2000 cm^{-1} . Como se puede observar en la figura 22, de las bandas seleccionadas para este estudio, la absorción de 1663,39 cm^{-1} , presenta ciertas absorciones que hace que cambie la forma de la misma, en los espectros correspondientes a la muestra y muestra fortalecida respectivamente, por tanto, fue descartada para este análisis. Y se decidió trabajar con la banda de 1735,52 cm^{-1} , ya que esta luce libre de interferencias. En todas las disoluciones usadas para este estudio, se observa un crecimiento centrado, sin ningún tipo de deformación o desplazamiento (λ_{Max} , forma de la banda, etc.) que es consistente con la concentración del analito (ver Figuras 22b, 22c y 22d). Este comportamiento avala la viabilidad del método propuesto.

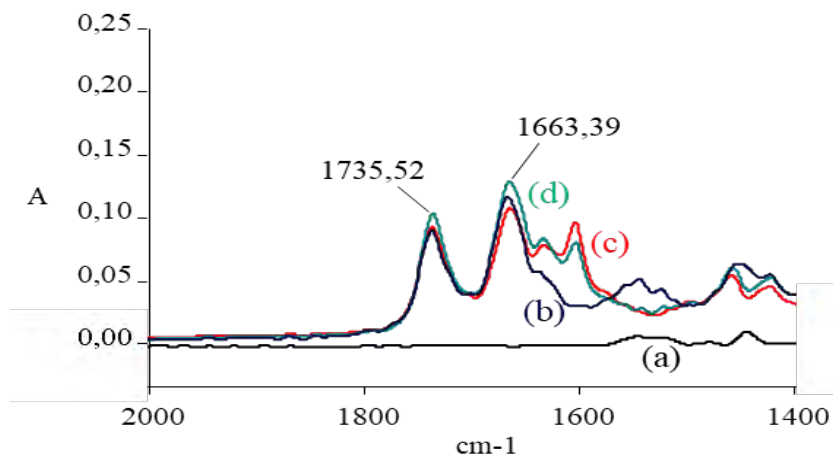


Figura 22. Comportamiento espectral de las soluciones: (a) Blanco, (b) patrón de Maleato de Enalapril, (c) muestra y (d) la solución muestra fortificada con patrón de Maleato de Enalapril.

8.4. Criterio de medida

La selección del criterio de medida es una etapa importante en el análisis que involucra el uso de las técnicas espectroscópicas moleculares. Debido a que en muchos casos la respuesta instrumental no coincide con la señal analítica. Esto principalmente a que los espectros pueden necesitar algún tratamiento de la data espectral con las herramientas que brindan los softwares correspondientes, como: corrección de línea base, suavizado, derivación o substracción de un blanco químico etc. Para la selección del criterio de medida se realizaron dos curvas de calibración y cuantificaron, primero; monitoreando el máximo de absorción con corrección de línea base, y segundo; la primera derivada del espectro de absorción de la banda centrada $1735,52 \text{ cm}^{-1}$ entre los valores $1690,79 - 1785,72 \text{ cm}^{-1}$ como se muestra en la Figura 23. En la tabla 6 se presentan los datos de las curvas de calibración (corrección de línea base y primera derivada respectivamente). Estos resultados arrojaron mejores valores para los coeficientes de correlación y determinación, para el criterio de corrección de línea base, por tanto, para el presente trabajo se seleccionó como criterio de medida la

absorbancia en el máximos de absorción ubicados en $1735,52 \text{ cm}^{-1}$, corregida mediante líneas de base establecidas entre $1690,79 - 1785,72 \text{ cm}^{-1}$ respectivamente, como se ilustra en la figura 23.

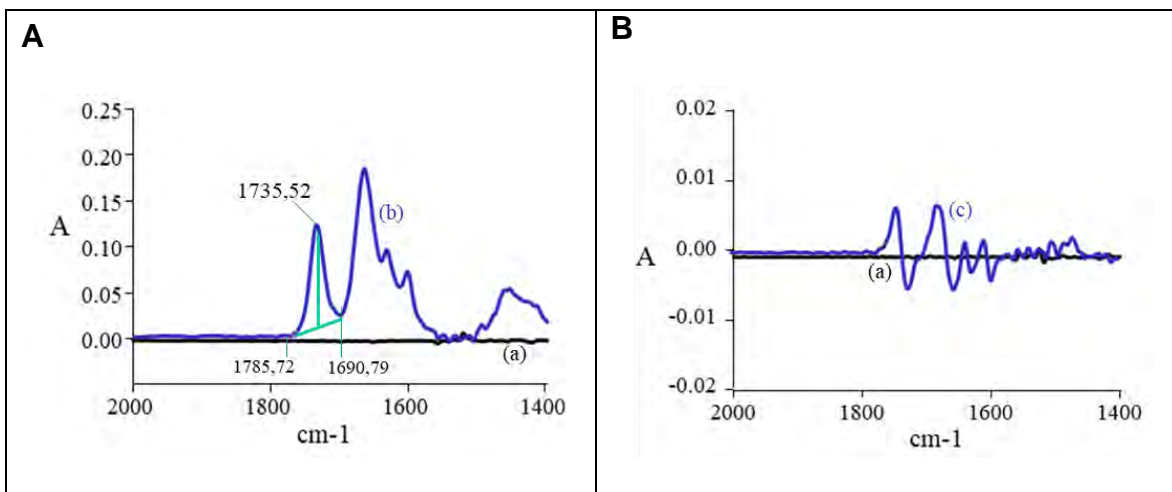


Figura 23. (A) Altura de pico en la banda $1735,52 \text{ cm}^{-1}$ entre $1690,79 - 1785,72 \text{ cm}^{-1}$. (a) Blanco (CHCl_3), (b) Solución patrón de Maleato de Enalapril. **(B)** Primera Derivada en la banda $1735,52 \text{ cm}^{-1}$. (a) Blanco (CHCl_3), (c) Solución patrón de Maleato de Enalapril.

Tabla 6. Valores de la altura de pico de curva sencilla y de la primera derivada.

	ECUACIÓN DE LA RECTA	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (R)	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)
Máximo de Absorción	$y=(6,32 \times 10^{-05} \pm 8 \times 10^{-07}) x + (0,0007 \pm 0.00003)$	0,9996	0,9991
1era Derivada	$y=(4 \times 10^{-06} \pm 2 \times 10^{-06}) x + (-0.0002 \pm 0.0001)$	0,9948	0,9896

8.5. Optimización de los parámetros experimentales

Dentro del marco de investigación para una metodología propuesta, es necesario un diseño experimental mediante el cual se plantea el proceso que seguirá el desarrollo del método en cuestión. Estos diseños consisten en la secuencia de pasos que permitan la recolección de información con alta fidelidad para luego ser

analizada mediante herramientas estadísticas que aporten conclusiones válidas y objetivas al trabajo de investigación. (59)

Para la aplicación del diseño experimental se requiere del reconocimiento de los factores involucrados y la optimización de los mismos. Entonces, se realizarán pruebas que permitan la caracterización de las variables de mayor influencia evaluando cambios cuantificables en las variables respuestas. (60) De esta manera, se buscará minimizar el impacto de variación determinando rangos que proporcionen respuestas óptimas al proceso.

La optimización de los parámetros implicados en el desarrollo del método nos permitirá seleccionar sistemáticamente los valores que brinden la mejor solución y satisfagan los objetivos planteados. (61) Este procedimiento puede realizarse de dos maneras, univariado y multivariado. En este caso se realizó el primero donde se varía un factor a la vez y los demás se mantienen constantes para así encontrar un valor óptimo a cada variable decisión.

Es necesario optimizar tanto el procesamiento de las muestras para extraer el analito como las condiciones instrumentales del espectrómetro para su detección y cuantificación. Entre los factores evaluados se encontraron: tiempo de sonificación, ancho de banda (resolución) y acumulación de espectros (scans).

8.5.1. El proceso de extracción-Preparación de la solución-muestra

Las características químicas y físicas de las tabletas pueden variar de un producto a otro; ya que los excipientes y su concentración; así como sus propiedades físicas pueden diferir considerablemente en los distintos productos comerciales.

La primera etapa del método propuesto involucra la extracción (sólido-líquido) cuantitativa del analito presente en los comprimidos, usando CHCl_3 como medio extractante. Para facilitar el lixiviado del principio activo, esta etapa se realizó en un baño ultrasónico; y se varió el tiempo de tratamiento con ultrasonido (t_{son}) entre 0 y 60 min. El estudio se realizó para todas las muestras evaluadas. Sin embargo, por razones de simplicidad, en la figura 25.A solo se muestra el comportamiento

observado para dos muestras. En ausencia de ultrasonido ($t_{\text{Son}} = 0$), se observa una señal analítica significativa. Esto indica que una fracción importante del principio activo -presente en el sólido- pasa con facilidad al bulto de la solución extractante. A partir de ese punto, se observa un incremento en la señal con t_{Son} , hasta los 20 minutos aproximadamente. Para valores superiores, la señal analítica disminuye un poco hasta mantenerse constante. Por tanto, el uso de mayores tiempos involucra un incremento en el tiempo de análisis sin aportar algún beneficio, considerando que el leve decaimiento de la señal podría relacionarse a una posible degradación del principio activo debido al tratamiento con ultrasonido. Debido a esto, el tiempo óptimo fue establecido en el valor máximo de la curva (Figura 25.A) correspondiente a 20 minutos.

Para corroborar la eficiencia del proceso de extracción, se comparó el espectro FTIR obtenido a partir de una solución estándar de Maleato de Enalapril 1000 mg/L y una solución muestra de concentración equivalente, preparadas directamente en cloroformo, analizadas mediante el procedimiento descrito. No se observan diferencias significativas entre ambos espectros (ver Fig. 25.B), lo cual corrobora que el proceso de extracción fue cuantitativo.

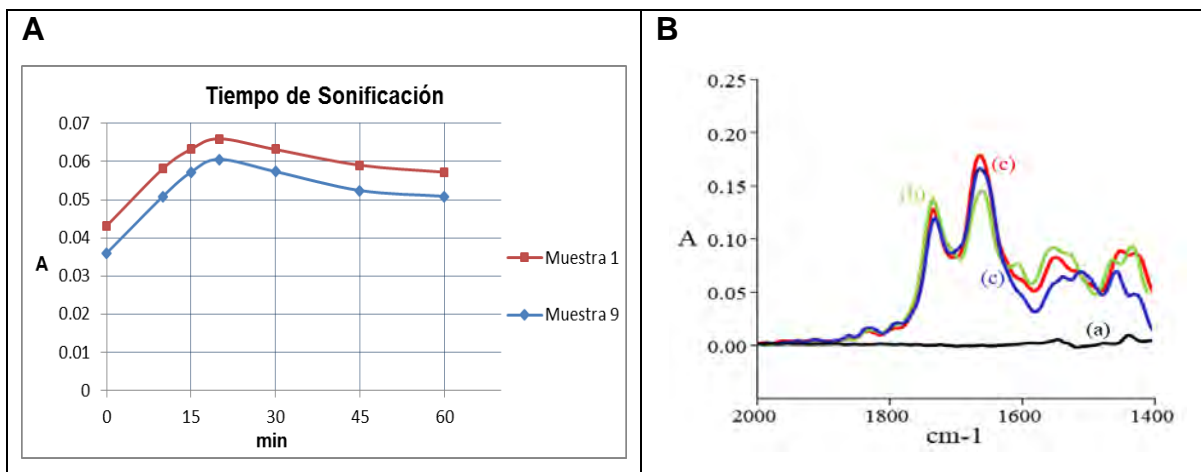


Figura 24. Optimización del proceso de extracción. (A) Efecto del tiempo de tratamiento ultrasónico (t_{Son}) sobre la eficiencia del proceso de extracción (t_{Son} : 0-60 min; [maleato de enalapril] Muestra (M1 y M9) \approx 1000 mg/L). **(B)** Espectros FTIR correspondientes a: a) blanco (CHCl_3); b) estándar de Maleato de Enalapril 1000 mg/L en CHCl_3 y c) solución-muestra de concentración equivalente.

8.5.2. Parámetros espectroscópicos-instrumentales

Se estudió la influencia que tienen sobre la señal analítica algunos parámetros inherentes a la espectrometría FTIR como son: la resolución y la acumulación de espectros (scans). De igual forma, se evaluaron las condiciones para establecer la señal de fondo, el background. Los estudios se realizaron usando dos referencias: un estándar de maleato de enalapril en cloroformo 1000 mg/L y una solución-muestra de concentración equivalente.

Con relación a la resolución nominal (R_N), se estudió el efecto de este parámetro sobre la señal de las soluciones de referencia, en el intervalo de 2 a 64 cm^{-1} . En la Fig. 25, la señal analítica (Abs en $\lambda_{\text{máx}}$, corregida por línea de base) presenta un leve incremento de la señal analítica hasta un valor de resolución 4 cm^{-1} ; y a partir de ese valor disminuye de forma considerable. Como se puede observar un incremento de este parámetro causa un decrecimiento en la señal analítica, así como una disminución del tiempo de adquisición del espectro. Aunado a esto, la forma de la banda cambia con el incremento de este parámetro ver figura 26. Por lo tanto, para la selección del mismo, se debe llegar a un compromiso entre la sensibilidad analítica, la reproducibilidad y el tiempo de análisis. No obstante, en esta oportunidad se seleccionó una resolución nominal de 4 cm^{-1} , dando prioridad a la sensibilidad analítica sobre los demás criterios mencionados.

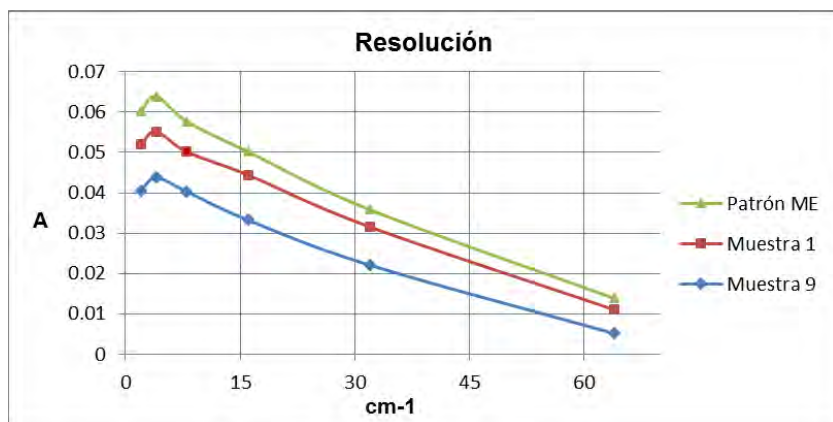


Figura 25. Gráfico de Absorbancia vs Resolución.

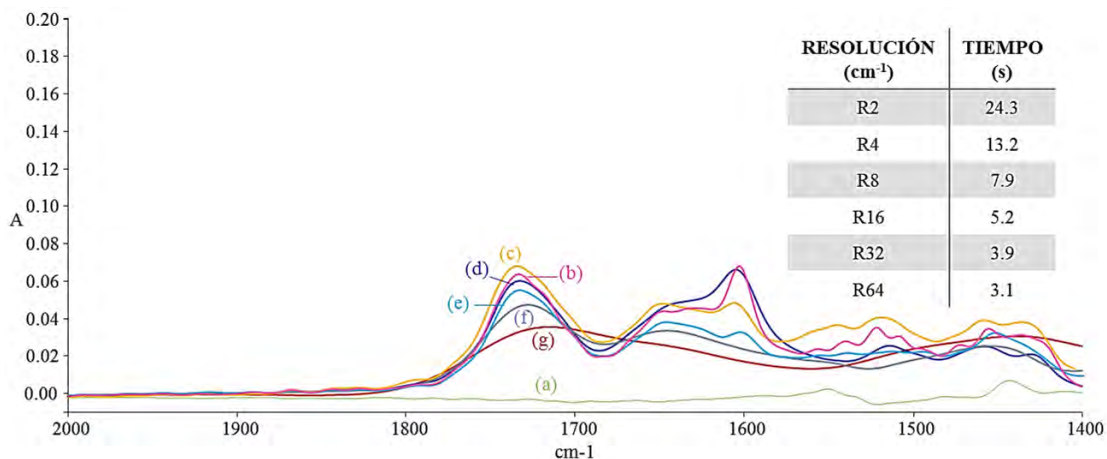


Figura 26. Espectros a diferentes resoluciones con su tiempo respectivo: (a) Blanco a R 4 cm⁻¹, (b) R 2 cm⁻¹, (c) R 4 cm⁻¹, (d) R 8 cm⁻¹, (e) R 16 cm⁻¹, (f) R 32 cm⁻¹, (g) R 64 cm⁻¹.

Con respecto a la acumulación de espectros, se puede señalar que la experiencia obtenida en investigaciones previas (62) (63), indica que el número de interferogramas acumulados (n) es un parámetro que tiene poca influencia sobre la relación señal/ruido, cuando se utiliza cloroformo como disolvente. En este trabajo se evidenció el mismo comportamiento (ver figura 27). Sobre esta base, se fijó el valor de n en 5, tanto para establecer el background como para la adquisición de los espectros correspondientes al blanco, a estándares y muestras. En estas condiciones se obtiene un blanco de calidad, sin mayores costos en el tiempo de análisis.

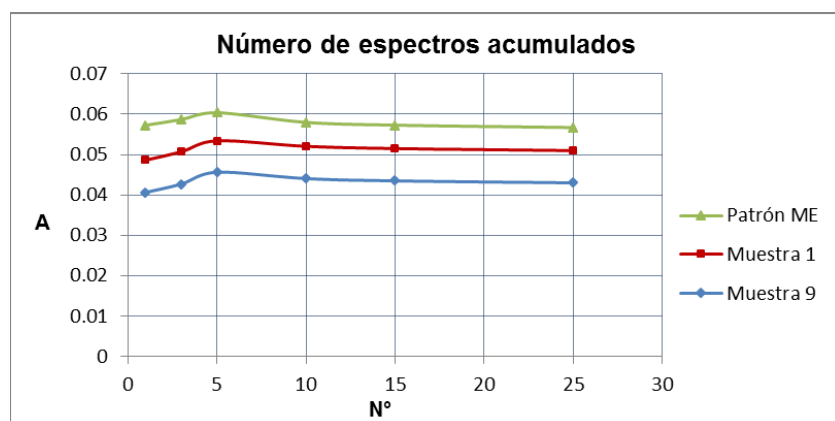


Figura 27. Gráfico de Absorbancia vs Numero de Espectros acumulados.

En la siguiente tabla se condensa la información obtenida para cada parámetro de la metodología propuesta en base a la optimización realizada.

Tabla 7. Condiciones experimentales de la metodología propuesta.

EXTRACCIÓN DEL ANALITO EN LA MUESTRA	
Tiempo De Sonificación (Min)	20
Número De Filtro	Nº2, Diámetro 9,0 cm
PARÁMETROS ESPECTROSCÓPICOS	
Espectrómetro	Perkin Elmer Modelo Spectrum 2000 Explorer FT-IR
Fuente De Radiación	Emisor De Nernst
Detector	DTGS
Paso Óptico (mm)	2,00
Intervalo Espectral (cm^{-1})	1450 – 2000
Banda A Estudiar (cm^{-1})	1735,52
Resolución (cm^{-1})	4,00
Numero De Espectros (Ciclos)	5

8.6. Validación del Método propuesto

Uno de los procedimientos más importantes para el desarrollo de un método analítico es la validación, este nos permitirá proporcionar resultados con un alto grado de fiabilidad y seguridad.

La Norma ISO/IEC 1705 establece los requisitos que debe cumplir cualquier laboratorio para demostrar un funcionamiento competente. Esta norma define la validación como la confirmación a través del aporte de evidencias objetivas, de que los requisitos especificados son adecuados para el uso previsto. Indica que se validarán los métodos no estándar, los desarrollados en laboratorio y los estándar utilizados fuera de alcance, previstos o modificados de otro modo. Este proceso será tan extenso como sea necesario para satisfacer las necesidades de la aplicación. (64)

La validación tiene como finalidad brindar confianza al método planteado, por ello el sistema analítico fue estudiado y caracterizado para evaluar los diferentes parámetros comprendidos en el proceso.

8.6.1. Características analíticas del método propuesto

Entre las partes que fundamentan la validación del método analítico se encuentran ciertas características de desempeño, las cuales son capacidades o propiedades cuantificables del método que indican el grado de calidad del método.

Basándonos en la Norma ISO/IEC 17025 las características de desempeño incluyen, entre otras, el rango de medición, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad, linealidad, repetibilidad o reproducibilidad, robustez, sensibilidad ante interferencias con la matriz de la muestra y sesgo. (64)

El uso de técnicas estadísticas permite soportar el proceso de validación para el manejo y análisis de los datos obtenidos que concluyan a una evaluación apropiada del método. Dentro de un análisis cuantitativo se emplea una curva de calibración la cual se obtiene a partir del análisis de la respuesta instrumental respecto a la concentración de soluciones estándar. De esta manera, se establece una función de calibración que puede obtenerse gráfica o matemáticamente, tomando en cuenta que esta relación puede ser lineal o no. (43)

Para la elaboración de la curva de calibración se tomó en consideración los parámetros optimizados y se trabajó con un patrón de Maleato de Enalapril de 2000 mg/L del cual se extrajeron las alícuotas correspondientes para preparar soluciones con un rango de concentración entre 200 - 1400 mg/L diluyendo con agua desionizada. Estas soluciones fueron medidas con el espectrómetro FT-IR obteniendo sus espectros correspondientes como se muestra en la figura 28.

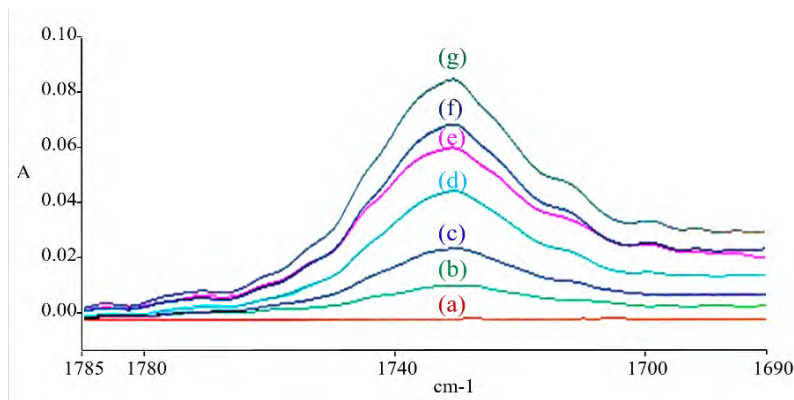


Figura 28. Comportamiento espectral de patrones de Maleato de Enalapril (a) blanco, (b) 200 mg/L, (c) 400 mg/L, (d) 800 mg/L, (e) 100 mg/L, (f) 1200 mg/L, (g) 1400 mg/L. Criterio de medida para cuantificación: Altura de pico, rango entre: 1785,72 - 1690,79 cm^{-1} .

Máximo de absorción en 1735,52 cm^{-1} .

Luego de la respectiva cuantificación de cada espectro mediante la técnica por altura de pico en la banda seleccionada, se obtuvo la curva de calibración normal en la cual se puede observar un comportamiento lineal en el intervalo de trabajo establecido. A partir de la recta obtenida, mediante una regresión lineal, se puede extraer diferentes parámetros analíticos como la pendiente con su desviación estándar que representa la sensibilidad analítica, el corte de la ordenada y su desviación estándar. Además, se determinó la sensibilidad de la técnica, estableciendo experimentalmente los límites de detección y cuantificación. Todos estos datos obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 8.

Tabla 8. Características analíticas de la curva de calibrado normal.

Número de onda (Banda)	1735 cm^{-1}
Pendiente (m)	$6,32 \times 10^{-05}$
Desviación Estándar (S_m)	8×10^{-07}
Intercepto (b)	0,0007
Desviación Estándar (S_b)	0.00003
Coefficiente De Determinación (R^2)	0,9991
LOD (mg/L)	12,00
LOQ (mg/L)	40,00

8.6.2. Precisión del método propuesto

La precisión se puede definir como el grado de concordancia entre las medidas replicadas de una solución a concentración conocida bajo las mismas condiciones. Puede ser expresada cuantitativamente mediante términos como la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de variación, las cuales representan cuán dispersos se encuentran los resultados respecto a la media. (43)

Una forma de representar las medidas de precisión es mediante la repetibilidad y reproducibilidad. La primera da una idea de la variabilidad esperada de los resultados cuando un método es aplicado durante un periodo de tiempo corto. Por otro lado, la reproducibilidad representa la variabilidad obtenida cuando una muestra es analizada en diferentes laboratorios. Otra forma de estimar la variación de los resultados es con la precisión intermedia, esta puede realizarse en tiempos más largos en días diferentes dentro de un mismo laboratorio.

Para estimar la precisión se consideró el uso de 5 replicados de una misma muestra y patrón para evaluar su repetibilidad. También se comparó las medidas de las soluciones en diferentes días para determinar la precisión intermedia. En la tabla 9, se encuentran los valores obtenidos tras el estudio donde se pueden apreciar coeficientes de variación menores al 5%. Según la USP (5), estos datos aseguran la precisión del método propuesto para el análisis realizado.

Tabla 9. Estudios de precisión para la metodología propuesta.

		PATRÓN	MUESTRA
Longitud de onda (cm⁻¹)		1735,52	
Repetibilidad De La Metodología	Desviación estándar(S)	0.0007	0.0010
	Desviación estándar Relativa (RSD)	0.836%	0.771%
Precisión Intermedia	Desviación estándar(S)	0.0012	0.0011
	Desviación estándar Relativa (RSD)	1.066%	1.131%

8.6.3. Estabilidad de las soluciones de trabajo

La estabilidad de una solución es la propiedad de conservar su concentración y la identidad fisicoquímica del analito de interés tras almacenarse en condiciones determinadas por un tiempo definido.

Otra característica evaluada para la validación es la robustez, esta nos indicará la aptitud y susceptibilidad del método midiendo su capacidad para no ser afectado ante variaciones en los parámetros del procedimiento establecido. (5)

Para evaluar la estabilidad de las soluciones, se midió su señal analítica por un lapso de 5 días. Como se observa en la figura 29, no se aprecian cambios significativos en su respuesta instrumental donde el comportamiento lineal del grafico indica la estabilidad y robustez del método.

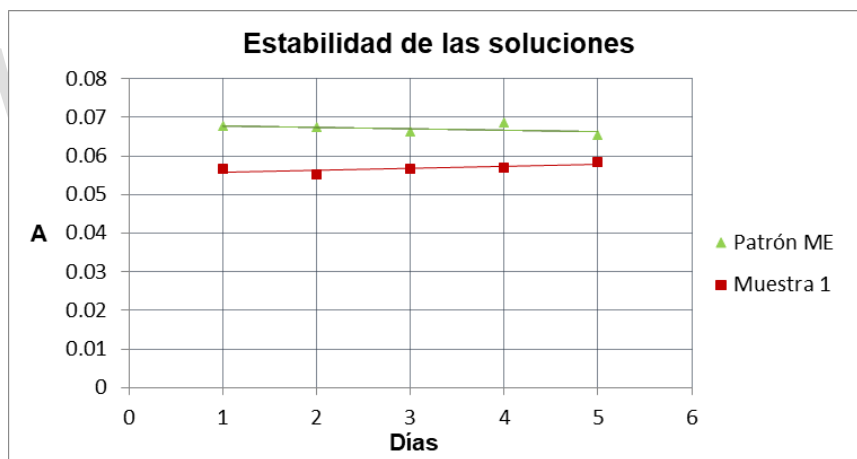


Figura 29. Estudio de la estabilidad de la metodología propuesta.

8.6.4. Curva de calibración por adición de estándar (CAAE) y análisis de significancia entre las pendientes de la curva de calibración sencilla

Para el análisis adecuado de un analito en productos farmacéuticos, este se trata bajo un proceso de extracción óptimo para aislarlo de la mayoría de las partes que integran la matriz. Sin embargo, existen situaciones en las que algunos de los

componentes que no logran separarse pueden generar un aumento o disminución de la respuesta instrumental del analito en cuestión.

En estos casos, la calibración se puede realizar mediante el método de las adiciones estándar, donde se toman volúmenes iguales de solución problema y, a todas salvo una, se le adicionan cantidades diferentes y conocidas de analito. En estas mezclas se observa un aumento en las señales analíticas, producto de la proporción entre la señal proveniente de la muestra y la del estándar añadido. (65) Este tipo de calibración somete al estándar a un mismo entorno que el analito en la muestra de manera que permite contrarrestar el posible efecto matriz presente en la misma.

Como parte del estudio, se realizaron las curvas de Adiciones estándar correspondientes a cada marca farmacéutica analizada, utilizando una cantidad constante de muestra más la adición de volumen creciente de Maleato de Enalapril a un volumen final constante. Cada curva presento un comportamiento lineal de las cuales se pudieron extraer ciertas características que se detallan en la tabla 10 para luego con estos datos realizar el tratamiento estadístico necesario.

Tabla 10. Parámetros analíticos de las curvas de calibración de adición estándar.

Nº DE MUESTRA	ECUACIÓN DE LA RECTA	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R ²)
Muestra 1	$y=(6,7 \times 10^{-05} \pm 2 \times 10^{-06}) x + (0.00646 \pm 0.00002)$	0,9959
Muestra 2	$y=(6,69 \times 10^{-05} \pm 7 \times 10^{-07}) x + (0.00870 \pm 0.00006)$	0,9994
Muestra 3	$y=(6,7 \times 10^{-05} \pm 1 \times 10^{-06}) x + (0.00930 \pm 0.00009)$	0,9989
Muestra 4	$y=(6,76 \times 10^{-05} \pm 6 \times 10^{-07}) x + (0.00542 \pm 0.00005)$	0,9996
Muestra 5	$y=(6,58 \times 10^{-05} \pm 3 \times 10^{-07}) x + (0.00735 \pm 0.00003)$	0,9998
Muestra 6	$y=(6,61 \times 10^{-05} \pm 8 \times 10^{-07}) x + (0.00724 \pm 0.00007)$	0,9992
Muestra 7	$y=(6,94 \times 10^{-05} \pm 7 \times 10^{-07}) x + (0.00531 \pm 0.00006)$	0,9995
Muestra 8	$y=(6,8 \times 10^{-05} \pm 1 \times 10^{-06}) x + (-0.00096 \pm 0.00002)$	0,9969
Muestra 9	$y=(6,9 \times 10^{-05} \pm 1 \times 10^{-06}) x + (0.00691 \pm 0.00009)$	0,9983

Muestra 10	$y=(6,86 \times 10^{-05} \pm 5 \times 10^{-07}) x + (0.00493 \pm 0.00004)$	0,9997
Muestra 11	$y=(6,9 \times 10^{-05} \pm 1 \times 10^{-06}) x + (0.00523 \pm 0.00001)$	0,9972
Muestra 12	$y=(6,97 \times 10^{-05} \pm 9 \times 10^{-07}) x + (0.00501 \pm 0.00008)$	0,9992
Muestra 13	$y=(6,46 \times 10^{-05} \pm 6 \times 10^{-07}) x + (0.00352 \pm 0.00004)$	0,9996
Muestra 14	$y=(6,5 \times 10^{-05} \pm 1 \times 10^{-06}) x + (0.00517 \pm 0.00001)$	0,9983
Curva Sencilla	$y = (6,32 \times 10^{-05} \pm 8 \times 10^{-07}) x + (0,00068 \pm 0.00003)$	0,9991

Para llevar a cabo la comparación de pendientes entre la curva de calibración sencilla desarrollada en la figura 28 y las curvas de adición estándar obtenidas, fue necesario realizar un contraste de significancia probando la veracidad de una hipótesis comparando dos coeficientes de regresión o pendientes para estimar su similitud. Esta evaluación se llevó a cabo mediante el estadístico “t” de Student con un 95 % de confianza. La prueba estadística desarrollada fue la siguiente: (65)

a) Hipótesis nula (H_0): $b_1 = b_2$

b) Hipótesis alternativa (H_1): $b_1 \neq b_2$

Dónde: b representa las pendientes de las curvas

c) Nivel de aceptación de H_0 : $1-\alpha = 0,95$

d) Estadístico de prueba: $t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}}$ (Ecuación 1)

dónde S es la desviación estándar de las pendientes.

e) Zona de aceptación (ZA) para hipótesis de igualdad de las pendientes:

$$ZA: \{-t_{[0,95;5]} < t_c < t_{[0,95;5]}\}$$

$$ZA: \{t_{-2,57} < t < t_{2,57}\}$$

En la tabla 11 se encuentra la comparación entre la t calculada y la t crítica al 95% de confianza donde la primera se encuentra dentro de la zona de aceptación. Estos resultados muestran que no existe diferencia significativa entre las

pendientes de las curvas contrastadas y por ende, es posible indicar que el método propuesto no presenta efecto matriz estando libre de interferencias físicas y químicas.

Tabla 11. Estudio correspondiente al estadístico “t” de Student.

N° DE MUESTRA	T CALCULADO	T 95 % DE CONFIANZA
Muestra 1	0,88	±2,57
Muestra 2	-0,85	
Muestra 3	-0,94	
Muestra 4	-1,92	
Muestra 5	1,86	
Muestra 6	-0,68	
Muestra 7	-2,19	
Muestra 8	-0,14	
Muestra 9	-2,75	
Muestra 10	-1,52	
Muestra 11	-1,08	
Muestra 12	-2,15	
Muestra 13	1,72	
Muestra 14	1,16	

8.6.5. Exactitud de la metodología propuesta

La exactitud indica el grado de concordancia entre el valor medido y el valor real o aceptado. (43) Entonces, la veracidad del método nos lo dará la proximidad entre los resultados obtenidos experimentalmente y la cantidad reportada de analito presente en la muestra.

La exactitud se puede determinar de diferentes maneras, estas pueden ser mediante la comparación de resultados con otro método con exactitud verificada,

análisis contra un material estándar de referencia y también con el porcentaje de recuperación de una muestra. (42)

❖ **Estudios de recuperación:**

La evaluación cuantitativa de la exactitud puede efectuarse en términos de porcentaje de recuperación del analito para muestras que han sido diluidas y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\%Rec = \frac{C_F - C_O}{C_A} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde %Rec es el porcentaje de recuperación del analito desde la matriz, C_F es la concentración de la muestra fortificada, C_O es concentración del analito en la matriz y C_A es la concentración del analito añadida. (66)

Tabla 12. Estudio de recuperación de muestra.

N° de Muestra	% de Recuperación
Muestra 1	99,64
Muestra 2	100,08
Muestra 3	98,70
Muestra 4	98,25
Muestra 5	102,84
Muestra 6	99,38
Muestra 7	101,40
Muestra 8	100,93
Muestra 9	90,35
Muestra 10	99,70
Muestra 11	97,93
Muestra 12	100,08

Muestra 13	100,17
Muestra 14	102,61

En general, el %Rec como herramienta para el control de calidad, evalúa la recuperación del analito presente en una muestra tomando en cuenta la eficiencia de extracción, proceso de preparación o posibles interferencias que afecten el análisis. Como se aprecia en la tabla 12, los porcentajes obtenidos se encuentran dentro de lo establecido en la USP 41 (5) la cual indica un rango entre 90-110%.

Con base a lo reportado, se efectuó un análisis mediante el estadístico t de Student contrastándolo con un método con exactitud validada para determinar la confiabilidad de los resultados obtenidos y establecer la exactitud del método planteado.

8.7. Análisis de significancia entre la metodología propuesta y el método validado por UV-Vis:

Todo método analítico debe ser validado para confirmar que los resultados arrojados por el mismo poseen cierto grado de confiabilidad. Existen diferentes formas evaluar su exactitud, entre estas se encuentra el uso de un método de referencia que posea una exactitud conocida comparado con el desarrollado en este trabajo de investigación mediante herramientas estadísticas.

Al hacer un contraste de significación, se utiliza una hipótesis donde se estudia el contraste entre medias muestrales de cada método a través del estadístico t de Student. La prueba planteada se realizó de la siguiente manera: (65)

- Hipótesis nula (H_0): $\bar{X}_l = \bar{X}_u$
- Hipótesis alternativa (H_1): $\bar{X}_l \neq \bar{X}_u$
- Nivel de aceptación de H_0 : $1-\alpha = 0,95$

d) Estadístico de prueba: $t = \frac{X_i - X_{ii}}{s \sqrt{\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_{ii}}}}$ (Ecuación 3)

Donde \bar{X} es la Media muestral, n el número de muestras y

$$s = \frac{(n_i - 1)s_i^2 + (n_{ii} - 1)s_{ii}^2}{n_i + n_{ii} - 2} \quad (\text{Ecuación 4})$$

e) Zona de aceptación (ZA) para hipótesis de igualdad de los valores:

$$ZA: \{-t_{[0,95;4]} < t_c < t_{[0,95;4]}\}$$

$$ZA: \{-2.78 < t < 2.78\}$$

Cada muestra fue evaluada y sus resultados respectivos se encuentran plasmados en la tabla 14, donde se puede notar la diferencia entre la t calculada y el t crítico a un 95% de confianza. Esto indica la exactitud del método ya que no existen evidencias significativas entre los resultados comparados. De esta manera, la metodología planteada se presenta como una válida alternativa para el análisis de Maleato de Enalapril en productos farmacéuticos.

Tabla 13. Resultados obtenidos de a comparación de los métodos oficiales y la metodología alternativa.

N° de Muestra	Concentración declarada del fármaco (mg)	Método Propuesto FT-IR (mg)	Método de referencia UV-Vis (mg)	t calculado	t 95% de confianza
Muestra 1	20	19,4 ± 0,4	19,9 ± 0,8	0,97	2,78
Muestra 3	20	18,8 ± 0,5	19,1 ± 0,4	-0,35	
Muestra 7	20	19,6 ± 0,2	19,8 ± 0,6	-0,21	
Muestra 12	10	9,8 ± 0,2	10,5 ± 0,5	-2,15	
Muestra 14	5	5,3 ± 0,2	5,2 ± 0,1	0,14	

8.7.1. Correlación del método propuesto y el método de referencia

Con la finalidad de brindar más soporte a la validación, se procedió a realizar un gráfico de correlación entre los resultados del método desarrollado y el método

por UV-Vis. Estos datos son representados en la figura 30 donde es posible apreciar la relación lineal entre ambos. Al evaluar su coeficiente de determinación, el cual es muy cercano a 1, se puede verificar la confianza que posee el análisis.

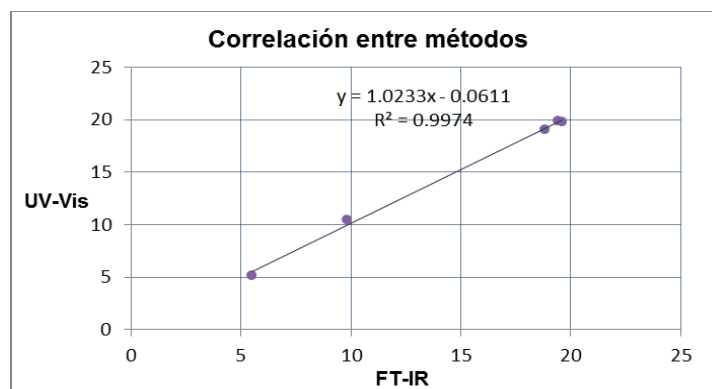


Figura 30. Gráfico de correlación entre los resultados obtenidos por el método propuesto y el de UV-Vis.

8.8. Análisis de los productos farmacéuticos adquiridos en la ciudad de Mérida

Luego de efectuada la optimización y validación del método propuesto, se realizó el análisis de las muestras obtenidas en las diferentes farmacias y centros de salud de la ciudad, haciendo uso de la metodología desarrollada.

Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 14, reportados con su respectivo error relativo.

Tabla 14. Análisis de las muestras farmacéuticas para la determinación de Maleato de Enalapril.

N° de Muestra	Concentración declarada del fármaco (mg)	Metodología por Espectroscopia FT-IR
Muestra 1	20	19,4 ± 0,4
Muestra 2	20	19,6 ± 0,2
Muestra 3	20	18,8 ± 0,5
Muestra 4	20	19,4 ± 0,3

Muestra 5	20	20,8 ± 0,4	
Muestra 6	20	18,8 ± 0,5	
Muestra 7	20	19,6 ± 0,2	
Muestra 8	20	19,7 ± 0,5	
Muestra 9	20	14,8 ± 0,6	
Muestra 10	10	10,4 ± 0,3	
Muestra 11	10	9,6 ± 0,4	
Muestra 12	10	9,8 ± 0,2	
Muestra 13	10	9,7 ± 0,4	
Muestra 14	5	5,3 ± 0,2	

Es importante exceptuar la muestra 9 debido probablemente a una degradación del principio activo por mal almacenamiento, alguna interacción de sus excipientes o pérdidas al momento del traslado a otro envase, sumándole a ello los posibles errores aleatorios presentes.

En la tabla 14 puede observar que los valores se encuentran dentro del rango aceptado por la USP 41 que corresponde a $\pm 10\%$, por tanto, la técnica permite el análisis de las muestras de manera efectiva.

9. Conclusiones

- Se desarrolló una propuesta metodológica alternativa para la determinación de Maleato de Enalapril en fórmulas farmacéuticas mediante la técnica espectroscópica de absorción molecular en el infrarrojo medio.
- El proceso de análisis consistió en la preparación de patrones y soluciones muestra en cloroformo con un análisis directo por espectrometría FT-IR, propiciando un análisis simple, rápido y accesible a diferentes laboratorios.
- En comparación con otros métodos oficiales de análisis para la cuantificación de Maleato de Enalapril, el procedimiento propuesto permite la determinación del analito mediante un tratamiento sencillo de las muestras con un consumo de solvente razonablemente bajo.
- El estudio de correlación realizado entre un método de referencia por UV-Vis y el método propuesto indican que los resultados obtenidos son confiables para el análisis de este principio activo en diferentes marcas comerciales.
- La técnica espectroscópica de Absorción Molecular en la región del Infrarrojo, aporta rapidez, selectividad, confiabilidad y sencillez al método desarrollado.
- Los resultados obtenidos en el análisis de muestras fueron precisos y exactos proporcionando al método un perfil adecuado para ser considerado como una nueva alternativa válida e interesante para el control de calidad de formulaciones solidas en la industria farmacéutica.

10. Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. Información general sobre la Hipertensión en el mundo. Día mundial de la Salud 2013. [Online].; 2013 [cited 2020 Julio 24. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf?ua=1.
2. Organización Panamericana de la Salud. Hipertensión. [Online].; 2021 [cited 2021 Abril 9. Available from: <https://www.paho.org/es/temas/hipertension>.
3. Lahera V, López-Jaramillo P, Cachofeiro V. Fármacos que actúan sobre el sistema renina-angiotensina. In Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portolés A. Farmacología Básica y Clínica. 19th ed. Madrid: Médica Panamericana; 2018.
4. Raghavendra Rao NG, Shruthi K, Kistayya C. Formulation and Evaluation of Fast Dissolving Tablets Enalapril Maleate Using Different Superdisintegrants. European Journal of Pharmaceutical and Medical Research. 2016; 3(11): p. 445-451.
5. United States Pharmacopeial Convention. Monografías Oficiales de USP 41. In USP 41. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 36. Formulario nacional. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2018. p. 1635-1639.
6. Farmacopea Británica Oficina Estacionaria de su Majestad, London: electronic version; 2013.
7. Logoyda L, Abdel.Megied AM, Kondratova Y, Trofimenko O, Korobko D, Dakhym I. Development and Validation of HPLC Method for the simultaneous determination of Enalapril Maleate in present of their impurities: Application to tablet analysis. International Journal of Applied Pharmaceutics. 2018; 10(1): p. 98-102.
8. Lodha SR, Shah SA, Shah RD, Shah DR, Kalyankar GG, Bodiwala KB, et al. Development and validation of HPTLC method for simultaneous estimation of Lercanidipine Hydrochloride and Enalapril Maleate in their syntetic mixture. Journal of Pharmacy and Applied Sciences. 2016; 3(2): p. 26-33.

9. Abdel-Monem AK, Assaf EAB. Conductometric Determination of the two Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, Ramipril and Enalapril Maleate in pure form and in tablets using Phosphotungstic Acid. *Innovare Journal of Medical Sciences*. 2018; 6(1): p. 1-5.
10. Mehmeti E, Stankovic DM, Kalcher K. Determination of Enalapril in Pharmaceuticals using Electrochemical Sensing with Amperometric Detection. *Analytical & Bioanalytical Electrochemistry*. 2017; 9(8): p. 1000-1007.
11. Rahman H. Analytical Applications of Permanganate as an Oxidant in the Determination of Pharmaceuticals Using Chemiluminescence and Spectrophotometry: A Review. *Current Analytical Chemistry*. 2020; 16(6): p. 670-686.
12. Zoppi A, Linares M, Longhi M. Quantitative analysis of enalapril by ¹H NMR spectroscopy in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005; 37(3): p. 627-630.
13. El Sheikh R, Gouda AA, Gouda N. Validated Spectrophotometric Methods for determination of Enalapril Maleate in pure and Dosage forms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015; 7(7): p. 190-197.
14. Prasad N, Kumar R, Kumar V, Kumar Roy R. A simple UV Spectrophotometric method for Quantitative Estimation of Enalapril maleate. *Current Research in Pharmaceutical Sciences*. 2016; 6(1): p. 21-26.
15. Flórez J, Armijo JA, Mediavilla Á. *Farmacología Humana*. Sexta ed. España: Elsevier Masson; 2014.
16. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D, et al. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines. 2020; 75(6): p. 1334-1357.
17. Ponte-Negretti CI. Hipertensión arterial. [Online].; 2019 [cited 2021 Marzo 12. Available from: <https://svcardiologia.org/es/articulo/430-hipertension-arterial.html>.
18. Clínica El Rosario. Información sobre Antihipertensivos para el egreso del paciente. [Online].; 2020 [cited 2021 marzo 24. Available from:

<https://www.clinicaelrosario.com/images/Docs/guiapacientes/nuevas/131%20GI%20%20Instructivos%20Antihipertensivos%20V1.pdf>.

19. Hilal-Dandan R. Renina y angiotensina. In Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 13th ed. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores. S.A. de C.V.; 2019. p. 721-744.
20. Sabán Ruiz J. Control Global del Riesgo Cardiometabólico. La disfunción endotelial como diana preferencial: Díaz de Santos; 2017.
21. Lane Liley L, Rainforth Collins S, Snyder JS. Farmacología y proceso enfermero. 9th ed. Barcelona: Elsevier; 2020.
22. Farmacopea Argentina. Séptima ed. Buenos Aires: (Versión Electrónica); 2013.
23. Qiao B, Du C, Dong R, Jin Z, Zhang Y, Ye T, et al. Experiment and Computation of Solubility and Dissolution Properties for Enalapril Maleate and Its Intermediate in Pure Solvents. J. Chem. Eng. Data. 2018 Noviembre.
24. Verbeeck RK, Kanfer I, Löbenberg R, Abrahamsson B, Cristofolletti R, Groot DW, et al. Biowaiver Monographs for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Enalapril. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017 Abril;: p. 1933-1943.
25. World Health Organization; 2019. The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee on Selection and Use of Essential Medicines, 2019 (including the 21st WHO Model List of Essential Medicines and the 7th WHO Model List of Essential Medicines for Children)..
26. Vasotec, Enalapril Tablets. Product Monograph. 2018 Junio 25;(Submission Control No.: 214740): p. 1-38.
27. Orange Book: Approved Drug Products List with Therapeutic Equivalence Evaluations. 41st ed.: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2021.
28. Gomez E. Análise Comparativa Da Farmacocinética Do Enalapril E Da Hidroclorotiazida Quando Utilizados Em Formulação Isolada E Em Associação

Florianópolis: Universidade Federal De Santa Catarina; 2011.

29. González Morales EM, Mena Zuniga AdS, Rocha Solórzano PL. Seguimiento farmacoterapéutico utilizando el método Dáder a pacientes hipertensos en edad de 45 - 65 años tratados con enalapril tableta de 10 mg que asisten a la consulta externa en el centro de salud Enrique Cisne, Nindirí - Masaya, Enero - Junio 2019 Managua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua; 2019.
30. Ariza Paba JE. Estudios de estabilidad física y química de una preparación extemporánea de enalapril maleato para uso hospitalario. Bogota: Universidad Nacional de Colombia; 2013.
31. Enalapril Mylan. Prospecto: Información para el paciente. 2017.
32. Enalapril Cinfa. Ficha Técnica. 2018.
33. Gherman S, Zavastin D, Şpac A, Panainte AD. Determination of Enalapril maleate from tablets using a new HPLC method. *Sciendo*. 2021; 32(1): p. 70-75.
34. Danafar H, Hamidi M. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS) method for the assignment of enalapril and enalaprilat in human plasma. *Pharmaceutical and Biomedical Research*. 2015; 1(3): p. 47-58.
35. Sakur AA, Balid B. Direct Spectrophotometric Determination of Perindopril Erbumine and Enalapril Maleate in Pure and Pharmaceutical Dosage Forms using Bromocresol Green. *Research Journal Pharmacy and Technology*. 2021; 14(6): p. 3276-3282.
36. Oliva MdIA, Sombra LL, Olsina RA, Masi AN. A new Fluorescent Assay for Enalapril Maleate. *Journal of Fluorescence*. 2005; 15(5): p. 723-728.
37. Khaleel AI, Abdoon FM. Construction of ion selective membrane electrodes for the potentiometric determination of enalapril maleate in its pure form and pharmaceutical preparations. *Iraqi National Journal of Chemistry*. 2012; 47: p. 311-321.
38. Rossi Salamanca-Neto CA, Hatumura PH, Teixeira CR, Sartori ER. Electrochemical evaluation and simultaneous determination of binary mixture of antihypertensives hydrochlorothiazide and enalapril in combined dosage forms using carbon nanotubes

- paste electrode. *Ionics*. 2015; 21(6): p. 1615-1622.
39. Gherman S, Zavastin D, Spac A, Mircea C, Stefanache A, Pascu LF, et al. Development and Validation of a Capillary Electrophoretic Method for the Determination of Enalapril. *Rev Chim (Bucuresti)*. 2015; 66(10): p. 1577-1581.
40. Elmali F, Alpdoğan G, Aycan Ş, Sungur S. Differential Pulse Polarographic Determination of Enalapril Maleate. *Turkish Journal of Chemistry*. 2003; 27(1): p. 65-70.
41. Logoyda LS, Korobko DB. Development of the methodology for the estimation of Enalapril Maleate in medicines. *Química médica y clínica*. 2017; 19(3): p. 11-14.
42. Christian GD, Dasgupta PK, Schug KA. *Analytic Chemistry*. 7th ed. USA: Wiley; 2014.
43. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. *Fundamentos de Química Analítica*. 9th ed. D. F.: Cengage Learning; 2014.
44. McMurry J. *Química Orgánica*. 9th ed. D.F.: Cengage Learning; 2018.
45. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principios de Análisis Instrumental*. 7th ed. México: Cengage Learning; 2018.
46. Wade LGJ. *Química Organica*. 9th ed. México: Pearson Educación; 2017.
47. ¿Qué es la espectroscopia?: Instrumentación y partes de un espectrómetro, tipos de técnicas espectroscópicas. [Online].; 2020. Available from: <https://www.antaesinstrumentacion.com/que-es-espectroscopia-instrumentacion-tecnicas/>.
48. Hernandez H. FQF UES Ciclo I 2017 Espectroscopia Infrarroja El Salvador: Academia; 2017.
49. Indiamart. [Online]. [cited 2022 Enero 11. Available from: <https://www.indiamart.com/proddetail/kbr-pellet-making-die-set-4359230955.html>].
50. Sensor infrarrojo no dispersivo filtro Óptico de Espectroscopia de detector de Gas. [Online].; 2022 [cited 2022 Enero 11. Available from: <https://www.freepng.es/png->

[g5b21e/](#).

51. ESPECTROFOTOMETRO INFRARROJO. [Online]. [cited 2022 Enero 11. Available from: <https://www.emaze.com/@AFZCQCFI>.
52. Barbero Soriano MT. DocPlayer. [Online].; 2019 [cited 2022 Enero 11. Available from: <https://docplayer.es/89216732-Unidad-ii-espectrometria-ir.html>.
53. Téllez Mesa C. Aplicaciones de la Espectroscopía Infrarroja en el análisis de alimentos Sevilla: Universidad de Sevilla; 2019.
54. Holguin Ruiz R. Espectroscopia de Reflectancia Difusa. [Online].; 2018. Available from: <https://steemit.com/stem-espanol/@rossyholg/espectroscopia-de-reflectancia-difusa>.
55. Mondragón Cortez P. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO PARA TODOS Jalisco: CIATEJ; 2017.
56. Torres Rodríguez I. Predicción del color de la pulpa en melones intactos usando la espectroscopía NIRS Córdoba: Universidad de Córdoba; 2014.
57. Harris DC. Quantitative Chemical Analysis. 9th ed. New York, NY: W. H. Freeman; 2015.
58. Nakanishi K, Solomon PH. Infrared Absortion Spectroscopy. Segunda ed. San Francisco, Ca, USA: Holden-Day, INC.; 1977.
59. Montoya-Márquez JA, Sánchez-Estudillo L, Torres-Hernández P. Diseños experimentales ¿qué son y cómo se utilizan en las ciencias acuáticas? Ciencia y Mar. 2011; XV(43): p. 61-70.
60. Melo M. OO, López P. LA, Melo M. SE. Diseño de Experimentos. Méodos y Aplicaciones. Segunda ed. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias; 2020.
61. Hernández Lomeli MD. Optimización de un método analítico para la cuantificación de ácido ascórbico en gomitas pediátricas D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.

62. Galignani M, Ayala C, Brunetto M, Burguera JL, Burguera M. A simple strategy for determining ethanol in all type of alcoholic beverages based on its on-line liquid-liquid extraction with chloroform, using a flow injection system and Fourier transform infrared spectrometric detection in the mid-IR. *Talanta*. 2005; 68(2): p. 470-479.
63. Galignani M, Torres M, Ayala C, Brunetto MR. Determinación de cafeína en café mediante espectroetría infrarroja de transformada de Fourier. *Revista Técnica de Ingeniería de La Universidad del Zulia*. 2008; 68(2): p. 19-168.
64. Organización Internacional de Normalización. International Standar ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Tercera ed. Vernier, Geneva, Switzerland; 2017.
65. Miller JN, Miller JC. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Cuarta ed. Madrid: Pearson Educación S.A.; 2002.
66. Rodríguez Bonet SG. Desarrollo y Validación de un método analítico para la determinación y cuantificación de Di(2-etilhexil)adipato en aguas superficiales del Lago Ypacaraí San Lorenzo: Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; 2019.