

# **Trabajo Final de Licenciatura en Ciencias Químicas**



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DEL NORDESTE**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS Y NATURALES  
Y AGRIMENSURA**

## **“Disolución y Cuantificación por Métodos Electroquímicos de Ciprofloxacina en Comprimidos”**

Alumno: Mario Raúl Delfino (h)

Directora: Dra. Maria del Carmen Sarno

**AÑO 2009**

*A mi familia.  
A mis profesores, amigos  
y compañeros.*

## **INDICE:**

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	4
<b>Capítulo 1:</b> Introducción	5
<b>Capítulo 2:</b> Desarrollo de un Método Potenciométrico para la Cuantificación de Ciprofloxacina en Comprimidos	9
<b>Capítulo 3:</b> Perfil de Disolución de Comprimidos de Ciprofloxacina por Conductimetría	12
<b>Capítulo 4:</b> Validación del Método Potenciométrico	16
<b>Capítulo 5:</b> Discusión de los resultados y Conclusiones	24
<b>Anexo I:</b> Fundamentos de Espectrofotometría	26
<b>Anexo II:</b> Fundamentos de Cromatografía Líquida de Alta Presión	31
<b>Anexo III:</b> Fundamentos de Conductimetría	37
<b>Anexo IV:</b> Fundamentos de Potenciometría	43
<b>Anexo V:</b> Tablas de datos	50
<b>Referencias bibliográficas</b>	59

## RESUMEN

Los controles de calidad de los medicamentos incluyen, entre los principales ensayos, la cuantificación del principio activo presente en formulaciones farmacéuticas y los perfiles de disolución *in Vitro* de comprimidos. De acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) y la Farmacopea Argentina, los análisis de valoración se realizan por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) en fase reversa con detección UV en la mayoría de los casos, mientras que la disolución se monitorea mediante espectrofotometría UV. La Planta de Medicamentos de Corrientes (PLAMECOR) produce alrededor de veinticinco *especialidades farmacéuticas genéricas* (EFG) que son distribuidas gratuitamente entre los Hospitales del Sistema de Salud Provincial. Entre estas EFG, elabora comprimidos de ciprofloxacina 500mg, un antibiótico de amplio espectro. En este trabajo se desarrollan métodos de naturaleza electroquímica para efectuar ambos ensayos de control de calidad de este fármaco.

La titulación ácido-base con seguimiento potenciométrico, utilizando un electrodo de vidrio como indicador y solución acuosa de hidróxido de amonio como titulante, ofrece una respuesta específica evitando la etapa de separación de los componentes no activos presentes en el comprimido de ciprofloxacina. El método fue validado, resultando lineal en el rango de concentraciones de 0,7 a 1,5 mg/mL; respondiendo a la ecuación  $y = 0,9597x + 0,0032$ , con una bondad de **0,9949**, desviación estándar de  $\pm 2,27$ mg, CV% de 0,45 para la repetibilidad, y CV% de 0,61 para la precisión intermedia. El test t de student indicó que las diferencias entre los resultados alcanzados aplicando el método potenciométrico y el de referencia (HPLC – UV) para la cuantificación de ciprofloxacina, no son estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 95%. Los parámetros de validación alcanzados garantizan la calidad analítica del método.

Por otra parte, la velocidad con que un fármaco es liberado en el organismo, define las características de su absorción en el tracto gastrointestinal, así como su metabolismo, distribución y posterior eliminación. La disponibilidad *in vitro* es un parámetro indicativo de su comportamiento *in vivo* para este antibiótico. Se estudió el incremento en la conductividad eléctrica a medida que aumenta la cantidad de principio activo disuelto. Se compararon los perfiles obtenidos mediante este método con el de la USP. Se utilizaron comprimidos elaborados por PLAMECOR y comprimidos comerciales, como referencia. Las dos presentaciones, sin cubrimiento entérico, cumplen con las exigencias de disolución (>80% en 30' a 37°C y 50 rpm). Los seguimientos de la cinética de disolución *in vitro* por conductimetría y absorciometría resultaron estadísticamente equiparables en todas las fases del proceso. El método conductimétrico presenta ventajas al permitir la determinación *in situ* de la señal analítica y el monitoreo en tiempo real. El método oficial esta limitado al muestreo punto a punto, posterior disolución, reposición de volumen y filtrado.

Se pone en evidencia la factibilidad de aplicación de métodos electroanalíticos para el control de calidad de comprimidos de ciprofloxacina con parámetros comparables a los de los métodos de referencia de las farmacopeas vigentes.

# **CAPITULO 1: Introducción**

## **1.1.- ANTECEDENTES EN EL CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS**

La accesibilidad a medicamentos esenciales es una preocupación mundial. En la actualidad, ante la exigencia creciente de austeridad en el gasto farmacéutico, una de las medidas que se ha implementado es el uso de "medicamentos genéricos". Este concepto ha sido preferentemente entendido en un sentido amplio que engloba a todos los medicamentos con igual composición y forma farmacéutica que un producto original de un laboratorio innovador o licenciario [1].

Sin embargo, la legitimidad para realizar sustituciones entre diferentes marcas comerciales de un mismo fármaco depende también de otros factores relacionados con su utilización segura y eficaz. Algunos autores han establecido que la inefectividad terapéutica es un problema relacionado con medicamentos, que se presenta frecuentemente y que puede ocurrir en una variedad de situaciones relacionadas con el uso inapropiado, las interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas y los polimorfismos cristalinos, además de fallas en la tecnología farmacéutica [2].

Para el desarrollo de un nuevo medicamento, o de un equivalente farmacéutico, es necesario aplicar un método analítico cuantitativo al principio activo como materia prima o integrando una formulación farmacéutica. Los controles de calidad sobre medicamentos terminados implican, entre otros ensayos, la determinación de la humedad, uniformidad en peso y contenido, pureza, disolución y ensayos de valoración [3].

La Planta de Medicamentos de Corrientes (PLAMECOR) produce alrededor de veinticinco **especialidades farmacéuticas genéricas** (EFG) que son distribuidas gratuitamente entre los Hospitales del Sistema de Salud Provincial. Entre estas EFG, la planta elabora comprimidos de ciprofloxacina de 500 mg.

El laboratorio de Química Analítica Instrumental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la UNNE, a través de un acuerdo con el Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Corrientes, efectúa los controles de calidad de estos preparados farmacéuticos. PLAMECOR provee además los estándares de referencia certificados y los excipientes utilizados en su formulación. Éstos son sometidos a los controles de calidad de rutina de la industria farmacéutica.

Las técnicas de identificación protocolizadas por la USP (United States Pharmacopeia), la EP (European Pharmacopoeia) y la Farmacopea Argentina de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) se basan en la espectroscopia UV e IR, mientras que los análisis de valoración son realizados por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) en fase reversa con detección UV en la mayoría de los casos.

En la cuantificación de los principios activos, el rango permitido está comprendido, en general, entre 98% y 102% [4, 5, 6]. Esta variación, es muy cercana a la magnitud de la incertidumbre encontrada en los métodos apoyados en esta instrumentación. A su vez las formulaciones farmacéuticas deben contener generalmente entre 90% y 110% del principio activo [4, 5, 6].

Para la determinación cuantitativa de ciprofloxacina en comprimidos se han descrito varios métodos analíticos tales como espectrofotometría UV [7], espectrofotometría visible por formación de complejos con iones metálicos [8, 9, 10, 11], titrimetría en medios bifásicos con indicador coloreado del punto final [12], electrodos ión selectivos [13], titulación potenciométrica diferencial con Fe (III) [14], electroforesis capilar [15, 16],

y cromatografía líquida de alta presión (HPLC) [4, 5, 6, 17, 18, 19], entre otros. La mayor parte de éstos involucran laboriosas preparaciones de la muestra y equipos e insumos de elevado costo.

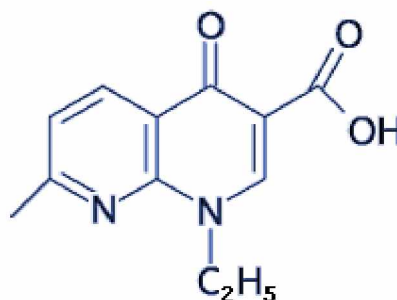
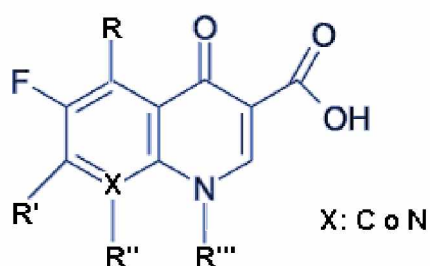
La posibilidad de intercambiar en un tratamiento terapéutico, el uso de productos medicinales originales por EFG, adquiere relevancia vinculada con la efectividad y el gasto de salud en las intervenciones farmacológicas.

Entre las pruebas indicadas para demostrar si un medicamento es intercambiable, se evalúan los perfiles de disolución, que comprende la determinación de la velocidad a la que el principio activo se disuelve bajo condiciones experimentales estandarizadas, a partir de la forma farmacéutica [20, 21]. Asimismo, al caracterizar perfiles de disolución comparando dos formulaciones [22, 23], tomando una como referencia, se evalúan propiedades que son esenciales para determinar la cantidad de principio activo que llega inalterado a la biofase. Velocidad y concentración en el sitio de acción del fármaco son parámetros que definen su biodisponibilidad. Por tanto, un perfil de disolución satisfactorio permite la predicción de una buena biodisponibilidad y como consecuencia, un medicamento alcanzaría el nivel terapéutico en un tiempo adecuado.

## 1.2.- FLUOROQUINOLONAS: CIPROFLOXACINA

Las fluoroquinolonas (Figura 1-1) comprenden una serie de agentes antibacterianos sintéticos de amplio espectro, derivadas del ácido nalidíxico (Figura 1-2). Poseen excelente biodisponibilidad y buena tolerabilidad, con el consecuente uso extensivo en la medicina a nivel mundial [24].

La estructura básica de las quinolonas consta de dos anillos con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonílico en la posición 3 y un grupo carboxílico en la posición 4. Estos antibióticos, cuando tienen un átomo de fluor en la posición 6, aumentan su potencia antibacteriana [25].



**FIGURA 1-1.** Estructura química de las fluoroquinolonas.

**FIGURA 1-2.** Estructura química de ácido nalidíxico.

Las modificaciones de los grupos en las posiciones C5, C7, C8 y N1 han permitido crear nuevas quinolonas con mayor actividad antibacteriana, mejores características farmacocinéticas, diferente metabolización y efecto tóxico [25]. Debido a estas modificaciones, las fluoroquinolonas han sido clasificadas por generación basadas en la actividad antimicrobiana dependiendo de su espectro (Tabla 1-1). La primera quinolona, el ácido nalidíxico fue aislado de la síntesis de cloroquina. Luego fueron introducidas cuatro quinolonas fluorinadas que son básicamente las representantes de la terapia con estos agentes.

GENERACION	ACTIVIDAD	QUINILONA
Primera	Acción sobre patógenos comunes que causan infecciones en el tracto urinario.	Ácido nalidíxico
		Ácido pipemídico
		Ácido oxolínic
		Cinoxacina
		Rosoxacina
Segunda	Mayor actividad sobre Gram-negativos y en menor medida sobre gonococos, cocos Gram-positivos, micobacteria, y organismos atípicos, incluyendo <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .	Norfloxacin
		Ciprofloxacina
		Pefloxacina
		Ofloxacina
		Enoxacina
		Lomefloxacina
Tercera	Menos activos sobre bacterias Gram-negativas y mayor actividad sobre cocos Gram-positivos, incluyendo <i>Streptococo pneumoniae</i> y algunas cepas de enterococos y MRSA.	Levofloxacina
		Gatifloxacina (*)
		Esparfloxacina
		Grepafloxacina (*)
Cuarta	Fluoroquinolonas de mayor espectro hasta la fecha, con importante actividad sobre anaerobios.	Maxifloxacina
		Trovafloxacina (*)
		Clinafloxacina

**TABLA 1-1.** Clasificación de las quinolonas. (\*) Retiradas del mercado.

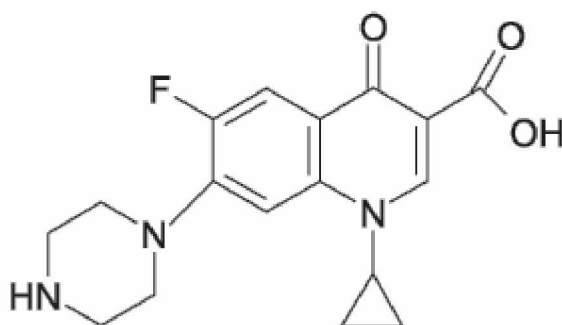
Las quinolonas son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis del ADN bacteriano. Las enzimas *topoisomerasas* (I a IV) inducen el giro negativo a las cadenas de ADN. De éstas, la ADN girasa (topoisomerasa II), produce el corte de los segmentos de la doble hélice; aquí las quinolonas forman complejos Droga – ADN girasa inhibiendo su acción e interfiriendo con la reconfiguración de las cintas de ADN bacteriano.

Las quinolonas, a excepción de las de primera generación, son fármacos que presentan una excelente biodisponibilidad, prolongada vida media, altos volúmenes de distribución e importante eliminación renal. En la Tabla 1-2 se resumen las principales características farmacocinéticas.

	Ácido nalidíxico	Norfloxacina	Ofloxacina	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Maxifloxacina
<b>Biodisponibilidad</b>	80%	50%	95%	75%	>95%	90%
<b>Pico sérico</b>	20-50 mg/L (1000 mg OR)	1,6 mg/L (400 mg OR)	2,7 mg/L (200 mg OR)	2,5 mg/L (500 mg OR)	5 mg/L (500 mg OR)	3 mg/L (600 mg OR)
<b>Vida media</b>	1,5 h	3-4 h	5-6 h	4 h	7 h	13 h
<b>Fijación protéica</b>	90%	15%	25%	30%	40%	50%
<b>Volumen de distribución</b>	0,45 L/kg	0,6 L/kg	1,4 L/kg	2-3 L/kg	1,4 L/kg	3 L/kg
<b>Metabolismo</b>	Hepático	Hepático 20%	Hepático 3%	Hepático 30%	No	Hepático
<b>Eliminación</b>	Renal 80%	Renal 50%	Renal 90%	Renal 60%	Renal 80%	Renal 40% Hepática 45%

**TABLA 1-2.** Características farmacocinéticas de las principales quinolonas.

La ciprofloxacina, nombre IUPAC 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(1-piperacínil)-3-ácido quinoleincarcóxico (Figura 1-3), una fluoroquinolona de segunda generación, posee un átomo de flúor en posición C6, el cual potencia la actividad antibacteriana de la molécula, ampliando su espectro tanto hacia los patógenos *gram positivos* como hacia los *gram negativos* [26, 27, 28, 29]. Es bien absorbida por vía oral, tiene una vida media prolongada y se distribuye ampliamente en los tejidos y fluidos corporales [18, 28, 29].



**FIGURA 1-3.** Estructura química de ciprofloxacina (PM 331,35)

Posee además dos grupos ionizables, uno ácido (-COOH en C3) y uno básico (amina secundaria del sustituyente piperacínilo en C7) que le atribuyen cualidades anfotéricas, siendo los pKa 6,09 y 8,74; respectivamente [30].

### 1.3.- OBJETIVOS

Este trabajo persigue esencialmente dos metas. Para comprimidos que contienen a la ciprofloxacina como monodroga se propone:

- Desarrollar y validar un método electroquímico sencillo, de bajo costo y eficiente para su cuantificación. Demostrar que la titulación potenciométrica de ciprofloxacina con una base débil como el hidróxido de amonio en medio acuoso es adecuada para este fin.
- Desarrollar un procedimiento conductimétrico para el seguimiento de los perfiles de disolución, relacionando el incremento en la conductividad eléctrica con la cantidad de principio activo disuelto. Comparar la eficiencia del método propuesto con el establecido por la USP.



## **CAPITULO 2: Desarrollo de un Método Potenciométrico para la Cuantificación de Ciprofloxacina en Comprimidos**

La presencia de un grupo ácido carboxílico y un amino secundario en la molécula de ciprofloxacina indican la posibilidad de utilizar una titulación ácido-base para su análisis.

El seguimiento potenciométrico, utilizando un electrodo de vidrio como indicador, daría una respuesta específica evitando la etapa de separación de los componentes no activos de la formulación farmacéutica.

En principio, se ensayó como reactivo titulante soluciones de hidróxido de sodio, las que no condujeron a resultados satisfactorios. Posteriormente, el uso de una base débil, como el hidróxido de amonio, resultó adecuada.

Se buscaron las condiciones óptimas de trabajo que permitieran detectar fácilmente el punto final de la titulación. Para ello se recurrió al uso del método de la primera y segunda derivada de la curva de valoración.

### **2.1.- EXPERIMENTAL**

#### **2.1.1.- Estándares y muestras**

Para este trabajo se utilizó:

- Ciprofloxacina clorhidrato, Lote 0607110, Vto. 05/2009, Ladilan Trading S.A., pureza 99,3%.
- Comprimidos de ciprofloxacina de 500 mg elaborados por PLAMECOR, Lotes 034 y 035, Vto. 10/2009
- Excipientes: precompactado blanco (16,6%), polivinilpirrolidona (5,2%), almidón glicolato de sodio (4,8%), talco (2%), aerosil (1,4%), estearato de magnesio (1%).

#### **2.1.2.- Reactivos**

- Biftalato de potasio p.a. (Anedra).
- Hidróxido de amonio 26% p.a. (Anedra).

#### **2.1.3.- Equipos**

- Balanza analítica Cobos, precisión  $\pm 0,1$  mg.
- Celda potenciométrica termostatazada a  $(25 \pm 0,2)$  °C.
- pH-metro Altronix, rango: 0-14; resolución 0,01; exactitud  $\pm 0,02$ .
- Sensor para medición ó compensación automática de temperatura.
- Electrodo de vidrio combinado.
- Agitador magnético.
- Bureta de 50 mL con graduación de 0,1 mL.

### **2.2.- PROCEDIMIENTO**

#### **2.2.1- Calibrado frente a estándares**

Se disuelven en agua destilada 500 mg de ciprofloxacina pura y se llevan a volumen de 500,0 mL en matraz aforado. Homogeneizada la solución, una alícuota se vierte en la celda titulométrica, se sumerge el electrodo de vidrio, se conecta el potenciómetro, previa-

mente calibrado, y el agitador. Desde la bureta se adicionan sucesivos volúmenes de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,0025 N valorado frente a biftalato de potasio (*Anexo V, Tabla V-1*). Se registra el potencial de la celda para cada agregado y se grafica pH contra volumen de titulante.

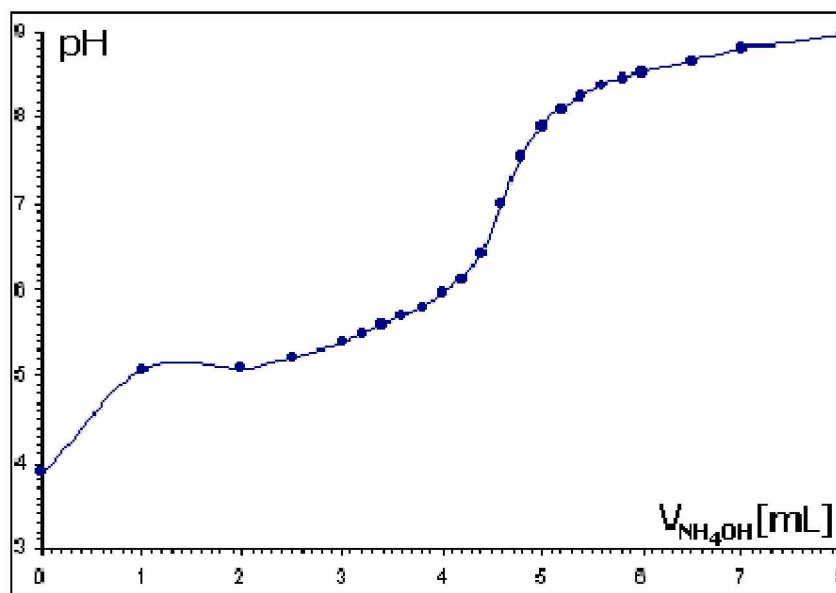
Se realizan agregados de 25, 50 y 100 mL de la solución estándar, determinando los puntos finales gráficamente mediante la primera y segunda derivada de la curva de titulación.

### 2.2.2.- Análisis de los Comprimidos

Se pesan veinte comprimidos de ciprofloxacina y se determina el peso promedio (*Anexo V, Tabla V-2*). Se pulverizan las tabletas en un mortero de porcelana. Se toma una masa equivalente al peso promedio de un comprimido (755,5 mg), se disuelve, con agitación durante 15', llevándose luego a volumen en matraz de 500,0 mL. A continuación se introduce una alícuota de la solución obtenida en la celda y se procede de igual manera que con el principio activo.

## 2.3.- RESULTADOS

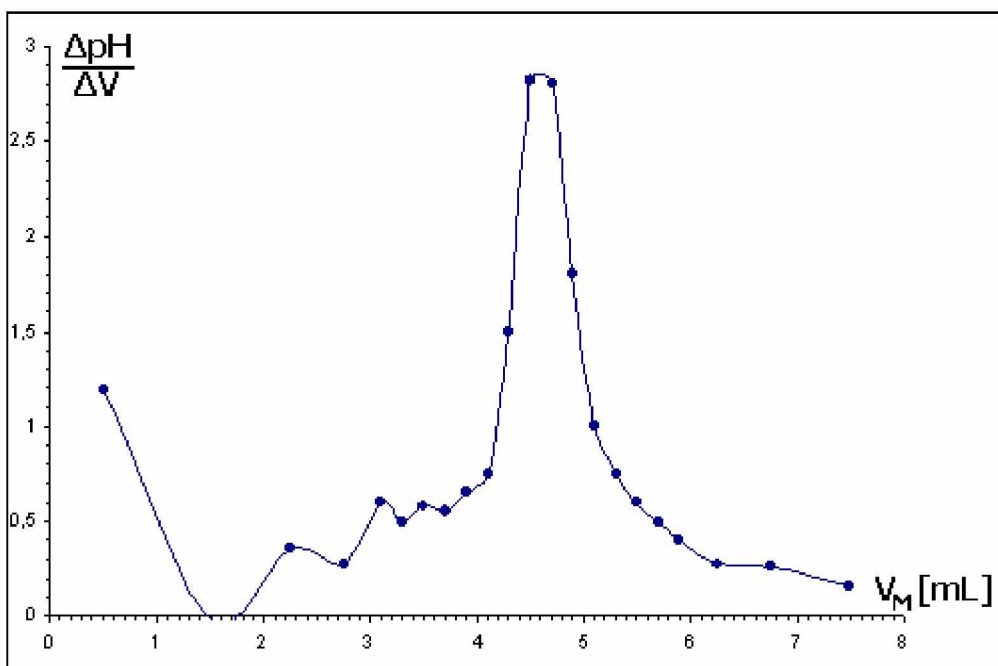
Los datos obtenidos fueron graficados utilizando la planilla de cálculo Microsoft Excel<sup>®</sup>. La Figura 2-1 muestra, a modo de ejemplo, una curva de titulación típica de una alícuota de solución de comprimido de ciprofloxacina con solución titulante de hidróxido de amonio (*Anexo V, Tabla V-3*).



**FIGURA 2-1.** Curva de titulación de 40mL de solución de ciprofloxacina con solución titulante de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,0241M.

En la figura se observa una inflexión muy suave, la que conduciría a una determinación poco exacta del punto final, indicando la conveniencia del uso de las derivadas para optimizarla.

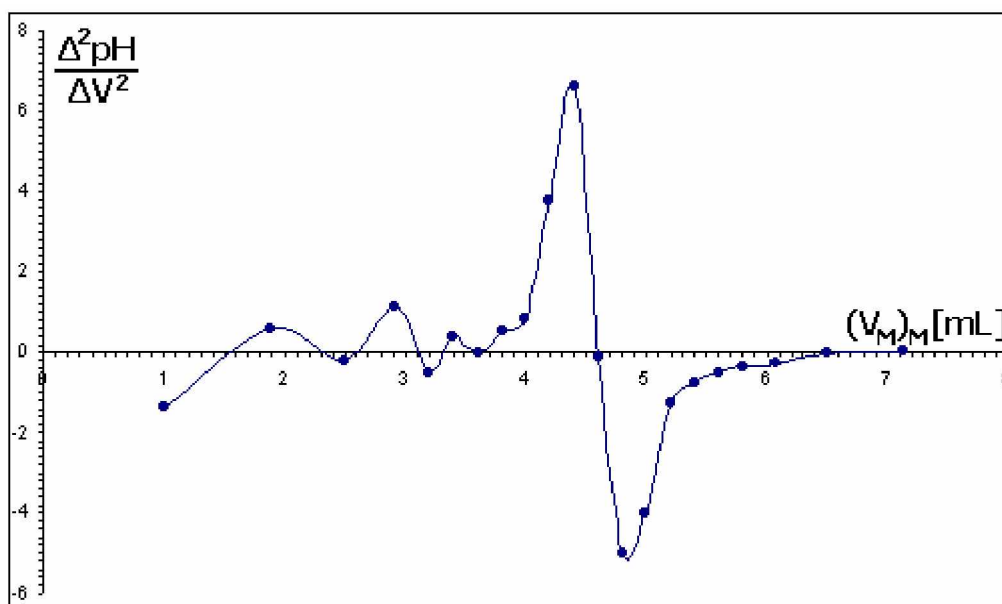
La primera derivada de la curva de titulación potenciométrica de comprimidos de ciprofloxacina con  $\text{NH}_4\text{OH}$  se muestra en la Figura 2-2 (*Anexo V, Tabla V-3*).



**FIGURA 2-2.** Primera derivada de la titulación de 40mL de una solución de ciprofloxacina con  $NH_4OH$  0,0241M.

El máximo observado deriva del punto de inflexión de la curva de pH contra volumen medio de solución de  $NH_4OH$  agregado.

En la Figura 2-3, la segunda derivada, a través de un cambio de signo, conduce a una localización más precisa del punto final de la titulación potenciométrica (*Anexo V, Tabla V-3*).



**FIGURA 2-3.** Segunda derivada de la titulación de 40mL de una solución de ciprofloxacina con  $NH_4OH$  0,0241M.

Los ensayos efectuados indican la posibilidad de aplicación del método potenciométrico de análisis a la ciprofloxacina para los fines enunciados. La posterior aplicación de un protocolo de validación permitirá constatar si este procedimiento cumple con los requisitos de calidad de la industria farmacéutica.

## **CAPITULO 3: Perfil de Disolución de Comprimidos de Ciprofloxacina por Conductimetría**

La velocidad con que un fármaco es liberado en el organismo determina factores tan importantes como su absorción en el tracto gastrointestinal, así como su metabolismo, distribución y posterior eliminación. El ANMAT según normativas 3185/9 y 2814/02 dispone de exenciones para realizar estos estudios de equivalencia *in vivo* en aquellas formulaciones altamente solubles y permeables, de ventana terapéutica amplia, administrados por vía oral, valor intrínseco potencial terapéutico elevado y bajo riesgo sanitario. Las formulaciones de ciprofloxacina analizadas en este trabajo comparten estas últimas características, presentando por tanto seguridad y eficacia.

Las monografías oficializadas [4, 5, 6] dan pautas firmes para la disolución *in vitro* de comprimidos farmacéuticos. La USP 25 establece que en condiciones estandarizadas, una cantidad de ciprofloxacina equivalente a no menos del 80% del rotulado debe disolverse en 30'. El monitoreo de la cinética se efectúa por absorciometría en la región UV del espectro.

Se estudió el incremento en la conductividad eléctrica registrado a medida que aumenta la cantidad de principio activo disuelto. Se compararon los perfiles de disolución obtenidos mediante este método con el de la USP.

### **3.1.- EXPERIMENTAL**

#### **3.1.1.- Estándares y muestras**

- Ciprofloxacina clorhidrato. Lote 0607110, Vto. 05/2009, Ladilan Trading S.A., pureza 99,3%.
- Nexofloxacin Comprimidos (Ciprofloxacina 500 mg), Lote 423, Vto. 01/2010.
- Ciprofloxacina 500 mg, PLAMECOR, Lote 034, Vto, 10/2009.
- Excipientes: precompactado blanco (16,6%), polivinilpirrolidona (5,2%), almidón glicolato de sodio (4,8%), talco (2%), aerosil (1,4%), estearato de magnesio (1%).

#### **3.1.2.- Equipos**

- Disolutor VK 7000 con microprocesador (requerimientos según USP), agitación con paletas (Figura 3-1).
- Espectrofotómetro UV-Visible Spectrum 2100, rango 190-900 nm.
- Conductímetro Parsec, rango 0,1-2.10<sup>5</sup>μS, rango de temperatura 0 a 80°C.

#### **3.1.3.- Metodología**

Las condiciones de ensayo han sido las establecidas por el protocolo vigente de la USP 25 para comprimidos de ciprofloxacina:

- Velocidad de agitación: 50 rpm
- Temperatura 37 ± 0,5 °C
- Medio de disolución: Agua destilada
- Volumen medio: 900 mL
- Número de comprimidos ensayado por lote: 6
- Volumen de muestra (método espectrofotométrico): 1,0 mL



**FIGURA 3-1.** Fotografía del equipo utilizado.

### **3.1.4.- Procedimiento**

En el vaso del aparato de disolución, el cual contiene 900 mL de agua destilada a una temperatura de 37°C se sumergen los electrodos del conductímetro y se accionan las paletas a 50 rpm. A tiempo cero se introduce un los comprimido en cada recipiente. Se realizan las extracciones (1,0 mL) para el método espectrofotométrico cada 3' hasta completar los 30', reponiendo el volumen de muestra extraído con uno equivalente de agua destilada, conservada a la misma temperatura. Se diluye la alícuota extraída con agua destilada (1:25) y, sobre porciones filtradas a través de membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, se efectúa la lectura espectrofotométrica a 276 nm. Simultáneamente se registra la conductancia, en  $\mu\text{S}$ , a cada minuto durante el mismo lapso.

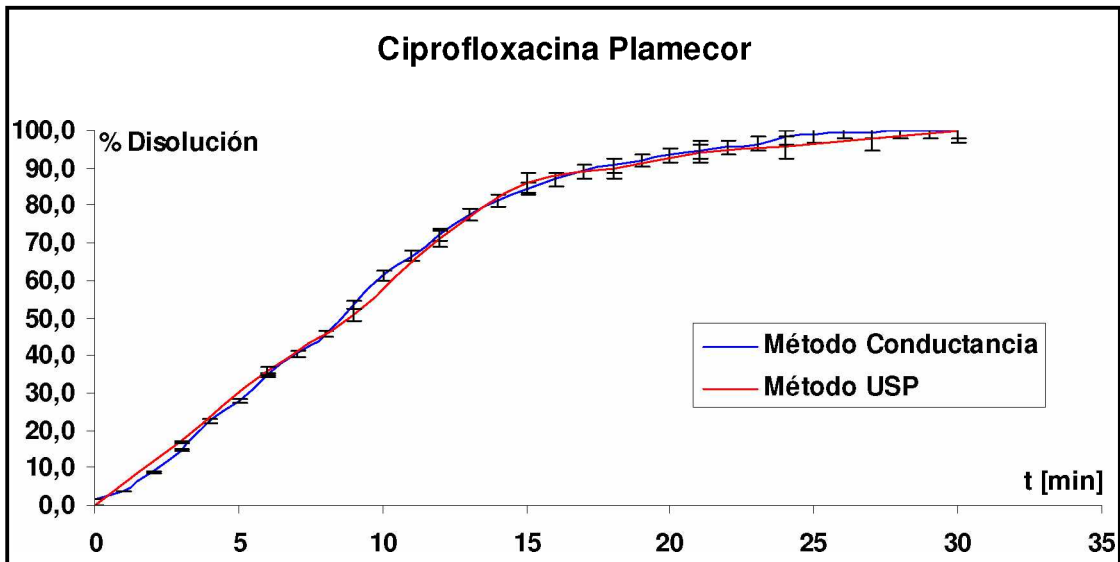
Como referencia del 100% se toman las lecturas absorciométricas y conductimétricas correspondientes a la disolución de 500 mg de principio activo de ciprofloxacina en las mismas condiciones de la experiencia a tiempo completo.

La inercia de la conductancia electrolítica de los excipientes del formulado de PLAMECOR se comprueba al operar con placebo preparado por compresión en las mismas proporciones másicas en que se encuentra en el comprimido.

Se realizan seis corridas para cada una de las formulaciones, a partir de las cuales se calculan los valores promedio de disolución para cada tiempo

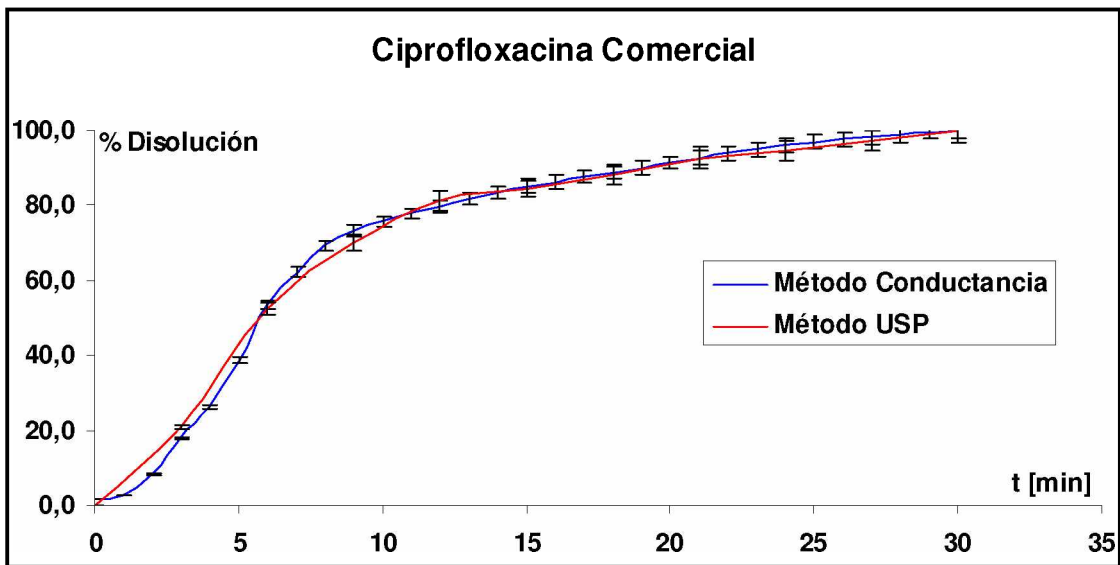
### **3.2.- RESULTADOS**

La concordancia entre los perfiles de disolución de comprimidos de ciprofloxacina de PLAMECOR obtenidos por el procedimiento de referencia y el método conductimétrico propuesto en este trabajo se muestra en la Figura 3-2 (*Anexo V, Tabla V-4 y V-5*).



**FIGURA 3-2.** Perfil de disolución de comprimidos de ciprofloxacina de 500 mg elaborados por PLAMECOR. Método conductimétrico y de referencia.

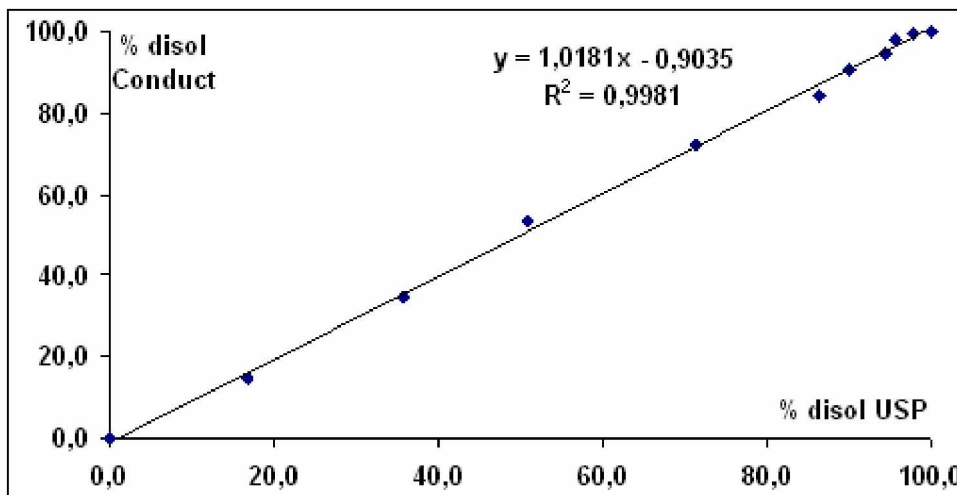
Idéntica comparación vale en la Figura 3-3 para los comprimidos comerciales ensayados, observándose nuevamente coincidencia en los porcentajes de disolución (*Anexo V, Tabla V-6 y V-7*).



**FIGURA 3-3.** Perfil de disolución de comprimidos de ciprofloxacina comercial de 500 mg. Método conductimétrico y de referencia.

En ambos casos los valores representados incluyen la incertidumbre de la determinación, expresada como coeficiente de variación (CV), el que resultó ser de un 2% para el método conductimétrico y del 3% para el absorciométrico (Método USP). Esta estimación de la precisión fue calculada en base a seis (6) repeticiones de cada tiempo de análisis.

La aplicación de un modelo de regresión lineal (Figura 3-4), permite verificar si los resultados provistos por ambos métodos son comparables (*Anexo V, Tabla V-8*) [31, 32].



**FIGURA 3-4.** Comparación de Métodos para los Comprimidos de PLAMECOR.

El valor de la ordenada al origen ( $- 0,9035 \pm 2,3730$ ) y el de la pendiente ( $1,0183 \pm 0,0315$ ), que incluyen en sus intervalos de confianza al punto (0;1), con un coeficiente de correlación lineal  $R^2 = 0,9981$ , obtenidos al graficar los porcentajes de disolución alcanzados por el método propuesto contra los correspondientes al absorciométrico para comprimidos de ciprofloxacina de PLAMECOR, demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos (*Anexo V*, Tabla V-9 y V-10).

Las dos presentaciones, sin cubrimiento entérico, cumplen con las exigencias de disolución (>80% en 30' a 37°C y 50 rpm).

Comparando los perfiles de disolución de los comprimidos de ciprofloxacina comerciales y PLAMECOR, éstos sólo muestran diferencias significativas en los primeros 15'. No obstante, los seguimientos de la cinética de disolución *in vitro* por conductimetría y absorciometría son estadísticamente equiparables en todas las fases del proceso.

## **CAPITULO 4: Validación del Método Potenciométrico**

El **control de calidad** y la **garantía de calidad** juegan un papel central para asegurar la fiabilidad de los procesos analíticos [33]. Estos dos términos suelen utilizarse juntos, y su significado se presta a confusión. El *control de calidad* es un conjunto de medidas activas tomadas para asegurar la exactitud y precisión de los resultados analíticos. Se basan en **procedimientos estándar de trabajo** escritos, que especifican exactamente los pasos a seguir desde que se toma la muestra hasta el cálculo de resultados. El término *garantía de calidad* tiene un significado más amplio que comprende *control de calidad*, evaluación de la calidad y toda la documentación relacionada. Se refiere a todos los procedimientos, datos y documentos destinados a demostrar que los datos analíticos son fiables y que los resultados son exactos y precisos.

Los métodos analíticos se seleccionan para satisfacer necesidades específicas, como son la calidad de datos, las limitaciones de costes y la disponibilidad de equipos. Una vez escogido el método, se debe seleccionar la forma de preparar la muestra y los procedimientos analíticos.

La elaboración de un método no significa determinar el modo de hacer un análisis con la "máxima calidad", sino encontrar una manera de satisfacer los objetivos de calidad de los datos, teniendo en cuenta los condicionantes prácticos.

Una vez que se ha escogido un método, normalmente se tienen que optimizar los parámetros de trabajo. La **validación de un método** es el procedimiento para demostrar que el método analítico es aceptable para el fin que se pretende [34, 35]. En Química Farmacéutica, las exigencias de validación de un método, a efectos del cumplimiento de normas, comprenden estudios de **especificidad, linealidad, precisión, exactitud, intervalo de validez, límite de detección, límite de cuantificación y robustez**.

### **4.1.- EXPERIMENTAL**

#### **4.1.1.- Estándares y muestras.**

Para este trabajo se utilizó:

- Ciprofloxacina clorhidrato, Lote 0607110, Vto. 05/2009, Ladilan Trading S.A., pureza 99,3%.
- Comprimidos de ciprofloxacina de 500mg elaborados por PLAMECOR, Lotes 034, Vto. 10/2009.
- Excipientes: precompactado blanco (16,6%), polivinilpirrolidona (5,2%), almidón glicolato de sodio (4,8%), talco (2%), aerosil (1,4%), estearato de magnesio (1%).

#### **4.1.2.- Reactivos.**

- Biftalato de potasio p.a. (Anedra).
- Hidróxido de amonio 26% p.a. (Anedra).
- Acido Fosfórico p.a. (Mallinckrodt).
- Buffer pH 4,00 ± 0,02 y Buffer pH 7,00 ± 0,02 p.a. (Anedra).
- Acetonitrilo (Sintorgan), grado HPLC.
- Agua (Sintorgan), grado HPLC.



### 2.1.3.- Equipos.

- Balanza analítica Cobos, precisión  $\pm 0,1$  mg.
- Celda potenciométrica termostatazada a 25°C.
- pH-metro Altronix, rango 0-14; resolución 0,01; exactitud  $\pm 0,02$ .
- Sensor para medición ó compensación automática de temperatura.
- Electrodo de vidrio combinado.
- Agitador magnético.
- Bureta de 50 mL con graduación de 0,1 mL.
- HPLC, Agilent 1100 con detector UV.

## 4.2.- PROCEDIMIENTO

### 4.2.1.- Especificidad del método

La **especificidad** (o *selectividad*) se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra. Se expresa como el grado de inexactitud del método. La evaluación de este parámetro es especialmente importante en el caso de los métodos analíticos diseñados para la cuantificación del analito en formulaciones y en estudios de estabilidad.

Para determinar la especificidad del método se efectúa la titulación del placebo, descontando el potencial desarrollado por la adición de la solución titulante de hidróxido de amonio en agua.

Se prepara una mezcla de excipientes manteniendo las proporciones presentes en los comprimidos de ciprofloxacina. Por cuarteo, se toma una masa equivalente a la de excipientes de un comprimido (teniendo en cuenta su peso promedio). Se disuelve en agua y se agita durante 15'. Se titula una alícuota con solución valorada de hidróxido de amonio. Se registra pH en función del volumen de titulante agregado.

### 4.2.2.- Linealidad del método

La **linealidad** es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis de diferentes cantidades o concentraciones del analito. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionada con la aplicación del método.

Para el estudio de *linealidad* se valoraron soluciones estándares de ciprofloxacina en un intervalo de concentración 0,7 a 1,5 mg/mL. El análisis se realizó por quintuplicado, para cada nivel de concentración, tomando distintos volúmenes de solución estándar.

### 4.2.3.- Intervalo de validez de método

El **intervalo de validez** es la franja de concentraciones dentro de las cuales son aceptables la *linealidad*, *exactitud* y *precisión*. Para el componente activo en una muestra de un preparado farmacéutico será el rango de concentraciones que cumpla con las siguientes especificaciones: coeficiente de correlación lineal  $\geq 0,995$  (una medida de la linealidad), una recuperación del  $100 \pm 2\%$  (una medida de la exactitud) y una precisión de  $\pm 3\%$ . Comprende desde la menor concentración que puede medirse (límite de cuantificación, LC) hasta la pérdida de la linealidad [32].

#### 4.2.4.- Límite de detección del método

El **límite de detección** es la menor cantidad de analito que es "significativamente distinto" del blanco. Existen varias maneras de definirlo [36, 37, 38]. Si bien no existe un acuerdo total entre investigadores, editores y asociaciones profesionales y estatuarias sobre este punto, va en aumento la tendencia a definir el *límite de detección* (LD) como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco,  $y_B$ , más tres veces la desviación estándar del blanco,  $s_B$  [31]. En la práctica,  $s_B$  puede reemplazarse por el estadístico  $s_{y/x}$  que estima los errores aleatorios en la dirección  $y$ , calculado a partir de los residuos de la regresión [31].

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - 2}} \quad (\text{Ec. 4-1})$$

donde  $\hat{Y}_i$  son los puntos sobre la recta de regresión calculada correspondiente a los valores individuales de  $x_i$ , es decir, los valores de  $y$  "ajustados". El valor de  $\hat{Y}_i$ , para un valor de  $x$  dado, se calcula rápidamente a partir de la ecuación de regresión.

El valor de la ordenada al origen calculada se puede utilizar como una estimación de  $y_B$ , la propia señal del blanco [31]. Entonces, la ecuación para el cálculo de LD será

$$\text{LD} = A + 3 \cdot s_{y/x} \quad (\text{Ec. 4-2})$$

donde A es el valor de la ordenada al origen calculada por regresión por cuadrados mínimos.

#### 4.2.5.- Límite de cuantificación del método

El **límite de cuantificación** (LC) es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas. Si bien no se utiliza profusamente, se ha sugerido la siguiente expresión para su estimación [31]:

$$\text{LC} = A + 10 \cdot s_{y/x} \quad (\text{Ec. 4-3})$$

#### 4.2.6.- Precisión del método.

La **precisión** refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos, que se realizan sobre una muestra homogénea, son semejantes entre sí. Aunque la USP 25 expresa que la precisión es la expresión del grado de la reproducibilidad, algunos autores [39] incluye dentro de este acápite la *repetibilidad*, la *reproducibilidad* y la *robustez* del método analítico, mientras que la Norma Británica [40] incluye sólo la *repetibilidad* y la *reproducibilidad*.

**4.2.6.1.- Repetibilidad.** Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto.

El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). Este parámetro permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de los datos alrededor de la media.

Cuando el número de muestras es pequeño (menor que 30), el intervalo de confianza del valor de la media (rango en el cual se incluye el valor real con la probabilidad indicada) se calcula mediante la distribución t de Student.

Para evaluar la *repetibilidad* del método se aplicó el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2 a 12 alícuotas de solución de pool de comprimidos, analizadas en el mismo día, por el mismo operador, utilizando los mismos reactivos y el mismo equipo.

**4.2.6.2.- Reproducibilidad.** También denominada *precisión intermedia*, es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la *repetibilidad*. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de *repetibilidad* para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la *reproducibilidad*.

Para evaluar este parámetro se efectuaron análisis en tres niveles: 40; 50 y 60 mg de ciprofloxacina, valorados por dos analistas en dos días diferentes.

#### **4.2.7.- Robustez del método.**

La *robustez* (o *tolerancia*) es normalmente expresada como la ausencia de influencia significativa de variables operacionales y ambientales sobre los resultados de un ensayo analítico. La robustez, es una medida de la reproducibilidad de los resultados del análisis bajo condiciones operacionales normales efectuados en distintos laboratorios y por distintos analistas. Entre los factores que influyen en este parámetro, se puede mencionar la temperatura y humedad ambiente, la diferente experiencia de los operadores, los instrumentos y reactivos de distintos proveedores [41]. Según Hoffman [42], el resultado más real es el que se obtiene en las pruebas interlaboratorios, sin embargo, estos resultan muy costosos y consumen una gran cantidad de tiempo. Debido a esto, en la mayoría de los casos, se asume la determinación de la *precisión intermedia* como un estimador aceptable de la robustez del método.

#### **4.2.8.- Exactitud del método**

La *exactitud* indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la *exactitud* refleja el error sistemático o la tendencia. Cuando existen interferencias en el método por falta de *selectividad* (desviación por exceso en los resultados), o cuando se trata de métodos analíticos muy laboriosos, con varias etapas, como extracciones, purificaciones, etcétera (desviación por defecto en los resultados), el método se considera no exacto o sesgado.

Para evaluar la *exactitud* del método se procedió de dos maneras:

##### **4.2.8.1.- Análisis de recuperación sobre soluciones de placebo**

Se analizan cantidades conocidas del analito (para materias primas) o cantidades conocidas del analito añadidas a sistemas placebo (para formulaciones) para calcular el recobrado por comparación de las cantidades teóricas con los valores determinados.

El porcentaje de recuperación alcanzado en la titulación potenciométrica para distintos sobreagregados de principio activo sobre placebo reportó la exactitud del método. El análisis se efectuó por triplicado (Tabla 4-3).

##### **4.2.8.2.- Comparación con el método de referencia**

Se compara el valor medio obtenido por el método propuesto para la determinación del analito contra el valor medio obtenido por un método ya validado o valor teórico (100%). Para ello se realiza en primera instancia un *test F* de Fisher de comparación de las precisiones y luego un *test t* de Student.

El método de referencia para la determinación de ciprofloxacina en formulaciones farmacéuticas es HPLC con detección UV.

**Método Cromatográfico.** Se utiliza una columna RP-18 de 125x4,5 mm; ácido fosfórico 0,025 M (pH = 3,0 ± 0,1) - acetonitrilo (87:13) como fase móvil, un caudal de 1,5 mL/min y detección UV (278 nm). Se prepara una solución de ciprofloxacina principio activo de 0,5 mg/mL en fase móvil. A partir del pool de comprimidos, se pesa la masa necesaria para obtener una solución 0,5 mg/mL utilizando fase móvil como disolvente. Se filtra por membrana de 0,45 µm de diámetro de poro y se inyectan 10 µL en el cromatógrafo. El pico de la ciprofloxacina a los 13,2' es cuantificado por comparación de las áreas a partir de la relación:

$$C_m = C_{std} \cdot A_m / A_{std} \quad (\text{Ec. 4-4})$$

donde:

$C_m$  = Concentración de ciprofloxacina de la muestra

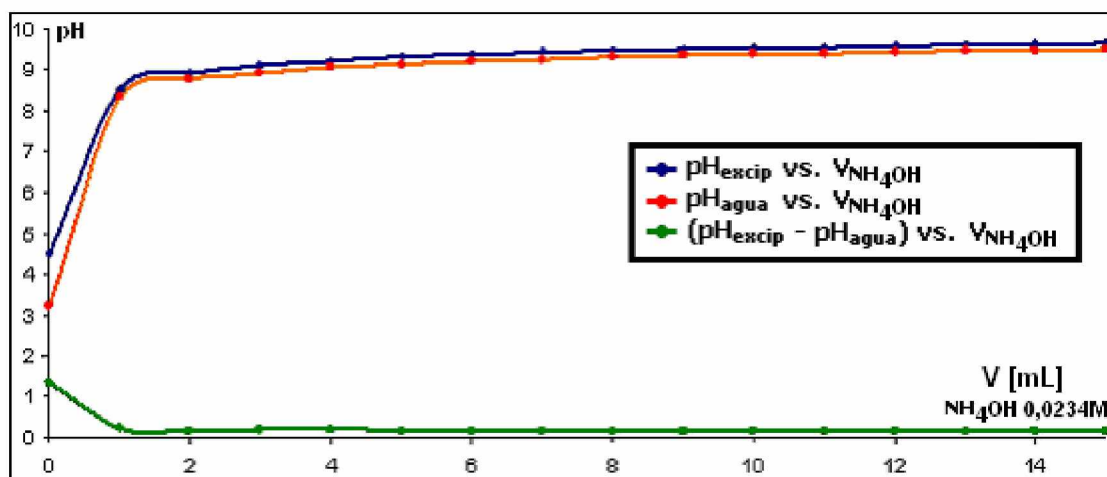
$C_{std}$  = Concentración de ciprofloxacina del estándar

$A_m$  = Área bajo el pico de la muestra

$A_{std}$  = Área bajo el pico del estándar

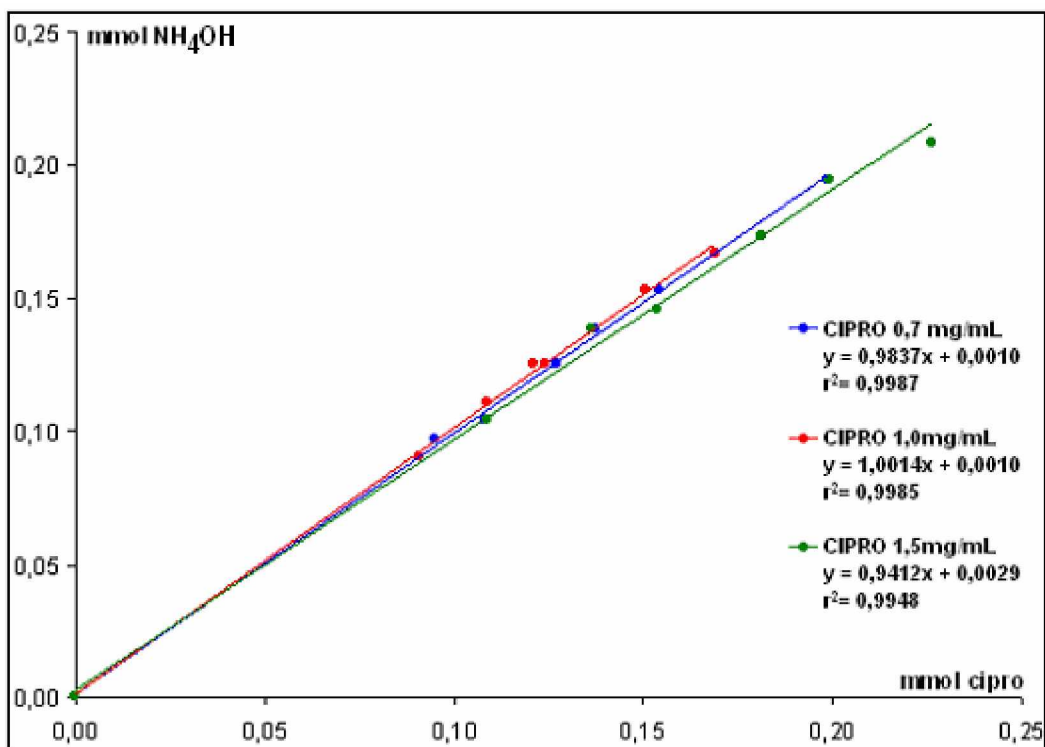
#### 4.3.- RESULTADOS

La titulación del placebo es una línea asintótica al eje de las abscisas. La Figura 4-1 muestra que la variación del pH observada es causada por el agregado de cantidades crecientes de hidróxido de amonio en agua y no es atribuible a los excipientes que acompañan a la ciprofloxacina en la formulación farmacéutica (*Anexo V, Tabla V-11*).



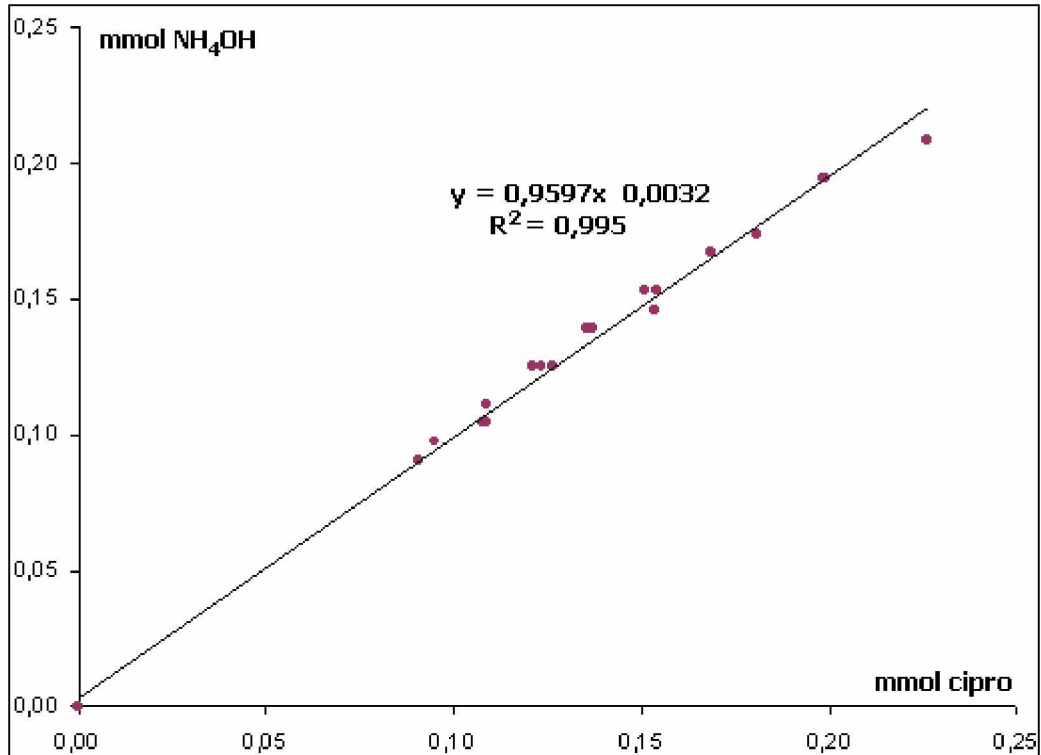
**Figura 4-1.** Especificidad del método potenciométrico para ciprofloxacina.

El método es lineal en el rango de 0,7 a 1,5 mg/mL de ciprofloxacina (Figura 4-2;), respondiendo a  $y = 0,9597 x + 0,0032$ , con una bondad de **0,995** (Figura 4-3). No es necesario explorar la linealidad de la respuesta en un rango inferior dado el tenor elevado de las concentraciones involucradas en el control de calidad de este fármaco (*Anexo V, Tabla V-12*).



**Figura 4-2.** Regresión lineal para cada nivel de concentración de ciprofloxacina (0,7; 1,0 y 1,5 mg/mL) y cinco volúmenes diferentes para cada nivel.

El valor de la pendiente, próximo a la unidad sugiere que la estequiometría de la reacción es 1:1.



**Figura 4-3.** Regresión lineal global del método potenciométrico para ciprofloxacina.

Los *límites de detección y cuantificación* calculados a partir de las Ecuaciones 4-2 y 4-3, utilizando los datos para el ensayo de linealidad, resultaron ser de 0,0164 y 0,0472 mmol de ciprofloxacina, respectivamente (*Anexo V, Tabla V-13*).

El estudio de *repetibilidad* es detallado en la Tabla 4-1.

Nº	Masa Recuperada [mg]
1	498,81
2	498,81
3	500,83
4	502,67
5	502,67
6	503,16
7	497,60
8	497,60
9	500,83
10	503,16
11	497,60
12	498,81
<b>X<sub>m</sub></b>	500,21
<b>SD</b>	2,27
<b>CV%</b>	0,45

**Tabla 4-1.** Repetibilidad del método potenciométrico para comprimidos de 500 mg de ciprofloxacina.

La desviación estándar es de 2,27 mg. El coeficiente de variación es menor al 2%, valor aceptado por las farmacopeas de referencia para este tipo de determinaciones analíticas.

La Tabla 4-2 corresponde a los resultados del estudio de precisión intermedia (*reproducibilidad* del método). Cada análisis se realizó por triplicado por dos analistas en dos días distintos.

<b>M<sub>cipro</sub></b>	<b>ANALISTA 1</b>		<b>ANALISTA 2</b>		<b>REPRODUCIBILIDAD</b>	
	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>		
40mg	498,61	498,61	493,60	493,60	<b>n =</b>	<b>12</b>
	498,61	498,61	493,60	493,60	<b>M =</b>	<b>496,11</b>
	498,61	498,61	493,60	493,60	<b>SD =</b>	<b>2,62</b>
<b>M</b>	498,61	498,61	493,60	493,60	<b>SD =</b>	<b>2,62</b>
<b>CV%</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>CV%</b>	<b>0,53</b>
50mg	499,19	503,16	500,22	500,22	<b>n =</b>	<b>12</b>
	498,19	503,16	500,22	500,22	<b>M =</b>	<b>499,95</b>
	497,21	497,19	500,22	500,22	<b>SD =</b>	<b>1,90</b>
<b>M</b>	498,20	501,17	500,22	500,22	<b>SD =</b>	<b>1,90</b>
<b>CV%</b>	0,20	0,69	0,00	0,00	<b>CV%</b>	<b>0,38</b>
60mg	500,83	500,83	502,67	502,67	<b>n =</b>	<b>12</b>
	500,83	500,83	502,67	502,67	<b>M =</b>	<b>501,75</b>
	500,83	500,83	502,67	502,67	<b>SD =</b>	<b>0,96</b>
<b>M</b>	500,83	500,83	502,67	502,67	<b>SD =</b>	<b>0,96</b>
<b>CV%</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	<b>CV%</b>	<b>0,19</b>
<b>M<sub>prom</sub></b>	<b>499,27</b>	<b>SD<sub>global</sub></b>	<b>3,05</b>	<b>CV%<sub>global</sub></b>	<b>0,61</b>	

**Tabla 4-2.** Reproducibilidad de la determinación de ciprofloxacina por titulación potenciométrica con NH<sub>4</sub>OH.

El CV% global para el estudio de precisión intermedia resultó menor que el doble del correspondiente a la repetibilidad. Por lo tanto la precisión del método evaluada, como repetibilidad y precisión intermedia, muestra resultados satisfactorios.

La recuperación encontrada enriqueciendo al placebo con principio activo se indica en la Tabla 4-3.

<b>M<sub>agregada</sub> [mg]</b>	<b>V<sub>titulante</sub> [mL]</b>	<b>M<sub>recuperada</sub> [mg]</b>	<b>%Recup.</b>	<b>%Recup. Prom.</b>	<b>Precisión</b>	
40,00	4,20	40,01	100,03	99,63	<b>M prom =</b>	39,85
	4,15	39,53	98,84		<b>SD =</b>	0,27
	4,20	40,01	100,03		<b>CV% =</b>	0,68
45,00	4,75	45,25	100,56	100,20	<b>M prom =</b>	45,09
	4,70	44,77	99,50		<b>SD =</b>	0,27
	4,75	45,25	100,56		<b>CV% =</b>	0,59
50,00	5,20	49,54	99,07	99,39	<b>M prom =</b>	49,70
	5,20	49,54	99,07		<b>SD =</b>	0,27
	5,25	50,01	100,03		<b>CV% =</b>	0,54
<b>%Recup<sub>global</sub> = 99,74</b>			<b>CV% = 0,60</b>			

**Tabla 4-3.** Exactitud del método potenciométrico para ciprofloxacina.

Los valores alcanzados están comprendidos dentro de las exigencias establecidas por la USP y ANMAT (98,0-102,0%).

Los resultados obtenidos en la aplicación del método de referencia (HPLC-UV) son consignados en el *Anexo V, Tabla V-14*.

Se comparó el método propuesto con el de referencia [31] (*Anexo V, Tabla V-15*), haciendo uso del *test F* (*Anexo V, Tabla V-16 y V-18*) y del *test t* (*Anexo V, Tabla V-17 y V-19*). La Tabla 4-4 muestra los resultados alcanzados.

<b>Parámetro</b>	<b>Método Potenciométrico</b>	<b>Método HPLC-UV</b>
<b>Xm ± SD</b>	502,22 ± 1,10	502,75 ± 0,56
<b>N</b>	6	6
<b>CV%</b>	0,219	0,124
<b>S<sup>2</sup></b>	1,207	0,391
<b>test F</b>	3,891 (5,050)	
<b>test t</b>	1,047 (2,228)	

**Tabla 4-4.** Comparación entre el método propuesto y el de referencia.  
Los valores de *F* y *t* entre paréntesis son los tabulados para  $p = 0,05$ .

Las diferencias entre los resultados alcanzados aplicando el método potenciométrico y el de referencia para la determinación de ciprofloxacina no son significativas para un nivel de confianza del 95%.

## **CAPITULO 5:**

### **5.1.- Discusión de los resultados**

El monitoreo de la disolución de comprimidos de 500 mg de ciprofloxacina por conductimetría condujo a perfiles de disolución equivalentes a los obtenidos por espectrofotometría UV. Adicionalmente el método propuesto demostró claras ventajas al permitir la lectura directa, el seguimiento en tiempo real y de forma continua; cuando el espectrofotométrico está limitado por un muestreo punto a punto y reposición de volúmenes, con diluciones y filtrados mediante, procedimiento que altera la composición inicial en el disolutor. La eliminación del "tiempo muerto" entre la toma de muestra y la lectura instrumental, contribuye sensiblemente a acortar el análisis.

Ambos procedimientos conducen a resultados enmarcados en las exigencias de la USP y el ANMAT (normativas 3185/9 y 2814/02).

La cuantificación de ciprofloxacina por titulación potenciométrica con soluciones de hidróxido de amonio, a partir de una solución acuosa de los comprimidos, no requirió tratamiento previo alguno, dada la inercia de los excipientes. Dentro del rango lineal del método, se alcanzaron parámetros de exactitud, precisión, y reproducibilidad acordes a las pautas establecidas en los protocolos de validación de procedimientos analíticos para preparados farmacéuticos de la USP y el ANMAT.

La facilidad de automatización, tanto de las mediciones de conductancia como de potencial, dada su naturaleza electroquímica, constituye una ventaja adicional, para su aplicación a controles *online*, que posibilitan la corrección inmediata de cualquier desviación significativa en la producción del fármaco.

Los procedimientos electroanalíticos, que fueron relegados los últimos años, en alguna medida por los cromatográficos, hoy resurgen a través del desarrollo de dispositivos específicos como los sensores y biosensores, por lo que el estudio desarrollado para la ciprofloxacina, servirá de base para propuestas futuras en este sentido.

### **5.2.- Conclusiones**

El procedimiento conductimétrico desarrollado para el seguimiento de los perfiles de disolución de comprimidos de ciprofloxacina, que relaciona el incremento en la conductividad eléctrica con la cantidad de principio activo disuelto, resultó adecuado a las normas vigentes, con ventajas evidentes frente al método de referencia.

La valoración potenciométrica del principio activo presente en los preparados farmacéuticos de este antibiótico, haciendo uso de hidróxido de amonio acuoso como titulante, demostró ser un método sencillo y eficiente para la cuantificación de ciprofloxacina. Los parámetros de validación alcanzados garantizan la calidad analítica de las determinaciones.



# ANEXOS

## **ANEXO I: Fundamentos de Espectrofotometría.**

### **INTRODUCCIÓN**

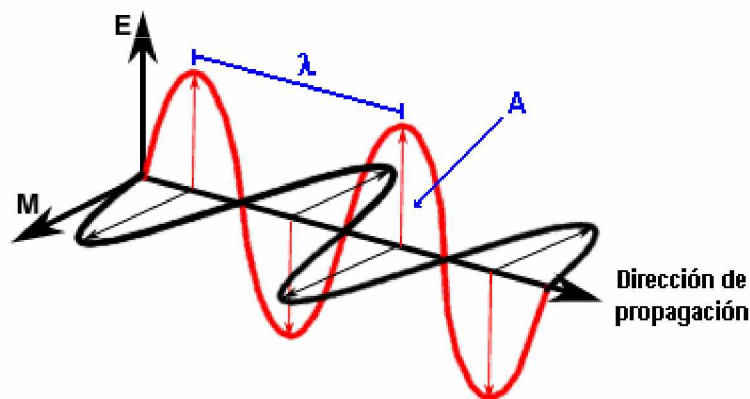
Los métodos espectrométricos son un amplio grupo de métodos analíticos que se basan en las espectroscopias atómica y molecular; siendo la espectroscopía un término general que trata de la ciencia que se encarga de las distintas interacciones de la radiación con la materia.

La espectrometría y los métodos derivados de ella, hacen referencia a la medida de la intensidad de la radiación mediante un detector fotoeléctrico o con otro tipo de dispositivo electrónico.

Los métodos espectrométricos más ampliamente utilizados son los relacionados con la radiación electromagnética, que es un tipo de energía que toma varias formas, de las cuales las que pueden reconocerse más fácilmente son la luz visible y el calor radiante. No obstante, otras manifestación, aunque más difícilmente reconocibles, incluyen los rayos gamma y los rayos X, las radiaciones ultravioletas (UV), de microondas y radiofrecuencia.

### **PROPIEDADES GENERALES DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.**

Muchas de las propiedades de la radiación electromagnética pueden explicarse con el modelo clásico de onda sinusoidal, que utiliza parámetros como la longitud de onda, la frecuencia, la velocidad y la amplitud. A diferencia de otros fenómenos ondulatorios, como el sonido, la radiación electromagnética no necesita un medio de apoyo para transmitirse y, por lo tanto, se propaga fácilmente a través del vacío.



**FIGURA I-1.** Representación de un haz de radiación monocromática, polarizada en el plano. Los campos eléctricos (E) y magnéticos (M) son perpendiculares entre sí y respecto a la dirección de propagación. Se observan también la amplitud (A) y la longitud de onda ( $\lambda$ ) del haz.

El modelo ondulatorio falla al intentar explicar aquellos fenómenos asociados con la absorción o emisión de energía radiante. Para lograr la comprensión de estos fenómenos se ha propuesto un modelo corpuscular en el que la radiación electromagnética se contempla como un flujo de partículas discretas de energía, denominados **fotones**, en los que la energía de un fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación.

Este doble punto de vista de la radiación como partícula y como onda no es mutuamente excluyente, sino complementario. Por ello, es conveniente describir la luz en términos de partículas como de ondas. Las ondas de la luz constan de campos eléctricos y magnéticos que oscilan en planos perpendiculares entre sí y respecto a la dirección de propagación. Para representar este aspecto, por simplicidad, en la Figura I-1 se muestra una onda electromagnética **polarizada en el plano**. Esto significa que todas las oscilaciones, tanto del campo eléctrico como del magnético, están en un solo plano. La **amplitud** (A) de una onda sinusoidal se representa como la longitud del vector eléctrico en el máximo de la onda. El tiempo, en segundos, necesario para el paso de sucesivos máximos o mínimos por un punto fijo en el espacio se denomina **período** de la radiación ( $p$ ). La **frecuencia** ( $\nu$ ), es el número de oscilaciones del campo por segundo, y es igual a la inversa del período;

$$\nu = 1/p \quad (\text{Ec. I-1})$$

La unidad habitual de frecuencia es la inversa de segundo ( $s^{-1}$ ), o **Hertz** (Hz), que corresponde a un ciclo por segundo. Otro parámetro característico es la **longitud de onda** ( $\lambda$ ), que es la distancia lineal entre dos máximos o dos mínimos sucesivos. Las unidades usadas habitualmente para designar la longitud de onda difieren considerablemente según las diversas regiones espectrales. Por ejemplo, el **angstrom** ( $\text{\AA}$ ) es adecuado para los rayos X; el **nanómetro** (nm) para la radiación visible y ultravioleta; el **micrómetro** ( $\mu\text{m}$ ) es útil para la región infrarroja.

La relación entre la frecuencia y la longitud de onda es:

$$\nu \cdot \lambda = c \quad (\text{Ec. I-2})$$

donde  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío ( $2,998.10^8\text{m/s}$ ). En un medio distinto al del vacío, la velocidad de la luz es:

$$v = c/n \quad (\text{Ec. I-3})$$

donde  $n$  es el **índice de refracción** de ese medio.

Desde el punto de vista de la energía, es más conveniente concebir a la luz como partículas llamadas fotones. Cada fotón transporta energía ( $E$ ) dada por:

$$E = h.v \quad (\text{Ec. I-4})$$

donde  $h$  es la **constante de Planck** ( $h = 6,626.10^{-34}\text{ J.s}$ ).

La Ecuación I-4 afirma que la energía es proporcional a la frecuencia. Combinando las Ecuaciones I-2 y I-4 se puede escribir

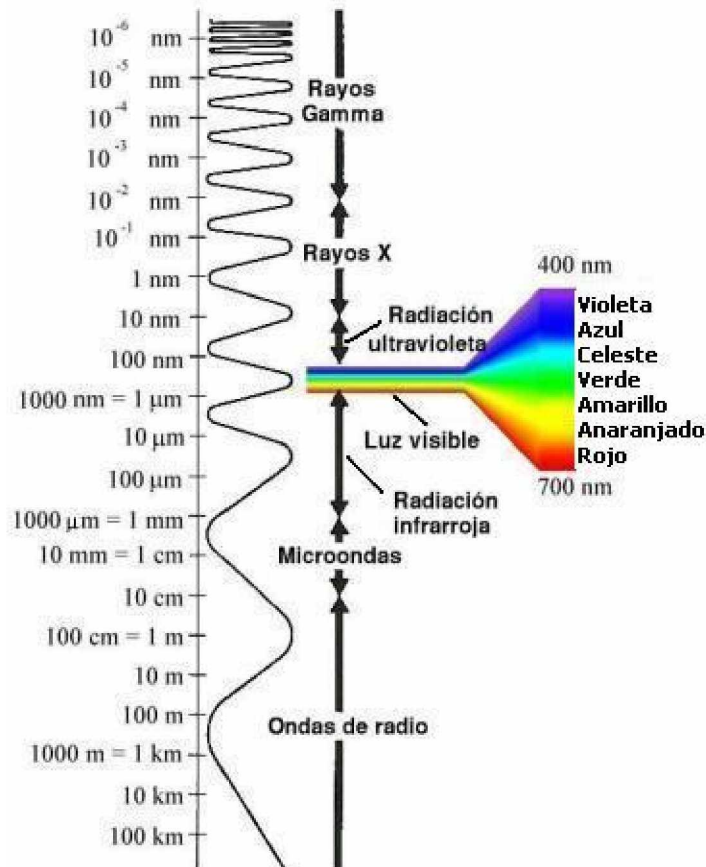
$$E = h.c/\lambda \quad (\text{Ec.I-5})$$

Se observa que la energía es inversamente proporcional a la longitud de onda.

La **potencia** ( $P$ ) de la radiación es la energía del haz que llega a una superficie cada segundo, mientras que la **intensidad** ( $I$ ) es la potencia por unidad de ángulo sólido. Estos parámetros se relacionan con el cuadrado de la amplitud. Aunque estrictamente no es correcto, potencia e intensidad se utilizan a menudo como sinónimos.

## EL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO.

El espectro electromagnético abarca un gran intervalo de longitudes de onda y de frecuencias (como así también de energías). La Figura I-2 describe cualitativamente las principales regiones espectrales. Las divisiones se basan en los métodos que se precisan para generar y detectar las diversas clases de radiación. Se puede observar que la región visible del espectro percibido por el ojo humano es muy pequeña si se compara con otras regiones espectrales. Se debe tener en cuenta que los métodos espectroquímicos que utilizan no solo radiación visible, sino también ultravioleta o infrarroja se denominan **métodos ópticos**, a pesar de que el ojo humano no es sensible a estos últimos dos tipos de radiación.



**FIGURA I-2.** Regiones del espectro electromagnético.

## ASPECTOS CUANTITATIVOS DE LAS MEDIDAS ESPECTROQUÍMICAS.

Como se observa en la Tabla I-1, los métodos espectroquímicos se clasifican en cuatro categorías. Las cuatro requieren la medida de la potencia radiante,  $P$ , que es la energía de un haz de radiación que alcanza un área dada por segundo. En los instrumentos modernos, la potencia radiante se determina con un detector de radiación que convierte la energía radiante en una señal eléctrica,  $S$ . Generalmente,  $S$  es un potencial o una corriente que idealmente es directamente proporcional a la potencia radiante. Esto es

$$S = k.P \quad (\text{Ec. I-6})$$

donde  $k$  es una constante.

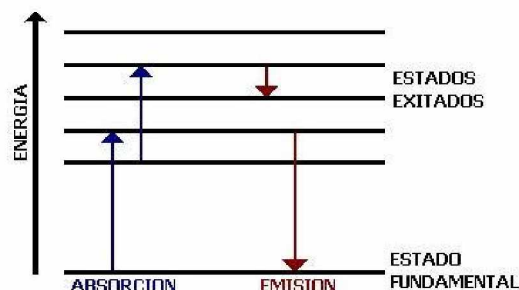
CLASE	MEDIDA DE LA POTENCIA RADIANTE	RELACIÓN CON LA CONCENTRACIÓN	TIPOS DE MÉTODOS
Emisión	Emitida, $P_e$	$P_e = k.c$	Emisión atómica
Luminiscencia	Luminiscente, $P_l$	$P_l = k.c$	Fluorescencia Fosforescencia Quimioluminiscencia atómica Quimioluminiscencia molecular
Dispersión	Dispersada, $P_d$	$P_d = k.c$	Dispersión Raman Turbidimetría Nefelometría
Absorción	Incidente, $P_0$ y Transmitida, $P$	$-\log P/P_0 = k.c$	Absorción atómica Absorción molecular

**TABLA I-1.** Principales clases de métodos espectroquímicos

### ABSORCIÓN DE LUZ.

Cuando una molécula absorbe un fotón aumenta su energía. Se dice que la molécula ha pasado a un **estado excitado** (ver Figura I-3). Si una molécula emite un fotón, disminuye su energía. El estado de mínima energía de una molécula se denomina **estado fundamental**.

En los métodos cuantitativos basados en la absorción se requieren dos medidas de potencia: una antes de que el haz haya pasado a través del medio que contiene el analito ( $P_0$ ), y la otra después ( $P$ ). La **transmitancia** ( $T$ ) y la **absorbancia** ( $A$ ) son los dos términos que se utilizan ampliamente en la espectrometría de absorción y se relacionan por la razón de  $P_0$  y  $P$ .



**FIGURA I-3.** Cuando una molécula absorbe luz, aumenta su energía. Al emitir luz, disminuye su energía.

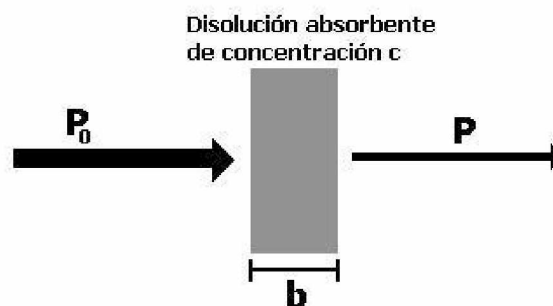
### Transmitancia.

La Figura I-4 muestra un haz de radiación paralelo antes y después de atravesar un medio que tiene un espesor  $b$  [cm] y una concentración  $c$  de una especie absorbente. Como consecuencia de las interacciones entre los fotones y los átomos o moléculas absorbentes, la potencia del haz disminuye de  $P_0$  a  $P$ . La **transmitancia**  $T$  del medio es la fracción de radiación incidente transmitida por el medio:

$$T = P/P_0 \quad (\text{Ec. I-7})$$

Por tanto,  $T$  puede valer de 0 a 1. La transmitancia se expresa con frecuencia como porcentaje:

$$\%T = (P/P_0).100 \quad (\text{Ec. I-8})$$



**FIGURA I-4.** Atenuación de un haz de radiación por una disolución absorbente

## Absorbancia.

La *absorbancia*  $A$  de un medio se define por la ecuación

$$A = -\log T = \log P_0/P \quad (\text{Ec. I-9})$$

Se puede observar que, al contrario que con la *transmitancia*, la absorbancia de un medio aumenta cuando la atenuación del haz se hace mayor. Cuando no se absorbe luz,  $P = P_0$  y  $A = 0$ . Si se absorbe el 90% de luz, se transmite el 10%, y  $P = P_0/10$ ; para este cociente resulta  $A = 1$ . Si solamente se transmite el 1% de luz,  $A = 2$ .

## La Ley de Lambert-Beer.

Para una radiación monocromática, la absorbancia es directamente proporcional al camino óptico  $b$  a través del medio absorbente y a la concentración  $c$  de la especie que absorbe. Estas relaciones vienen dadas por

$$A = a.b.c \quad (\text{Ec. I-10})$$

donde  $a$  es una constante de proporcionalidad denominada *absortividad* que es función de la naturaleza del analito y de  $\lambda$ . Las unidades en que se exprese  $a$  dependerá de las utilizadas para  $b$  y  $c$ . Con frecuencia para soluciones de una especie absorbente,  $b$  se da en cm y  $c$  en g/L. Las unidades de la absortividad en ese caso son  $\text{L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

Cuando la concentración se expresa en mol/L y la longitud de la cubeta en cm, la absortividad se denomina *absortividad molar* y se representa por el símbolo  $\epsilon$ . Así, cuando  $b$  está en cm y  $c$  en mol/L,

$$A = \epsilon.b.c \quad (\text{Ec. I-11})$$

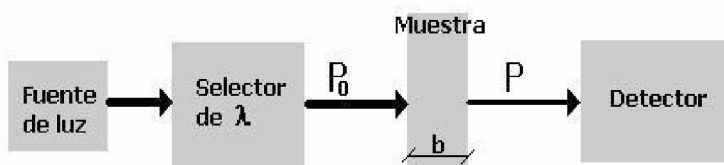
donde  $\epsilon$  tiene las unidades de  $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . La absortividad molar es característica de una sustancia y nos dice cuanta luz absorbe a una longitud de onda determinada.

Las Ecuaciones I-10 y I-11 constituyen el fundamento cuantitativo de la espectrofotometría tal como se aplica en química analítica y se denominan *Ley de Lambert-Beer*. La absorbancia es adimensional, pero en algunos casos se escribe "unidades de absorbancia" (U.A.) después del valor numérico.

El *espectro de absorción* de una sustancia es un gráfico que muestra como varía  $A$  (o  $\epsilon$ ) al variar la longitud de onda.

## MEDIDA DE LA ABSORBANCIA.

Los componentes esenciales de un espectrofotómetro (instrumento utilizado para medir la absorbancia de la luz) se muestran en Figura I-5:



**FIGURA I-5.** Diagrama esquemático de un experimento espectrofotométrico de haz simple.

La luz procedente de una fuente continua pasa a través de un *monocromador*, que selecciona una banda estrecha de longitudes de onda del haz incidente. Esta luz "monocromática" atraviesa una muestra de camino óptico  $b$ , y se mide la radiación que llega al detector.

En espectroscopia visible y UV se coloca una muestra líquida normalmente en una celda llamada *cubeta*, que tiene paredes lisas de sílice fundida ( $\text{SiO}_2$ ). El vidrio es adecuado para espectroscopia visible, pero no para UV, porque absorbe dicha radiación. Las cubetas más utilizadas tienen un camino óptico ( $b$ ) de 1,000 cm, y se adquieren en pares calibrados para la muestra y la referencia.

La Figura I-5 describe un instrumento de *haz simple*, llamado así porque utiliza un único haz de luz. En ese caso no se mide directamente la intensidad incidente  $P_0$ . En realidad, se detecta la intensidad de la luz que pasa a través de una cubeta de referencia que contiene disolvente puro o blanco, y que se define como  $P_0$ . Luego se retira esta cubeta, y se reemplaza por otra idéntica que contiene la muestra. La intensidad de la luz que llega al detector después de pasar a través de la muestra es la cantidad  $P$ . conociendo ambas,  $P$  y  $P_0$ , se puede determinar  $T$  o  $A$ . La medición de la referencia o blanco compensa la reflexión, dispersión y absorción de la cubeta y del disolvente que contienen al analito.

En análisis espectrofotométrico, normalmente se escoge la longitud de onda de máxima absorbancia por dos razones:

1.- La curva es relativamente aplanada en las proximidades del máximo, de manera que apenas varía la absorbancia si se desajusta un poco el monocromador o si varía algo la anchura de banda escogida. La Ley de Lambert-Beer se cumple mejor cuando la absorbancia es casi constante a lo largo de la banda de longitudes de onda escogida.

2.- La sensibilidad del análisis es máxima en el máximo de absorbancia; es decir, se consigue la máxima respuesta para una concentración dada de analito.

La mayoría de los espectrofotómetros presenta un mínimo de incertidumbre relativa a valores intermedios de absorbancia ( $A \approx 0,4-0,9$ ). Si pasa muy poca luz por la muestra (gran absorbancia), es difícil medir la intensidad. Si pasa demasiada luz (baja absorbancia), es difícil apreciar la diferencia entre la muestra y la referencia. Es deseable entonces, ajustar la concentración de la muestra de modo que la absorbancia caiga en el intervalo medio, donde es menor el error fotométrico.

## **ANEXO II: Fundamentos de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)**

### **INTRODUCCIÓN**

En general, los métodos para el análisis químico son, en el mejor de los casos, selectivos; siendo muy pocos, si es que los hay, verdaderamente específicos. En consecuencia, la separación del analito de los posibles interferentes es a menudo una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos.

Las aplicaciones de la cromatografía han aumentado considerablemente en los últimas décadas, debido no sólo al desarrollo de nuevas y diversas técnicas cromatográficas, sino también a las crecientes necesidades, por parte de los científicos, de más y mejores métodos para caracterizar sustancias en mezclas complejas. El gran impacto de ésta técnica podría visualizarse mejor si se tiene en cuenta que sólo en la lista de Premios Nóbel entregados entre 1937 y 1972, hay doce galardones basados en trabajos en los que la cromatografía tuvo un papel vital [43].

La cromatografía líquida de alta eficacia, mejor conocida por su sigla en inglés, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), es una de las técnicas analíticas de separación más ampliamente utilizada. Su popularidad se debe a su alta sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo su aplicabilidad a sustancias de gran interés en la industria, en amplios campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos incluyen separaciones de: aminoácidos, proteínas, carbohidratos, fármacos, plaguicidas, antibióticos, etc., en mezclas complejas.

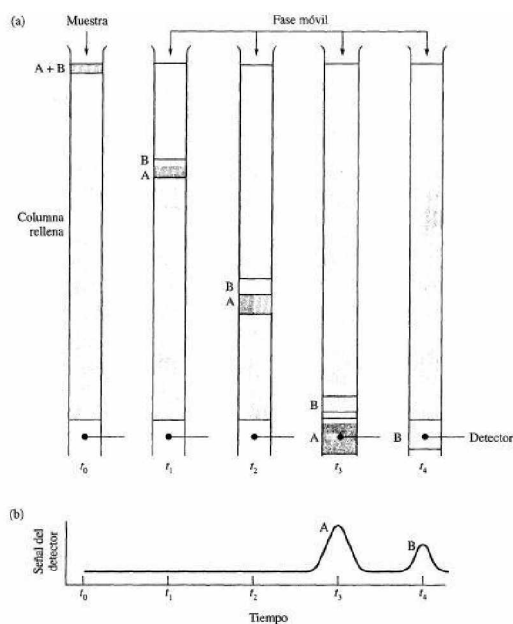
### **DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA CROMATOGRAFÍA.**

La cromatografía comprende un grupo de técnicas que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios [44, 45, 46]. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una **fase móvil**, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una **fase estacionaria** con la que es inmisible y que se fija a una columna o soporte sólido. Ambas fases se eligen de manera tal que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente **retenidos** por la fase estacionaria se desplazan lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta velocidad, los componentes de la muestra se separan en **bandas** o **zonas** discretas que pueden analizarse cuantitativa y/o cualitativamente.

### **CROMATOGRAMAS.**

Si se coloca un detector al final de la columna, que responda a la concentración del soluto, y se registra su señal en función del tiempo (o del volumen de fase móvil), se obtienen una serie de picos como se muestra en la Figura II-1a. Este gráfico se denomina **cromatograma**, y es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo.

La posición de los picos en el eje del tiempo puede ser utilizado para identificar los componentes de la muestra; mientras que el área bajo los picos proporciona una medida cuantitativa de cada componente presente en la muestra ingresada.



**FIGURA II-1.** (a) Diagrama que muestra la separación de una mezcla de A y B por cromatografía de elución en columna. (b) Señal de salida del detector en las distintas fases de la elución mostradas en (a). (D.A. Skoog, F.J. Holler y T.A. Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*, 5ta. Edición, Ed. Mc Graw-Hill, España, 2001).

## VELOCIDADES DE MIGRACIÓN DE LOS SOLUTOS

La eficacia de una columna para separar dos solutos depende de las velocidades relativas con las que eluyen las dos especies. Dichas velocidades están determinadas por la magnitud de las constantes de los equilibrios en función de las cuales las especies se distribuyen entre la fase móvil y estacionaria.

### Constante de distribución.

En general, los equilibrios de distribución implicados en cromatografía se describen con ecuaciones sencillas:



La constante de equilibrio  $K$  para un proceso como el descrito por la Ecuación II-1 se denomina **constante de distribución** o **coeficiente de distribución** [47], y se define como:

$$K = C_S / C_M \quad (\text{Ec. II-2})$$

donde  $C_S$  es la concentración molar del analito en la fase estacionaria y  $C_M$  es la concentración molar en la fase móvil. Idealmente,  $K$  es constante en un amplio intervalo de concentraciones de soluto; de este modo  $C_S$  es directamente proporcional a  $C_M$ . La cromatografía en la que es aplicable la Ecuación II-2 se denomina **cromatografía lineal** y, en tales casos, los picos son gaussianas simétricas características y los tiempos de retención son independientes de la cantidad de analito inyectado.

### Tiempos de retención.

El tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra hasta que el pico de concentración alcanza el detector se denomina **tiempo de retención**, y se simboliza con  $t_R$ .

Un pequeño pico que aparece al comienzo de la corrida cromatográfica corresponde a una especie que no es retenida por la columna. A menudo la muestra o la fase móvil contiene una o más especies que no son retenidas por la columna. El tiempo necesario para que la especie no retenida alcance el detector, se denomina **tiempo muerto**, y se simboliza por  $t_M$ . La velocidad de migración de la especie no retenida coincide con la velocidad promedio del movimiento de las moléculas de la fase móvil.

La velocidad lineal promedio de migración del analito  $v$  es:

$$v = L / t_R \quad (\text{Ec. II-3})$$

donde  $L$  es la longitud de la columna cromatográfica.



De igual manera, la velocidad lineal promedio  $u$  del movimiento de las moléculas de la fase móvil es:

$$u = L/t_M \quad (\text{Ec. II-4})$$

donde el *tiempo muerto*, es el tiempo necesario para que, por término medio, una molécula de la fase móvil pase a través de toda la columna.

### Factor de retención.

El **factor de retención**  $k'$  para un analito dado, es un parámetro importante que con frecuencia se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en las columnas. Para una especie A,  $k'_A$  se define como:

$$k'_A = K_A(V_S/V_M) \quad (\text{Ec. II-5})$$

donde  $V_M$  es el volumen de fase móvil y  $V_S$  el de fase estacionaria. No obstante, el factor de retención puede ser calculado fácilmente a partir de los datos de un cromatograma, utilizando la ecuación:

$$k'_A = (t_R - t_M)/t_M \quad (\text{Ec. II-6})$$

Cuando  $k'$  para una especie es mucho menor que la unidad, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con exactitud su tiempo de retención. Cuando  $k'$  es del orden de 20 o mayor, los tiempos de elución son excesivamente largos. Idealmente, las separaciones se realizan en condiciones tales que los  $k'$  para las especies de una mezcla oscilen entre 2 y 10.

### Factor de selectividad o separación.

El **factor de selectividad**  $\alpha$  de una columna para dos especies A y B, se define como:

$$\alpha = K_B/K_A \quad (\text{Ec. II-7})$$

donde  $K_B$  es el factor de distribución para la especie más fuertemente retenida B, y  $K_A$  para la menos retenida o que eluye con mayor rapidez, A. Según esta definición  $\alpha$  **será siempre mayor que la unidad**.

A partir de las Ecuaciones II-5 y II-6, se puede reordenar la Ecuación II-7 para determinar el *factor de selectividad* a partir de un cromatograma:

$$\alpha = (t_{R,B} - t_M)/(t_{R,A} - t_M) \quad (\text{Ec. II-8})$$

## INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Como su nombre lo indica, en la cromatografía líquida (LC) la fase móvil es un líquido. El gran poder de la LC reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores.

Los diferentes tipos de LC pueden clasificarse, entre muchas otras maneras, atendiendo a la interacción que se produce entre la fase estacionaria y el soluto. Los cuatro tipos básicos de interacción se denominan:

- cromatografía de **fase normal**;
- cromatografía de **fase reversa**;
- cromatografía de **intercambio iónico**;
- cromatografía de **filtración en gel** (también llamada de *exclusión* o *permeabilidad en gel*)

Algunas fases estacionarias se diseñan para que interaccionen con grupos químicos específicos. La cromatografía en la que la fase estacionaria presenta puntos activos para los grupos específicos se llama **cromatografía de afinidad**.

Es importante entender que la separación por LC no se produce por un único tipo de interacción entre los analitos y la fase estacionaria. Siempre hay otras interacciones además de la mencionada, pero la predominante nos indicará el tipo.

Para que la LC sea eficaz es necesario manejar todos los equilibrios que afectan a la distribución del analito entre ambas fases (Ec II-1).

Los cambios en el disolvente producen desplazamientos en el equilibrio entre las fases móvil y estacionaria. La separación cromatográfica se puede mejorar pasando de una elución **isocrática** (pasa un

único eluyente) a una elución en **gradiente**. Esta última se consigue mezclando dos o más eluyentes diferentes de manera que la composición de la fase móvil cambie con el tiempo.

### **CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE REVERSA.**

En la *cromatografía en fase reversa*, la fase estacionaria es menos polar que la móvil. Se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases estacionaria, estando formada la más común por grupos no polares unidos a la sílice; siendo los más utilizados los grupos orgánicos  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ , y  $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ . De ellos, la cadena de 18C (grupo octadecilo) es la más común. Estos grupos orgánicos ligados producen un efecto similar al que tendría una capa extremadamente fina de disolvente orgánico sobre la superficie de partículas de sílice. De manera que la distribución de solutos entre la superficie de las partículas y la fase móvil se parece más a una extracción líquido-líquido. Además, cuanto más larga sea la cadena carbonada, la capa ligada se vuelve más "orgánica". Como resultado, las cadenas más largas interactúan con más fuerza con los solutos que se disuelven en fases orgánicas.

Parece que la unión de estas cadenas largas sobre la superficie no es completa; es decir, parte de la superficie de la sílice queda expuesta entre regiones hidrófobas. Estas porciones de superficie remanente de sílice disminuyen la eficacia de la separación, produciendo ensanchamiento o colas en los picos. Para mejorar la eficiencia, estas áreas se **recubren** en una segunda reacción con grupos orgánicos de cadena corta (normalmente grupos metilo) que se combinan donde los grupos de cadena larga no se habían unido.

La cromatografía en fase reversa es relativamente popular ya que en las separaciones en que se la utiliza los picos resultan agudos y simétricos y los equilibrios de adsorción/desorción tienden a ser rápidos.

### **INSTRUMENTACIÓN PARA LA LC**

Con el objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable con rellenos que presentan un tamaño de partícula entre 2 y 10  $\mu\text{m}$  (que son comúnmente utilizados en la cromatografía moderna), se requieren presiones de unos cientos de kg-fuerza por centímetro cuadrado. Como consecuencia de esto, el equipo necesario para HPLC puede considerarse más sofisticado y costoso si lo comparamos con otros tipos de cromatografía.

#### **Recipientes para la fase móvil y sistema para el tratamiento de los disolventes.**

Los recipientes utilizados en HPLC se equipan, a menudo, con un sistema para eliminar los gases disueltos -en general oxígeno y nitrógeno- que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Estas burbujas provocan ensanchamiento en las bandas.

Un desgasificador puede consistir en un sistema de:

- bombeo por vacío;
- destilación;
- calentamiento y agitación de los disolventes;
- purga para arrastrar los gases disueltos mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad (por ej. He).

Con frecuencia estos sistemas incorporan un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión en los disolventes para evitar que éstas dañen la bomba, los sistemas de inyección u obturen la columna.

Una separación en la que la composición de la fase móvil es constante en el tiempo se denomina **elución isocrática**. Con frecuencia, la eficacia de la separación se mejora utilizando una **elución con gradiente**. En este caso se utilizan dos o más disolventes con polaridades significativamente distintas. Una vez que comienza la elución se varía la relación de los disolventes de forma programada.

#### **Sistemas de bombeo.**

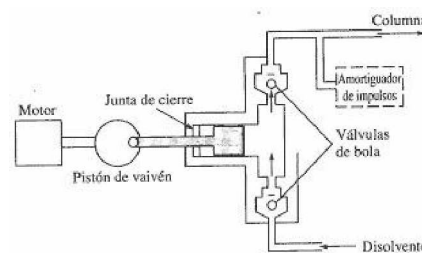
Los requisitos fundamentales para un sistema de bombeo son:

- generación de presiones por encima de los 6000 psi;
- flujo libre de pulsaciones;
- intervalo de caudales de 0,1 a 10 mL/min;
- control y reproducibilidad del caudal mejor al 0,5%;
- componentes resistentes a la corrosión.

Las bombas más utilizadas son las llamadas **bombas recíprocas** (Figura II-2), estando presente en más del 90% de los sistemas de HPLC comerciales [48].

Estas bombas consisten en una pequeña cámara en la que la fase móvil es impelida por el movimiento en vaivén de un pistón accionado por un motor de arrastre. Dos válvulas que se abren y cierran alternativamente controlan el flujo de la fase móvil hacia adentro y hacia fuera de un cilindro. La fase móvil está en contacto directo con el pistón. Las bombas recíprocas tienen la desventaja de que producen un flujo pulsado, que se manifiesta como ruido en la línea de base del cromatograma. Entre las ventajas, podemos citar:

- pequeño volumen interno (de 35 a 400  $\mu\text{L}$ );
- altas presiones de salida (por encima de los  $10^4$  psi)
- fácil adaptación a la elución con gradiente;
- caudales constantes, prácticamente independientes de la contrapresión de la columna y de la viscosidad de la fase móvil.

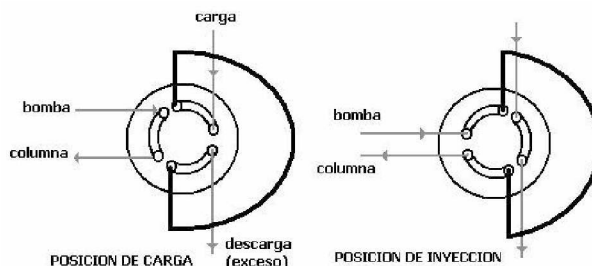


**FIGURA II-2.** Esquema de una bomba recíproca para HPLC. (D.A. Skoog, F.J. Holler y T.A. Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*, 5ta. Edición, Ed. Mc Graw-Hill, España, 2001).

### Sistemas de inyección de muestra.

Un factor limitante en la precisión de las medidas en HPLC es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra. Para ello, los volúmenes que se empleen han de ser muy pequeños y además, se ha de poder introducir la muestra sin despresurizar el sistema.

En HPLC, el método más utilizado para la introducción de la muestra es mediante bucles (o *loops*) de muestra, como el que se esquematiza en la Figura II-3. Estos dispositivos son normalmente una parte integrada del equipo y hay bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestras desde 5 a 500  $\mu\text{L}$ . Con bucles de este tipo se puede introducir la muestra a presiones de hasta 7000 psi.



**FIGURA II-3.** Válvula de inyección de HPLC.

### Columnas para HPLC.

Las columnas para HPLC se construyen con tubos de acero inoxidable. Se comercializan por distintos fabricantes cientos de columnas rellenas que difieren en las dimensiones (longitud y diámetro interno) y tipo de relleno, y su costo oscila entre los 200 a 500 dólares (U\$) [49].

La mayoría de las columnas analíticas para HPLC tienen una longitud entre 10 y 30 cm, cuyo diámetro interno es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes comprenden de 5 a 10  $\mu\text{m}$ . Tal vez, la columna más ampliamente utilizada sea la que presenta 25 cm de longitud; 4,6 mm de diámetro interno y rellena con partículas de 5  $\mu\text{m}$ .

### Tipos de rellenos de la columna.

Los rellenos más típicos son los de **partícula porosa**, que están formados por micropartículas porosas con diámetros comprendidos entre los 3 y 10  $\mu\text{m}$  y con la menor dispersión posible con respecto a un tamaño determinado. Dichas micropartículas son de sílice, alúmina o de una resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o resinas de intercambio iónico, aunque, de todos éstos, la sílice es el material de relleno más ampliamente difundido en HPLC. Las partículas de sílice se recubren muchas veces con películas orgánicas, que se unen física o químicamente a la superficie.

### Detectores.

Un detector ideal para HPLC, debe poseer las siguientes características:

- Adecuada sensibilidad.
- Buena estabilidad y reproducibilidad.
- Respuesta lineal para solutos que se extiende varios órdenes de magnitud.
- Tiempo de respuesta corto e independiente del caudal.
- Alta fiabilidad y manejo sencillo.
- Respuesta semejante para todos los solutos, o por el contrario, una respuesta selectiva y predecible para uno o más tipos de solutos.
- No destructivo de la muestra.

Los detectores en LC pueden ser de dos tipos. Los que se basan en la medida de *una propiedad de la disolución*, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifican por la

presencia de los analitos. Por el contrario, los detectores basados en *una propiedad del soluto* responden a su absorbancia en el UV, fluorescencia, etc.

Los detectores más simples para HPLC son los de absorbancia en el UV, que consisten en fotómetros de filtro con una lámpara de mercurio como fuente. En estos casos, lo más común es aislar la línea intensa a 254 nm por medio de filtros; en algunos equipos se pueden aislar también las líneas a 250, 313, 334 y 365 nm.

Hoy en día, la mayoría de los fabricantes de instrumentos HPLC ofrecen detectores que consisten en un espectrofotómetro de barrido con una red de difracción entre sus componentes ópticos. Algunos se limitan a la radiación UV; mientras que otros abarcan la radiación UV y visible.

## **ANEXO III: Fundamentos de Conductimetría.**

### **INTRODUCCIÓN**

La conductimetría comprende un grupo de métodos analíticos basados en la medida de la conductancia eléctrica de una solución.

La conductividad es una magnitud característica de los conductores de la electricidad, y específicamente para el caso de los de segunda especie o electrolitos viene dada por la migración de aniones y cationes en solución, hacia los electrodos respectivos.

En soluciones diluidas la conductancia está estrechamente vinculada con la concentración del electrolito y esto constituye la base de este método analítico que puede llevarse a cabo a través de dos técnicas:

- a. conductimetría directa
- b. titulaciones conductimétricas

En el segundo caso se puede medir la conductancia de una solución durante el curso de una titulación. Se grafica las variaciones de conductancia en función de los volúmenes de titulante añadido y se detecta el punto de equivalencia.

Las aplicaciones de mediciones de conductancia directa al análisis son limitadas a causa de la naturaleza no selectiva de ésta propiedad (todos los iones presentes conducen la electricidad). No obstante, su alta sensibilidad (se detectan cantidades muy pequeñas, en el orden de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  mg según el campo aplicado) la convierte en un importante instrumento analítico para ciertas aplicaciones, entre las que podemos mencionar:

- 1.- Análisis de mezclas binarias agua-analito: mediante la construcción de curvas de calibración con soluciones estándar, en condiciones preestablecidas de temperatura, potencial aplicado, área superficial y distancia de electrodos.
- 2.- Estimación de la pureza de agua destilada o desionizada: la conductancia específica del agua pura es sólo del orden de  $5 \cdot 10^{-8} \text{ ohm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (o lo que es lo mismo  $5 \cdot 10^{-2} \mu\text{S/cm}$ ), y vestigios de una impureza iónica aumentarán la conductancia en un orden de magnitud o más.
- 3.- Mediciones de salinidad del agua de mar.

### **CONDUCTIVIDAD ELECTROLÍTICA.**

La conductividad electrolítica es una magnitud que expresa la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Los responsables de la circulación de dicha corrientes son los iones en solución, cuyo movimiento en el sentido del electrodo de carga eléctrica opuesta hace conductora a la misma.

Por lo tanto se cumple la Ley de Ohm:

$$V = i \cdot R \quad (\text{Ec. III-1})$$

donde:

V: es el potencial aplicado medido en volts o voltios, [V];

i: es la corriente eléctrica medido en ampers o amperios, [A];

R: es la resistencia medida en ohms u ohmios, [ $\Omega$ ].

La recíproca de la resistencia (R) recibe el nombre de **conductancia** (L):

$$L = R^{-1} \quad (\text{Ec. III-2})$$

cuyas unidades son  $\text{ohm}^{-1}$ , mho o Siemens, [S].

Por lo tanto L es directamente proporcional al área de sección (A) e inversamente proporcional a la longitud (l) de un conductor uniforme:

$$L = k \cdot A / l \quad (\text{Ec. III-3})$$

$$y \quad A / l = \theta^{-1} \quad (\text{Ec. III-4})$$

donde k es la conductancia específica o conductividad en mho/cm o S/cm, que representa la conductancia de un cubo de líquido de 1 cm de arista, por lo tanto  $A = l = 1$ .

El valor de  $l/A$  se denomina constante de la celda  $\theta$  y se expresa en  $\text{cm}^{-1}$ .

Dado que  $k$  está referido a un determinado volumen de solución y considerando que la conductividad de una solución depende de:

- número de iones totales por unidad de volumen,
- movilidad de los iones por aplicación de un campo eléctrico.

Entonces, con el objeto de comparar la capacidad de conducir la corriente eléctrica de los distintos iones, debemos referirnos a un mismo número de cargas iónicas presentes. Se define entonces la **conductancia iónica equivalente** o **conductividad equivalente**  $\Lambda$  como la conductancia de una solución que contiene 1 eq-g de soluto entre dos grandes electrodos paralelos, colocados a 1 cm de distancia entre sí (para la conductancia electrolítica el equivalente se define en función del número de cargas transportadas por un ión y no por su destino en una reacción específica).

El volumen de una solución y el área de los electrodos varían para satisfacer las condiciones de la definición. Por ejemplo, una solución 1,0 N (1 eq-g/L) requeriría electrodos con áreas individuales de  $10^3 \text{ cm}^2$ , y una solución 0,1 N necesitaría electrodos de  $10^4 \text{ cm}^2$ . Por ello nunca se emprende la medición directa de  $\Lambda$ , sino que se la determina indirectamente de datos de conductancias específicas.

Por definición  $\Lambda = L$  cuando 1eq-g de soluto está contenido entre electrodos separados por 1 cm. El volumen  $v$  de solución de concentración  $C$  (eq-g/L) que contendrá 1 eq-g de soluto será:

$$v = 1000/C \quad (\text{Ec. III-5})$$

Este volumen también puede expresarse en función de las dimensiones de la celda o pila:

$$v = l.A \quad (\text{Ec. III-6})$$

Con  $l$  fijado por definición en 1 cm, entonces:

$$V = A = 1000/C \quad (\text{Ec. III-7})$$

Sustituyendo esta Ecuación III-7 en la expresión de  $L$  en función de la conductancia específica  $k$ , Ecuación III-3, se tiene:

$$L = \frac{k \cdot 1000}{C \cdot l} \quad (\text{Ec. III-8})$$

Dado que  $l = 1 \text{ cm}$ , y como 1 eq-g de soluto está contenido entre electrodos separados por 1 cm, entonces  $L = \Lambda$ , obteniéndose:

$$\Lambda = k \cdot 1000/C \quad (\text{Ec. III-9})$$

Esta expresión permite el cálculo de  $\Lambda$  partiendo del valor experimental de  $k$  para una solución de concentración conocida.

Si despejamos  $k$  de la Ecuación III-9:

$$k = \Lambda \cdot C / 1000 \quad (\text{Ec. III-10})$$

Introduciendo la Ecuación III-10 en la III-3, y teniendo en cuenta la Ecuación III-4:

$$L = k \cdot A / l = \frac{\Lambda \cdot C}{1000} \cdot A / l = \frac{\Lambda \cdot C}{1000 \cdot \theta}$$

de esta manera se llega a:

$$L = 10^{-3} \cdot \theta^{-1} \cdot C \cdot \Lambda \quad (\text{Ec. III-11})$$

$L$  es proporcional a  $C$ , y esto se cumple para soluciones diluidas.

La movilidad de un ión en solución responde a cuatro fuerzas:

1.- *Fuerza eléctrica*:  $F_E = E \cdot q$ ; donde  $E$  es el potencial del electrodo y  $q$  la carga del ión. Esta fuerza tiende a desplazar la partícula hacia el electrodo de carga opuesta. Este efecto es parcialmente contrarrestado por la fuerza de fricción.

2.- *Fuerza de fricción*: generada por el movimiento de la partícula. Limita la velocidad de migración de la misma y es característica de cada ión.

Estos dos efectos tienen importancia en la conductividad en soluciones infinitamente diluidas.

A concentraciones finitas surgen dos factores más que hacen que  $L$  disminuya al aumentar la concentración. Ambas se originan en la atmósfera iónica que rodea la partícula.

3.- *Efecto electroforético*: se debe al movimiento de iones de carga opuesta que rodean al ión en cuestión. Estos iones arrastran partículas de disolvente y retardan el movimiento de la partícula por el flujo del disolvente en sentido opuesto.

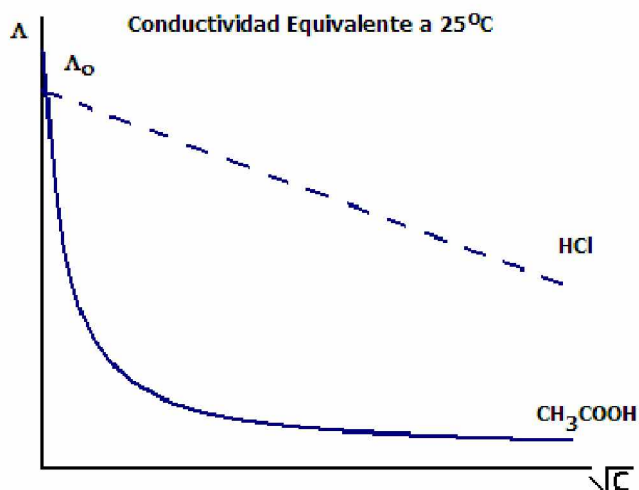
4.- *Efecto de relajación*: el movimiento del ión es retardado por la carga de signo opuesto que se acumula detrás de la partícula en movimiento.

Para electrolitos fuertes se verifica una relación lineal entre  $\Lambda$  y la raíz cuadrada de la concentración ( $C^{1/2}$ ).

$$\Lambda = \Lambda_0 - A.C^{1/2} \quad (\text{Ec. III-12})$$

La extrapolación a  $C^{1/2} = 0$  da  $\Lambda_0$  que es la **conductancia iónica equivalente a dilución infinita**.

Se observa que en la Figura II-1 aparecen dos tipos de comportamiento: aquellos electrolitos que presentan esencialmente variación lineal, se les agrupa entre los *electrolitos fuertes*, mientras que, los que se aproximan al valor límite de las disoluciones diluidas de forma casi tangencial, están agrupados como *electrolitos débiles*.



**FIGURA III-1.** Variación de la conductancia equivalente respecto a  $C^{1/2}$  para disoluciones acuosas de electrolitos a 25°C.

Para un electrolito débil la relación no es lineal y es más difícil hallar  $\Lambda_0$ . A dilución infinita las atracciones entre los iones se anulan y se cumple la ley de Kohlraus de la migración independiente de iones, entonces la conductancia de una solución es la sumatoria de las conductividades iónicas equivalentes.

$$\Lambda_0 = \sum \lambda_0^+ + \sum \lambda_0^- \quad (\text{Ec. III-13})$$

donde las  $\lambda$  son las conductividades iónicas equivalentes a dilución infinita del catión y anión respectivamente.

La contribución independiente de los iones se comprueba trabajando con un ión común. Por ejemplo, para NaCl y KCl, las contribuciones de  $\text{Cl}^-$  deben ser las mismas. (Ver Tabla III-1 de conductividades iónicas equivalentes).

La conductividad iónica equivalente es una medida de la movilidad del ión bajo la influencia de un campo de fuerzas eléctricas, siendo así una medida de su capacidad de transporte de la corriente.

La diferencia entre la conductividad iónica equivalente de distintas especies se debe a diferencias en su tamaño y grado de hidratación. Por ejemplo, las conductividades del ión  $\text{K}^+$  y del ión  $\text{Cl}^-$  son semejantes, lo que indica que transportan fracciones semejantes de corriente eléctrica. Por el contrario, la conductividad del protón  $\text{H}^+$  es mucho mayor que la del ión  $\text{Cl}^-$ :

$$\text{Fracción transportada por el } \text{H}_3\text{O}^+ = \frac{\lambda_{\text{H}_3\text{O}^+}}{\lambda_{\text{H}_3\text{O}^+} + \lambda_{\text{Cl}^-}} = \frac{350}{350+76} = 0,82 \Rightarrow 82\%$$

$$\text{Fracción transportada por el } \text{Cl}^- = \frac{\lambda_{\text{Cl}^-}}{\lambda_{\text{H}_3\text{O}^+} + \lambda_{\text{Cl}^-}} = \frac{76}{350+76} = 0,18 \Rightarrow 18\%$$

Esto indica que el HCl 0,001N tendrá mayor conductancia que el KCl 0,01 N, por ejemplo. Esto es importante para predecir el curso de una titulación conductimétrica.

Observando la Tabla III-1, las conductividades iónicas equivalentes de los iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  son muy semejantes por lo que se los utiliza en la construcción de puentes salinos.

Los símbolos  $\frac{1}{2} \text{Mg}^{2+}$ ,  $\frac{1}{2} \text{Fe}^{2+}$ , etc., indican la concentración en equivalentes por litro.

CATION	$\lambda_0^+$ [S.cm <sup>2</sup> /mol]	ANION	$\lambda_0^-$ [S.cm <sup>2</sup> /mol]
H <sup>+</sup>	398,2	OH <sup>-</sup>	198
Li <sup>+</sup>	38,69	Cl <sup>-</sup>	75,23
Na <sup>+</sup>	50,11	I <sup>-</sup>	76,8
K <sup>+</sup>	73,52	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	40,9
Ag <sup>+</sup>	61,92	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	79,8
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	73,4	½ C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	74,2
Ca <sup>2+</sup>	59,5	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	71,4
½ Mg <sup>2+</sup>	53,1	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	67,3
½ Fe <sup>2+</sup>	54,0	1/3 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	69,0

**TABLA III-1.** Conductancias iónicas equivalentes a dilución infinita y 25°C

### EFFECTO DE LA TEMPERATURA

El coeficiente de variación de  $L$  con la temperatura ( $\Delta L/\Delta T$ ) para mediciones de  $L$  es del 2%/°C. Se realizan mediciones a temperatura constante, en baños de aceite o agua para medidas muy precisas.

Para mediciones relativas, como las titulaciones, la celda de conductancia sólo necesita alcanzar el equilibrio térmico con el medio que la rodea, antes de proceder a la lectura de la conductancia.

Se trabaja con agitación muy suave.

### MEDICIÓN DE LA CONDUCTANCIA

Las mediciones de conductancia electrolítica por lo general involucran la determinación de la resistencia de una columna de solución contenida entre dos electrodos paralelos, empleando la Ley de Ohm.

Estos electrodos son de platino metálico recubierto con un depósito de negro de platino para aumentar el área superficial y reducir los efectos de la polarización.

Las medidas de la conductancia de las soluciones acuosas se realizan con una célula de conductancia y un sistema de circuitos eléctricos como se representa en la Figura II-2.

Se emplea una fuente de corriente alterna de elevada frecuencia para evitar la fijación de cargas de signo opuesto en las proximidades de cada electrodo, ya que aparecería así una resistencia adicional. En esta situación se ha comprobado que la célula de conductancia cumple con la Ley de Ohm; la corriente que fluye a través de la celda es proporcional al voltaje entre los electrodos de la misma. Por tanto, es posible asignar una resistencia de algunos ohm a ésta pila.

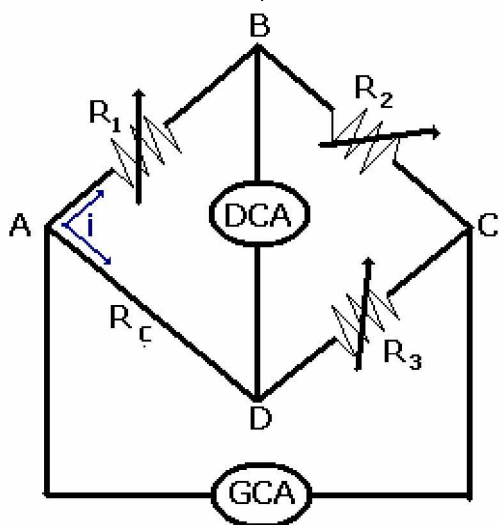
Recordemos que en una pila con corriente directa o continua, ocurren la oxidación en el ánodo y la reducción en el cátodo, se trata entonces de un proceso farádico, es decir, que verifica la Ley de Faraday.

Quando circula corriente alterna se forma una doble capa en la superficie del electrodo. Esta corriente se invierte cada medio ciclo. Si se selecciona una frecuencia tal que no ocurran procesos farádicos, por ejemplo 1000 ciclos/seg (1000 Hz), que es la frecuencia de los osciladores de audio, entonces sólo se mide la conductancia.

El circuito utilizado para medir la resistencia de la solución es el *punte de Wheatstone* convenientemente modificado para operar en corriente alterna. Es un dispositivo que compensa a cero.

**DCA** es un Detector de Corriente Alterna de aproximadamente 1000 Hz, frecuencia audible al oído humano, generalmente un par de audífonos o un microamperímetro para CA.

**GCA** es un Generador de Corriente Alterna de la misma frecuencia que el detector.



**FIGURA III-2.** Puente de Wheatstone, circuito para la medición de conductancia.



El puente se alimenta del GCA, generalmente a la frecuencia de la electricidad. Las resistencias  $R_2$  y  $R_3$  permiten seleccionar, mediante un interruptor, distintas relaciones de trabajo a efectos de lograr que la medida entre en escala.

$$\text{Cuando } V_{BD} = 0 \Rightarrow V_B = V_D \Rightarrow \Delta V_{AB} = \Delta V_{BC} \quad \text{y} \quad \Delta V_{BC} = \Delta V_{CD}$$

Por la Ley de Ohm:

$$\begin{aligned} i_{ABC} \cdot R_1 &= i_{ADC} \cdot R_C \\ i_{ABC} \cdot R_2 &= i_{ADC} \cdot R_3 \end{aligned}$$

dividiendo miembro a miembro:

$$R_1/R_2 = R_C/R_3 \quad \Rightarrow \quad R_C = R_1 \cdot R_3 / R_2 \quad \Rightarrow \quad L_C = R_C^{-1} = R_2 / R_1 \cdot R_3 \quad (14)$$

### CONSTANTE DE PILA, $\theta$ .

En la practica se obtiene la constante de pila,  $\theta = I/A$ , de la medida de  $L$  de una celda con una solución de conductancia especifica conocida  $k$ , casi siempre KCl. Entonces, se determina  $L$  y se puede obtener la constante de pila  $\theta$ , la que es necesario determinar para mediciones por conductimetría directa.

Para las titulaciones conductimétricas, esta calibración es innecesaria.

### TITULACIONES CONDUCTIMÉTRICAS.

El método conductimétrico es muy versátil, y puede aplicarse en muchos casos en donde no se dispone de indicadores y no se pueden aplicar los métodos potenciométricos. Sin embargo, su versatilidad es una limitación, ya que la conductividad no es una propiedad selectiva. Todos los iones que están presentes en una solución contribuyen a su conductividad y en algunas ocasiones los cambios que ocurren durante la titulación pueden ser bastante menores en comparación con la conductividad originada por especies no reaccionantes.

Aun así, las titulaciones conductimétricas tienen usos prácticos importantes ya que se pueden aplicar a reacciones con pequeñas constantes de equilibrio y a soluciones de muy bajas concentraciones. Además, es adaptable a las técnicas de instrumentación automática.

La principal ventaja de las titulaciones conductimétricas es que las curvas de titulación son líneas rectas, por lo tanto se obtienen 3 o 4 puntos antes y después del punto de equilibrio de la titulación y por extrapolación se obtiene el punto final (no interesa lo que ocurre en el punto mismo de equivalencia, por eso esta técnica es adecuada para reacciones incompletas).

Este método es aplicable en general a reacciones en que hay variación en el número total de iones en solución o iones de gran movilidad son sustituidos por otros de menor movilidad y viceversa. Es útil en particular para titular:

- ácidos y bases débiles (reacción incompleta), por ejemplo ácido acético, ácido bórico,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , mezcla de ácidos de distinta fuerza, etc.;
- soluciones muy diluidas;
- titulaciones de precipitación y complexométricas.

Al ir agregando titulante, el volumen de disolución en la que se realiza la medición conductimétrica varía, y esto se corrige mediante un factor  $f$ :

$$f = (v + V)/V \quad (\text{Ec. III-15})$$

donde  $v$  es el volumen agregado de titulante y  $V$  el volumen de la alícuota tomada para realizar la titulación.

También es útil preparar un titulante unas 10-20 veces (o más) mas concentrado para evitar una gran variación en el volumen y así obviar el uso del factor, aunque esto no siempre es posible.

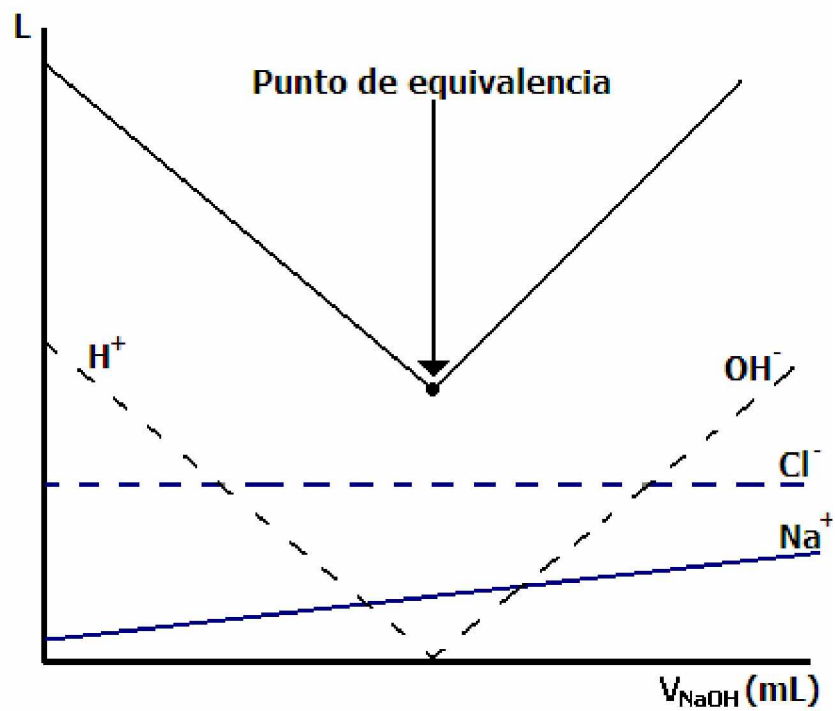
### CONSTRUCCIÓN DE UNA CURVA DE TITULACIÓN CONDUCTIMÉTRICA.

Ejemplo: titulación de HCl con NaOH.



Es un ejemplo de una valoración volumétrica, de un ácido fuerte con una base fuerte. Puede realizarse en una pila de conductividad y mediante la variación de  $L$  que se produce a medida que la base se va agregando al ácido. El resultado que se representa en la Figura III-3 se comprende al ser mayor la conductividad de los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$  comparada con la de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Entonces, el punto de

equivalencia se caracteriza como el punto de intersección de las dos rectas que pueden trazarse a partir de los datos extremos de la titulación.



**FIGURA III-3.** Forma de la curva de titulación conductimétrica (línea negra de trazo continuo) y de las contribuciones de los iones en la titulación de HCl con NaOH

Otras aplicaciones de interés:

- control de aguas minerales y de consumo;
- control de alimentación de calderas y circuitos industriales;
- monitoreo de efluentes industriales y aguas servidas;
- control de pureza de materias primas y productos alimenticios.

## **ANEXO IV: Fundamentos de Potenciometría**

### **INTRODUCCIÓN**

Los **métodos potenciométricos** de análisis se basan en las medidas del potencial de celdas electroquímicas en ausencia de corrientes apreciables, siendo estos, por tanto, *procesos no farádicos*. Cuando estos métodos son utilizados para medir concentraciones pueden trabajar de dos maneras:

- por comparación del potencial desarrollado por una muestra con el de patrones de concentración conocida, llamados métodos **potenciométricos directos**;

- aquellos en que el transcurso de una valoración es seguido por la medida del potencial de un electrodo sumergido en la disolución que se valora, llamados **valoraciones potenciométricas**.

Es claro que para estas técnicas es necesario contar con un electrodo sensible a la concentración de uno de los participantes de la reacción analítica. Entre estos se encuentra el **electrodo de membrana de vidrio** sensible a iones  $H^+$ , uno de los primeros desarrollado y estudiado. De origen más reciente son los electrodos de membrana selectivos a otros iones, los cuales están relativamente libres de interferencias y proporcionan un medio rápido y conveniente para estimaciones cuantitativas de numerosos aniones y cationes importantes. [50]

El equipo requerido para los métodos potenciométricos es sencillo y económico e incluye un **electrodo de referencia**, un **electrodo indicador** y un **dispositivo para la medida del potencial**. Ambas técnicas involucran la medición de la diferencia de potencial entre un electrodo indicador y uno de referencia, por lo que resulta esencial la medición de la f.e.m. de la celda.

### **MEDIDA DEL POTENCIAL.**

Como resulta imposible la medida del potencial de electrodos aislados en forma directa, la medición se realiza respecto de algún electrodo de referencia cuyo potencial es conocido o aceptado. Esto requiere establecer una celda galvánica entre el electrodo de potencial conocido (de referencia) y el electrodo indicador. El valor así determinado será relativo al sistema de referencia utilizado y a la temperatura a la que se realizó la medición.

Si bien los potenciales de media celda o de electrodo se refieren al **electrodo normal de hidrógeno** (ENH), éstos pueden expresarse respecto a cualquier sistema de electrodos de referencia.

En general se requiere un dispositivo que mida potenciales en el intervalo de 0 a 1,5 V, con una exactitud, como mínimo, de  $\pm 0,001$  V.

Lo primero que se podría sugerir para medir la f.e.m. ( $E$ ), es usar un voltímetro (ver Figura IV-1). Pero resulta que la f.e.m. generada por la celda no puede ser medida exactamente por la simple inserción de un voltímetro entre sus electrodos, a causa de que es necesario el paso de una pequeña corriente para accionar el medidor. [51]

Cuando esta corriente sale de la celda, tiene lugar una disminución del voltaje. Esto es debido en parte a cambios en las concentraciones de las especies reaccionantes cuando la pila comienza a descargarse.

Además, la celda tiene una resistencia interna propia ( $r$ ); cuando pasa la corriente, desarrolla una caída óhmica de potencial (igual al producto de la corriente por la resistencia), que se opone a la de los electrodos.

$$V = i.R \quad (\text{Ec. IV-1})$$

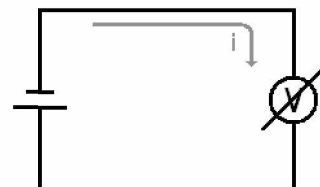
$$E = V + i.r \quad (\text{Ec. IV-2})$$

Dividiendo la Ecuación IV-2 por la IV-1 y reemplazando:

$$\frac{E}{V} = \frac{i.R + i.r}{i.R} = 1 + r/R$$

$$E = V \cdot (1 + r/R) \quad (\text{Ec. IV-3})$$

De la expresión anterior se concluye que un valor verdaderamente significativo de la f.e.m. de la celda se puede alcanzar solamente si la medida se hace con un paso de corriente despreciable.



**FIGURA IV-1.** Voltímetro.

Un instrumento sencillo para medir la f.e.m. de pilas galvánicas, utiliza un circuito potenciométrico de oposición, para lograr un paso de corriente despreciable. [52]

## ELECTRODOS DE REFERENCIA

En la mayoría de las aplicaciones electroanalíticas, es deseable que el potencial de una hemicelda sea conocido, constante y completamente insensible a la composición de la disolución en estudio. Un electrodo que se ajusta a estas condiciones se denomina **electrodo de referencia**. [53, 54]

Junto con el *electrodo de referencia* se ocupa un **electrodo indicador** o **de trabajo**, cuya respuesta depende de las concentraciones de analito.

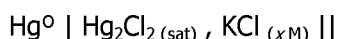
Algunas características que deberá cumplir un *electrodo de referencia ideal* serán que:

- sea reversible y obedezca a la ecuación de Nernst;
- presente un potencial que sea constante en el tiempo;
- retorne a su potencial original después de haber estado sometido a corrientes pequeñas;
- presente poca histéresis con ciclos de temperatura.

Si bien ningún *electrodo de referencia* satisface completamente estos requerimientos, varios están bastante cerca de cumplirlos.

## Electrodos de calomelanos

Estos electrodos de referencia se componen de mercurio en contacto con una solución saturada de cloruro de mercurio (I) (calomelanos) que contiene también una concentración conocida de cloruro de potasio. La hemicelda de calomelanos se puede representar según el siguiente diagrama:



donde  $x$  representa la concentración molar de KCl en la disolución.

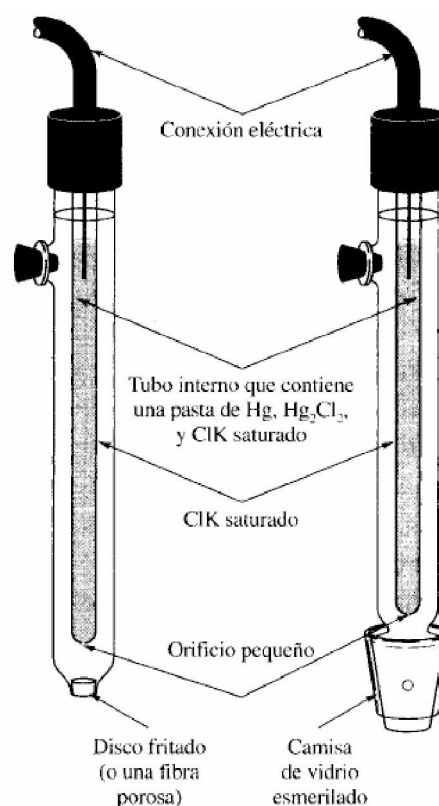
El potencial de electrodo para esta hemicelda está determinado por la reacción:



y depende de la concentración  $x$  de cloruros. Así, esta cantidad debe especificarse en la descripción del electrodo.

Uno de los electrodos de calomelanos más utilizados por los químicos analíticos es el **electrodo de calomel saturado** (ECS), debido a la facilidad con que puede prepararse. Debe tenerse en cuenta que el término "saturado" se refiere a la concentración de KCl (alrededor de 4,6 M) y no a la concentración de calomelanos; esta última es saturada en todos los electrodos de calomelanos. El potencial de ECS a 25°C es 0,2444 V.

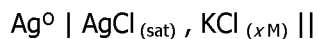
Entre los electrodos de calomelanos que se consiguen comercialmente, dos característicos son los que se ilustran en la Figura IV-2. El cuerpo de cada electrodo consiste en un tubo externo de vidrio o plástico que tiene de 5 a 15 cm de longitud y de 0,5 a 1,0 cm de diámetro. El tubo interno contiene una pasta de mercurio/cloruro de mercurio (I) en cloruro de potasio saturado; este tubo está en contacto con una disolución de cloruro de potasio saturada del tubo exterior a través de un pequeño orificio.



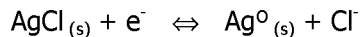
**FIGURA IV-2.** Electrodos de referencia de calomelanos típicos. (D.A. Skoog, F.J. Holler y T.A. Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*, 5ta. Edición, Ed. Mc Graw-Hill, España, 2001).

### Electrodo de plata/cloruro de plata.

El electrodo de referencia más ampliamente comercializado consiste en un electrodo de plata sumergido en una disolución de cloruro de potasio saturada con cloruro de plata:



El potencial de electrodo esta determinado por la hemirreacción:



Los modelos comerciales de estos electrodos son semejantes en apariencia a los dos electrodos de calomelanos representados en la Figura IV-2. Sin embargo, en los electrodos de plata/cloruro de plata el tubo interno se reemplaza por un alambre de plata recubierto con una capa de cloruro de plata; este alambre está sumergido en una disolución de cloruro de potasio saturada con cloruro de plata. Para ambos tipos de electrodos se utilizan uniones similares.

### ELECTRODOS INDICADORES

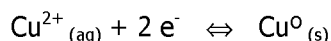
Un **electrodo indicador ideal** responde de forma rápida y reproducible a los cambios de actividad del ión analito. Aunque ningún electrodo indicador es absolutamente específico en su respuesta, actualmente se dispone de unos pocos que son marcadamente selectivos. Hay dos tipos de electrodos indicadores: **metálicos** y **membrana**.

Entre los **electrodos indicadores metálicos** se pueden distinguir cuatro tipos:

- de primera especie;
- de segunda especie;
- de tercera especie;
- electrodos redox.

#### Electrodos indicadores metálicos de primera especie

Estos electrodos están en equilibrio directo con el catión que deriva del electrodo metálico. En este caso interviene una única reacción. Por ejemplo, para un electrodo indicador de cobre, se puede escribir:



El potencial E de este electrodo viene dado por:

$$E = E^{\circ}_{\text{Cu}} + (0,0592/2) \cdot \log a_{\text{Cu(II)}} = E^{\circ}_{\text{Cu}} - (0,0592/2) \text{pCu} \quad (\text{Ec. IV-4})$$

donde pCu es el logaritmo negativo de la actividad del ión cobre(II). De esta manera, el electrodo de cobre proporciona una medida directa del pCu de la disolución.

Los electrodos de primera especie no son muy utilizados en el análisis potenciométrico por varias razones, como ser:

- no son muy selectivos y responden no solo a sus propios cationes sino también a otros cationes más fácilmente reducibles;
- algunos electrodos metálicos solo pueden utilizarse en disoluciones neutras o básicas porque se disuelven en presencia de ácidos (por ej., Zn y Cd);
- algunos metales se oxidan tan fácilmente que su uso queda restringido a disoluciones previamente desaireadas;
- algunos metales duros no proporcionan potenciales reproducibles (por ej. Fe, Cr, Co, Ni).

#### Electrodos indicadores metálicos de segunda especie

Frecuentemente se puede lograr que algunos metales respondan a la actividad de un anión con el que forme un precipitado o un ión complejo estable. Por ejemplo, la plata puede servir como un **electrodo de segunda clase** para haluros (X). Para preparar un electrodo capaz de determinar cloruros sólo es necesario saturar con AgCl la capa de disolución del analito adyacente al electrodo de plata. La reacción de electrodo se puede escribir como:



Aplicando la ecuación de Nernst se obtiene:

$$E = E^{\circ} - 0,0592 \cdot \log a_{Cl} = E^{\circ} + 0,0592 \cdot pCl \quad (\text{Ec. IV-5})$$

### Electrodos indicadores metálicos de tercera especie

Bajo ciertas circunstancias, se puede hacer que un electrodo metálico responda a un catión diferente. Entonces se convierte en un **electrodo de tercera especie**. Como ejemplo, un electrodo de mercurio se ha utilizado para la determinación del *pCa* en disoluciones que contengan calcio.

### Electrodos indicadores redox.

Los electrodos construidos con platino, oro, paladio u otros metales inertes sirven frecuentemente como electrodos indicadores para sistemas de oxidación/reducción. En estas aplicaciones, el electrodo inerte actúa como una fuente o sumidero de los electrones transferidos desde un sistema redox presente en la disolución.

### Electrodos indicadores de membrana. Electrodo de vidrio para mediciones de pH

Comercialmente, se puede conseguir una amplia variedad de electrodos de membrana que permiten la determinación rápida y selectiva de numerosos cationes y aniones por medidas potenciométricas directas. A menudo, los *electrodos de membrana* se denominan **electrodos selectivos de iones (ISE)** debido a la gran selectividad de la mayor parte de estos dispositivos. También se refieren a ellos como **electrodos de pIón**, debido a que su respuesta se registra como una función *p* (logaritmo negativo de la actividad del ión), tal como pH, pCa, o pNO<sub>3</sub>.

Todas las membranas selectivas de iones presentan propiedades comunes, que proporcionan sensibilidad y selectividad al electrodo frente a distintos aniones o cationes. Estas propiedades son:

- *Mínima solubilidad*. La solubilidad de la membrana en disoluciones de analito (generalmente acuosas) debe ser mínima. Así, muchas membranas están formadas por moléculas grandes o agregados moleculares tales como los vidrios de sílice o resinas poliméricas.

- *Conductividad eléctrica*. Una membrana debe presentar algo de conductividad eléctrica, aunque sea pequeña. Generalmente, esta condición se debe a la migración en el interior de la membrana de iones con una sola carga.

- *Reactividad selectiva con el analito*. La membrana, o alguna de las especies contenida en la matriz de la membrana, debe ser capaz de unirse selectivamente con los iones de los analito. Las uniones más comunes son por intercambio iónico y cristalización. [48]

El **electrodo de membrana de vidrio** para mediciones de pH es anterior, en varias décadas, a todos los demás electrodos de membrana. Empezando 1930, la manera más adecuada de determinar el pH era midiendo la diferencia de potencial a través de una membrana de vidrio que separa la disolución de analito de una disolución de referencia de acidez fija. Una celda moderna característica puede verse en la Figura IV-3, la cual consiste en un *electrodo indicador* de vidrio y un *electrodo de referencia* de Ag/AgCl o ECS sumergidos en una disolución cuyo pH se va a determinar.

El electrodo indicador consiste en una delgada membrana de vidrio sensible al pH sellada en el extremo de un tubo de vidrio o de plástico de paredes gruesas. El tubo contiene un pequeño volumen de ácido clorhídrico diluido saturado con AgCl. En esta disolución un alambre de plata forma un electrodo de referencia de Ag/AgCl, que se conecta a una de las terminales de un dispositivo para medir el potencial. El electrodo de referencia se conecta a la otra terminal.



## TITULACIONES POTENCIOMÉTRICAS

Una titulación potenciométrica típica implica la medida y el registro del potencial que toma la celda luego de la adición de un reactivo valorado. El potencial de un electrodo indicador adecuado puede emplearse cómodamente para determinar el punto de equivalencia en una titulación. Una valoración potenciométrica proporciona información diferente que la de una medida potenciométrica directa [48].

El punto final potenciométrico es ampliamente aplicable y proporciona datos inherentemente más exactos que el método correspondiente que utilice indicadores. Es particularmente útil para las valoraciones de sustancias coloreadas o turbias y para detectar la presencia de especies insospechadas en disolución.

### Determinación gráfica del punto final en titulaciones potenciométricas

En las titulaciones potenciométricas se construyen curvas del tipo  $E = f(V)$ , o sea, potencial registrado (medido en mV) en función del volumen de titulante agregado (en mL). Se requiere entonces encontrar el punto final de la titulación, con el fin de poder calcular la concentración de una muestra incógnita.

Existen diversos métodos gráficos para determinar el punto final de una titulación potenciométrica: método de la bisección, de las tangentes paralelas, del ajuste del círculo, etc. [52]

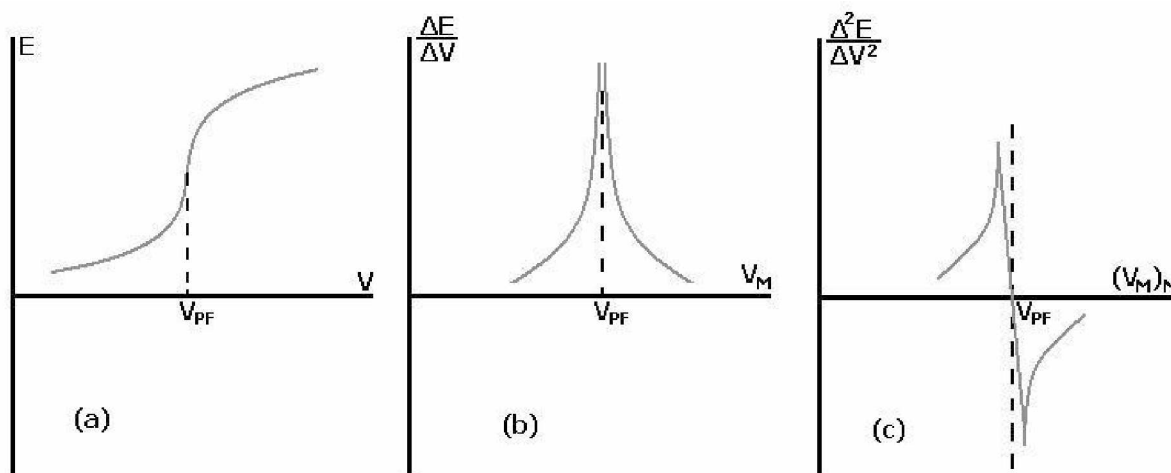
El **método de la primera derivada** resulta más laborioso que los anteriores, pero si se procede correctamente se puede determinar con exactitud el punto final de la titulación. Para ello, luego de obtener los valores de  $E$  (mV) y  $V$  (mL) se traza la gráfica correspondiente  $E = f(V)$  (ver Figura IV-5a), descartándose los valores dudosos según el criterio de rechazo adoptado. Se construye luego una tabla de seis columnas (Tabla IV-1) en la que se anotan:

- $E$ , potencial en mV
- $V$ , volumen en mL
- $\Delta E$ , incremento del potencial, se obtiene realizando las diferencias entre dos valores consecutivos de  $E$ ;
- $\Delta V$ , incremento del volumen, se obtiene realizando las diferencias entre dos valores consecutivos de  $V$ ;
- $\Delta E/\Delta V$ , primera derivada
- $V_M$ , volumen correspondiente a  $\Delta E/\Delta V$ , calculado como valor medio entre los volúmenes  $V_i$  y  $V_{i+1}$

Se construye la gráfica  $\Delta E/\Delta V = f(V_M)$  (ver Figura IV-5b). El punto correspondiente a la asíntota de ambos tramos de la curva, da origen al punto final.

$E$ [mV]	$V$ [mL]	$\Delta E = E_{i+1} - E_i$	$\Delta V = V_{i+1} - V_i$	$\Delta E/\Delta V = \Delta E_i/\Delta V_i$	$V_M = (V_i + V_{i+1})/2$
$E_1$	$V_1$	$\Delta E_1 = E_2 - E_1$	$\Delta V_1 = V_2 - V_1$	$(\Delta E/\Delta V)_1 = \Delta E_1/\Delta V_1$	$V_{M1} = (V_1 + V_2)/2$
$E_2$	$V_2$	$\Delta E_2 = E_3 - E_2$	$\Delta V_2 = V_3 - V_2$	$(\Delta E/\Delta V)_2 = \Delta E_2/\Delta V_2$	$V_{M2} = (V_2 + V_3)/2$
$E_3$	$V_3$	...	...	...	...

**TABLA IV-1.** Tabla de datos necesaria para la construcción de la curva de titulación  $E = f(V)$  y para la curva correspondiente al método de la primera derivada  $\Delta E/\Delta V = f(V_M)$ .



**FIGURA IV-5.** (a) Curva de titulación, gráfica de  $E = f(V)$ .  
 (b) Método de la primera derivada, gráfica de  $\Delta E/\Delta V = f(V_M)$   
 (c) Método de la segunda derivada, gráfica de  $\Delta^2 E/\Delta V^2 = f[(V_M)_M]$



Para proceder con el **método de la segunda derivada** es necesario que los incrementos de los volúmenes en las proximidades del punto de inflexión sean iguales y pequeños.

Para graficar debemos calcular y tabular los siguientes datos (Tabla IV-2):

- variación de  $\Delta E/\Delta V$ , realizando la diferencia entre dos valores consecutivos;
- variación de del volumen medio,  $\Delta V_M$ , mediante la diferencia entre dos valores consecutivos;
- $\Delta^2 E/\Delta V^2$ , realizando el correspondiente cociente entre  $\Delta E/\Delta V$  y  $\Delta V_M$ ;
- $(V_M)_M$ , promedio de dos valores consecutivos de  $V_M$ .

E [mV]	V [mL]	$\Delta E$	$\Delta V$	$\Delta E/\Delta V$	$V_M$	$\Delta(\Delta E/\Delta V)$	$\Delta V_M$	$\Delta^2 E/\Delta V^2$	$(V_M)_M$
E <sub>1</sub>	V <sub>1</sub>	$\Delta E_1$	$\Delta V_1$	$(\Delta E/\Delta V)_1$	V <sub>M1</sub>	$(\Delta E/\Delta V)_2 - (\Delta E/\Delta V)_1$	V <sub>M2</sub> - V <sub>M1</sub>	$\frac{(\Delta E/\Delta V)_2 - (\Delta E/\Delta V)_1}{V_{M2} - V_{M1}}$	$(V_M)_{M1} = (V_{M1} + V_{M2})/2$
E <sub>2</sub>	V <sub>2</sub>	$\Delta E_2$	$\Delta V_2$	$(\Delta E/\Delta V)_2$	V <sub>M2</sub>	$(\Delta E/\Delta V)_3 - (\Delta E/\Delta V)_2$	V <sub>M3</sub> - V <sub>M2</sub>	$\frac{(\Delta E/\Delta V)_3 - (\Delta E/\Delta V)_2}{V_{M3} - V_{M2}}$	$(V_M)_{M2} = (V_{M2} + V_{M3})/2$
E <sub>3</sub>	V <sub>3</sub>	$\Delta E_3$	$\Delta V_3$	$(\Delta E/\Delta V)_3$	V <sub>M3</sub>	...	...	...	...
E <sub>4</sub>	V <sub>4</sub>	...	...	...	...	...	...	...	...

**TABLA IV-2.** Tabla de datos necesaria para la construcción de la curva correspondiente al método de la segunda derivada  $\Delta^2 E/\Delta V^2 = f[(V_M)_M]$ .

Se construye la gráfica  $\Delta^2 E/\Delta V^2 = f(V_M)_M$  (Figura IV-5c). Donde la curva toma valor cero (cortando el eje de volúmenes) se obtiene el punto final,  $V_{PF}$ .

## **ANEXO V: Tablas de datos**

**V.1.-** Datos obtenidos en la valoración de la solución titulante de hidróxido de amonio utilizada.

<b>V<sub>NH<sub>4</sub>OH</sub> [mL]</b>	<b>1. pH</b>	<b>2. pH</b>
0	3,68	3,64
1	3,96	3,9
2	4,2	4,14
3	4,35	4,35
4	4,52	4,52
5	4,68	4,68
6	4,83	4,85
7	4,98	4,98
8	5,13	5,16
9	5,3	5,34
10	5,48	5,55
11	5,7	5,81
12	6,02	6,27
<b>13</b>	<b>6,67</b>	<b>7,45</b>
14	7,93	8,25
15	8,4	8,49
16	8,6	8,68
17	8,75	8,8
18	8,87	8,9
19	8,95	8,99
20	9,03	9,06

**TABLA V-1.** Valoración de NH<sub>4</sub>OH a partir de 64,0 mg de bitalato de potasio (PM 204,22). El punto final se determinó potenciométricamente utilizando el método de la primera derivada de la curva de valoración.

**V.2.-** Cálculo de la masa promedio de un comprimido (n = 12)

<b>#</b>	<b>Masa [mg]</b>
1	736
2	763
3	750
4	771
5	765
6	761
7	755
8	753
9	738
10	750
11	758
12	751
13	756
14	760
15	749
16	771
17	765
18	748
19	751
20	759
<b>X<sub>M</sub></b>	<b>755,5</b>
<b>SD</b>	<b>8,60</b>
<b>CV%</b>	<b>1,138</b>

**TABLA V-2.** Masa promedio de un comprimido de ciprofloxacina.

**V.3.-** Datos correspondientes a las Figuras 2-1, 2-2 y 2-3.

$V_{\text{NH}_4\text{OH}}$ [mL]	pH	$V_M$ [mL]	$\Delta\text{pH}/\Delta V$	$(V_M)_M$ [mL]	$\Delta^2\text{pH}/\Delta V^2$
0,0	3,89	0,50	1,19	1,000	-1,349
1,0	5,08	1,50	0,01	1,875	0,368
2,0	5,09	2,25	0,24	2,500	0,235
2,5	5,21	2,75	0,34	2,925	0,945
3,0	5,38	3,10	0,60	3,200	-0,500
3,2	5,50	3,30	0,50	3,400	0,400
3,4	5,60	3,50	0,58	3,600	-0,050
3,6	5,70	3,70	0,55	3,800	0,500
3,8	5,81	3,90	0,65	4,000	0,800
4,0	5,97	4,10	0,75	4,200	3,750
4,2	6,12	4,30	1,50	4,400	6,600
4,4	6,42	4,50	2,82	4,600	-0,100
4,6	6,99	4,70	2,80	4,800	-5,000
4,8	7,55	4,90	1,80	5,000	-4,000
5,0	7,91	5,10	1,00	5,200	-1,250
5,2	8,11	5,30	0,75	5,400	-0,750
5,4	8,26	5,50	0,60	5,600	-0,500
5,6	8,38	5,70	0,50	5,800	-0,364
5,8	8,45	5,90	0,40	6,075	-0,282
6,0	8,53	6,25	0,28	6,500	-0,032
6,5	8,67	6,75	0,26	7,125	0,014
7,0	8,80	7,50	0,16		
8,0	8,96				

**TABLA V-3.** Datos correspondientes a las Figuras 2-1, 2-2 y 2-3. Titulación de 40 mL de solución de ciprofloxacina con una solución titulante de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,0241 N.

V.4.- Datos correspondientes a la Figura 3-2.

t [min]	L ( $\mu$ S)							%Disolución
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>medio</sub>	
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	5,6	5,5	5,7	5,5	5,7	5,5	5,6	3,7
2	13,2	13,5	13,4	13,4	13,3	13,3	13,4	8,8
3	22,0	22,1	22,0	22,1	22,2	22,1	22,1	14,6
4	34,1	34,2	33,9	34,0	34,0	33,9	34,0	22,4
5	41,9	42,0	42,0	41,9	41,8	41,9	41,9	27,6
6	52,7	52,6	52,8	52,6	52,5	52,7	52,7	34,7
7	61,3	61,4	61,6	61,5	61,4	61,4	61,4	40,5
8	69,2	69,0	69,3	69,4	69,1	69,2	69,2	45,6
9	80,9	81,0	81,1	80,8	80,7	80,8	80,9	53,3
10	92,7	92,9	93,0	92,9	92,8	92,9	92,9	61,2
11	100,5	100,7	100,8	100,7	100,6	100,6	100,7	66,4
12	109,4	109,3	109,2	109,5	109,4	109,6	109,4	72,1
13	117,6	117,5	117,6	117,7	117,8	117,8	117,7	77,6
14	123,3	123,4	123,2	123,3	123,5	123,5	123,4	81,3
15	128,2	128,1	127,9	127,8	128,1	128,0	128,0	84,4
16	132,1	132,0	132,2	131,8	131,7	132,2	132,0	87,0
17	135,0	135,2	135,0	135,5	135,4	135,2	135,2	89,1
18	137,6	137,8	137,5	137,5	137,8	137,8	137,7	90,8
19	139,1	139,4	139,4	139,8	139,7	139,3	139,5	92,0
20	141,5	141,5	141,8	141,6	141,8	141,8	141,7	93,4
21	143,0	143,2	143,5	143,5	143,5	143,2	143,3	94,5
22	144,8	145,0	144,8	144,9	145,1	145,0	144,9	95,5
23	146,5	146,5	146,6	146,3	146,3	146,3	146,4	96,5
24	148,8	148,8	149,0	149,0	149,0	149,0	149,0	98,2
25	150,0	150,0	149,7	149,6	149,7	149,9	149,8	98,7
26	151,2	151,0	151,0	151,1	151,1	151,2	151,1	99,6
27	151,2	151,2	151,3	151,1	151,1	151,2	151,2	99,7
28	151,2	151,3	151,4	151,2	151,2	151,3	151,3	99,7
29	151,4	151,6	151,7	151,5	151,5	151,6	151,6	99,9
30	151,6	151,8	151,9	151,5	151,5	151,6	151,7	100,0

**TABLA V-4.** Cinética de disolución de comprimidos de ciprofloxacina elaborados por PLAMECOR. Método conductimétrico.

t [min]	A (276nm)							% Disolución
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>medio</sub>	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,0
3	0,180	0,177	0,179	0,176	0,179	0,177	0,178	16,9
6	0,375	0,376	0,375	0,378	0,378	0,378	0,377	35,7
9	0,536	0,535	0,538	0,538	0,537	0,537	0,537	50,9
12	0,751	0,751	0,750	0,753	0,753	0,752	0,752	71,3
15	0,911	0,911	0,910	0,910	0,909	0,908	0,910	86,3
18	0,952	0,949	0,948	0,949	0,951	0,951	0,950	90,0
21	1,000	0,994	0,990	0,990	0,994	1,000	0,995	94,3
24	1,008	1,007	1,010	1,011	1,011	1,009	1,009	95,6
27	1,029	1,033	1,032	1,029	1,029	1,032	1,031	97,7
30	1,056	1,056	1,055	1,052	1,053	1,056	1,055	100,0

**TABLA V-5.** Cinética de disolución de comprimidos de ciprofloxacina elaborados por PLAMECOR. Método espectrofotométrico.

**V.5.-** Datos correspondientes a la Figura 3-3.

t [min]	L ( $\mu$ S)						X <sub>medio</sub>	% Disolución
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>		
<b>0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<b>0,0</b>
<b>1</b>	3,9	3,9	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	<b>2,6</b>
<b>2</b>	13,1	12,9	12,9	12,9	13,1	13,1	13,0	<b>8,4</b>
<b>3</b>	28,1	27,8	27,9	27,9	28,1	28,1	28,0	<b>18,1</b>
<b>4</b>	41,0	41,0	41,2	40,9	40,9	41,0	41,0	<b>26,4</b>
<b>5</b>	60,0	59,7	59,8	59,8	59,8	59,7	59,8	<b>38,6</b>
<b>6</b>	82,7	82,6	82,8	82,6	82,5	82,7	82,7	<b>53,3</b>
<b>7</b>	96,3	96,4	96,6	96,5	96,4	96,4	96,4	<b>62,2</b>
<b>8</b>	107,5	107,5	107,6	107,7	107,8	107,6	107,6	<b>69,4</b>
<b>9</b>	113,4	113,4	113,5	113,5	113,6	113,5	113,5	<b>73,2</b>
<b>10</b>	117,2	117,5	117,5	117,3	117,5	117,5	117,4	<b>75,7</b>
<b>11</b>	120,5	120,7	120,8	120,7	120,6	120,6	120,7	<b>77,8</b>
<b>12</b>	123,5	123,6	123,6	123,8	123,8	123,6	123,7	<b>79,8</b>
<b>13</b>	126,7	126,5	126,6	126,7	126,8	126,8	126,7	<b>81,7</b>
<b>14</b>	129,3	129,5	129,5	129,5	129,4	129,6	129,5	<b>83,5</b>
<b>15</b>	132,2	132,1	131,9	131,8	132,1	132,0	132,0	<b>85,1</b>
<b>16</b>	134,0	134,0	133,8	133,9	133,7	133,7	133,9	<b>86,3</b>
<b>17</b>	135,8	136,0	136,1	135,7	135,9	136,0	135,9	<b>87,6</b>
<b>18</b>	137,9	137,7	137,5	137,8	137,7	138,0	137,8	<b>88,8</b>
<b>19</b>	139,5	139,7	139,7	139,8	139,7	139,6	139,7	<b>90,1</b>
<b>20</b>	141,7	141,6	141,7	141,8	141,9	141,8	141,8	<b>91,4</b>
<b>21</b>	143,5	143,8	143,5	143,5	143,5	143,7	143,6	<b>92,6</b>
<b>22</b>	145,6	145,9	145,6	145,9	145,8	145,9	145,8	<b>94,0</b>
<b>23</b>	147,5	147,4	147,7	147,5	147,6	147,5	147,5	<b>95,1</b>
<b>24</b>	149,0	148,8	149,0	148,7	149,0	149,0	148,9	<b>96,0</b>
<b>25</b>	150,5	150,4	150,2	150,6	150,5	150,4	150,4	<b>97,0</b>
<b>26</b>	151,5	151,6	151,6	151,5	151,7	151,6	151,6	<b>97,7</b>
<b>27</b>	152,6	152,6	152,5	152,7	152,6	152,5	152,6	<b>98,4</b>
<b>28</b>	153,6	153,5	153,7	153,6	153,6	153,6	153,6	<b>99,0</b>
<b>29</b>	154,4	154,6	154,5	154,5	154,5	154,5	154,5	<b>99,6</b>
<b>30</b>	155,2	155,0	155,2	154,9	154,9	155,1	155,1	<b>100,0</b>

**TABLA V-6.** Cinética de disolución de comprimidos comerciales de ciprofloxacina. Método conductimétrico.

t [min]	A (276nm)						X <sub>medio</sub>	% Disolución
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>		
<b>0</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	<b>0,0</b>
<b>3</b>	0,220	0,221	0,218	0,217	0,216	0,219	0,219	<b>20,9</b>
<b>6</b>	0,552	0,549	0,549	0,548	0,550	0,550	0,550	<b>52,6</b>
<b>9</b>	0,734	0,738	0,736	0,736	0,734	0,734	0,735	<b>70,3</b>
<b>12</b>	0,851	0,852	0,846	0,847	0,850	0,852	0,850	<b>81,3</b>
<b>15</b>	0,885	0,884	0,881	0,889	0,887	0,887	0,886	<b>84,7</b>
<b>18</b>	0,920	0,925	0,921	0,927	0,927	0,924	0,924	<b>88,3</b>
<b>21</b>	0,968	0,980	0,968	0,967	0,966	0,969	0,970	<b>92,7</b>
<b>24</b>	0,999	0,987	0,988	0,992	0,991	0,987	0,991	<b>94,7</b>
<b>27</b>	1,015	1,016	1,019	1,019	1,020	1,018	1,018	<b>97,3</b>
<b>30</b>	1,046	1,046	1,045	1,042	1,046	1,048	1,046	<b>100,0</b>

**TABLA V-7.** Cinética de disolución de comprimidos comerciales de ciprofloxacina. Método espectrofotométrico.

**V.6.-** Datos correspondientes a la Figura 3-4.

t [min]	% Disolución METODO CONDUCTIMETRICO	% Disolución METODO DE REFERENCIA
0	0,0	0,0
3	14,6	16,9
6	34,7	35,7
9	53,3	50,9
12	72,1	71,3
15	84,4	86,3
18	90,8	90,0
21	94,5	94,3
24	98,2	95,6
27	99,7	97,7
30	100,0	100,0

**TABLA V-8.** Datos correspondientes a la Figura. Comparación entre el Método. Conductimétrico y de referencia para la determinación del perfil de disolución de comprimidos de ciprofloxacina elaborados por PLAMECOR.

**V.7.-** Análisis de varianza para los datos de la Figura 3-4 obtenido mediante la planilla de cálculo Microsoft Excel®.

<b>Estadísticas de la regresión</b>	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99915873
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0,99831817
R <sup>2</sup> ajustado	0,9981313
Error típico	1,57332498
Observaciones	11

**TABLA V-9.** Datos correspondientes a la estadística de la regresión.

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	13224,0982	13224,0982	5342,31127	8,4937.10 <sup>-14</sup>
Residuos	9	22,2781635	2,4753515		
Total	10	13246,3764			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepto	-0,90352656	1,04900548	-0,86131729	0,41142264	-3,27654182	1,4694887
Variable X 1	1,01832786	0,01393231	73,0911162	8,4937E-14	0,98681079	1,04984493

**TABLA V-10.** Datos correspondientes al análisis de varianza.

**V.8.-** Datos correspondientes a la Figura 4-1.

$V_{\text{NH}_4\text{OH}}$ [mL]	$\text{pH}_{\text{excip}}$	$\text{pH}_{\text{agua}}$	$\text{pH}_{\text{excip}} - \text{pH}_{\text{agua}}$
0	4,52	3,20	1,32
1	8,54	8,32	0,21
2	8,93	8,77	0,16
3	9,12	8,95	0,18
4	9,24	9,07	0,17
5	9,32	9,16	0,16
6	9,39	9,23	0,16
7	9,43	9,28	0,15
8	9,48	9,32	0,16
9	9,52	9,36	0,16
10	9,54	9,39	0,15
11	9,57	9,42	0,15
12	9,60	9,44	0,16
13	9,62	9,47	0,16
14	9,64	9,49	0,15
15	9,65	9,51	0,14

**TABLA V-11.** Datos correspondientes a las Figuras 4-1.  
Ensayo de especificidad del método potenciométrico.

**V.9.-** Datos correspondientes a la Figura 4-2.

Conc. sol. std. de ciprofloxacina [mg/mL]	Alicuota de sol. std. de ciprofloxacina [mL]	$M_{\text{ciprofloxacina}}$ añadida [mg]	$M_{\text{ciprofloxacina}}$ añadida [mmol]	$V_{\text{NH}_4\text{OH}}$ consumido [mL]	$M_{\text{NH}_4\text{OH}}$ consumido [mmol]
0,7	0	0,0	0,0000	0,00	0,0000
0,7	45	31,5	0,0951	3,50	0,0973
0,7	60	42,0	0,1268	4,50	0,1251
0,7	65	45,5	0,1373	5,00	0,1390
0,7	73	51,1	0,1542	5,50	0,1529
0,7	51	35,7	0,1077	3,75	0,1043
0,7	94	65,8	0,1986	7,00	0,1946
1,0	0	0,0	0,0000	0,00	0,0000
1,0	30	30,0	0,0905	3,25	0,0904
1,0	40	40,0	0,1207	4,50	0,1251
1,0	50	50,0	0,1509	5,50	0,1529
1,0	56	56,0	0,1690	6,00	0,1668
1,0	41	41,0	0,1237	4,50	0,1251
1,0	36	36,0	0,1086	4,00	0,1112
1,5	0	0,0	0,0000	0,00	0,0000
1,5	30	45,0	0,1358	5,00	0,1390
1,5	40	60,0	0,1811	6,25	0,1738
1,5	50	75,0	0,2263	7,50	0,2085
1,5	24	36,0	0,1086	3,75	0,1043
1,5	34	51,0	0,1539	5,25	0,1460
1,5	44	66,0	0,1992	7,00	0,1946

**TABLA V-12.** Datos correspondientes a las Figuras 4-2. Titulación de distintas alícuotas de soluciones de distintas concentraciones de ciprofloxacina utilizando  $\text{NH}_3$  0,0278M .

**V.10.-** Cálculo del estadístico  $s_{y/x}$  para estimación del Límite de detección y de cuantificación del método potenciométrico.

$C_{\text{cipro}}$ [mg/mL]	mmol cipro ( $x_i$ )	mmol $\text{NH}_4\text{OH}$ utilizado ( $y_i$ )	mmol $\text{NH}_4\text{OH}$ según regresión ( $\hat{y}_i$ )	Residuo de y ( $y_i - \hat{y}_i$ )	( $y_i - \hat{y}_i$ ) <sup>2</sup>
0,7	0,0000	0,0000	0,0032	-0,0032	1,0240.10 <sup>-5</sup>
0,7	0,0951	0,0973	0,0944	0,0029	8,2111.10 <sup>-6</sup>
0,7	0,1268	0,1251	0,1248	0,0003	6,4519.10 <sup>-8</sup>
0,7	0,1373	0,1390	0,1350	0,0040	1,6135.10 <sup>-5</sup>
0,7	0,1542	0,1529	0,1512	0,0017	2,8811.10 <sup>-6</sup>
0,7	0,1077	0,1043	0,1066	-0,0023	5,5182.10 <sup>-6</sup>
0,7	0,1986	0,1946	0,1938	0,0008	6,7450.10 <sup>-7</sup>
1,0	0,0000	0,0000	0,0032	-0,0032	1,0240.10 <sup>-5</sup>
1,0	0,0905	0,0904	0,0901	0,0003	6,7602.10 <sup>-8</sup>
1,0	0,1207	0,1251	0,1191	0,0060	3,6562.10 <sup>-5</sup>
1,0	0,1509	0,1529	0,1480	0,0049	2,3847.10 <sup>-5</sup>
1,0	0,1690	0,1668	0,1654	0,0014	1,9750.10 <sup>-6</sup>
1,0	0,1237	0,1251	0,1219	0,0032	9,9246.10 <sup>-6</sup>
1,0	0,1086	0,1112	0,1075	0,0037	1,3928.10 <sup>-5</sup>
1,5	0,0000	0,0000	0,0032	-0,0032	1,0240.10 <sup>-5</sup>
1,5	0,1358	0,1390	0,1335	0,0055	2,9866.10 <sup>-5</sup>
1,5	0,1811	0,1738	0,1770	-0,0032	1,0433.10 <sup>-5</sup>
1,5	0,2263	0,2085	0,2204	-0,0119	1,4221.10 <sup>-4</sup>
1,5	0,1086	0,1043	0,1075	-0,0032	1,0355.10 <sup>-5</sup>
1,5	0,1539	0,1460	0,1509	-0,0050	2,4631.10 <sup>-5</sup>
1,5	0,1992	0,1946	0,1944	0,0002	5,8569.10 <sup>-8</sup>
$\Sigma(y_i - \hat{y}_i)^2$					3,680587.10 <sup>-4</sup>
$S_{y/x}$					0,0044

**TABLA V-13.** Cálculo del estadístico  $s_{y/x}$ .

**V.10.-** Resultados obtenidos para análisis de soluciones de pool de comprimidos utilizando el método de referencia.

Corrida	SEÑAL	$C_{\text{muestra}}$ [mg/mL]	$M_{\text{cipro/comp}}$ [mg]	$X_{\text{media}}$ [mg]	S [mg]	CV%
std	1,505	0,50	-	502,75	0,56	0,11
1	1,358	0,46	502,87			
2	1,355	0,46	501,76			
3	1,359	0,46	503,24			
4	1,357	0,46	502,50			
5	1,358	0,46	502,87			
6	1,359	0,46	503,24			

**TABLA V-14.** Resultados del método de referencia, HPLC-UV.

**V.11.-** Datos utilizados en la Tabla 4-4 para la comparación entre el método propuesto y el de referencia.

$M_{\text{cipro/comp}}$ [mg] METODO POTENCIOMETRICO	$M_{\text{cipro/comp}}$ [mg] METODO DE REFERENCIA
500,83	501,76
500,83	502,50
502,67	502,87
502,67	502,87
503,16	503,24
503,16	503,24

**TABLA V-15.** Valores utilizados para calcular los parámetros estadísticos (t y F) en la Tabla



**V.12.-** Resultados del *test F* y *t* realizando utilizando la planilla de cálculo Microsoft Excel®.

	<b>Variable 1</b>	<b>Variable 2</b>
Media	502,22	502,75
Varianza	1,207	0,310
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	3,8906	
P(F<=f) una cola	0,0811	
Valor crítico para F (una cola)	5,0503	

**TABLA V-16.** Prueba F para varianzas de dos muestras

	<b>Variable 1</b>	<b>Variable 2</b>
Media	502,75	502,22
Varianza	0,310	1,207
Observaciones	6	6
Varianza agrupada	0,759	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	1,0472	
P(T<=t) una cola	0,1598	
Valor crítico de t (una cola)	1,8125	
P(T<=t) dos colas	0,3197	
Valor crítico de t (dos colas)	2,2281	

**TABLA V-17.** Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

**V.13.-** Tablas utilizadas para los test  $t$  y  $F$  de dos colas.

		$\nu_1$													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	
$\nu_2$	1	647,8	799,5	864,2	899,6	921,1	937,1	948,2	956,7	963,3	968,6	976,7	984,9	993,1	
	2	38,51	39,00	39,17	39,25	39,30	39,33	39,36	39,37	39,39	39,40	39,41	39,43	39,45	
	3	17,44	16,04	15,44	15,10	14,88	14,73	14,62	14,54	14,47	14,42	14,34	14,25	14,17	
	4	12,22	10,65	9,979	9,605	9,364	9,197	9,074	8,980	8,905	8,844	8,751	8,657	8,56	
	5	10,01	8,434	7,764	7,388	7,146	6,978	6,853	6,757	6,681	6,619	6,525	6,428	6,329	
	6	8,813	7,260	6,599	6,227	5,988	5,820	5,695	5,600	5,523	5,461	5,366	5,269	5,168	
	7	8,073	6,542	5,890	5,523	5,285	5,119	4,995	4,899	4,823	4,761	4,666	4,568	4,467	
	8	7,571	6,059	5,416	5,053	4,817	4,652	4,529	4,433	4,357	4,295	4,200	4,101	3,999	
	9	7,209	5,715	5,078	4,718	4,484	4,320	4,197	4,102	4,026	3,964	3,868	3,769	3,667	
	10	6,937	5,456	4,826	4,468	4,236	4,072	3,950	3,855	3,779	3,717	3,621	3,522	3,419	
	11	6,724	5,256	4,630	4,275	4,044	3,881	3,759	3,664	3,588	3,526	3,430	3,330	3,226	
	12	6,554	5,096	4,474	4,121	3,891	3,728	3,607	3,512	3,436	3,374	3,277	3,177	3,073	
	13	6,414	4,965	4,347	3,996	3,767	3,604	3,483	3,388	3,312	3,250	3,153	3,053	2,948	
	14	6,298	4,857	4,242	3,892	3,663	3,501	3,380	3,285	3,209	3,147	3,050	2,949	2,844	
	15	6,200	4,765	4,153	3,804	3,576	3,415	3,293	3,199	3,123	3,060	2,963	2,862	2,756	
	16	6,115	4,687	4,077	3,729	3,502	3,341	3,219	3,125	3,049	2,986	2,889	2,788	2,681	
	17	6,042	4,619	4,011	3,665	3,438	3,277	3,156	3,061	2,985	2,922	2,825	2,723	2,616	
	18	5,978	4,560	3,954	3,608	3,382	3,221	3,100	3,005	2,929	2,866	2,769	2,667	2,559	
	19	5,922	4,508	3,903	3,559	3,333	3,172	3,051	2,956	2,880	2,817	2,720	2,617	2,509	
	20	5,871	4,461	3,859	3,515	3,289	3,128	3,007	2,913	2,837	2,774	2,676	2,573	2,464	

**TABLA V-18.** Valores críticos de  $F$  para un contraste de dos colas ( $P = 0,05$ ).  
 $\nu_1$  = número de grados de libertad del numerador, y  $\nu_2$  = número de grados de libertad del denominador.

Valor de $t$ para un intervalo de confianza de	90%	95%	98%	99%
Valor crítico de $ t $ para valores de $P$ de numero de grados de libertad	0,1	0,05	0,02	0,01
Numero de grados de libertad				
1	6,31	12,71	31,82	63,66
2	2,92	4,30	6,96	9,92
3	2,35	4,18	4,54	5,84
4	2,13	2,78	3,75	4,60
5	2,02	2,57	3,36	4,03
6	1,94	2,45	3,14	3,71
7	1,89	2,36	3,00	3,50
8	1,86	2,31	2,90	3,36
9	1,83	2,26	2,82	3,25
10	1,81	2,23	2,76	3,17
12	1,78	2,18	2,68	3,05
14	1,76	2,14	2,62	2,98
16	1,75	2,12	2,58	2,92
18	1,73	2,10	2,55	2,88
20	1,72	2,09	2,53	2,85
30	1,70	2,04	2,46	2,75
50	1,68	2,01	2,40	2,68
$\infty$	1,64	1,96	2,33	2,58

**TABLA V-19.** La distribución de  $t$ . Los valores críticos de  $|t|$  son adecuados para un contraste de *dos* colas. Para un contraste de *una* cola el valor se toma de la columna para *dos veces* el valor de  $P$  deseado, es decir, para un contraste de una sola cola,  $P = 0,05$ ; 5 grados de libertad, el valor crítico se lee de la columna  $P = 0,10$  y es igual a 2,02.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] A. Boix Montañés, M.T. Barrera Puigdollers, Sustitución y Selección de Equivalentes Terapéuticos. *Farm. Hosp.*, 20 (6), p. 351-358, 1996.
- [2] *Drug Safety*, 25(7), p.485-87, 2002.
- [3] J. Recasens y J.M. Suñé Negre, *Tecnología Farmacéutica*. Madrid España, 1991.
- [4] *Farmacopea Nacional Argentina*. 7ma. Edición, 2007.
- [5] *United States Pharmacopeia XXV*, National Formulary XX, US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2002.
- [6] *European Pharmacopeia*, 6ta Edición, EDQM, Council of Europe, 2007
- [7] K.P.R. Chowdary; G.D. Rao; Spectrophotometric Method for the Determination of Lomefloxacin Hydrochloride. *Indian Drugs*, Mumbai, v.34, p.107-108, 1997.
- [8] S.K. Bhowal; T.K. Das; Spectrophotometric Determination of Some Recently Introduced Antibacterial Drugs Using Ferric Chloride. *Anal. Lett.*, New York, .24, p.25-37, 1991.
- [9] L. Fratini, E.E.S. Schapoval. Ciprofloxacin Determination by Visible Light Spectrophotometry Using Iron(III) Nitrate. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.127, p.279-282, 1996.
- [10] R.L. Liu, J.R. Xu, Y.G. Liu y Z. Yao. Studies on Methods for Determination of Ciprofloxacin Hydrochloride, *Yaowu Fenxi Zazhi* 14, 45-6, 1994.
- [11] K. Basavaiah, P. Nagegowda, B.C. Somashekar y V. Ramakrishna, Spectrophotometric and Titrimetric Determination of Ciprofloxacin Based on Reaction with Cerium (IV) Sulphate. *Science Asia* 32, p.403-409, 2006.
- [12] S.F. Zhang, Z.X. Sun y X.L. Sun, Determination of Ciprofloxacin Lactate in Injections by Acid Dye Biphasic Titration, *Yaowu Fenxi Zazhi* 16, p.402, 1996.
- [13] H. Avsec y S. Gomiscek, Study of the Prospects for a Ciprofloxacin PVC-Coated Wire Ion-Selective Electrode on Quinolin-4-ones, *Anal Chim Acta* 268, 1992.
- [14] A.M. Abulkibash, S.M. Sultan, A.M. Al-Olyan, S.M. Al-Ghannam, Differential Electrolytic Potentiometric Titration Method for the Determination of Ciprofloxacin in Drug Formulations. *Talanta*, 61, p.239-244, 2003.
- [15] C.L. Flurer, Analysis of Antibiotics by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis*, Weinheim, v.18, p.2427-2437, 1997.
- [16] S.W. Sun, L.Y. Chen, Optimization of Capillary Electrophoretic Separation of Quinolones Antibacterials Using the Overlapping Resolution Mapping Scheme. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.766, p.215-224, 1997.
- [17] C. Mazuel, Norfloxacin. *Anal. Profiles Drug Subst. Excipients*, San Diego, v.20, p.557-600, 1991.
- [18] A. Marzo, L. Dal Bo, Chromatography as an Analytical Tool for Selected Antibiotic Classes: a Reappraisal Addressed to Pharmacokinetic Applications. *J. Chromatogr.* Amsterdam, v.812, p.17-34, 2002.
- [19] S.O. Thoppil, P.D. Amin, Stability Indicating Reversed Phase Liquid Chromatographic Determination of Ciprofloxacin as Bulk Drug and in Pharmaceutical Formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Amsterdam, v.22, p.699-703, 2000.
- [20] G. Tobaruela Martínez, P. O. Henara, C.F. Modamio Charles, *Tecnología Farmacéutica*; Actas VI Congreso SEFIG y 3º Jornadas TF. Barcelona (España), 2004.
- [21] J. Recasens, J.M. Suñé Negre, *Tecnología Farmacéutica*. Madrid, 1991.
- [22] P. Perez Lozano, E. García Montoya, A.O. Reig, *Biofarmacia y Farmacocinética*, p.365-368. Actas VI Congreso SEFIG y 3º Jornadas TF. Barcelona (España), 2004.
- [23] I. Caraballo, J. Alvarez Fuentes, L.M. Melgoza, M. Millán, M.A. Holgado, A.M. Rabasco y M. Fernández Arévalo. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol 18, 1998.
- [24] P. Lorenzo, P. A. Moreno, J.C. Leza, I. Lizasoain y M.A. Moro, *Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Médica Panamericana, 2005.
- [25] M.S. Byron Nuñez, R. Salazar Irigoyen, *Uso Racional de Antibióticos*, Línea Antibiótica, Bristol-Myers Squibb, p.19-25, 2007.
- [26] J. Bertino, D. Fish. Safety Profiles of the Fluoroquinolones. *Clin. Ther.*, Hillsborough, v.22, p.798-817, 2000.
- [27] J.A.H. Arteseros, J. Barbosa, R. Compano, M.D. Prat. Analysis of Quinolone Residues in Edible Animal Products. *J. Chromatogr.* Amsterdam, v.945, p.1-24, 2002.
- [28] V.F. Samanidou, E.A. Christodolou, I.N. Papadoyannis; Determination of Fluoroquinolones in Edible Animal Tissue Samples by High Performance Liquid Chromatography After Solid Phase Extraction. *J. Sep. Sci.*, Weinheim, v. 28, p.555-565, 2005.

- [29] V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis; C.E. Demetriou; Direct Determination of Four Fluoroquinolones, Enoxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, and Ciprofloxacin, in Pharmaceuticals and Blood Serum by HPLC. *Anal. Bioanal. Chem.*, Heidelberg, v.375, p.623-629, 2003.
- [30] D.L. Ross, C.M. Riley; *International Journal of Pharmaceutics*, 83, p.267, 1992.
- [31] J.N. Miller y J.C. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4ta. Edición, Ed. Pearson, Madrid (España), 2002.
- [32] A.C. Olivieri y H.C. Goicoechea, *La Calibración en Química Analítica*, Ed. UNL, Santa Fe (Argentina), 2007.
- [33] F.M. Garfield, E. Klesta y J. Hirsch, *Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories*, 3ra. Edición, AOAC International, 2000.
- [34] J.M. Green, *A Practical Guide to Analytical Method Validation*, *Anal. Chem.*, 68, 305A, 1996.
- [35] H. Fabre y K.D. Altria, *Key Points for Validating CE Methods, Particularly in Pharmaceutical Analysis*, *LC-GC*, 19, 498, 2001.
- [36] L. Long y J.D. Winefordner, *Limit of Detection*, *Anal. Chem.*, 55, 713A, 1983.
- [37] W.R. Porter, *Proper Statical Evaluation of Calibration Data*, *Anal. Chem.*, 55, 1290A, 1983.
- [38] M.E. Zorn, R.D. Gibbon y W.C. Sonzooni, *Evaluation of Aproximate Methods for Calculatig the Limits of Detection and Limit of Quantitation*, *Environ. Sci. Technol.*, 33, 2291, 1999.
- [39] A.C. Calpena, E. Escribano, C. Fernández; *Validación de los Métodos Analíticos*. *Farm. Clin.*, 7(9), p.749-758, 1991.
- [40] British Pharmacopeia Comisión. *British Pharmacopeia*. London, Her Majesty's Stationary Office, 1988:2.
- [41] S. Mookherjea, *Methods Development, Validation Procedures and Conformity Assessment in the Analytical Laboratory*, AOAC, 1997.
- [42] F. Hoffman, *Statical Validation: Quantitative Determination*, La Roche, p.1-9, 1987.
- [43] L.S. Ettre, *High-Performance Liquid Chromatography*, C. Howarth, Ed., Vol.1, pag.4, NY, Academic Press, 1980.
- [44] P. Sewell y B. Clarke, *Chromatography separation*, NY, Wiley, 1988.
- [45] M. Dekker, *Chromatography Theory and Basic Principles*, J. A. Johnson, Ed., NY, 1987.
- [46] K. Robards, P. R. Haddad y P. E. Jackson, *Principles and Practice of Modern Chromatography Methods*, NY, Academic Press, 1994.
- [47] L.S. Ettre, *Pure Appl. Chem.*, 65, 819, 1993.
- [48] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principios de Análisis instrumental*, 5ta edición, Ed. Mc Graw-Hill, España, 2001.
- [49] R.E. Majors, *LC-GC*, 13(8), 202, 1995.
- [50] E.P. Serjeant, *Potenciometry and Potenciometric Titrations*, New Cork, Wiley, 1984.
- [51] P.A. Tipler, *Física para la Ciencia y la Tecnología Vol. 2*, 4ta. Edición, Editorial Reverté, Buenos Aires, 2000.
- [52] J.A. Hammerly, J.M. Marracino y R.O. Piagentini, *Curso de Química Analítica*, Editorial El Ateneo, Buenos Aires, 1984.
- [53] D.J.G. Ives y G.J. Janz, *Reference Electrodes*, Academic Press, NY, 1961.
- [54] R.D. Caton, *Journal of Chemical Education*, 50, A571, 1973.