

TESIS DOCTORAL

MÉTODOS ALTERNATIVOS DE ANÁLISIS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE MEDICAMENTOS ESENCIALES

Mario Raúl Delfino (h)

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA

**MÉTODOS ALTERNATIVOS DE ANÁLISIS
EN EL CONTROL DE CALIDAD DE
MEDICAMENTOS ESENCIALES**

Mario Raúl Delfino (h)

DIRECTORA: Dra. María del Carmen Sarno

CODIRECTORA: Dra. Silvia Raquel Hernández

Tesis para optar al grado académico de
Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en Química

2016

**"Nunca consideres el estudio como una obligación
sino como una oportunidad para penetrar en
el bello y maravilloso mundo del saber".**

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta tesis: a la Universidad Nacional del Nordeste, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE), a la Universidad Nacional del Litoral, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por las becas doctorales que me permitieron llevar a cabo este trabajo.

A mis directoras, María del Carmen y Silvia, por haberme brindado constantemente sus consejos, ayuda y sabiduría, pero principalmente afecto, cariño, apoyo y por estimularme a continuar trabajando enfáticamente.

A mi familia, Mario, Amelia y Magdalena por brindarme afecto y acompañamiento en todo momento.

A Paola, que con amor y cariño fue mi sostén en todo momento, aguantando todos mis estados de ánimo y acompañándome en cada decisión. Te amo.

A mis colegas y compañeros en la Facultad. Celina, por siempre tenderme una mano cuando la necesité. Al Laboratorio de Bromatología y Nutrición (FACENA-UNNE), especialmente a Sonia y Gonzalo. Al Laboratorio de Química Física (FACENA-UNNE), en especial a la Profesora Nelly.

Al Laboratorio de Sensores y Biosensores (FBCB-UNL), por acogerme e incluirme en su grupo. Gracias Silvia H., Silvia F., Vane y Gabo. A la cátedra de Química Analítica de la FBCB-UNL, especialmente a Héctor, Carla, Quela y Pablo. A Caco y Mercedes del Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos.

A la Jefatura de Gabinete de Ministros de la Nación y al Programa BEC.AR por la beca que me fuera otorgada. A la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos, España, y especialmente al Laboratorio de Electroanálisis. A Maria Julia, quien fuera mi tutora durante mi estancia por aquellas tierras, también a Asunción y Olga. A mis compañeros Wil, Laura, Bego, Julia, Lorena, Jesús, David y Daniel.

Por último, agradecer afectuosamente y de corazón a toda la Familia Haquín. A don Alberto y Pochi por su cariño, atención, contención y confianza. Por abrirme generosamente las puertas de su hogar cada vez que necesitaba ir a Santa Fe a realizar mis ensayos. A Emanuel, gran amigo del alma, quien ha sido un ejemplo de amistad incondicional, esfuerzo, trabajo y honestidad. También a Emiliano y Alfonsina por el aguante. A los que fueron, son y serán parte de La Gran 7, por el buen rock. A los amigos que conocí: Santiago, Rufo, Pipi, Juani, José y Peché. A todos ellos MUCHAS GRACIAS.

PRÓLOGO

La política de medicamentos genéricos a nivel nacional, respaldada por las leyes Nº 25.649 y 26.688, ha propiciado la vinculación entre los laboratorios de producción pública de medicamentos y las universidades, a fin de promover la investigación y formación de recursos humanos altamente capacitados. Este contexto ha permitido el desarrollo de metodologías analíticas para el control de calidad de especialidades farmacéuticas genéricas. Esta tesis responde a resolver parte del control analítico de medicamentos de producción pública, que son distribuidos gratuitamente en hospitales y centros de atención primaria de la salud, en particular aquellos que están incluidos en el Listado Modelo de Medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud.

Las farmacopeas estadounidense, británica, europea, como así también la argentina, promueven la incorporación de metodologías innovadoras en sus monografías, referentes a los ensayos de valoración, estabilidad, disolución, etc.

En base a ello, este estudio se orientó al desarrollo de métodos analíticos espectroscópicos y electroquímicos, operativamente más simples, para el control de calidad en medicamentos esenciales. Se consideraron relevantes los parámetros analíticos de exactitud, precisión, repetitividad y reproducibilidad, los que se ajustaron a los criterios de aceptabilidad establecidos para los métodos oficiales y de referencia, conduciendo a la validación de los procedimientos propuestos.

Las experiencias fueron realizadas sobre lotes de comprimidos de cefalexina, metoclopramida, mebendazol, metronidazol y nelfinavir. Atendiendo a la estructura química de estos compuestos y en consecuencia a su reactividad, se ensayaron diversos análisis tanto sobre los principios activos, como sobre los comprimidos y excipientes que acompañan a cada formulación. Fruto de estos estudios surgieron cinco métodos alternativos de análisis que se resumen a continuación:

Se desarrolló y validó un método espectrofotométrico basado en la reacción de ninhidrina con cefalexina, que resultó útil para el control de calidad en comprimidos y fue publicado en la revista *Current Pharmaceutical Analysis* (año).

El método espectrofotométrico basado en la formación de un diazocompuesto coloreado, producto de la reacción entre metoclopramida y ácido nitroso generado *in situ*,

fue aplicado a la valoración del principio activo en comprimidos. Los resultados alcanzados fueron publicados en la revista *IOSR Journal of Pharmacy* (año).

Se logró la valoración de mebendazol en comprimidos, a partir de un método espectrofotométrico basado en la interacción entre el principio activo e hidróxido de sodio en medio acuoso-etanólico. Al no encontrarse antecedentes, se realizó un estudio teórico computacional para dilucidar su origen. Este trabajo se encuentra en redacción para ser enviado a una revista especializada.

Se desarrolló una pasta de carbono a partir de componentes nacionales, la cual fue evaluada para ser utilizada como electrodo de trabajo en métodos electroquímicos. Completó el estudio el diseño y confección de una plataforma electroquímica para el análisis en flujo. Ésta fue utilizada en el análisis cuantitativo de metronidazol en comprimidos y para el seguimiento *on line* del perfil de disolución del comprimido en condiciones estandarizadas, de acuerdo a los requerimientos de la Farmacopea Argentina. Este trabajo también se encuentra en redacción para ser enviado a una revista especializada.

Por último, se desarrolló un sensor electroquímico modificado con nanopartículas de carbono para la valoración del antiretroviral nelfinavir, tanto en muestras de orina como en comprimidos comerciales. Al no encontrarse bibliografía relacionada al origen de la señal analítica, se realizó el estudio y se propuso un mecanismo para la oxidación del fármaco frente a nanopartículas de carbono. Los resultados obtenidos fueron enviados a la revista *Electrochimica Acta*, para su publicación.

Los métodos aquí propuestos son simples, rápidos, específicos, lineales en el rango estudiado y permiten la cuantificación de los fármacos mencionados sin procesos de extracción preliminares ni interferencias por parte de los excipientes que acompañan a cada formulación. Los métodos electroquímicos, adicionan a estas características, la posibilidad de ser fácilmente automatizables.

Estas cualidades los hacen competitivos frente a los métodos oficiales y de referencia, HPLC con detección UV. La comparación estadística de los métodos desarrollados con los establecidos por las farmacopeas avala la aplicabilidad de los procedimientos alternativos propuestos para el control de calidad en comprimidos genéricos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
DERECHO A LA SALUD	1
MEDICAMENTOS ESENCIALES	2
MEDICAMENTOS GENÉRICOS	2
FARMACOPÉAS	5
CONTROLES DE CALIDAD	6
REFERENCIAS	7
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	9
OBJETIVOS GENERALES	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
CAPÍTULO III: MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS DE MEDICAMENTOS	11
FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFÍA	11
Descripción general de la cromatografía	12
Cromatogramas	12
Velocidades de migración de los solutos	13
Introducción a la cromatografía líquida	16
Cromatografía líquida en fase reversa	16
Instrumentación	17
ENSAYOS DE DISOLUCIÓN Y PERFILES DE DISOLUCIÓN	21
Leyes que rigen a la disolución de un sólido	24
Factores que influyen en la velocidad de disolución	25
Equipos de disolución	27
Ensayo de disolución	29
Perfil de disolución	29
Comparación de perfiles de disolución	30
REFERENCIAS	34
CAPÍTULO IV: VALIDACIÓN	36

METODOLOGÍAS ALTERNATIVAS DE ANÁLISIS	36
VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	37
Especificidad	37
Linealidad e intervalo	38
Exactitud	38
Precisión	39
Límite de detección	40
Límite de cuantificación	41
Robustez	41
DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	42
REFERENCIAS	43
CAPÍTULO V: INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROFOTOMETRÍA	44
INTRODUCCIÓN	44
PROPIEDADES GENERALES DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA	44
EL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO	47
ASPECTOS CUANTITATIVOS EN LAS MEDIDAS ESPECTROQUÍMICAS	48
ABSORCIÓN DE LA LUZ	48
Transmitancia	49
Absorbancia	50
Ley de Lambert-Beer	50
MEDIDA DE LA ABSORBANCIA	52
REFERENCIAS	53
CAPÍTULO VI: INTRODUCCIÓN A LA ELECTROQUÍMICA	54
INTRODUCCIÓN	54
Conceptos básicos	55
CONVENIOS DE SIGNOS Y LA ECUACIÓN DE NERNST	61
MODOS DE TRANSPORTE ELECTROQUÍMICO	61
Migración	62
Convección	62
Difusión	62
CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS	64

MÉTODOS DINÁMICOS	66
Amperometría	67
Voltametría	68
REFERENCIAS	70
 CAPÍTULO VII: DETERMINACIÓN DE CEFALEXINA CON NINHIDRINA	 71
INTRODUCCIÓN	71
EXPERIMENTAL	73
Reactivos y muestras	73
Equipamiento	73
Procedimiento espectrofotométrico	73
Procedimiento cromatográfico	74
Atributos analíticos y validación	74
RESULTADOS	75
Especificidad	75
Linealidad e intervalo	75
Repetibilidad	76
Precisión intermedia	77
Ensayo de recuperación	78
Comparación con la metodología oficial	79
CONCLUSIONES	80
REFERENCIAS	80
 CAPÍTULO VIII: DETERMINACIÓN DE METOCLOPRAMIDA CON NITRITO	 83
INTRODUCCIÓN	83
EXPERIMENTAL	85
Reactivos y muestras	85
Equipamiento	85
Procedimiento espectrofotométrico	85
Estabilidad del compuesto diazotado	86
Procedimiento cromatográfico	86
Atributos analíticos y validación	87
RESULTADOS	87

Especificidad	87
Estabilidad	88
Linealidad e intervalo	89
Repetibilidad	90
Precisión intermedia	90
Ensayo de recuperación	92
Comparación con la metodología oficial	92
CONCLUSIONES	93
REFERENCIAS	94
 CAPÍTULO IX: DETERMINACIÓN DE MEBENDAZOL	 97
INTRODUCCIÓN	97
EXPERIMENTAL	98
Reactivos y muestras	98
Equipamiento	99
Procedimiento espectrofotométrico	99
Procedimiento cromatográfico	100
Atributos analíticos y validación	100
Estudio teórico de la interacción MBZ-NaOH	101
RESULTADOS	101
Especificidad	101
Linealidad e intervalo	102
Repetibilidad	103
Precisión intermedia	104
Ensayo de recuperación	105
Comparación con la metodología oficial	105
Resultados del estudio teórico	106
CONCLUSIONES	108
REFERENCIAS	108
 CAPÍTULO X: FORMULACIÓN DE UNA PASTA DE CARBONO PARA	 111
LA FABRICACIÓN DE ELECTRODOS	
INTRODUCCIÓN	111

EXPERIMENTAL	112
Reactivos y muestras	112
Equipamiento	113
Construcción del cuerpo de los electrodos	113
Pasta de grafito y barniz serigráfico	114
Caracterización de los EPC	114
Evaluación de la relación grafito/barniz y de la temperatura de secado	116
RESULTADOS	117
CONCLUSIONES	122
REFERENCIAS	122
 CAPÍTULO XI: CONSTRUCCIÓN DE UNA PLATAFORMA PARA ANÁLISIS EN FLUJO CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA	 124
INTRODUCCIÓN	124
EXPERIMENTAL	125
Reactivos y muestras	125
Equipamiento	125
Diseño y fabricación de la plataforma	126
Construcción del electrodo de trabajo	127
Microscopía electrónica de barrido del electrodo de trabajo	127
Ensamblado del electrodo de referencia	128
Utilización de la plataforma para un sistema FIA	129
Ensayos para la respuesta del electrodo	129
Evaluación del flujo en el sistema FIA	130
RESULTADOS	131
Electrodo de referencia de la plataforma FIA	131
Electrodo de trabajo de la plataforma FIA	131
Visualización de la superficie de los electrodos mediante MEB	133
Velocidad de flujo y tiempo muerto del sistema FIA	134
CONCLUSIONES	136
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

CAPÍTULO XII: DETERMINACIÓN DE METRONIDAZOL MEDIANTE ANÁLISIS 138
EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

INTRODUCCIÓN	138
EXPERIMENTAL	139
Reactivos y muestras	139
Equipamiento	139
Comportamiento electroquímico del MNZ	140
Descripción del sistema FIA	141
Muestras	143
Procedimiento cromatográfico	144
RESULTADOS	144
Puesta a punto del sistema FIA	144
Mecanismo de reducción	145
Especificidad del método	146
Linealidad	146
Repetibilidad	147
Ensayo de recuperación	148
Dosaje de MNZ en comprimidos: comparación el método oficial	149
Seguimiento del perfil de disolución de comprimidos de MNZ	150
Comparación de métodos de monitoreo del perfil de disolución	151
CONCLUSIONES	152
REFERENCIAS	153

CAPÍTULO XIII: DETERMINACIÓN DE NELFINAVIR MEDIANTE VOLTAMETRÍA 156
DE ONDA CUADRADA CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS
MODIFICADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO

INTRODUCCIÓN	156
EXPERIMENTAL	159
Reactivos y muestras	159
Equipamiento	160
Fabricación de SPE	160
Modificación de los electrodos de trabajo	161
Mediciones electroquímicas	161

Preparación de muestras para VOC	162
Procedimiento cromatográfico	163
RESULTADOS	163
Influencia de la naturaleza de electrodo de trabajo serigrafiado en el comportamiento voltamétrico de NFV	163
Optimización de las variables experimentales	164
Linealidad, precisión y capacidad de detección	165
Mecanismo de oxidación	167
Aplicación del método a muestras de orina y de comprimidos comerciales	169
CONCLUSIONES	170
REFERENCIAS	170
CAPÍTULO XIV: CONCLUSIONES GENERALES	174
CAPÍTULO XV: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	175
PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS	175
PUBLICACIONES	177
CAPÍTULO XVI: RECONOCIMIENTO INSTITUCIONAL	179

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura III-1: (a) Se 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).	13
Figura III-2: Esquema de una bomba recíproca para CLAE.	19
Figura III-3: Válvula de inyección de CLAE.	19
Figura III-4: Celda de flujo de un detector UV-Visible para CLAE. La microcubeta posee un camino óptico de 5 mm y tiene un volumen de solamente uno 8-10 μL .	21
Figura III-5: Disolutor Varian, modelo VK 7000, utilizado en las experiencias.	28
Figura III-6: Esquema de los aparatos, las dimensiones están expresadas en milímetros [mm]. (a) Aparato 1, tipo canasta o canastillo; (b) aparato 2, tipo paleta rotatoria.	28
Figura III-7: Perfil de disolución de un comprimido de metronidazol 400 mg elaborado por PLAMECOR. El seguimiento se realizó mediante un método de análisis en flujo con determinación amperométrica.	30
Figura III-8: Aplicación del método del trapecioide para el cálculo de ABC_0^T .	32
Figura V-1. Representación de un haz de radiación monocromática, polarizada en el plano.	45
Figura V-2: Regiones del espectro electromagnético.	47
Figura V-3: Cuando una molécula absorbe luz, aumenta su energía. Al emitir luz, disminuye su energía.	49
Figura V-4: Atenuación de un haz de radiación por una disolución absorbente.	49
Figura V-5: Espectro de absorción UV del metronidazol, $[\text{MNZ}] = 0,02 \text{ mg/mL}$.	51

Figura V-6: Diagrama en bloque de un espectrofotómetro de haz simple.	52
Figura VI-1: Esquema de la doble capa eléctrica.	57
Figura VI-2: Resumen de los métodos electroanalíticos comunes.	65
Figura VI-3: Esquema de una celda para métodos electrodinámicos.	66
Figura VI-4: Electrodo serigrafiado comercial, elaborado por Dropsens®.	67
Figura VI-5: (A) Estímulo aplicado en una voltametría cíclica, y (B) voltamperograma correspondiente .	69
Figura VI-6: (A) Estimulo aplicado en una voltametría de onda cuadrada y (B) voltamperograma correspondiente .	69
Figura VII-1: Estructura química de la cefalexina.	71
Figura VII-2: Mecanismo de acción de la ninhidrina. Formación del aducto anaranjado ($A_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$).	72
Figura VII-3: Ensayo de especificidad. Espectros de absorción para soluciones de reactivos, de placebo más reactivos, y muestra más reactivos. [CFX] = 0,08 mg/mL.	75
Figura VII-4: Curva de calibrado del método CFX-ninhidrina.	76
Figura VIII-1: Estructura química de la metoclopramida.	83
Figura VIII-2: Diazotación de MCA con HNO_2 generado <i>in situ</i> .	84
Figura VIII-3: Ensayo de especificidad. Espectros de absorción para soluciones	88

de reactivos, de placebo más reactivos, y de muestra más reactivos.
[MCA] = 0,045 mg/mL

Figura VIII-4: Ensayo de estabilidad. Monitoreo de la absorbancia a 380 nm en función del tiempo. [MCA] = 0,100 mg/mL. 88

Figura VIII-5: Curva de calibrado del método MCA con nitritos. 89

Figura IX-1: Estructura química del mebendazol. 97

Figura IX-2: Ensayo de especificidad. Espectros de absorción para soluciones de reactivos, de placebo más reactivos, y de muestra más reactivos. [MBZ] = 0,3 mg/mL. 102

Figura IX-3: Curva de calibrado del método MBZ-NaOH. 102

Fig. IX-4: Espectros de absorción UV-visible del MBZ y de su producto de interacción con NaOH 107

Fig. IX-5: Productos de interacción entre MBZ y Na⁺ 108

Figura X-1: Construcción del cuerpo de electrodo de pasta de carbono. 113

Figura X-2: Superficie de respuesta de la función deseabilidad para los factores (a) Temperatura de secado y (b) Relación G/B, para el grafito Aldrich. 119

Figura X-3: Intensidad de corriente (VOC) en función de la temperatura de secado y la relación grafito-barniz, para electrodos realizados con grafito Aldrich. 119

Figura X-4: Intensidad de corriente (VC) en función de la temperatura de secado y la relación grafito-barniz, para electrodos realizados con grafito Aldrich. 120

Figura X-5: Relación de intensidades de corriente (VC) en función de la 120

temperatura de secado y la relación grafito-barniz, para electrodos realizados con grafito Aldrich.

Figura X-6: Diferencia de potencial entre los picos de oxidación y reducción (VC) en función de la temperatura de secado y la relación grafito-barniz, para electrodos realizados con grafito Aldrich. 121

Figura XI-1: Componentes y diagrama de ensamblado de la plataforma. 126

Figura XI-2: Esquema de la configuración del sistema de análisis en flujo con la plataforma electroquímica desarrollada. 129

Figura XI-3: A la izquierda, imágenes de los lotes de electrodos de disco fabricados con la pasta de carbono desarrollada. A la derecha, imagen ampliada de los electrodos. 131

Figura XI-4: Voltamperograma cíclico típico obtenido para un electrodo de trabajo. 132

Figura XI-5: Electrodos recubiertos con oro, sobre una placa de aluminio. La superficie superior, recubierta en oro, es la que se observó por MEB. 133

Figura XI-6: Imagen de la superficie de un electrodo de pasta de carbono con tratamiento de pulido. Resolución 1000x. 133

Figura XI-7: Imagen de la superficie de un electrodo de pasta de carbono sin tratamiento de pulido. Resolución 1000x. 134

Figura XI-8: Amperograma del ensayo para la determinación del tiempo muerto. 136

Figura XII-1: Estructura química del metronidazol. 138

Figura XII-2: Componentes y diagrama de ensamblado de la celda de flujo para la determinación amperométrica de MNZ.	140
Figura XII-3: Descripción del sistema FIA utilizado. Se muestran los recorridos de las soluciones <i>carrier</i> (rojo) y muestras (verde) para las posiciones de carga (A) e inyección (B).	141
Figura XII-4: Voltametría cíclica de MNZ en distintos medios, con distintos electrodos: (a) EPC pastilla y HCl 0,1 N; (b) EPC pastilla y buffer fosfato pH 2 en KCl 0,1 M; (c) ECV y HCl 0,1 N; y (d) ECV y buffer fosfato pH 2 en KCl 0,1 M.	145
Figura XII-5: Ensayo de especificidad del método propuesto.	146
Figura XII-6: Respuesta obtenida a partir de los estándares para la construcción de la curva de calibrado y respuesta de las alícuotas de muestra por sextuplicado. Inserto, curva de calibrado obtenida por regresión de mínimos cuadrados. La bondad del ajuste (R^2) fue de 0,9995.	147
Figura XII-7: Seguimiento del perfil de disolución de comprimidos de MNZ mediante el método FIA con detección amperométrica ($E_{apl} = -300$ mV contra Ag/AgCl en KCL 3 M). Respuesta obtenida en función del tiempo. Inserto: perfil de disolución obtenido, porcentaje de disolución en función del tiempo.	150
Figura XII-8: comparación entre método oficial y propuesto para el seguimiento del perfil de disolución de comprimidos de MNZ.	152
Figura XIII-1: Estructura química del nelfinavir.	157
Figura XIII-2: Genoma del HIV.	157
Figura XIII-3: Representación de nanotubos de carbono y sus dimensiones aproximadas	158

Figura XIII-4: Construcción de los electrodos serigrafiados.	161
Figura XIII-5: Voltamograma de onda cuadrada, I_p vs E (vs Ag/AgCl SPE) para los distintos electrodos preparados	164
Figura XIII-6: Curva de calibrado para la determinación de NFV por voltametría de onda cuadrada con electrodos serigrafiados modificados con nanotubos de carbono. Inserto, voltamogramas para diferentes concentraciones de NFV en condiciones óptimas.	166
Figura XIII-7: Voltametría cíclica de NFV. La línea azul continua corresponde al primer ciclo, y la línea roja punteada corresponde al segundo ciclo.	167
Figura XIII-8: Mecanismo de oxidación propuesto para la molécula de NFV.	168

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla III-1: Modelos matemáticos con sus ecuaciones respectivas, utilizados para el ajuste de los datos obtenidos en los perfiles de disolución.	33
Tabla III-2: Expresiones de las variables regresionales para cada modelo cinético.	33
Tabla IV-1: Datos requeridos para la validación de un método analítico.	43
Tabla V-1: Principales clases de métodos espectroquímicos.	48
Tabla VII-1: Análisis de varianza de la regresión del método CFX-ninhidrina, para un nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).	76
Tabla VII-2: Ensayo de repetibilidad del método propuesto para CFX.	77
Tabla VII-3: Ensayo de reproducibilidad para el método CFX-ninhidrina, realizado en 3 niveles de concentración, por dos analistas distintos y en dos días diferencites.	78
Tabla VII-4: Ensayo de recuperación de principio activo de CFX sobre placebo.	79
Tabla VII-5: Determinación de CFX en comprimidos por CLAE-UV.	79
Tabla VII-6: Resultados del análisis ANOVA entre el método oficial (CLAE-UV) y el método espectrofotométrico propuesto para CFX. Nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).	80
Tabla VIII-1: Análisis de varianza de la regresión para el método MCA-nitritos, para un nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).	89
Tabla VIII-2: Ensayo de repetibilidad del método propuesto para MCA.	90

Tabla VIII-3: Ensayo de reproducibilidad para el método MCA-nitritos, realizado en 3 niveles de concentración, por dos analistas distintos y en dos días diferentes.	91
Tabla VIII-4: Ensayo de recuperación de principio activo de MCA sobre placebo.	92
Tabla VIII-5: Determinación de MCA en comprimidos por CLAE-UV.	93
Tabla VIII-6: Resultados del análisis ANOVA entre el método oficial (CLAE -UV) y el método espectrofotométrico propuesto para MCA. Nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).	93
Tabla IX-1: Análisis de varianza de la regresión para el método MBZ-NaOH, para un nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).	102
Tabla IX-2: Ensayo de repetibilidad del método propuesto para MBZ.	103
Tabla IX-3: Ensayo de reproducibilidad para el método MBZ-NaOH, realizado en 3 niveles de concentración, por dos analistas distintos y en dos días diferentes.	104/5
Tabla IX-4: Ensayo de recuperación de principio activo de MBZ sobre placebo.	105
Tabla IX-5: Determinación de MBZ en comprimidos por CLAE -UV.	106
Tabla IX-6: Resultados del análisis ANOVA entre el método oficial (CLAE -UV) y el método espectrofotométrico propuesto para MBZ. Nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).	106
Tabla IX-7: Resultados de la comparación entre el estudio teórico y los datos experimentales.	107
Tabla X-1: Criterios de optimización.	118
Tabla XI-1: Evaluación de la diferencia de potencial del electrodo de referencia	131

de la plataforma FIA, respecto a uno comercial de Ag/AgCl (KCl 3,5 M).

Tabla XI-2: Evaluación de las velocidades de flujo para 3 posiciones del Regulador de velocidad.	135
Tabla XI-3: Ensayo para la evaluación del volumen muerto del sistema FIA.	135
Tabla XI-4: Ensayo para la evaluación del tiempo muerto (t_m) del sistema FIA.	136
Tabla XII-1: Análisis de varianza de la regresión lineal para la curva de calibrado. Nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).	147
Tabla XII-2: Ensayo de repetibilidad del método propuesto.	148
Tabla XII-3: Resultados del ensayo de recuperación de MNZ utilizando el sistema FIA con detección amperométrica.	149
Tabla XII-4: Determinación de MNZ en comprimidos por CLAE -UV.	149
Tabla XII-5: Resultados del análisis ANOVA entre el método de referencia (CLAE -UV) y el método amperométrico propuesto. Nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).	150
Tabla XII-6: Porcentajes de disolución obtenidos (%D) por ambos métodos utilizados para los cálculos de los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2).	151
Tabla XII-7: Análisis de varianza de la regresión lineal para la comparación entre los métodos espectrofotométrico y amperométrico para el seguimiento del perfil de disolución de comprimidos de MNZ. Nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).	152
Tabla XIII-1: Resultados del análisis ANOVA entre el método de referencia	169

(CLAE -UV) y para el método voltamétrico propuesto.

Nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).

Tabla XIII-2: Resultados del ensayo de recuperación de NFV en muestras de orina. 170

INTRODUCCIÓN

1.- DERECHO A LA SALUD

El derecho a la salud es parte fundamental de la Declaración Universal de Derechos Humanos de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y de lo que se entiende por una vida digna [1]. Se proclamó por primera vez en la Constitución de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en cuyo preámbulo se define a la SALUD como “un estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente ausencia de afecciones y enfermedades”. También se afirma que “el goce del grado máximo de salud que se puede lograr es uno de los derechos fundamentales de todo ser humano, sin distinción de raza, religión, ideología política, condición económica o social” [2].

El derecho a la salud, incluye a otros derechos básicos como ser:

- El derecho a un sistema de protección de la salud que brinde a todos iguales oportunidades para disfrutar del más alto nivel posible de salud.
- El derecho a la prevención y al tratamiento de las enfermedades, y la lucha contra ellas.
- **El acceso a medicamentos esenciales.**
- La salud materna, infantil y reproductiva.
- El acceso igual y oportuno a los servicios de salud básicos.
- El acceso a la educación y a la información sobre cuestiones relacionadas con la salud.
- La participación de la población en el proceso de adopción de decisiones en cuestiones relacionadas con la salud a nivel comunitario y nacional.

Deben facilitarse servicios, bienes e instalaciones de salud a todos sin discriminación. Estos deben estar disponibles y ser accesibles, aceptables y de buena calidad. Por último, deben ser apropiados desde el punto de vista científico y médico. Ello requiere, entre otras cosas, personal médico capacitado, medicamentos y equipo hospitalario científicamente aprobados y en buen estado, agua potable y condiciones sanitarias adecuadas [3].

2.- MEDICAMENTOS ESENCIALES

El 21 de octubre de 1977 se aprueba por el primer Comité de Expertos para la Selección de Medicamentos Esenciales la primera Lista de Medicamentos Esenciales de la OMS. Las más recientes son la decimonovena lista para adultos y la quinta lista para niños, ambas publicadas en abril de 2015 [4-5].

Se consideran esenciales los medicamentos que cubren las necesidades de atención de salud prioritarias de la población. Su selección se hace atendiendo a la prevalencia de las enfermedades y a su seguridad, eficacia y a la relación costo - eficacia comparativa.

Se pretende que, en el contexto de los sistemas de salud existentes, los medicamentos esenciales estén disponibles en todo momento, en cantidades suficientes, en las formas farmacéuticas apropiadas, con una calidad garantizada, y a un precio asequible para las personas y para la comunidad.

3.- MEDICAMENTOS GENÉRICOS

La OMS, en la Conferencia de Expertos realizada en 1985 en Nairobi, afirmó que: “el uso racional de medicamentos requiere que el paciente reciba la medicación apropiada a su necesidad clínica, en la dosis correspondientes con sus requerimientos individuales, por un adecuado período de tiempo, y al menor costo para él y su comunidad” [6].

“En la actualidad, el acceso de la población a los medicamentos esenciales para el cuidado de su salud constituye uno de los desafíos sociales más importantes para los Estados. Entendido en términos estrictos, el hecho de garantizar el acceso involucra no solo lograr la disponibilidad del medicamento cada vez que el ciudadano lo necesite, sino también garantizar un uso racional del mismo a un costo asequible. El acceso a los medicamentos constituye un elemento importante en la realización del derecho a la salud para todos y está reconocido entre los indicadores de las metas para el cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM), entendido en el contexto del acceso a los servicios de salud, en especial para los sistemas de protección social” [7].

La Ley N° 25.649 sobre **genéricos** fue sancionada en agosto del 2002 por el Senado y la Cámara de Diputados de la Nación Argentina [8]. En su artículo 4º, dicha ley define:

a.- Medicamento: es toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra.

b.- Principio activo o monodroga: es toda sustancia química o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural, biogénico, sintético o semisintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana.

c.- Nombre genérico: es la denominación de un principio activo, monodroga, o de una asociación de principios activos a dosis fijas, adoptada por la autoridad sanitaria, o en su defecto la denominación común internacional de un principio activo o combinación de los mismos recomendada por la OMS.

d.- Especialidad medicinal: es todo medicamento de composición cualitativa y cuantitativamente definida, declarada y verificable, de forma farmacéutica estable y de acción terapéutica comprobable debidamente autorizada por la autoridad sanitaria.

e.- Especialidad medicinal genérica: es la especialidad medicinal identificada por el nombre genérico que corresponda a su composición.

f.- Especialidad medicinal de referencia: es aquel medicamento debidamente habilitado como tal por la autoridad sanitaria nacional, cuya eficacia y seguridad terapéutica ha sido científicamente comprobada por su uso clínico y comercializado en el país por un laboratorio innovador. Cuando un producto que reúna estas características no se comercialice en el país, podrá utilizarse como especialidad medicinal de referencia a fin de comparar la especialidad medicinal genérica, aquella avalada por la OMS por haberse comprobado su acción terapéutica mediante su liderazgo en el mercado farmacéutico internacional.

En abril de 2002, inicia su producción la Planta de Medicamentos de Corrientes (PLAMECOR), dependiente del Ministerio de Salud de dicha provincia. Al día de hoy, instalada desde el 2003 en el predio del Hospital Pediátrico Juan Pablo II, produce más de 30 Especialidades Farmacéuticas Genéricas (EFG). Los medicamentos genéricos producidos son entregados gratuitamente a personas de escasos recursos a través de toda la red de hospitales públicos y Centros de Atención Primaria de la Salud (CAPS) a lo largo de la Provincia de Corrientes.

En el año 2007, se crea en Argentina la Red Nacional de Laboratorios Públicos Productores de Medicamentos. Esta red reúne laboratorios estatales (entre los que se encuentra asociado PLAMECOR), dependientes de la administración nacional, provincial, municipal, universitaria y/o organismos descentralizados; con el objetivo de promover la investigación y la producción de medicamentos a menor costo de los que se elaboran en laboratorios privados.

En julio de 2011, se sanciona la Ley N° 26.688, de Producción Pública de Medicamentos y Vacunas (PPMV) [9]. Dicha ley establece en el Artículo 1º: “declarar de interés nacional la investigación y producción pública de medicamentos, materias primas para la producción de medicamentos, vacunas y productos médicos entendiendo a los mismos como bienes sociales”. En el Artículo 2º declara: “Es objeto de la presente ley promover la accesibilidad de Medicamentos, vacunas y productos médicos y propiciar el desarrollo científico y tecnológico a través de laboratorios de producción pública”. En el Artículo 6º establece entre sus objetivos: “f) Promover su articulación con instituciones académicas y científicas y organizaciones de trabajadores y usuarios [...] i) Promover la investigación y docencia, así como la formación y capacitación de recursos humanos”.

En el Artículo 8º: “Los laboratorios de producción pública pueden celebrar convenios con universidades u otras entidades estatales pertinentes para realizar el control de calidad de los medicamentos, vacunas y productos médicos”. Es dentro de este marco que se consolidan los convenios que desde el año 2003 vienen celebrando PLAMECOR y el Laboratorio de Química Analítica Instrumental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la Universidad Nacional del Nordeste (FACENA-UNNE).

4.- FARMACOPEAS

La Farmacopea Argentina (FA) es el libro oficial de la República Argentina que contiene la información sobre medicamentos y drogas necesarias o útiles para ejercer la Medicina y la Farmacia, en sus distintos aspectos.

La finalidad principal de la FA es contribuir a promover la salud de la población estableciendo normas de calidad para los productos empleados en la elaboración de medicamentos. Las normas y especificaciones contenidas en esta publicación son

elemento de consulta indispensable para la autoridad sanitaria, para los elaboradores, para los profesionales de la salud, investigadores y docentes, todos ellos involucrados en el aseguramiento de la calidad que deben poseer los medicamentos para su empleo por parte del paciente [10].

La Farmacopea de Estados Unidos (USP, del inglés *United States Pharmacopeia*) es el texto oficial que se publica junto con el formulario nacional de medicamentos (NF, del inglés *National Formulary*) como la USP-NF. La *United States Pharmacopeial Convention* (también llamada comúnmente USP) es una organización sin fines de lucro que posee la marca registrada y los derechos de autor de la USP-NF y la publica todos los años. La USP establece por escrito normas de referencia para los medicamentos, los ingredientes alimentarios, suplementos dietéticos y sus ingredientes. Estas normas son utilizadas por los organismos reguladores y fabricantes para ayudarles a garantizar que estos productos son de la identidad adecuada, así como la fuerza, calidad, pureza y consistencia.

Los medicamentos recetados y de venta libre disponibles en los Estados Unidos deben, por ley federal, cumplir con las normas públicas USP-NF, cuando esas normas existen. Muchos otros países usan la USP-NF en lugar de emitir su propia farmacopea, o como complemento de su propia farmacopea. Es por ello, que la USP es revisada permanentemente y utilizada, en la práctica, como bibliografía de referencia en los controles de calidad de medicamentos junto con la FA vigente.

5.- CONTROLES DE CALIDAD

La calidad puede definirse como la capacidad de un producto o de un servicio de satisfacer las necesidades del usuario. Para lograr una calidad duradera, es necesario establecer un sistema de garantía de calidad, el que podría definirse como un conjunto adecuado de disposiciones preestablecidas y sistemáticas destinadas a dar confianza en la obtención de la calidad requerida [11]. Sin embargo, aun la aplicación estricta de un sistema adecuado de garantía de calidad no exime del control al producto terminado, ya que a pesar de todas las precauciones que se puedan tomar a nivel de la fabricación o la

preparación de los productos farmacéuticos, los pacientes y los profesionales de la salud no están a salvo de los incidentes que se presenten en las distintas etapas del proceso.

Para definir qué ensayos realizar a fin de conocer la calidad de un producto determinado, se debe recurrir a las Farmacopeas. Éstas brindan patrones públicos, especificaciones y métodos de ensayo que los analistas utilizan en el control de calidad [12]. Definen las características que debe poseer un producto y establecen los ensayos que permiten demostrar que el mismo satisface los requisitos mínimos de calidad exigidos por la Autoridad Sanitaria. Dichas normas se aplican en cualquier momento de la vida útil del producto, desde la elaboración hasta el vencimiento, y los resultados obtenidos se aplican exclusivamente al lote analizado [10].

El esquema básico de un protocolo completo de control de calidad para un producto terminado de una formulación sólida de administración oral incluye, sin contar los aspectos higiénicos microbiológicos, los ensayos de identificación, valoración, uniformidad de unidades de dosificación (UUD) y ensayo de disolución. Éstos son los controles fisicoquímicos fundamentales, aunque no los únicos, que se pueden aplicar a estas formas farmacéuticas.

El ensayo de identificación, en el caso de productos terminados, tiene por objeto confirmar que dicho producto se ajusta a la descripción dada en el rótulo del envase, y no está destinado a proporcionar una confirmación completa de la estructura química o composición de dicho producto. Luego, mediante la valoración del medicamento, se busca determinar la cantidad media del principio activo presente en el lote analizado. Numerosas técnicas analíticas son aplicables a este objetivo, siendo la cromatografía, la espectrofotometría y la volumetría las más comúnmente utilizadas [13]. Debido a que el resultado representa el contenido promedio en el lote, se realiza a continuación el ensayo de UUD, de manera de analizar el contenido en cada una de las unidades que verdaderamente se le administran al paciente. Por último, se realiza el ensayo de disolución, para determinar el comportamiento de liberación del principio activo contenido en la forma farmacéutica sólida, estableciendo un criterio de evaluación de las propiedades físicas y biofarmacéuticas del producto [10].

Se debe tener la certeza que la calidad de los análisis utilizados para evaluar un producto cumple con los estándares correspondientes [14]. Los métodos y los reactivos descriptos en las Farmacopeas deben ser siempre los de primera elección, y pueden aplicarse directamente como están descriptos. Sin embargo, también es posible utilizar

otros métodos con el mismo objetivo, y en ese caso la nueva técnica o sus modificaciones sencillas deben validarse.

6.- REFERENCIAS

- [1] Asamblea General de las Naciones Unidas, Res. Nº 217 A (III). París, 10/12/1948. Disponible en página web: <http://www.un.org/es/documents/udhr/law.shtml>
- [2] Constitución de la OMS (ONU), 45va Edición, Octubre de 2006. Disponible en página web: www.who.int/governance/eb/who_constitution_sp.pdf
- [3] El derecho a la salud, Folleto Informativo Nº 31. Oficina del Alto Comisionado para los Derechos Humanos, OMS. 2008.
- [4] Lista Modelo de Medicamentos Esenciales de la OMS. Abril de 2015. Disponible en página web: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML2015_8-May-15.pdf
- [5] Lista Modelo de Medicamentos Esenciales para Niños de la OMS. Abril de 2015. Disponible en página web: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EMLc2015_8-May-15.pdf
- [6] Uso racional de medicamentos. Informe de Conferencia de Expertos, OMS. Nairobi, Kenia. 25-29/11/1985.
- [7] Guía para la implementación de estrategias de medicamentos genéricos en los países de América Latina y el Caribe como mecanismo para mejorar el acceso a medicamentos. Organización Panamericana de Salud (OPS). Junio de 2011.
- [8] Ley Nº 25.649 sobre genéricos. Promoción de la utilización de medicamentos por su nombre genérico. Disponible en página web: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Ley_Medicamentos_Genericos_25649.pdf
- [9] Ley Nº 26.688 de Producción Pública de Medicamentos y Vacunas. Disponible en página web: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Legislacion/Medicamentos/Ley_26688.pdf
- [10] ANMAT, Farmacopea Argentina, 8va Edición, 2013.
- [11] Cohen, Y; Pradeau, D. Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos. Uteha, Noriega Editores, México D.F., 1998.
- [12] Keitel, S. El papel de la farmacopea en un mundo globalizado. *Pharm Tech Sud* 110 (2011) 54-56.
- [13] Ruiz, M.E.; Fagiolino, P.; Buschiazzi, P.M.; Volonté, M.G. Tesis Doctoral: La intercambiabilidad de medicamentos, consideraciones biofarmacéuticas y terapéuticas. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Bs.As., 2011.
- [14] Watson, D.G. Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2005.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

1.- OBJETIVOS GENERALES

Se propone desarrollar métodos alternativos de análisis para algunos fármacos genéricos esenciales. La metodología que se logre deberá responder con precisión y exactitud a las exigencias de los protocolos y monografías establecidas. Para ello se implementarán procedimientos de naturaleza (a) electroanalítica con énfasis en el desarrollo de sensores, y (b) espectroscópicas, sea en forma directa o por derivatización. Los métodos propuestos serán evaluados en cuanto a sus parámetros de desempeño analítico: exactitud, precisión, linealidad, selectividad, intervalo de linealidad y robustez, a fin de someterlos al proceso de Validación de Métodos de Análisis de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), dado que son varias las presentaciones farmacéuticas que aún no están contempladas en sus monografías, así como es continua la revisión de las ya establecidas.

Las actividades necesarias para el logro de estos objetivos fueron realizadas entre la Unidad de Control de Fármacos y Tóxicos (UCFT, Resolución N° 893/07 CD) del Laboratorio de Química Analítica Instrumental de la FACENA-UNNE, donde se realizan los controles de calidad de las EFG elaboradas por PLAMECOR y el Laboratorio de Sensores y Biosensores (LSB) de la Cátedra de Química Analítica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL), donde se desarrollan técnicas analíticas electroquímicas y se forman recursos humanos especializados en electroanalítica aplicada.

Ambos laboratorios cuentan con trayectoria académica y líneas de interés en disciplinas relacionadas al tema de la tesis, contribuyendo a la calidad del trabajo planificado así como a la formación del futuro doctorando.

Además, al pertenecer a dos universidades vecinas, como son la UNNE y la UNL, se fortalecen los vínculos académicos, valiosos para el desarrollo regional.

2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proponer métodos analíticos alternativos a los establecidos en las farmacopeas internacionales, que presenten ventajas en cuanto a sencillez, tiempo de análisis y costos y que resulten estadísticamente comparables a los métodos de referencia en los parámetros analíticos de exactitud, precisión, sensibilidad, trazabilidad y robustez.
- A partir de las estructuras moleculares de cada principio activo presente en los fármacos que se elaboran en PLAMECOR, diseñar procedimientos analíticos tanto espectroscópicos como electroquímicos que respondan con adecuada sensibilidad a sus propiedades fisicoquímicas.
- Desarrollar sensores electroquímicos que permitan la cuantificación de los principios activos.
- Desarrollar las etapas analíticas conducentes a la validación de los métodos propuestos ante la ANMAT.
- Lograr la formación del doctorando como recurso humano capacitado en la investigación de insumos para la salud de los sectores sin cobertura social, disminuyendo su vulnerabilidad en el tema esencial de los medicamentos.
- Fortalecer la articulación entre el sector científico con los organismos e instituciones provinciales, en este caso el Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Corrientes a través de su planta de medicamentos (PLAMECOR).

CAPÍTULO III

MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS DE MEDICAMENTOS

La Farmacopea Argentina (FA) y la USP establecen las metodologías generales para los ensayos y valoraciones de las drogas estudiadas.

En esta tesis se proponen métodos de análisis cuantitativo del principio activo de las EFG y técnicas para el monitoreo de la disolución de sus comprimidos de liberación inmediata. Para la cuantificación de los principios activos en comprimidos, las farmacopeas establecen como método oficial la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (CLAE, o HPLC por sus siglas en inglés: *High Performance Liquid Chromatography*). En cuanto a los ensayos de disolución y al estudio de los perfiles de disolución, ambos se realizan mediante CLAE ó espectrofotometría UV.

1.- FUNDAMENTOS DE LA CROMATOGRAFÍA

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 las 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 esta técnica podría visualizarse mejor si se tiene en cuenta que sólo en la lista de Premios Nobel entregados entre 1937 y 1972, hay doce galardones basados en trabajos en los que la cromatografía tuvo un papel vital [1].

La CLAE 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 [2].

1.1.- Descripción General de la Cromatografía

La cromatografía, que comprende un grupo de técnicas, permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios [3-5]. 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 las distintas velocidades los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cuantitativa y/o cualitativamente.

1.2.- 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 Fig. III-1a. Este gráfico se denomina cromatograma, y es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo.

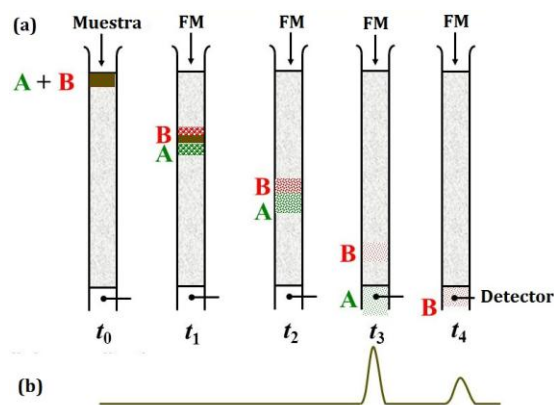


Fig. III-1: (a) Se muestra la separación de una mezcla de A y B por cromatografía de elución en columna. (b) Señal de salida del detector en las distintas fases de la elución mostradas en (a).

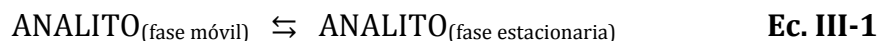
La posición de los picos en el eje del tiempo es utilizado para identificar los componentes de la muestra; mientras que el área bajo los picos proporciona una medida cuantitativa de cada componente presente en la muestra ingresada.

1.3.- 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.

1.3.1.- 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 III-1 se denomina constante de distribución o coeficiente de distribución [6], y se define como:

$$K = C_S / C_M \quad \text{Ec. III-2}$$

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 III-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.

1.3.2.- 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:

$$v = L/t_R \quad \text{Ec. III-3}$$

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 (u) es:

$$u = L/t_M \quad \text{Ec. III-4}$$

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.

1.3.3.-Factor de retención

El factor de retención (k') para un analito dado es un parámetro 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:

$$k_A' = K_A(V_S/V_M) \quad \text{Ec. III-5}$$

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:

$$k_A' = (t_R - t_M)/t_M \quad \text{Ec. III-6}$$

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.

1.3.4.- Factor de selectividad o separación

El factor de selectividad (α) de una columna para dos especies A y B, se define como:

$$\alpha = K_B/K_A \quad \text{Ec. III-7}$$

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 α será siempre mayor que la unidad.

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

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

1.4.- Introducción a la Cromatografía Líquida

Como su nombre lo indica, en la cromatografía líquida (CL) la fase móvil es un líquido. El gran poder de la CL 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 CL 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 exclusión molecular 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 CL 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 CL sea eficaz es necesario manejar todos los equilibrios que afectan a la distribución del analito entre ambas fases (Ec. III-1).

Los cambios en el disolvente producen desplazamientos en el equilibrio de distribución del analito entre las fases móvil y estacionaria.

1.5.- 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 [2].

Pareciera 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.

1.6.- Instrumentación

Con el objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable con rellenos que presentan un tamaño de partícula entre 2 y 10 μm (comúnmente utilizados en la cromatografía moderna), se requieren sistemas de bombeo que soporten altas presiones. Como consecuencia de esto, el equipo necesario para CLAE puede considerarse más sofisticado y costoso si lo comparamos con otros tipos de cromatografía.

1.6.1.- Recipientes y sistema para el tratamiento de los disolventes

Los recipientes utilizados en CLAE incluyen, a menudo, 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 se incorpora 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. A menudo, 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.

1.6.2.- 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 (Fig. III-2), estando presente en más del 90% de los sistemas de CLAE comerciales [2]. 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. No obstante, las bombas modernas traen un atenuador de pulso ubicado antes de la salida a la columna.

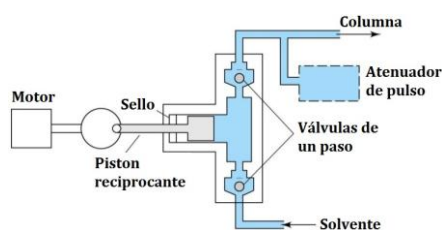


Fig. III-2: Esquema de una bomba recíproca para CLAE.

Entre las ventajas, podemos citar:

- pequeño volumen interno (de 35 a 400 μL);
- 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.

1.6.3.- Sistemas de inyección de muestra

Un factor limitante en la precisión de las medidas en CLAE 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 CLAE, el método más utilizado para la introducción de la muestra es mediante un bucle (o *loop*) de muestra. Estos dispositivos son normalmente una parte integrada de la válvula de inyección (Fig. III-3) y se dispone comercialmente de bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestras desde 5 a 500 μL . Con bucles de este tipo se puede introducir la muestra a presiones de hasta 7000 psi.

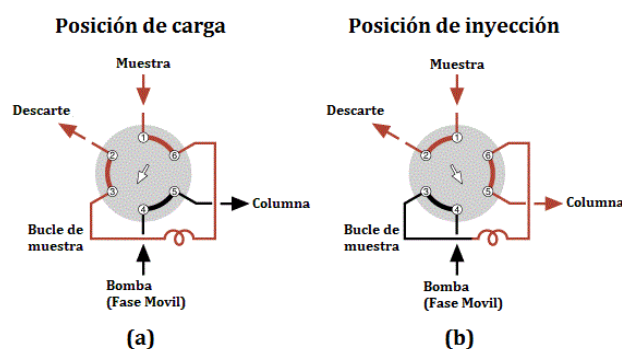


Fig. III-3: Válvula de inyección de CLAE.

1.6.4.- Columnas para CLAE

Las columnas para CLAE 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 1.000 dólares [7].

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 μm . 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 μm [2].

1.6.5.- Tipos de rellenos de la columna

Los rellenos típicos son los de partícula porosa, formados por micropartículas con diámetros comprendidos entre 3 y 10 μm 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. De todos éstos, la sílice es el material de relleno más ampliamente difundido en CLAE. Las partículas de sílice se recubren muchas veces con películas orgánicas, que se unen física o químicamente a la superficie.

1.6.6.- Detectores

Un detector ideal para CLAE debe poseer las siguientes características:

- Adecuada sensibilidad.
- Buena estabilidad y reproducibilidad.
- Respuesta lineal 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 CLAE pueden ser de dos tipos:

- a) Los que se basan en la medida de una propiedad de la disolución (índice de refracción, constante dieléctrica, densidad, etc.) que se modifican por la presencia de los analitos.
- b) Los que responden a una propiedad específica del soluto (absorbancia, fluorescencia, etc.)

Los detectores más simples y utilizados para CLAE son los de absorbancia UV, que consisten en un espectrofotómetro con una red de difracción o monocromador entre sus componentes ópticos y como detectores tubos fotomultiplicadores o arreglos de diodos (ver Capítulo V). Algunos se limitan a la radiación UV; mientras que otros abarcan UV y visible. Poseen lámparas de xenón, deuterio y tungsteno.

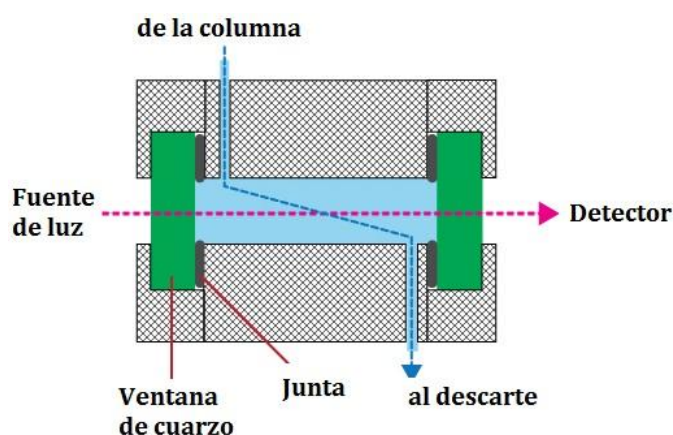


Fig. III-4: Celda de flujo de un detector UV-Visible para CLAE. La microcubeta posee un camino óptico de 5 mm y tiene un volumen de solamente uno 8-10 μL .

Para evitar el ensanchamiento de picos, el volumen del detector debe ser menor que el 20% del volumen de la banda cromatográfica [2]. Las burbujas que puedan aparecer en la celda de flujo producen ruido en el detector, y por eso se debe aplicar una contrapresión, para impedir que se formen burbujas durante la despresurización del eluyente [2].

2.- ENSAYOS DE DISOLUCIÓN Y PERFILES DE DISOLUCIÓN

La evaluación de la disolución de medicamentos tiene aproximadamente un siglo de desarrollo. Sin embargo, en las últimas décadas ha suscitado mayor interés, especialmente por su aplicación al estudio de productos medicamentosos sólidos, en los que el proceso de disolución se encuentra relacionado con la biodisponibilidad del fármaco en el organismo [8].

Para que una molécula con determinada actividad intrínseca pueda convertirse en un fármaco, debe ser capaz de alcanzar su lugar de acción en el organismo. En el caso de fármacos formulados para su administración oral, el proceso de absorción dependerá de su disolución o solubilización bajo condiciones fisiológicas y de su permeabilidad a través

de la membrana de las células del tracto digestivo. En consecuencia, la velocidad a la que aquellos principios activos poco solubles en agua se disuelven en el tracto gastrointestinal, a partir de la forma farmacéutica, se correlaciona con su velocidad de absorción sistémica [9]. Es por ello que el ensayo de disolución es la prueba *in vitro* de elección para estudiar el comportamiento que tendrán los medicamentos *in vivo*, y se ha convertido en un requisito primordial en las Farmacopeas, para la evaluación de formas farmacéuticas sólidas orales [10].

La *Food and Drugs Administration* (FDA) de los Estados Unidos define la biodisponibilidad como la "la velocidad y la medida en que se absorbe el ingrediente activo o la fracción activa de un fármaco y se hace disponible en el sitio de acción" [11]. Sin embargo, debido a que para la mayoría de los principios activos no es posible conocer su concentración en el sitio de acción, se ha propuesto otra definición según la cual la biodisponibilidad es la "cantidad relativa del medicamento que ha accedido a la circulación general después de su administración y velocidad a la cual se ha producido dicho acceso" [8]. Esta última definición ha sido adoptada por la autoridad sanitaria de nuestro país, entre otras, y constituye tanto el fundamento de la determinación práctica de la biodisponibilidad como de su estrecha relación con el ensayo de disolución *in vitro*.

Por lo tanto, es la relación existente entre la disolución de un medicamento y su posterior desempeño *in vivo* el motivo de la relevancia de la prueba de disolución, ya que con ciertas limitaciones, la misma puede emplearse como elemento predictivo de la biodisponibilidad *in vivo* del fármaco

Las pruebas de disolución, como hoy las conocemos, son métodos de control *in vitro* que permiten evaluar las características de liberación de un fármaco desde su forma farmacéutica a un medio de disolución apropiado, en condiciones experimentales cuidadosamente estandarizadas [12]. Para el control de calidad de productos orales de liberación inmediata las farmacopeas indican, en las monografías correspondientes, las condiciones en las que se debe realizar el "Ensayo de Disolución": aparato, medio, volumen, temperatura, agitación, tiempo de muestreo y porcentaje disuelto. Bajo dichas condiciones, se ensayan seis unidades del producto en cuestión y, al tiempo especificado, cada una de ellas debe haber superado cierto porcentaje de disolución. Sin embargo, una única determinación (único tiempo de muestreo) no permite caracterizar a la forma farmacéutica, y por lo tanto resulta de interés evaluar y comparar "perfiles" de disolución: registros del porcentaje disuelto (respecto al valor declarado) en función del tiempo [13].

La obtención y comparación de perfiles es una metodología aplicable con numerosos objetivos, entre ellos:

- a. servir como guía para el desarrollo de formas farmacéuticas orales;
- b. monitorear la calidad, la consistencia y la estabilidad de dichas formulaciones;
- c. establecer las especificaciones finales de disolución para una forma farmacéutica dada;
- d. predecir la absorción *in vivo* del principio activo, mediante el establecimiento de correlaciones *in vitro/in vivo* que permiten reducir costos y acelerar el desarrollo de productos farmacéuticos, además de evitar la realización de estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia en voluntarios humanos;
- e. establecer la similitud de dos productos farmacéuticos, por ejemplo:
 - productos conteniendo el mismo principio activo, en igual dosis y forma farmacéutica, pero provenientes de distintos laboratorios (es decir, potenciales equivalentes farmacéuticos);
 - productos del mismo fabricante que han sufrido algún cambio posterior a su aprobación: escalado, cambio de composición, de sitio de producción, de equipamiento, etc.

Por último, para que los resultados de disolución sean comparables y reproducibles, el ensayo debe realizarse según las recomendaciones dadas en la Farmacopea Argentina y asegurando que el equipo cumple las dimensiones estándares indicadas en el Capítulo de Métodos Generales de Análisis, sobre Ensayo de Disolución [14-15].

2.1.- Leyes que rigen la disolución de un sólido

La disolución se define como la transferencia de masa desde un sólido al medio de disolución o solvente que lo rodea [8]. Es una propiedad dinámica que se modifica en el tiempo y que explica el proceso por medio del cual se puede obtener una mezcla homogénea de un sólido o un líquido en un solvente.

En 1897, Noyes y Whitney sugieren que la velocidad de disolución (dC/dt) es limitada por una capa estanca de solución saturada que se forma instantáneamente alrededor de las partículas del sólido y a partir de la cual las moléculas difunden al seno de la solución (Ec. III-9) [16]. Luego, en 1904 Nernst y Brunner establecieron la relación

entre la velocidad de disolución y el coeficiente de difusión (D), mediante una ecuación derivada de la de Noyes-Whitney por la aplicación de la ley de difusión de Fick (Ec. III-10) [17]. Las ecuaciones correspondientes son las siguientes:

$$dC/dt = k \cdot (C_s - C) \quad \text{Ec. III-9}$$

$$dC/dt = (D \cdot S / V \cdot h) \cdot (C_s - C) \quad \text{Ec. III-10}$$

En las ecuaciones anteriores, dC/dt representa la velocidad de disolución de la droga; k es una constante; C_s es la concentración de la droga en la capa estanca (concentración de saturación); C es la concentración en el seno de la solución; S es el área superficial del sólido; D es el coeficiente de difusión; V es el volumen de solución; y h es el espesor de la capa estanca.

Las ecuaciones anteriores pueden ser consideradas como diferentes expresiones del “modelo de la capa de difusión”. Es decir, este modelo es la herramienta empleada para explicar físicamente el proceso de disolución, de la que luego se derivan las diferentes ecuaciones. En todos los casos, la etapa limitante es la difusión de las moléculas a través de la capa estanca de líquido (de espesor h) alrededor de la superficie sólida.

No obstante, a pesar de toda la labor desarrollada en este tema, no existe actualmente una única teoría que logre explicar satisfactoriamente el comportamiento de disolución de los sólidos. En el caso de productos farmacéuticos la resolución es más compleja, ya que no suelen tratarse de sólidos puros sino de mezclas de componentes (principio activo y excipientes). Sin embargo, las teorías expuestas resultan útiles para analizar, por ejemplo, la influencia que tendrán distintos factores experimentales sobre la velocidad de disolución (agitación, área superficial, etc.).

2.2.- Factores que influyen en la velocidad de disolución

Dada la complejidad del proceso de disolución, son numerosos los factores que pueden modificar la velocidad a la que se produce. Estos factores pueden clasificarse en:

2.2.1.- Factores que dependen del medio de disolución

Son factores experimentales, variables críticas a definir durante los ensayos.

Agitación: De acuerdo con la teoría de Nernst y Brünner, el espesor de la capa líquida que rodea a las partículas es inversamente proporcional a la velocidad de agitación. Por lo tanto, si aumenta la intensidad de la agitación, disminuye el espesor de la capa, favoreciendo la difusión de las moléculas al seno de la solución.

Temperatura: Según la Ley de Le Chatéllier, un proceso endotérmico es favorecido por el aumento de temperatura. Como la mayoría de los sólidos presentan calores de disolución positivos, el aumento de temperatura favorece su solubilidad y velocidad de disolución.

Composición del medio de disolución: El pH es importante en todos los productos de carácter iónico, ya que la solubilidad de un electrolito varía en función del pH.

Tensión superficial: Los agentes tensioactivos provocan una disminución de la tensión superficial y contribuyen así a aumentar la velocidad de disolución de un sólido mediante tres mecanismos principales:

- i. Pueden mejorar la humectación de las partículas, es decir, favorecer el contacto entre éstas y el disolvente y así aumentar la superficie libre para el ataque por el líquido disolvente.
- ii. Pueden aumentar la solubilidad a través de un mecanismo de falsas emulsiones o soluciones. A partir de una cierta concentración, cuando el tensioactivo ya no se encuentra en solución verdadera sino en forma micelar, el poder solvente frente a las sustancias hidrófobas aumenta.
- iii. Los agentes tensioactivos también pueden influir sobre los fenómenos de difusión asociados a los procesos de disolución.

2.2.2.- Factores que dependen del sólido a disolver

Son factores no modificables durante los ensayos.

Solubilidad: Es un parámetro termodinámico que representa la concentración de la solución de un fármaco en equilibrio con el soluto. Según la ecuación de Noyes-Whitney (Ec. III-9) la solubilidad (C_s) es el factor más importante en la velocidad de disolución.

Área superficial: Depende principalmente del tamaño de las partículas, aunque también de su porosidad y forma geométrica. Al disminuir el tamaño de las partículas aumenta su área superficial (S) y con ella la velocidad de disolución (ver Ec. III-10)

2.2.3.- Factores tecnológicos y de formulación

Al igual que los anteriores, estos factores no pueden modificarse durante el ensayo, sino solamente en la etapa de preformulación. Tanto los procedimientos de fabricación (mezcla, granulación, fuerza de compresión, etc.), como los excipientes que acompañan a los principios activos en la formulación, pueden influir de alguna manera en el proceso de disolución.

Excipientes: Los diluyentes, que se emplean para dar volumen a un comprimido (por ej. sacarosa, lactosa, etc.), pueden generar comprimidos demasiado consistentes, con menores velocidades de disolución. Por el contrario, los desintegrantes contribuyen a la disgregación rápida en el fluido gastrointestinal (por ej. almidones), y por lo tanto al aumentar la cantidad de desintegrante aumenta la velocidad de disolución. Otros excipientes que se utilizan para dar resistencia mecánica a los comprimidos (llamados aglutinantes), en general producen un aumento en el tiempo de desintegración y, por lo tanto, la disminución de la velocidad de disolución. Los lubricantes, por su parte, también disminuyen la velocidad de disolución. Dichos excipientes (por ej. estearato de magnesio), que se incluyen en la mezcla para evitar la adherencia y mejorar la fluidez de los polvos, pueden impedir la humectación de las partículas, disminuyendo así su disolución.

Método de granulación: De acuerdo con el método empleado pueden obtenerse comprimidos de diversa resistencia mecánica, la cual influye en la velocidad de disolución del principio activo.

Fuerza de compresión: Durante la compresión es difícil mantener las características granulométricas de los principios activos. La velocidad de disolución, según algunos autores, aumenta con el aumento de la fuerza de compresión, llega a un máximo y luego decrece hasta un nivel constante. Otros autores consideran que cuando se aplica una fuerza débil, las partículas se aglomeran, y disminuyen la velocidad de disolución, pero si aumenta la fuerza llega un punto en que las partículas se rompen, y la velocidad de disolución aumenta hasta un máximo para luego disminuir.

Envejecimiento: La velocidad de disolución de comprimidos envejecidos puede ser menor que la de los recién elaborados. Este efecto se puede deber a diferentes causas, como la presencia de ciertos excipientes que aumentan la dureza de los comprimidos en el tiempo, o al efecto del agua residual del granulado.

2.3.- Equipos de disolución

La USP codifica siete aparatos de disolución: (1) canastillo; (2) paleta rotatoria; (3) cilindro reciprocante; (4) celda de flujo; (5) paleta sobre disco; (6) cilindro rotatorio; y (7) disco reciprocante [12].

Los más usados son los aparatos 1 y 2, y son los únicos incluidos en la Farmacopea Argentina [11]. Ambos equipos constan de un baño de agua en el que se sumergen al menos seis vasos de 1 L de capacidad, los que contienen el medio de disolución. Durante el ensayo, la temperatura de dicho baño se fija en $37 \pm 0,5$ °C (para productos de administración oral). Los equipos poseen un motor giratorio de velocidad variable que acciona elementos de agitación o vástagos sumergidos en el centro de cada vaso (Fig. III-5). Las dimensiones estandarizadas de ambos aparatos pueden observarse en la Fig. III-6.



Fig. III-5: Disolutor Varian, modelo VK 7000, utilizado en las experiencias.

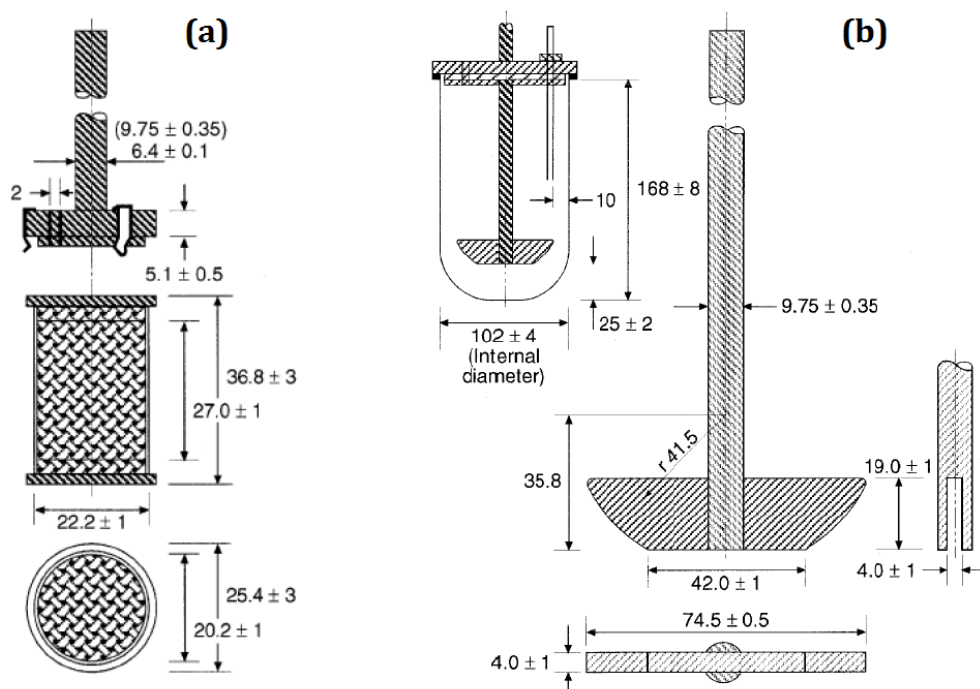


Fig. III-6: Esquema de los aparatos, las dimensiones están expresadas en milímetros [mm].

(a) Aparato 1, tipo canasta o canastillo; (b) aparato 2, tipo paleta rotatoria.

2.4.- Ensayo de disolución

Para el control de calidad de productos orales de liberación inmediata las farmacopeas indican, en las monografías correspondientes, las condiciones en las que se debe realizar el ensayo de disolución. Bajo dichas condiciones experimentales, se ensayan seis unidades del producto en cuestión y, a un tiempo especificado, se toma una muestra de cada vaso y se cuantifica el principio activo disuelto, el cual debe haber superado cierto porcentaje de disolución para cumplir con dicho ensayo. Por lo tanto, se trata de un ensayo a un único tiempo, que sólo permite determinar si el producto evaluado cumple con los requisitos de disolución establecidos.

Las condiciones que se encuentran en el apartado correspondiente al ensayo de disolución, en la monografía individual de un producto, son las siguientes:

- Equipo: típicamente, aparatos 1 o 2.
- Temperatura: para productos de administración oral es de $37 \pm 0,5$ °C
- Medio de disolución: se indica qué medio utilizar y qué volumen del mismo.
- Agitación: expresada en rpm
- Tolerancia: se expresa como porcentaje disuelto, %D, (sobre valor declarado) a un tiempo dado (tiempo al que se debe alcanzar dicho %D).

- Tipo de muestreo: en la mayoría de los casos el muestreo es individual; se toma una muestra de cada vaso y se analizan por separado, obteniéndose seis valores de %Disuelto (%D).
- Método analítico: empleado para la determinación de %D en las alícuotas extraídas del equipo de disolución.

2.5.- Perfil de disolución

A pesar de que el ensayo de disolución es el ensayo oficial codificado, una única determinación (único tiempo de muestreo), no permite caracterizar la forma farmacéutica, y por lo tanto resulta de interés evaluar y comparar perfiles de disolución: registros de %D en función del tiempo. La obtención de un perfil de disolución también permite:

- Determinar el orden cinético del proceso de disolución
- Determinar constantes de velocidad del proceso de disolución
- Detectar y cuantificar tiempos de latencia
- Determinar cambios en el proceso de disolución

Los perfiles de disolución se pueden llevar a cabo siguiendo las mismas condiciones experimentales establecidas para el ensayo de disolución u otras diferentes, según sea el objetivo. La metodología a seguir es similar a la del ensayo, con la diferencia de que se toman muestras a varios tiempos para poder obtener luego la curva de %D en función del tiempo, que representa al perfil de disolución (Fig. III-7).

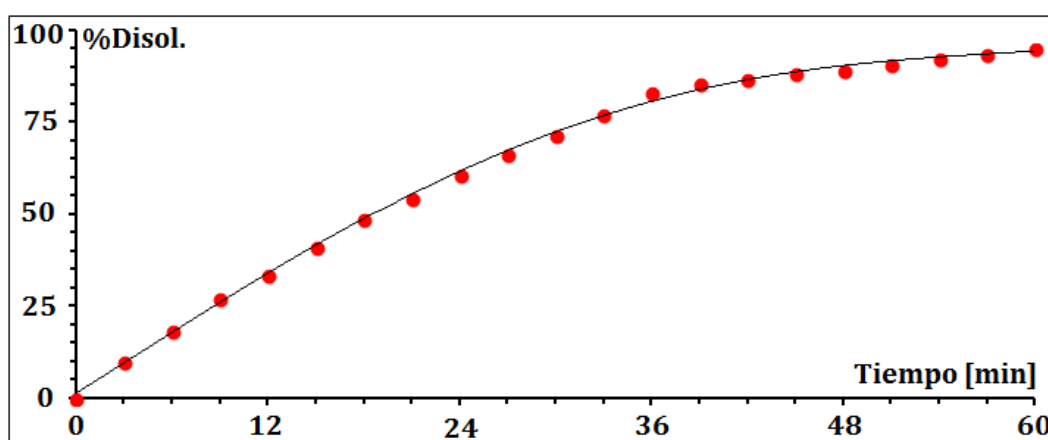


Fig. III-7: Perfil de disolución de un comprimido de metronidazol 500 mg, elaborado por PLAMECOR. El seguimiento se realizó mediante un método de análisis en flujo con determinación amperométrica.

2.6.- Comparación de perfiles de disolución

Con el aumento de la relevancia de los estudios de disolución *in vitro* de productos farmacéuticos, al punto de permitir reemplazar a los estudios *in vivo* en ciertas circunstancias, aumentó también la discusión referida a los métodos empleados para comparar dichos datos, como asimismo acerca de qué criterio de similitud aplicar.

En la década de los '90, aparecieron en la literatura científica numerosas propuestas de métodos útiles para la comparación de perfiles de disolución. Éstos pueden clasificarse en dos categorías:

- Métodos independientes del modelo
- Métodos dependientes del modelo

2.6.1.- Métodos independientes del modelo

Son aquellos que permiten comparar perfiles de disolución sin necesidad de ajustar los datos a un modelo o ecuación que los represente. Incluyen, entre otros, a los métodos matemáticos de cálculo de factores de diferencia y similitud (f_1 y f_2 , respectivamente), y también la comparación de parámetros obtenidos a partir de los perfiles, como el área bajo la curva (ABC_0^T) y la eficiencia de disolución (EF%).

El más conocido de los métodos empleados para comparar perfiles de disolución, posiblemente por ser el método actualmente exigido por la mayoría de las agencias regulatorias de medicamentos, es el cálculo de los factores de diferencia (f_1) y similitud (f_2):

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=t_1}^{t_n} (R_t - T_t)}{\sum_{t=t_1}^{t_n} R_t} \right\} \times 100 \quad \text{Ec. III-11}$$

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + (1/n) \sum_{t=t_1}^{t_n} (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad \text{Ec. III-12}$$

donde R_t y T_t son los %D al tiempo t para la referencia y la muestra respectivamente. Los perfiles se consideran similares si el valor de f_1 es menor a 15 y el de f_2 es mayor o igual a 50.

Para obtener el valor de ABC_0^T , se debe calcular el área bajo la curva del perfil de disolución, desde el tiempo cero hasta el último valor experimental, mediante el método de los trapezoides (Ec. III-13). Cada punto experimental forma con la horizontal un área de trapecio, excepto la primer área, que es la de un triángulo (Fig. III-8).

$$A = (B+b).h/2 \quad \text{Ec. III-13}$$

$$ABC_0^T = \Sigma A_t \quad \text{Ec. III-14}$$

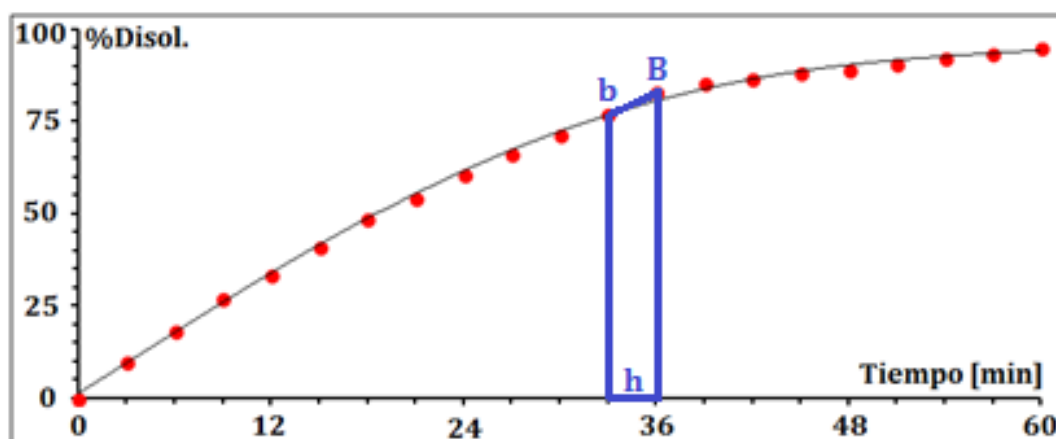


Fig. III-8: Aplicación del método del trapecoide para el cálculo de ABC_0^T .

La eficiencia de la disolución, EF%, viene dada por la expresión:

$$EF\% = (100.ABC_0^T)/(Q_{100}.T) \quad \text{Ec. III-15}$$

donde, $Q_{100}.T$ es el área total, es decir el rectángulo formado por la cantidad máxima disuelta y el último punto experimental (tiempo T).

2.6.2.- Métodos dependientes del modelo

Incluyen diferentes formas estadísticas de comparación de perfiles, con el denominador común de precisar, todas ellas, una etapa previa de modelado de los datos, de manera de ajustarlos a ecuaciones que describan su evolución temporal.

El criterio de selección del modelo, así como la interpretación de sus parámetros son desventajas de estos métodos.

Algunas de las ecuaciones matemáticas no-lineales más empleadas para el ajuste de datos de disolución pueden verse en la Tabla III-1 a continuación:

Modelo	Ecuación
Orden cero	$Q_{\infty} - Q_t = -K_0 \cdot t + Q_{\infty}$
Primer orden	$Q_{\infty} - Q_t = Q_{\infty} \cdot e^{-K_d \cdot t}$
Raiz cúbica (o de Hixson-Crowell)	$Q_t = Q_{\infty} - (Q_{\infty}^{1/3} - K_d \cdot t)^3$
Raiz cuadrada (o de Higuchi)	$Q_t = K_d \cdot t^{1/2}$
Función de Weibull	$\ln \{ \ln [Q_{\infty} / (Q_{\infty} - Q_t)] \} = \beta \cdot (\ln t - \ln t_d)$

Tabla III-1: Modelos matemáticos con sus ecuaciones respectivas, utilizados para el ajuste de los datos obtenidos en los perfiles de disolución. Símbolos utilizados: Q_{∞} , cantidad de fármaco disuelto a tiempo infinito (coincide con la dosis si la disolución es total); Q_t , cantidad de fármaco disuelta a cada tiempo t ; ($Q_{\infty} - Q_t$), cantidad de fármaco remanente o no disuelto a tiempo t ; K_0 , constante de orden cero; K_d , constante de difusión; β , es un parámetro de forma, adimensional; t_d , tiempo que tarda en disolverse el 63,2 % de la dosis.

Para analizar qué tipo de modelo matemático sigue el proceso de disolución de un determinado fármaco, se realizan regresiones lineales por mínimos cuadrados, transformando los datos en función de la ecuación representativa de cada modelo (Tabla III-2). El mejor ajuste de los datos a una línea recta nos indicará la cinética del proceso.

Modelo	Variable	
	Independiente	Dependiente
Orden Cero	t [min]	Q [mg]
Primer Orden	t [min]	$\ln (Q_{\infty} - Q_t)$
Raiz cúbica (o de Hixson-Crowell)	t [min]	$Q_{\infty}^{1/3} - (Q_{\infty} - Q_t)^{1/3}$
Raiz cuadrada (o de Higuchi)	$t^{1/2}$ [min ^{1/2}]	Q [mg]
Función de Weibull	$\ln t$	$\ln \{ \ln [Q_{\infty} / (Q_{\infty} - Q_t)] \}$

Tabla III-2: Expresiones de las variables regresionales para cada modelo cinético.

Un parámetro más discriminatorio de modelos es el Criterio de Información de Akaike (CIA), que tiene en cuenta la suma de los cuadrados residuales, que debe ser mínima y el número de parámetros de la función de ajuste. El valor de CIA más pequeño indicará cuál es el modelo que estadísticamente explica mejor el proceso de disolución. CIA se calcula según la ecuación:

$$CIA = n \cdot \ln SSQ + 2p$$

Ec. III-16

donde n es el número de pares de datos experimentales empleados en el ajuste; SSQ es la suma de los cuadrados de los residuales y p es el número de parámetros de la función de ajuste [18].

3.- REFERENCIAS

- [1] Ettre, L.S.; Howarth, C. High-Performance Liquid Chromatography, Vol.1, pag. 4, NY, Academic Press, 1980.
- [2] Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Principios de Análisis Instrumental, 5ta Edición, Cap. 26, pag. 731. Ed. Mc Graw-Hill. Madrid, 2001.
- [3] Sewell, P.; Clarke, B. Chromatography separation, NY, Wiley, 1988.
- [4] Dekker, M.; Johnson, J.A. Chromatography Theory and Basic Principles, NY, 1987.
- [5] Robards, K.; Haddad, P.R.; Jackson, P.E. Principles and Practice of Modern Chromatography Methods, NY, Academic Press, 1994.
- [6] Ettre, L.S. *Pure Appl Chem* 65 (1993) 819.
- [7] Majors, R.E. *LC-GC* 13(8) (1995) 202.
- [8] Voltoné, M.G.; Quiroga, P. Análisis Farmacéutico. Series Libros de Cátedra. Cap. 10, pag. 232. Editorial EDULP. La Pata, 2013.
- [9] Shargel, L.; Yu, A.B.C. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. Prentice-Hall International, London, 1993.
- [10] Saaverda, I.; Iturriaga, V.; Ávila, L.; Quiñones, L. Estudios de bioexención (in vitro) para establecer equivalencia de medicamentos. *Cuad Méd Soc* 51(2) (2011) 66-79.
- [11] U.S. Food and Drug Administration. Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para productos farmacéuticos administrados oralmente - consideraciones generales. Disponible en la página web: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm201469.htm>
- [12] Arancibia, A.; Pezoa, R.; Biodisponibilidad de medicamentos. I Simposio Internacional. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas. Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas. Santiago de Chile, 1992.

- [13] Shah, V.P.; Midha, K.K.; Dighe, S.; McGilveray, I.J.; Skelly, J.P.; Yacobi, A. . Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 16:4 (1991) 249-55.
- [14] Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Farmacopea Argentina, 8va Edición, 2011.
- [15] US Pharmacopoeial Convention. United State Pharmacopoeia 38 and National Formulary 32. Rockville, Meryland. 2015.
- [16] Noyes, A.A.; Whitney, W.R. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J Am Chem Soc* 19 (1897) 930-934.
- [17] Dokoumetzidis, A.; Macheras, P. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *Int J Pharm* 321(1-2) (2006) 1-11.
- [18] Aguilar Ros, A.; Caamaño Somoza, M.; Martín Martín, F.R.; Montejo Rubio, M.C. Biofarmacia y Farmacocinética, ejercicios y problemas resueltos. Ed. Elsevier. Barcelona, 2008.

VALIDACIÓN

1.- METODOLOGÍAS ALTERNATIVAS DE ANÁLISIS

Los equipos de CLAE constituyen un instrumento de alto costo, de funcionamiento complejo y que necesitan de técnicos entrenados para operar. Además, involucran el uso de solventes orgánicos, poco amigables con el medio ambiente, que generan grandes volúmenes de desechos contaminantes.

Las Farmacopeas británica, estadounidense, europea, internacional así como la argentina promueven la incorporación de metodologías innovadoras en sus monografías [1-5]. Además son varias las presentaciones farmacéuticas que aún no están incorporadas en ellas.

Estas metodologías deben presentar ventajas en cuanto a costo, sencillez y tiempo de análisis, debiendo ser estadísticamente comparables con los métodos de referencia en cuanto a los atributos analíticos (precisión, exactitud, sensibilidad, robustez, etc.).

Las técnicas analíticas alternativas desarrolladas en la presente tesis abarcan no solamente la valoración del principio activo en las presentaciones farmacéuticas, sino que también son susceptibles a ser aplicadas a los ensayos de uniformidad de unidades de dosificación, de disolución y de estabilidad. Dichas metodologías suman nuevas aplicaciones de la Química Analítica en el campo de la Farmacología, basadas en técnicas de menor costo operativo. Esto implica un beneficio tanto económico como en el terreno del conocimiento científico, así como también social, fruto de la vinculación entre el ente académico y PLAMECOR.

Las metodologías desarrolladas han sido evaluadas en cuanto a sus parámetros de desempeño analítico: exactitud, precisión, linealidad, selectividad, intervalos de linealidad y robustez, a fin de ser sometidas al proceso de Validación de Métodos de Análisis establecido por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) en su Farmacopea [5].

2.- VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

El término validación ha sido definido en la literatura de diversas maneras y por numerosos autores. Aunque los términos dados son diferentes, el significado es siempre el mismo: especificar e implementar, aprobar y documentar [6].

Una de las definiciones más utilizadas es la provista por las Normas ISO, que señalan que la Validación es la confirmación, mediante el examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto [7]. Por otro lado, la Farmacopea Argentina define a la Validación como el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio debidamente documentados, que un método es apropiado para el uso propuesto [5].

En Química Farmacéutica, las exigencias de validación de un método, a efectos del cumplimiento de normas, comprenden estudios de especificidad, linealidad, exactitud, precisión, intervalo lineal, límite de detección, límite de cuantificación y robustez [5, 8]. A continuación se define cada uno de los atributos necesarios para validar un método analítico junto con una breve descripción de cómo deben determinarse.

2.1.- Especificidad

La especificidad es la capacidad de un método para evaluar inequívocamente al analito en presencia de los componentes que pueden estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc. Esto puede realizarse agregando al producto farmacéutico, cantidades apropiadas de impurezas y/o excipientes y demostrando que el resultado de la valoración no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños. Otro procedimiento consiste en evaluar las respuestas obtenidas cuando se analizan alícuotas de muestra, de placebo y de placebo con sobreagregado del analito [5,6,8]. Entendiéndose como placebo, a una mezcla de los excipientes que acompañan a la formulación, en similares proporciones, pero sin el agregado del principio activo correspondiente.

2.2.- Linealidad e intervalo

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado.

En algunos casos puede ser necesaria la aplicación de transformaciones matemáticas para obtener una recta.

El intervalo correspondiente se refiere al rango de concentraciones del analito que pueden ser determinadas con precisión, exactitud y linealidad. Normalmente, se expresa con las mismas unidades que los resultados del ensayo y debería abarcar, al menos, el intervalo de 0,5 a 1,5 veces la concentración esperada de analito [5,6,8].

La linealidad debe establecerse por medio de un método estadístico apropiado (por ej., cálculo de regresión por mínimos cuadrados). Los datos obtenidos a partir de la recta que mejor se ajusta se utilizan para estimar matemáticamente el grado de linealidad. Deben informarse el coeficiente de correlación (r^2), la ordenada al origen (o intercepto) y la pendiente de la recta de regresión ($y = A + Bx$) [5,6,8].

2.3.- Exactitud

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real. La exactitud debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico.

En el caso de la valoración de una sustancia en un producto farmacéutico, la exactitud puede determinarse mediante un ensayo de recuperación, es decir la aplicación del método analítico a mezclas preparadas con todos los componentes del producto a las cuales se les agrega cantidades conocidas del analito dentro del intervalo del método. Este procedimiento asegura que la matriz de la muestra y del estándar añadido son esencialmente las mismas. La exactitud debe evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración que cubran el intervalo especificado. La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación obtenido a partir de la valoración de una cantidad agregada, conocida, del analito en la muestra. Como criterio de aceptación se establece una recuperación del $100 \pm 2 \%$ [5,6,8].

Si no es posible obtener muestras de todos los componentes del producto, se acepta agregar cantidades conocidas de analito al producto (método de adición de estándar) o comparar los resultados obtenidos con un segundo método cuya exactitud hay sido establecida o sea considerado como oficial o de referencia. En este último caso, los resultados obtenidos por ambos métodos deben ser analizados mediante las pruebas

t de Student y F de Fisher para evaluar las medias y varianzas, respectivamente, para un nivel de confianza del 95 % [5,6,8].

2.4.- Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. Generalmente, se expresa como desviación estándar o desviación estándar relativa (también conocida como coeficiente de variación, CV) de una serie de mediciones. La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad [5,6,8].

2.4.1.- Repetibilidad

La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto. Puede evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el método (por ej.: tres niveles de concentración y tres replicas de cada nivel), o un mínimo de seis determinaciones al 100% del valor declarado. Como criterio de aceptación se calcula el CV, el cual debe ser igual o menor al 2 % [5,6,8].

2.4.2.- Precisión intermedia

La precisión intermedia expresa las variaciones intralaboratorio. Para evaluarla, se realiza un mínimo de cuatro series de determinaciones ejecutadas por dos operadores en dos días distintos utilizando el mismo instrumental. Cada serie consta de nueve determinaciones que cubren el intervalo especificado para el método (por ej.: tres niveles de concentración y tres replicas de cada nivel). Como criterio de aceptación se calcula el CV global del ensayo, el cual debería ser menor al doble del CV del ensayo de repetibilidad ($CV_{\text{global}} < 2 \times CV_{\text{repet}})$ [5,6,8].

2.4.3.- Reproducibilidad

La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios, realizada mediante un estudio colaborativo. Se analizan alícuotas de una misma muestra por diferentes analistas en diferentes laboratorios y en fechas distintas, usando los equipos y reactivos de cada uno de los laboratorios participantes del ensayo [5,6,8].

2.5.- Límite de detección

El límite de detección (LD) es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo condiciones experimentales establecidas [5,6,8].

Existen diversos criterios para determinar LD. En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras de blanco y determinando la relación señal/ruido (S/R). Una relación S/R de 3:1 o 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar LD [5,6,8]. Otras aproximaciones se basan en realizar un análisis de regresión para estimar los valores de la ordenada al origen (y_A) y su desviación (s_A). Se define entonces al LD a partir de la ecuación [9]:

$$LD = y_A + 3.s_A \qquad \text{Ec. IV-1}$$

Cualquiera sea el procedimiento empleado, el LD debería ser luego confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el LD propuesto [5,6,8].

2.6.- Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LC) es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. Se expresa en las mismas unidades de concentración empleadas para el analito de la muestra [5,6,8].

Se han propuesto varios métodos para determinar LC. En métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, se puede emplear una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades

conocidas de analito con muestras de blanco y determinando la relación señal/ruido (S/R). Una relación S/R de 10:1 se considera generalmente aceptable para estimar LC [5,6,8]. Otras aproximaciones se basan en realizar un análisis de regresión para estimar los valores de la ordenada al origen (y_A) y su desviación (s_A). Se define entonces al LC a partir de la ecuación [9]:

$$LC = y_A + 10.s_A$$

Ec. IV-2

Cualquiera sea el procedimiento empleado, el LC debería ser luego confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el LC propuesto [5,6,8].

2.7.- Robustez

La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad de no verse afectado por pequeños cambios deliberados de parámetros operativos, proporcionando una indicación de su confiabilidad. Ejemplos de variaciones que deben estudiarse durante la evaluación de la robustez de un método son: diferentes instrumentos, diferentes lotes de reactivos, diferentes tiempos de valoración, diferentes temperaturas de valoración, etc. Se expresa normalmente como la falta de influencia de las variables operativas y del entorno sobre los resultados del ensayo.

La robustez de un método analítico se determina mediante el análisis de alícuotas a partir de lotes homogéneos empleando condiciones operativas y ambientales diferentes pero que están dentro de los parámetros especificados en la valoración. El grado de reproducibilidad de los resultados del ensayo es luego determinado como una función de las variables de la valoración. Esta reproducibilidad puede compararse con la precisión de la valoración bajo condiciones normales para obtener una medida de la robustez del método analítico [5,6,8].

3.- DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Los métodos analíticos descritos en las farmacopeas [1-5] varían desde determinaciones analíticas complejas hasta la evaluación subjetiva de ciertas características, para los cuales se requieren diferentes esquemas de validación. Las categorías de métodos analíticos más comunes son las siguientes:

- Categoría I: Incluye a los métodos analíticos empleados para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos.
- Categoría II: Incluye a los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en las materias primas o productos de degradación en las formulaciones farmacéuticas. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos límites.
- Categoría III: Incluye a los métodos analíticos empleados para la determinación de características de desempeño (por ej., disolución, liberación de principio activo, etc.).
- Categoría IV: Incluye ensayos de identificación.

Para cada categoría de análisis se necesita de diferente información analítica. En la Tabla IV-1 se indican los atributos que se requieren para cada una de estas categorías. La validez de un método analítico puede comprobarse solo mediante estudios de laboratorio. En consecuencia, la documentación que avale tales estudios es un requisito básico para determinar si un método es apropiado para una aplicación determinada. Cualquier método analítico propuesto debe estar acompañado de la documentación necesaria [5,6,8].

ATRIBUTO	CAT. I	CAT. II		CAT. III	CAT. IV
		Cuantitativo	Ensayo límite		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Repetibilidad	SI	SI	NO	SI	NO
Precisión intermedia	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

* Puede requerirse según la naturaleza del ensayo.

Tabla IV-1: Datos requeridos para la validación de un método analítico [5].

4.- REFERENCIAS

- [1] British Pharmacopoeial Commission Secretariat of the Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, *British Pharmacopoeia 2015*. Londres.
- [2] US Pharmacopoeial Convention. *United State Pharmacopoeia 38 and National Formulary 32*. Rockville, Meryland. 2015.
- [3] European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). *European Pharmacopoeia*, 8va. Edición, 2014.
- [4] Organización Mundial de la Salud, Organización de las Naciones Unidas. *Farmacopea Internacional*, 4ta Edición, 2014.
- [5] Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. *Farmacopea Argentina*, 8va Edición, 2011.
- [6] Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). *Validación de métodos analíticos*. Publicaciones AEFI, Barcelona, 2001.
- [7] ISO/IEC 17025:2005
- [8] Harris, D.A. *Análisis Químico Cuantitativo*, 3ra Edición (6ta Edición original). Cap. 29, pag. 723. Editorial Reverté.
- [9] Miller, J.N.; Miller, J.C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4ta Edición, Cap. 5. Editorial Pearson, Madrid, 2002.

CAPÍTULO V

INTRODUCCIÓN A LA ESPECTROFOTOMETRÍA

1.- INTRODUCCIÓN

La espectroscopía es la ciencia que estudia las distintas interacciones de la radiación con la materia. Los métodos espectrométricos comprenden un amplio grupo que incluye a las espectroscopias atómica y molecular [1].

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 [1].

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 manifestaciones, aunque más difícilmente reconocibles, incluyen los rayos gamma, los rayos X, las radiaciones ultravioleta (UV), de microondas y radiofrecuencia [2].

2.- 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 a través del vacío.

El modelo ondulatorio falla al intentar explicar aquellos fenómenos asociados con la absorción o emisión de energía radiante. Para lograr la comprensión de éstos 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 tanto de partículas como de ondas [1-3].

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 Fig. V-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.

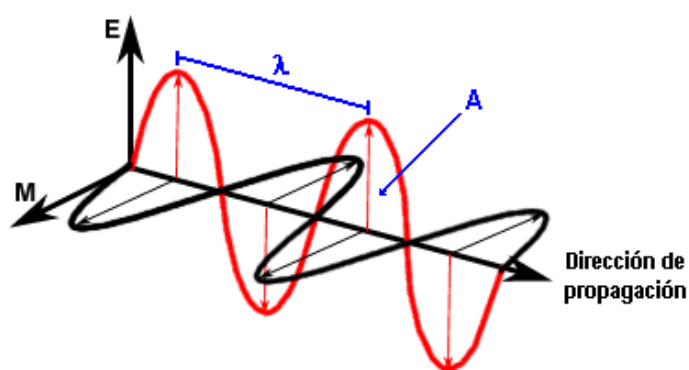


Fig. V-1. Representación de un haz de radiación monocromática, polarizada en el plano. Los campos eléctrico (E) y magnético (M) son perpendiculares entre sí y respecto a la dirección de propagación. Se indican también la amplitud (A) y la longitud de onda (λ) del haz.

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 dos máximos o mínimos sucesivos por un punto fijo en el espacio se denomina **periodo** de la radiación (p). La **frecuencia** (ν), es el número de oscilaciones del campo por segundo, y es igual a la inversa del período;

$$\nu = 1/p$$

Ec. V-1

La unidad habitual de frecuencia es la inversa de segundo (s^{-1}) o el *Hertz* (Hz), que corresponde a un ciclo por segundo. Otro parámetro característico es la **longitud de onda** (λ), 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* (μm) es útil para la región infrarroja.

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

$$v \cdot \lambda = c \quad \text{Ec. V-2}$$

donde c es la velocidad de la luz en el vacío ($2,998 \cdot 10^8$ m/s). En un medio distinto al del vacío, la velocidad de la luz (v) es:

$$v = c/n \quad \text{Ec. V-3}$$

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:

$$E = h \cdot v \quad \text{Ec. V-4}$$

donde h es la **constante de Planck** ($h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s).

La Ec. V-4 afirma que la energía es proporcional a la frecuencia. Combinando las ecuaciones Ec. V-2 y Ec. V-4, se puede escribir

$$E = h \cdot c / \lambda \quad \text{Ec. V-5}$$

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 [4].

3.- EL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

El espectro electromagnético abarca un gran intervalo de longitudes de onda y de frecuencias (como así también de energías). La Fig. V-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 [1-5].

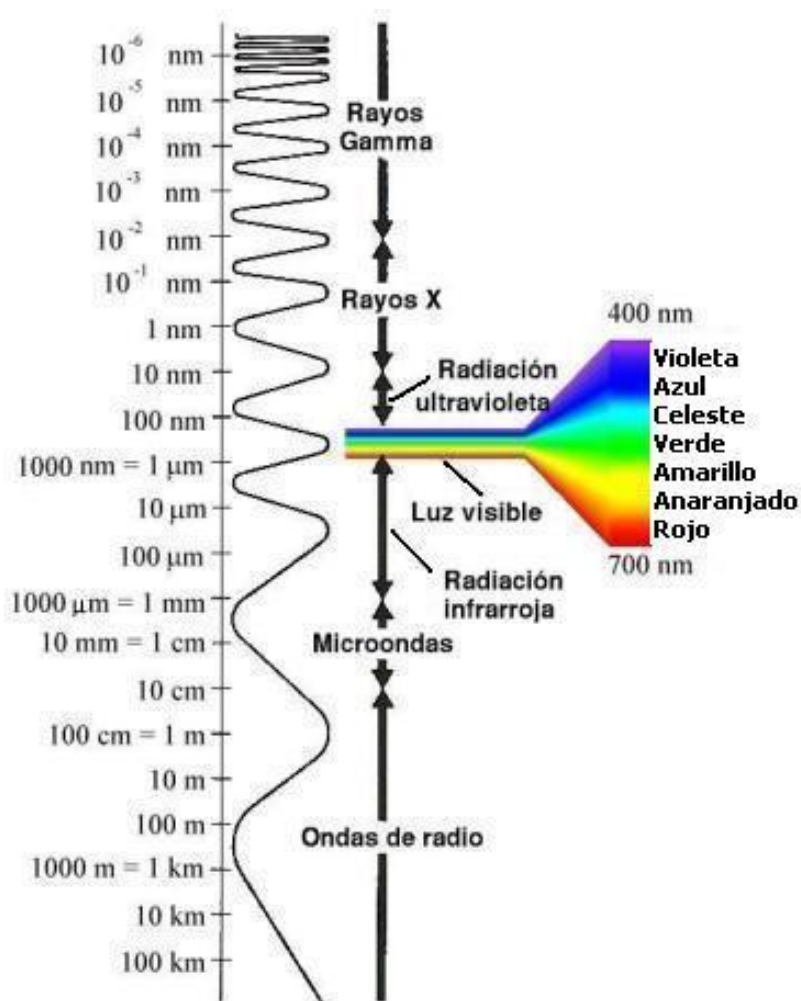


Fig. V-2: Regiones del espectro electromagnético.

4.- ASPECTOS CUANTITATIVOS DE LAS MEDIDAS ESPECTROQUÍMICAS

Como se observa en la Tabla V-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

$$S = k.P$$

Ec. V-6

donde k es una constante de proporcionalidad.

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 y molecular
Dispersión	Dispersada, P_d	$P_d = k.c$	Dispersión Raman
			Turbidimetría
			Nefelometría
Absorción	Incidente, P_0	$-\log P/P_0 = k.c$	Absorción atómica
	y Transmitida, P		Absorción molecular

Tabla V-1: Principales clases de métodos espectroquímicos.

5.- ABSORCIÓN DE LUZ

Cuando una molécula absorbe un fotón aumenta su energía. Se dice que la molécula ha pasado a un **estado excitado** (Fig. V-3). Si una molécula emite un fotón, disminuye su energía. El estado de mínima energía de una molécula se denomina **estado fundamental** [4].

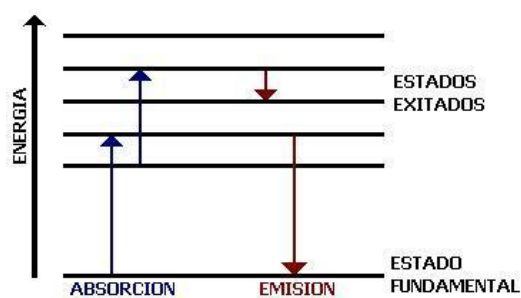


Fig. V-3: Cuando una molécula absorbe luz, aumenta su energía.
Al emitir luz, disminuye su energía.

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 .

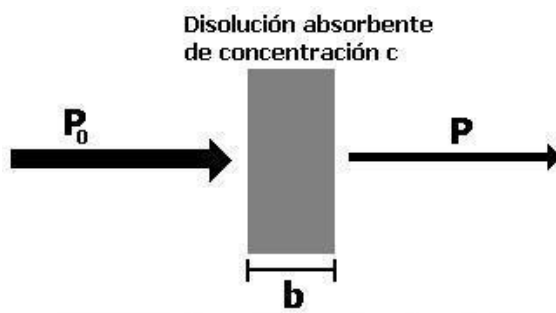


Fig. V-4: Atenuación de un haz de radiación por una disolución absorbente.

5.1.- Transmitancia

La Fig. V-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:

$$T = P/P_0 \quad \text{Ec. V-7}$$

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

$$\%T = (P/P_0).100$$

Ec. V-8

5.2.- Absorbancia

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

$$A = -\log T = \log P_0/P$$

Ec. V-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 $A = 0$.

5.3.- 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

$$A = a.b.C$$

Ec. V-10

donde a es una constante de proporcionalidad denominada ***absortividad*** que es función de la naturaleza del analito y de la longitud de onda. 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 L.g⁻¹.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 ϵ . Así, cuando b está en cm y c en mol/L,

$$A = \epsilon.b.c$$

Ec. V-11

donde ϵ tiene las unidades de L.mol⁻¹.cm⁻¹. La absortividad molar es característica de una sustancia y nos dice cuanta luz absorbe a una longitud de onda determinada [2].

Las ecuaciones Ec. V-10 y Ec. V-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” (UA) después del valor numérico[1-2].

El **espectro de absorción** de una sustancia es un gráfico que muestra como varía A (o ϵ) al variar la longitud de onda (Fig. V-5).

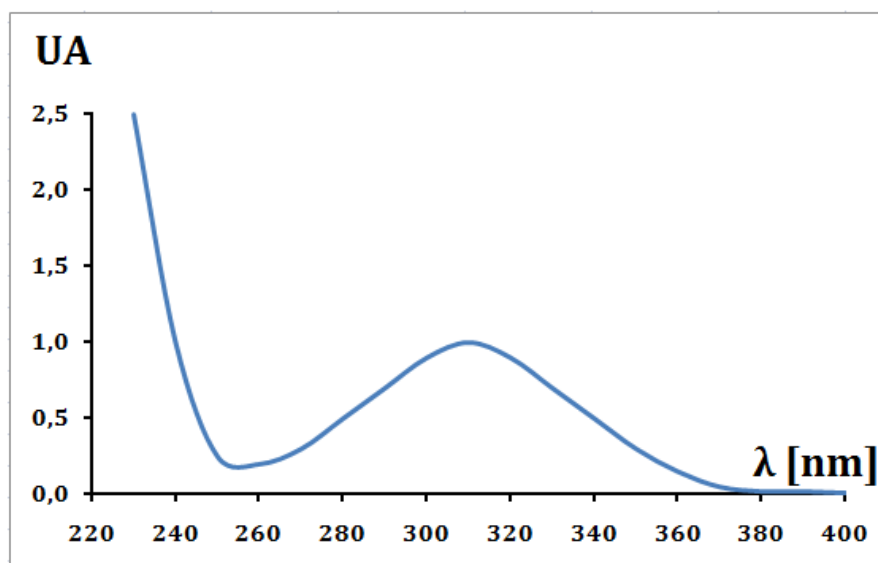


Fig. V-5: Espectro de absorción UV del metronidazol. [MNZ] = 0,02 mg/mL.

La espectroscopía de absorción es una de las herramientas mas utilizadas en el análisis cuantitativo. Las características mas importantes de los métodos espectrofotométricos incluyen:

- gran aplicabilidad, tanto para sistemas orgánicos como inorgánicos;
- sensibilidades en el orden de 10^{-4} a 10^{-7} M;
- selectividad moderada a alta;
- buena precisión;
- fácil adquisición de datos.

Las aplicaciones de los métodos de absorción UV y visible no solo son numerosas, sino que abarcan todos los campos en los que se demanda información química cuantitativa [4].

6.- MEDIDA DE LA ABSORBANCIA

Los componentes esenciales de un espectrofotómetro (instrumento utilizado para medir la absorbancia de la luz) se muestran en Fig. V-6:

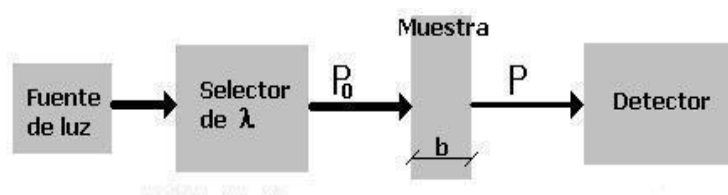


Fig. V-6: Diagrama en bloque de un espectrofotómetro de haz simple.

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 [1].

En espectroscopía visible y UV se coloca una muestra líquida normalmente en una celda llamada **cubeta**, que tiene paredes lisas de sílice fundida (SiO_2). El vidrio es adecuado para espectroscopía visible, pero no para UV, porque absorbe dicha radiación. Las cubetas más utilizadas tienen un camino óptico (b) de 1,00 cm, y se adquieren en pares calibrados para la muestra y la referencia [2].

La Fig. V-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 el 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. La Ley de Lambert-Beer se cumple mejor cuando la absorbancia es constante.
- 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 (alta 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 [1].

7.- REFERENCIAS

- [1] Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Principios de Análisis Instrumental, 5ta edición. Editorial Mc Graw-Hill. Madrid, 2001.
- [2] Harris, D.C. Análisis Químico Cuantitativo, 3ra edición. Editorial Reverté. Córdoba, España, 2009.
- [3] Rubinson, K.A.; Rubinson, J.F. Análisis Instrumental. Editorial Prentice Hall. Madrid, 2001.
- [4] Rouessac, F.; Rouessac, A. Análisis Químico. Editorial Mc Graw-Hill. Madrid, 2003.
- [5] Higson, S.J. Química Analítica. Editorial Mc Graw-Hill. India, 2004.

INTRODUCCIÓN A LA ELECTROQUÍMICA ANALÍTICA

1.- INTRODUCCIÓN

La Química Electroanalítica abarca un grupo de métodos analíticos cuantitativos basados en las propiedades eléctricas de un analito en solución cuando forma parte de una celda electroquímica [1-3]. Las técnicas electroanalíticas son capaces de proporcionar límites de detección excepcionalmente bajos junto con una abundante información que permite caracterizar y describir los sistemas tratables electroquímicamente [4]. Tal información incluye la estequiometría de la reacción, la velocidad de transferencia de carga interfacial y de transferencia de masas, además de las constantes de velocidad y de equilibrio de reacciones químicas [5].

Los métodos electroanalíticos tienen ciertas ventajas de carácter general sobre otro tipo de métodos:

- las medidas electroquímicas son a menudo específicas del estado de oxidación particular de un elemento, mientras que la mayor parte del resto de métodos analíticos sólo puede proporcionar la concentración total del elemento;
- los métodos electroquímicos utilizan una instrumentación que es relativamente económica;
- pueden proporcionar información sobre las actividades en lugar de las concentraciones de las especies químicas;
- ofrece posibilidades de automatización de una manera sencilla y económica.

1.1.- Conceptos básicos

1.1.1.- Reacciones redox

Una reacción redox resulta de la transferencia de electrones de una especie a otra. Se dice que una especie se oxida cuando pierde electrones, mientras que se reduce cuando los gana. Un agente oxidante toma electrones de otra sustancia y se reduce. Por otro lado, un agente reductor cede electrones a otra sustancia y se oxida en dicho proceso. En la siguiente reacción:



el Fe^{3+} es el agente oxidante, porque toma un electrón del V^{2+} . Así mismo, el V^{2+} es el agente reductor, ya que cede un electrón al Fe^{3+} .

1.1.2.- Carga eléctrica

La carga eléctrica (q) se mide en culombios (C). Un electrón tiene una carga de $1,602 \times 10^{-19}$ C, de manera que 1 mol de electrones tiene una carga de $9,649 \times 10^4$ C. Esta cantidad se conoce como constante de Faraday (F) y sus unidades son C/mol. La relación entre carga y moles viene dada por la ecuación:

$$q = n \cdot F \quad \text{Ec. IX-2}$$

donde n son los moles de electrones transferidos.

1.1.3.- Corriente eléctrica

La cantidad de carga eléctrica que circula por segundo a través de un circuito se llama corriente eléctrica (I). La unidad de corriente es el amper o amperio (A). Una corriente de 1 A representa una carga de 1 C que pasa por un punto cada segundo.

1.1.4.- Voltaje, trabajo y energía libre

La diferencia de potencial eléctrico (E) entre dos puntos es una medida del trabajo (W) que es necesario hacer, o que se puede realizar, cuando una carga eléctrica se mueve

de un punto al otro. La diferencia de potencial se mide en voltios (V). El trabajo tiene dimensiones de energía, cuyas unidades son el joule o julio (J). Cuando una carga q se mueve a través de un campo eléctrico E , el trabajo realizado (W) es:

$$W = E \cdot q \quad \text{Ec. IX-3}$$

El julio (J) es la energía ganada o perdida cuando 1 C de carga se traslada entre dos puntos cuyos potenciales difieren en 1 V.

La variación de energía libre (ΔG) de una reacción química, que transcurre de forma reversible a temperatura y presión constantes, es igual al trabajo eléctrico máximo que se puede realizar con esa reacción química sobre su entorno.

$$W = - \Delta G \quad \text{Ec. IX-4}$$

El signo negativo de la ecuación Ec. IX-4 indica que la energía libre de un sistema disminuye cuando se realiza trabajo sobre su entorno. Combinando las ecuaciones Ec. IX-2, Ec. IX-3 y Ec. IX-4, resulta una ecuación de capital importancia en química:

$$\Delta G = - W = E \cdot q \quad \rightarrow \quad \Delta G = - nFE \quad \text{Ec. IX-5}$$

La ecuación Ec. IX-5 relaciona la variación de energía libre de una reacción con la diferencia de potencial que se puede generar por la reacción.

1.1.5.- Ley de Ohm

La ley de Ohm afirma que la corriente eléctrica que pasa por un circuito es directamente proporcional al voltaje, e inversamente proporcional a la resistencia (R) del circuito.

$$I = E/R \quad \text{Ec. IX-6}$$

La resistencia se mide en ohmios (Ω). Por un circuito con una diferencia de potencial de 1 V y una resistencia de 1 Ω , circula una corriente de 1 A.

1.1.6.- Procesos farádicos y no farádicos

Se distinguen dos tipos de procesos en los electrodos: uno incluye aquellos en los cuales las cargas (electrones) son transferidas a través de la interfase electrodo-solución; aquí tiene ocurrencia la oxidación o la reducción. Tales procesos están gobernados por la Leyes de Faraday y son llamados procesos farádicos.

Bajo ciertas condiciones, un electrodo puede estar en una región de potencial en que las reacciones de transferencia de carga no ocurren porque ellas son termodinámica o bien cinéticamente desfavorables. Sin embargo, ocurren procesos adsorptivos y la estructura de la interfase electrodo-solución puede modificarse, causando a su vez cambios transitorios en la corriente o potencial. Estos son llamados procesos no farádicos [4].

1.1.7.- Corriente de carga

Un ejemplo importante de proceso no farádico es la carga de un electrodo. A un dado potencial E_1 , existe una cierta carga por unidad de área en el metal del electrodo, con una cantidad igual de carga de signo opuesto presente en la adyacencia inmediata del electrodo, formando lo que se llama la doble capa eléctrica (Fig. IX-1) [4].

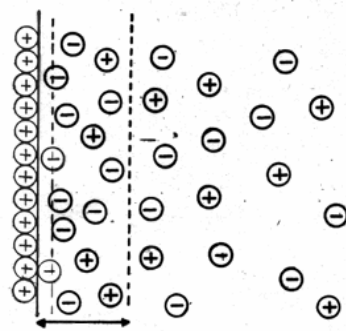


Fig. IX-1: esquema de la doble capa eléctrica.

Si el potencial es cambiado a E_2 , en que la carga por unidad de área del electrodo es mayor ($E_2 > E_1$), la corriente puede fluir para llevar o acarrear esas cargas extras a la interfase. Esta es llamada corriente de carga y es una corriente transiente que fluye solamente hasta que se consiga la nueva carga de equilibrio. Luego, la corriente se detiene debido a que en ausencia de reacciones redox no existe ningún mecanismo para que la corriente fluya a través de la interfase. Así, el proceso de carga es no farádico y la corriente de carga es una corriente no farádica.

Para comprender la diferencia básica entre una corriente farádica y no farádica, imagínese un electrón viajando a través del circuito externo hacia la superficie de un electrodo. Cuando el electrón alcanza la interfase de la solución, puede hacer sólo una de dos cosas: puede permanecer en la superficie del electrodo y aumentar la carga de la doble capa, lo que constituye una corriente no farádica; o, alternatively, puede abandonar la superficie del electrodo y transferirse a una especie en la solución, convirtiéndose de este modo en parte de una corriente farádica [4].

Un electrodo para el cual no se transfieren cargas a través de la interfase con la solución, cualquiera sea el potencial impuesto desde una fuente de voltaje externa, es llamado electrodo idealmente polarizado (EIP). Ningún electrodo real tiene este comportamiento en todos los potenciales, pero ciertos sistemas se aproximan a ésta conducta en un rango limitado de potenciales. Por ejemplo, un electrodo de Hg en contacto con una solución desoxigenada de NaCl actúa como un EIP sobre un rango cercano a los 2 V. Los dos procesos farádicos que podrían ocurrir, la reducción de Na^+ a amalgama de sodio (Na/Hg) y la oxidación del electrodo a Hg_2Cl_2 , tienen lugar a potenciales que difieren de 2 V. En los EIP solamente ocurren procesos no farádicos.

1.1.8.- Capacitancia de un electrodo

Siempre que la carga no pueda atravesar la interfase de un EIP cuando se cambia el potencial, la conducta de su interfase es similar a la de un capacitor. Cuando se aplica un potencial a través de un capacitor, él se carga hasta que satisface la relación:

$$C = q/E$$

Ec. IX-7

donde C es la capacitancia expresada en faradios [F]; q es la carga en culombios [C]; y E el voltaje aplicado al capacitor en voltios [V].

El tiempo durante el cual la corriente de carga fluye es directamente proporcional a la capacidad del electrodo y a la resistencia de la solución. Para electrodos de área constante inmersos en soluciones de muy baja resistencia, el tiempo durante el cual la corriente de carga es apreciable es muy corto (fracciones de segundo). Con electrodos cuyas áreas aumentan en el tiempo, por ejemplo, el electrodo de goteo de mercurio, la

corriente de carga muere más lentamente (es esencialmente proporcional a la velocidad de exposición de la superficie fresca).

En términos de aplicaciones analíticas, la corriente de carga es frecuentemente un rasgo distintivo, ya que a menudo es un factor limitante en la sensibilidad de los métodos electroquímicos.

Pueden usarse técnicas especiales para distinguir entre la corriente debida a la carga de la doble capa y la corriente debida a reacciones farádicas de la sustancia de interés. En general, la corriente de carga decrece rápidamente en el tiempo, mientras los cambios en el tiempo de la corriente farádica son mucho más lentos en experiencias comunes.

1.1.9.- Procesos farádicos

Consideremos un EIP: únicamente ocurren procesos no farádicos, ninguna carga atraviesa la interfase y ninguna corriente continua puede fluir. Adicionando una sustancia que puede ser oxidada o reducida a una diferencia de potencial particular, la corriente fluye; se dice que el electrodo es despolarizado y la sustancia responsable es llamada despolarizador.

Los procesos farádicos pueden proceder a varias velocidades, dentro de un rango posible. Si el proceso es tan rápido que las especies oxidadas y reducidas están en equilibrio, la reacción es llamada reversible y se aplica la ecuación de Nernst. La reversibilidad, así definida, depende de las velocidades relativas de los procesos de electrodo y de la rapidez de las mediciones electroquímicas. Un sistema particular puede conducirse reversiblemente cuando las mediciones son hechas lentamente, pero irreversiblemente si las mediciones involucran un tiempo muy corto (pulsos de corriente o de voltaje, altas frecuencias de una señal eléctrica alterna). Consecuentemente, en la actualidad se prefiere decir que los procesos de electrodo se comportan como rápidos o lentos y que tienen una conducta reversible o irreversible (más que el uso clásico de decir que son reversibles o irreversibles).

Una vez que la corriente farádica fluye, el equilibrio entre las especies oxidadas y reducidas es perturbado y uno puede restablecerlo continuamente solo en el caso que todas las etapas involucradas en el proceso de electrodo sean suficientemente rápidas. Estos procesos incluyen transferencia de carga, movimiento del despolarizador al

electrodo y del producto volviendo desde él (transporte de masa) y la posible adsorción o reacciones químicas.

Si existe un retardo, luego el potencial de electrodo cambia su valor de equilibrio; la magnitud del cambio del potencial es llamada sobrevoltaje o sobrepotencial.

Muchos sistemas pueden mostrar sobrevoltajes, esto es, ellos pueden volverse polarizados. En un electrodo polarizado la corriente fluye, pero su magnitud es menor que si el sistema se comportara de modo reversible.

La corriente está limitada por una de las etapas (o más de una) en los procesos de electrodo. Si la transferencia de carga es la etapa lenta (limitante) el efecto es llamado polarización por activación. Si la velocidad o movimiento lento del despolarizador o del producto es responsable, se lo refiere como polarización por concentración.

Si los procesos de electrodo fuesen infinitamente rápidos, entonces la corriente podría ser obtenida sin sobrevoltajes; esto daría un electrodo no polarizable. En la práctica, algunos sistemas de electrodo permiten que fluyan corrientes apreciables con sobrepotenciales despreciables y tales sistemas son usados como electrodos de referencia [4].

2.- CONVENCIONES DE SIGNO Y LA ECUACION DE NERNST

Las convenciones de signo de la electroquímica han causado grandes dificultades y desentendimientos no solamente a los estudiantes sino también a los propicios investigadores por muchos años.

Todas las celdas electroquímicas son consideradas como una combinación de dos hemiceldas: una para la reacción de reducción y otra para la reacción de oxidación. Para que fluya una corriente en un sistema electroquímico, ambas, oxidación y reducción, deben ocurrir. Los electrones deben tener lugar a donde ir; ellos no pueden simplemente aparecer o desaparecer.

Una reacción de hemicelda puede ser escrita como oxidación o reducción. Por convención éstas son escritas como reducciones. De acuerdo con el convenio de la IUPAC,

el término potencial de electrodo se reserva exclusivamente para semirreacciones escritas como reducciones:



Usando una tabla de fuerzas electromotrices o de potenciales estándares (valores de E^0) para hemirreacciones, el potencial de cada hemicelda puede calcularse por la ecuación de Nernst:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{C_{RED}}{C_{OX}} \quad \text{Ec. IX-9}$$

3.- MODOS DE TRANSPORTE ELECTROQUÍMICO

En general, las especies químicas son transportadas en solución por uno o más procesos conceptualmente distintos: migración, convección y difusión.

3.1.- Migración

La migración eléctrica es el movimiento de sustancias cargadas en un gradiente eléctrico; un resultado de la fuerza ejercida por un campo eléctrico sobre partículas. Esto puede ser visto como una consecuencia de una simple atracción culómbica de, por ejemplo, un ión cargado positivamente hacia una superficie de electrodo cargada negativamente o, alternativamente, una repulsión desde un electrodo cargado positivamente.

En casi todos los métodos electroquímicos de análisis, los efectos de la migración no tienen propósitos útiles; son usualmente “tapados” por la adición de una cantidad relativamente grande (0,1-1,0 M) de un electrolito “soporte”, “inerte”, “indiferente”, “base”, tal como el KCl o HNO_3 . La corriente puede fluir entonces como resultado de la

migración de los iones K^+ o Cl^- , siendo ésta despreciable para las especies electroactivas, las cuales se mueven como resultado de diferencias de concentración.

3.2.- Convección

La convección significa el transporte de materia de la sustancia electroactiva hacia el electrodo por movimiento físicos groseros (flujo hidrodinámico) de la solución. Generalmente, el flujo del fluido ocurre como consecuencia de una convección natural (causada por gradiente de densidad) o convección forzada (causada normalmente por agitación).

3.3.- Difusión

La transferencia de masa por difusión es el transporte natural o movimiento de una sustancia bajo la influencia de un gradiente de potencial químico, esto es debido a un gradiente de concentración. Las sustancias se mueven desde regiones de alta concentración a regiones de baja concentración, en orden de minimizar o eliminar estas diferencias.

La difusión es el medio de transporte de materia más estudiado. La velocidad de difusión está dada por la Ley de Fick:

$$\text{Velocidad} = D \cdot dC/dx \quad \text{Ec. IX-10}$$

donde D es el coeficiente de difusión de la sustancia en $[cm^2/seg]$ y dC/dx es el gradiente de concentración en la dirección x . Esta ecuación es a menudo aproximada por:

$$\text{Velocidad} = D \cdot \Delta C/\delta \quad \text{Ec. IX-11}$$

donde ΔC es la diferencia de concentración a través de la región donde ocurre la difusión (capa difusa), y δ es el espesor de la capa difusa.

El coeficiente de difusión D es una constante para una sustancia en particular bajo un conjunto de condiciones de la solución (temperatura, concentración y naturaleza del electrolito). La corriente farádica refleja la velocidad de los procesos de electrodo. Si este último es una reacción multietapa, luego, cada etapa tiene su propia velocidad inherente y

la corriente farádica refleja la velocidad del proceso más lento. Esta podría ser el proceso de adsorción, alguna reacción química en la solución que involucra al oxidante o reductor, el mismo proceso de transferencia de carga o la velocidad a la cual las especies electroactivas difunden hacia el electrodo desde el seno de la solución.

Cuando está presente un electrolito soporte, en los casos más simples, el movimiento de las especies electroactivas está limitado por la difusión; así, la solución de las ecuaciones que gobiernan la difusión es importante en varias técnicas electroanalíticas.

Consideremos un electrodo de área fija inmerso en una solución que contiene a la especie electroactiva y a un electrolito soporte. Inicialmente, la composición de la solución es uniforme en toda su extensión. Cuando se aplica un potencial suficientemente grande para que una reacción farádica ocurra, las partículas de la especie electroactiva en la vecindad del electrodo reaccionan. Si el potencial aplicado es suficientemente grande, la concentración de la especie electroactiva en la superficie del electrodo es reducida a cero.

Inmediatamente después de la aplicación del potencial inicial, la velocidad de la reacción y consecuentemente la magnitud de la corriente, dependen de la velocidad a la cual la especie electroactiva difunde hacia la superficie del electrodo. El gradiente de concentración es abrupto al principio y la capa de solución agotada (capa de difusión δ) es delgada; al pasar el tiempo, el espesor de la capa difusa aumenta, el gradiente se hace menos abrupto y la velocidad de difusión disminuye. Como resultado, cuando se aplica un potencial, fluye una corriente elevada que luego disminuye en el tiempo. La solución de las ecuaciones para la difusión conduce a la relación conocida como Ecuación de Cottrell:

$$i_t = nFAC \cdot (D/\pi \cdot t)^{1/2}$$

Ec. IX-12

donde i_t es la corriente al tiempo t , n es el número de electrones involucrados en el proceso electroquímico, A es el área del electrodo, C es la concentración de la especie electroactiva y D es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva en esas condiciones.

Es decir, la corriente decrece en proporción a la raíz cuadrada del tiempo tomado desde el instante al cual se da comienzo a la electrólisis.

4.- CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

Los métodos electroquímicos se definen, para nuestros propósitos, como aquellos en que se mide la respuesta eléctrica de la muestra o del sistema químico. El sistema experimental se divide en:

- el electrolito, un sistema químico capaz de conducir la corriente;
- un circuito externo o de medida, usado para aplicar o medir las señales eléctricas (corrientes, voltajes, etc.);
- los electrodos, conductores que sirven de contacto entre el sistema de medida y el electrolito.

Los electrodos se clasifican en ánodos y cátodos. En el ánodo ocurre la oxidación (los electrones son tomados desde el electrolito y pasan al circuito de medida); en el cátodo ocurre la reducción (los electrones fluyen desde el cátodo hacia el electrolito). Además, hablamos de electrodo indicador o de trabajo, refiriéndonos a aquel en que la reacción bajo estudio tiene lugar; de electrodo de referencia, que mantiene su potencial constante independientemente de los cambios producidos en la corriente.

La corriente que fluye en un sistema electroquímico está determinada por la resistencia total del circuito completo. Un buen diseño asegura que la magnitud de la corriente no está influenciada por el circuito de medida. Esto es, se distinguen dos tipos de métodos:

- 1.- aquellos en los cuales la resistencia de los electrodos es despreciable y se mide la conductancia del electrolito;
- 2.- aquellos en que la resistencia del electrolito es insignificante y se estudian los fenómenos ocurrientes en los electrodos.

Existen muchísimas técnicas basadas en los procesos de los electrodos; sin embargo, muy pocas de ellas tienen importancia real en la Química Analítica. Algunas de sus formas principales se muestran en la Fig. IX-2.

Los métodos electroanalíticos pueden ser divididos en dos clases: los que no involucran un flujo de corriente neta (potenciométricos) y todos los demás. En potenciometría se mide el potencial de equilibrio termodinámico de un sistema, esencialmente sin que se cause electrólisis o drene una corriente sobre el sistema (ya que esto modificaría la existencia del equilibrio). En los otros métodos se aplica un voltaje, o una corriente, y se monitorea la corriente que fluye a través o los cambios de potencial.

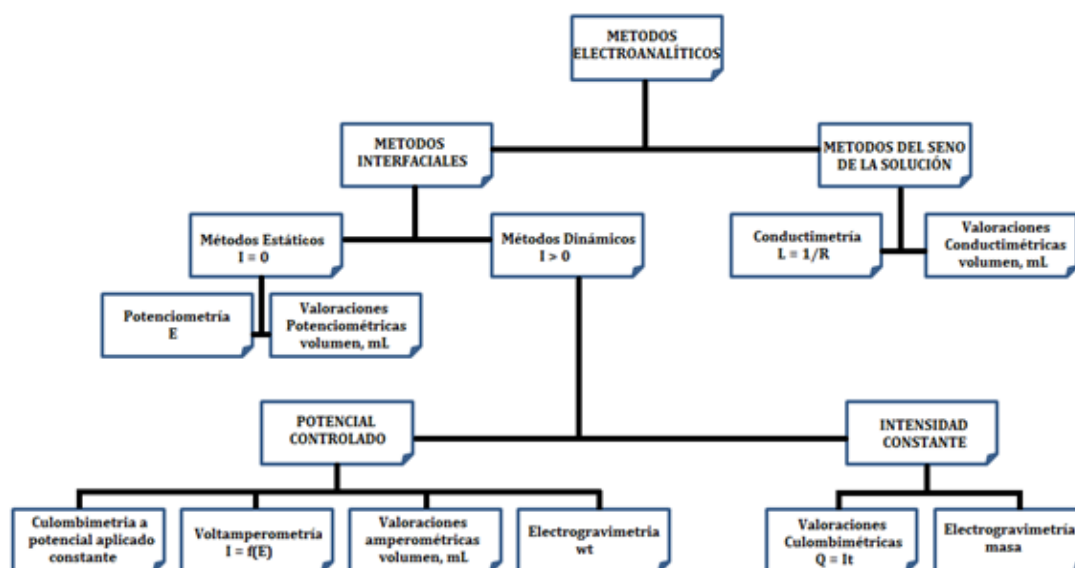


Fig. IX-2: Resumen de los métodos electroanalíticos comunes.

5.- MÉTODOS DINÁMICOS

Se describirán los métodos dinámicos utilizados en el desarrollo de la presente tesis. En éstos se mide el flujo electrónico hacia un electrodo inerte, al aplicar un potencial que dirige dicho flujo desde o hacia la molécula rédox monitoreada (analito). El sistema fundamental de medida utiliza tres electrodos, como se observa en la Fig. IX-3.

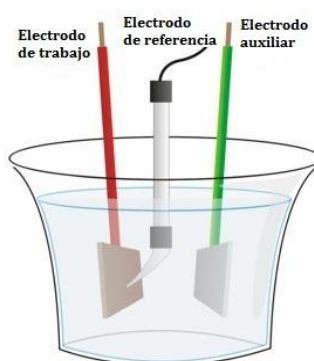


Fig. IX-3: Esquema de una celda para métodos electrodinámicos.

En la celda, el electrodo de referencia gobierna el valor del potencial aplicado al electrodo de trabajo. Está constituido por dos especies de una cupla rédox de composición constante. Ejemplos clásicos son Ag/AgCl y $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ (calomel). Para minimizar la contaminación de la solución con la muestra, el electrodo de referencia se aísla y la conexión con la solución se realiza mediante un puente salino intermediario.

El electrodo auxiliar lleva el flujo de corriente fuera del electrodo de referencia y está formado a partir de un material conductor inerte, como es un cable de platino o varilla de grafito [6].

En el electrodo de trabajo ocurre la reacción deseada y es construido a partir de diversas formas de carbono y de metales inertes, como platino, oro, etc. La elección de este electrodo es un factor crucial, debido a que afecta la sensibilidad de la metodología, el costo del análisis y la posibilidad de adoptar diferentes procedimientos de modificación. Los electrodos comúnmente elegidos son a base de carbono, debido a su bajo costo, buena cinética y biocompatibilidad en la transferencia electródica [7]. La construcción de los electrodos a base de carbono utilizados en el presente trabajo de tesis, los fundamentos de su funcionamiento y su optimización, se detallan en el Capítulo X.

En los últimos años ha cobrado interés el uso de los Electrodo Serigrafiados (ES) como herramienta para el análisis electroquímico, en sustitución de las celdas convencionales. Un ES es una pequeña tarjeta donde se encuentra un circuito eléctrico integrado que consiste en los electrodos en sí, junto a contactos eléctricos para su conexión al sistema de medida. Algunos fabricantes internacionales de estos dispositivos son DropSens (España), PalmSens (Holanda), BioLogic (Francia), Pine Research Instrumentation (Estados Unidos), Metrohm Autolab (Holanda), Quasense (Tailandia) y eDAQ (Australia), entre otros.

El uso de estos electrodos en la detección electroquímica ha mejorado la sensibilidad de los métodos. Dentro de las ventajas que presentan los ES se pueden citar: bajo costo de producción, elaboración en grandes cantidades, posibilidad de modificaciones y minimización o ausencia de etapas de pre-tratamiento o limpieza [8]. En la fabricación de los ES, la técnica de serigrafía involucra la impresión de diferentes tintas en un soporte plástico o cerámico plano. Su naturaleza plana permite la fácil modificación de la superficie electródica [9-11]. Debido a las dimensiones miniaturizadas de los ES, todas las etapas de modificación pueden ser realizadas en una gota, por lo cual se reduce el consumo de reactivos y de muestra (Fig. IX-4) [12].



Fig. IX-4: Electrodo serigrafiado comercial, elaborado por Dropsens®.

5.1.- Amperometría

Es una técnica basada en la medida de la corriente eléctrica que pasa entre un par de electrodos que impulsan una electrólisis. Uno de los reactivos es el analito buscado y la corriente medida es proporcional a su concentración.

5.2.- Voltametría

La voltametría abarca un conjunto de métodos electroanalíticos que se basan en la relación que existe entre la corriente y el potencial aplicado durante un proceso electroquímico. La señal que se intenta medir es la corriente eléctrica, más precisamente la corriente farádica, que corresponde a la reducción (u oxidación) del analito que tiene lugar en el electrodo de trabajo. Como resultado de las mediciones se obtiene un voltamperograma, que es la representación gráfica de la corriente frente al potencial del electrodo de trabajo.

A continuación se resumen las principales características de las voltametrías más frecuentemente utilizadas en el desarrollo del presente trabajo de tesis.

5.2.1.- Voltametría Cíclica (VC)

En la VC se aplica al electrodo de trabajo una onda de potencial de forma triangular (Fig. X-5A). La primer etapa consiste en una rampa de voltaje lineal, que luego se invierte para volver a llevar el potencial a su valor inicial. Este ciclo se puede repetir varias veces. Durante el barrido de potencial, el instrumento mide la corriente resultante a cada potencial aplicado y devuelve los resultados en un voltamperograma cíclico (Fig. X-5B).

En la primera parte del voltamperograma cíclico (parte superior, en la Fig. IX-5B) se observa una *onda catódica*. En lugar de estabilizarse en el valor máximo de la onda, la

corriente disminuye a medida que aumenta el potencial. Esta disminución tiene lugar porque desaparece el analito en las proximidades del electrodo y la difusión es demasiado lenta para reponerlo. Cuando se alcanza el pico de voltaje, la corriente catódica disminuye a un valor francamente pequeño. Luego se invierte el potencial y, finalmente, el producto reducido se oxida en las cercanías del electrodo dando lugar a una *onda anódica*. Por último, a medida que se consume el producto reducido, de nuevo disminuye la corriente anódica a su valor inicial.

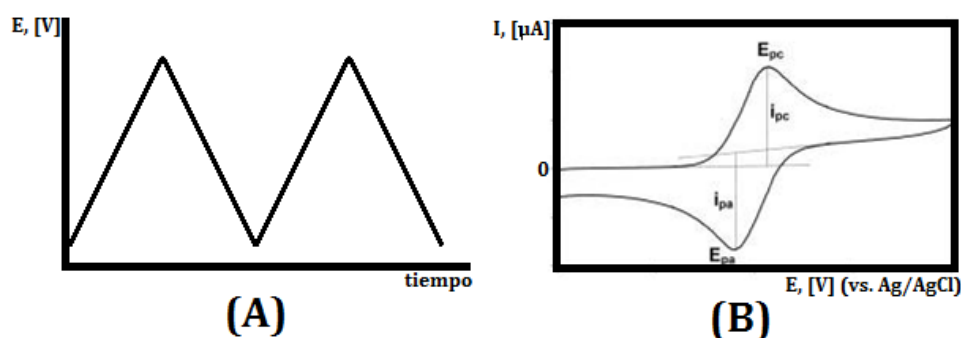


Fig. IX-5: (A) Estímulo aplicado en una voltametría cíclica, y (B) voltamperograma correspondiente.

La VC es útil para caracterizar el comportamiento redox de compuestos y dilucidar la cinética de reacciones en el electrodo.

5.2.2.- Voltametría de onda cuadrada (VOC)

La VOC utiliza el perfil de voltaje más eficaz para una voltametría [5]. La forma de la onda se representa en la Fig. IX-6A. Consiste en una onda cuadrada superpuesta a una de tipo escalera. Durante cada impulso catódico llega un aporte brusco de analito, que se reduce en la superficie del electrodo. Durante el impulso anódico el analito que acaba de reducirse se reoxida. El voltamograma (Fig. IX-6B) corresponde a la diferencia de corriente entre los puntos A y B de la Fig. IX-6A. Los electrones van desde el electrodo al analito en el punto A, y en dirección contraria en el B. Dado que ambas corrientes tienen signos opuestos, su diferencia es mayor que cualquiera de las dos corrientes por separado.

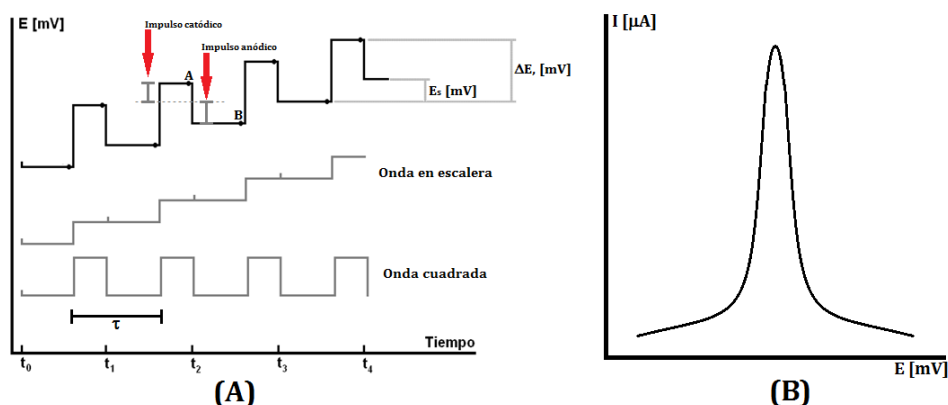


Fig. IX-6: (A) Estimulo aplicado en una voltametría de onda cuadrada y (B) voltamperograma correspondiente

La señal en VOC adquiere forma de pico. El aumento en la señal, respecto a otras voltametrías, se debe a que el producto reducido de cada impulso catódico está situado justo en la superficie del electrodo esperando a ser oxidado por el siguiente impulso anódico. Cada impulso anódico suministra una alta concentración de reactivo en la superficie del electrodo, dispuesta al siguiente impulso catódico.

Entre las ventajas de la VOC se puede mencionar que:

- el límite de detección se reduce a $\sim 10^{-7}$ M;
- la señal es mayor;
- las mediciones son más rápidas;
- la forma derivada (del pico) permite una mejor resolución de las señales vecinas.

6.- REFERENCIAS

- [1] Bard, A.J.; Faulkner, L.R. *Electrochemistry Methods*. Editorial Wiley. Nueva York, 1980.
- [2] Sawyer, D.T.; Sobkowiak, A.; Roberts, J.L. *Electrochemistry for Chemist*. Editorial Wiley, Nueva York, 1995.
- [3] Galus, Z. *Fundamentals of Electrochemistry Analysis*. 2da. Edición. Editorial Ellis Horwood. Nueva York, 1994.
- [4] Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. *Principios de Análisis Instrumental*, 5ta edición. Editorial Mc Graw-Hill. Madrid, 2001.
- [5] Harris, D.C. *Análisis Químico Cuantitativo*, 3ra edición. Editorial Reverté. Córdoba, España, 2009.
- [6] Wang, J. *Analytical Electrochemistry*, 2nd Edition, Editorial Wiley-VCH, Nueva York, 2001.
- [7] Jacobs, C.B.; Peairs, M.J.; Venton, B.J. *Anal Chim Acta* 662 (2010) 105–127.
- [8] Hayat, A.; Barthelmebs, L.; Marty, J.L. *Anal Chim Acta* 690 (2011) 248-252.

- [9] Zhu, Y.; Zeng, G.; Zhang, Y.; Tang, L.; Chen, J.; Cheng, M.; Zhang, L.; He, L.; Guo, Y.; He, X.; Lai, M.; He, Y. *Analyst* 139 (2014) 5014-5020.
- [10] Molinero Abad, B.; Alonso Lomillo, M.A.; Domínguez Renedo, O.; Arcos Martínez, M.J. *Anal Chim Acta* 812 (2014) 41-44.
- [11] Asturias Arribas, L.; Alonso Lomillo, M.A.; Domínguez Renedo, O.; Arcos Martínez, M.J. *Anal Chim Acta* 834 (2014) 30-36.
- [12] Calvo Pérez, A.; Domínguez Renedo, O.; Alonso Lomillo, M.A.; Arcos Martínez, M.J.. *Anal Chim Acta* 833 (2014) 15-21.

CAPÍTULO VII

DETERMINACIÓN DE CEFALEXINA CON NINHIDRINA

1.- INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas son sumamente frecuentes y pueden llegar a tener una alta tasa de mortalidad si no son atacadas a tiempo. Los antibióticos son los medicamentos prescritos más frecuentemente, debido al perfil de seguridad que poseen muchos de ellos [1]. La toxicidad selectiva de este conjunto de drogas constituye su principal ventaja, ya que interfieren con las funciones vitales de las bacterias sin afectar las células del huésped. En el amplio espectro de antibióticos, los β -lactámicos son considerados entre los más importantes. Su estructura química contiene un anillo de cuatro miembros constituido por tres átomos de carbono y uno de nitrógeno adyacente a un grupo carbonilo ($>C=O$).

La cefalexina (CFX, Fig. VII-1) - según IUPAC, ácido 7-(D- α -amino- α -fenilacetamido)-3-metil-cefem-4-carboxílico- es una cefalosporina de segunda generación y uno de los antibióticos más comúnmente utilizados. Su estructura presenta un anillo β -lactámico unido a un anillo heteroatómico de seis miembros que contiene azufre.

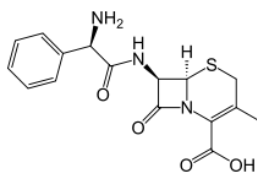


Fig. VII-1: Estructura química de la cefalexina ($C_{16}H_{17}N_3O_4S$, PM 347,39).

La CFX es un medicamento activo contra infecciones provocadas por bacterias del género *Streptococci* y *Staphylococci*. Es utilizado para infecciones cutáneas y de tejidos blandos, como también para la profilaxis contra infecciones posoperatorias. Es un medicamento estrechamente relacionado con la familia de las penicilinas, por lo que es utilizado en pacientes alérgicos a la misma [2].

Los antibióticos β -lactámicos basan su acción terapéutica en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana. Dicha pared, tanto en bacterias Gram positivas como negativas, es una estructura rígida de peptidoglicano que protege a las bacterias de la ruptura osmótica. Estos microorganismos producen proteínas llamadas proteínas de unión penicilínica en su pared. La CFX inhibe la síntesis de dichas proteínas [3].

De acuerdo a las Farmacopeas Argentina, Europea y de los Estados Unidos (USP), el método analítico de referencia para la determinación de CFX en comprimidos es CLAE con detección UV [4-6]. Se han reportado varios métodos para la determinación de CFX en preparados farmacéuticos, pero todos ellos requieren largos tiempos de reacción, equipamiento costoso y/o el uso de reactivos tóxicos o de metales pesados [7]. Otras técnicas incluyen a la densitometría [8], etapas de extracción en fase sólida [9], métodos electroquímicos [10-12], cromatográficos [13-17], quimioluminiscentes [18,19], espectrofluorimétricos [20,21] y espectrofotométricos [22-25].

El método espectrofotométrico propuesto utiliza ninhidrina como agente cromógeno. El grupo amino de la CFX, donador de electrones, actúa como ligando en la formación de complejos con átomos o moléculas aceptores de electrones. La reacción del grupo α -amino de la CFX con ninhidrina genera un aducto anaranjado que presenta una absorbancia máxima a 480 nm (Fig. VII-2).

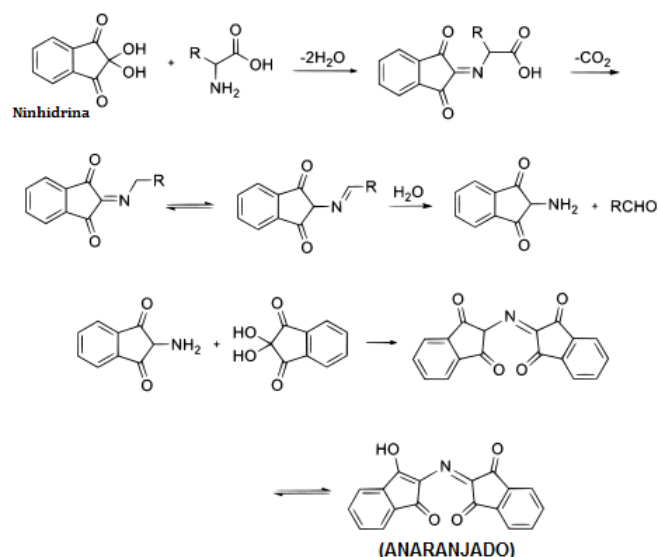


Fig. VII-2: Mecanismo de acción de la ninhidrina (C₉H₆O₄, PM 178,14).
Formación del aducto anaranjado ($A_{\max} = 480 \text{ nm}$)

2.- EXPERIMENTAL

2.1.- Reactivos y muestras

- Cefalexina, principio activo: Lote 0607110, origen China, pureza >99,3%.
- Cefalexina, comprimidos de 500 mg elaborados por PLAMECOR, Lote 032.
- Excipientes: celulosa microcristalina, almidón glicolato de sodio, polivinilpirrolidona, estearato de magnesio y talco.
- Ninhidrina, p.a. (Biopack, Argentina).
- Ácido sulfúrico, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Acetonitrilo, grado HPLC (Biopak, Argentina).
- Fosfato de potasio monobásico, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Hidroxido de potasio, p.a. (Anedra, Argentina).

2.2.- Equipamiento

- Espectrofotómetro UV-Visible Boeco S26, rango 190-900 nm
- CLAE con detector de UV de longitud de onda variable, Agilent 1120, controlado mediante software EZ Chrome Elite.
- Balanza analítica Acculab, precisión $\pm 0,1$ mg
- Agitador magnético Decalab FBR con termostatizador

2.3.- Procedimiento Espectrofotométrico

Se preparó una solución stock de CFX 0,5 mg/mL disolviendo 250 mg de CFX en 500 mL de agua destilada. Las soluciones de trabajo consistieron en soluciones de ácido sulfúrico 20% v/v y ninhidrina 0,2 % p/v. A partir de estas soluciones se prepararon los estándares, con un volumen variable de solución stock de CFX (1, 2, 3 y 5 mL), 4 mL de solución de ácido sulfúrico y 0,5 mL de solución de ninhidrina. El blanco contenía las mismas cantidades de reactivos, pero sin el agregado de CFX. Todas estas soluciones fueron llevadas a un volumen final de 10 mL con agua destilada en matraz aforado, luego homogenizadas y calefaccionadas en baño María a 100 °C durante 15 min. La reacción se detuvo utilizando un baño frío. La absorbancia fue registrada en función de la concentración de los estándares.

Para el análisis de la muestra, 20 comprimidos fueron pesados y se calculó el peso promedio del comprimido (756,8 mg). Luego se pulverizaron y redujeron a polvo fino, obteniéndose una mezcla homogénea. Una masa equivalente al peso promedio fue disuelta con agitación durante 10 min y llevada a volumen final de 500 mL. Una alícuota de 15 mL se centrifugó 10 min a 2000 rpm. El procedimiento ya descrito para el principio activo, fue aplicado a 2 mL del sobrenadante. La concentración de CFX en la muestra fue determinada mediante curva de calibrado.

2.4.- Procedimiento Cromatográfico (Método oficial)

Se disolvieron 6,8 g de fosfato de sodio monobásico en 1 L de agua destilada. Se ajustó su pH a $5,0 \pm 0,1$ con hidróxido de potasio 10 % p/v. Esta solución se utilizó para disolver el stock de CFX, las muestras y preparar la fase móvil (FM). La FM consistió en mezcla de acetonitrilo y solución de fosfato de potasio pH 5 (80:20). Se utilizó una columna RP-18C de $125 \times 4,5$ mm, flujo de FM de 1,5 mL/min y detección a 254 nm. El estándar consistió en una solución 1,0 mg/mL de CFX. La muestra se preparó disolviendo 153 mg de mezcla homogénea del comprimido, mediante agitación, en 100 mL de la solución de fosfato de potasio pH 5,0. Se centrifugaron 15 mL de esta solución durante 10 min a 2000 rpm. Una alícuota de 50 μ L del sobrenadante fue introducida al sistema de inyección del cromatógrafo.

Se registró la señal correspondiente al pico de CFX, en las soluciones estándar y muestra. El tiempo de retención (t_R), en las condiciones ensayadas fue de 2,46 min. Se determinaron las áreas de pico, con las que luego se determinaron las concentraciones en las muestras inyectadas.

2.5.- Atributos analíticos y validación

Para determinar los atributos analíticos del método espectrofotométrico y realizar su validación, se siguió el protocolo propuesto por las Farmacopeas vigentes [4-6].

3.- RESULTADOS

3.1.- Especificidad

Los espectros de absorción para las soluciones de reactivos y de placebo más reactivos, resultaron muy similares entre ellas y presentaron una respuesta muy cercana a la línea de base (Fig. VII-3). Por otro lado, la respuesta de la solución de muestra más reactivos presentó un espectro con un pico pronunciado cuya absorbancia máxima fue a 480 nm.

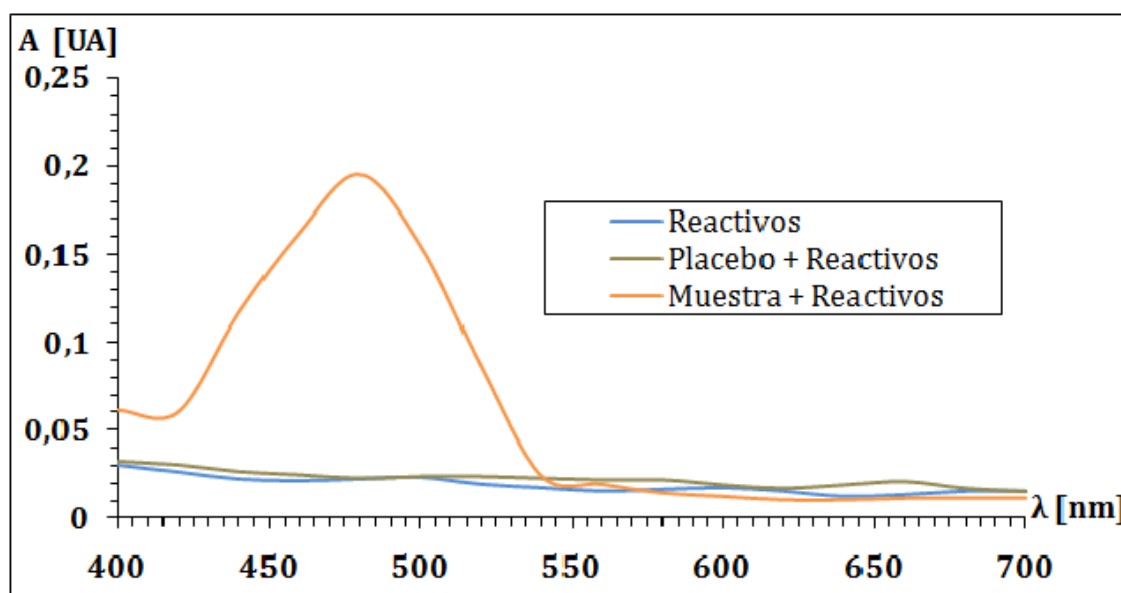


Fig. VII-3: Ensayo de especificidad. Espectros de absorción para soluciones de reactivos, de placebo más reactivos, y muestra más reactivos. [CFX] = 0,08 mg/mL

Se demuestra que los excipientes que acompañan al principio activo en el preparado farmacéutico son químicamente indiferentes a los reactivos utilizados. Por lo tanto, la especificidad del método queda establecida.

3.2.- Linealidad

Para evaluar la linealidad del método propuesto, se construyó una curva de calibrado con patrones de CFX. Los datos obtenidos fueron graficados (Fig. VII-4) y sometidos a un análisis de regresión lineal (Tabla VII-1).

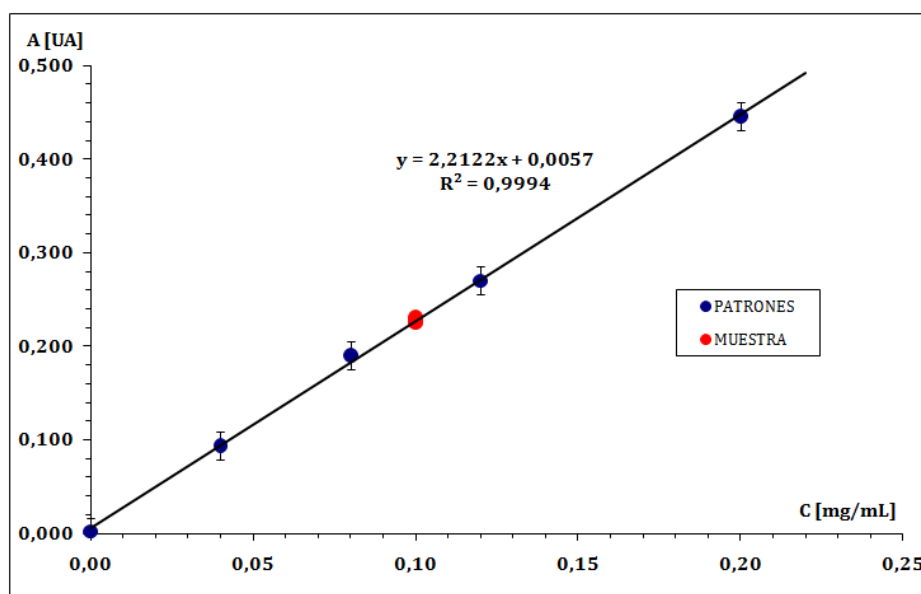


Fig. VII-4: Curva de calibrado del método CFX-ninhidrina.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN

Coefficiente de Correlación, R^2	0,9994
Ordenada al origen	$0,0057 \pm 0,0061$
Pendiente	$2,2122 \pm 0,0279$

Tabla VII-1: Análisis de varianza de la regresión del método CFX-ninhidrina, para un nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).

La recta de calibrado responde a la ecuación $A = 2,2122 C + 0,0057$; con una bondad de ajuste lineal $R^2 = 0,9994$; para un nivel de confianza del 95%. La ordenada al origen incluye al punto (0; 0).

El método resultó lineal en el rango de concentraciones estudiado. No fue necesario explorar un intervalo de respuesta mayor ya que su fin es el control de calidad del ingrediente activo.

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) calculados a partir de las ecuaciones Ec.VI-1 y Ec.VI-2 son 0,008 y 0,027 mg/mL, respectivamente.

3.3.- Repetibilidad

Se analizaron 12 alícuotas preparadas a partir de una mezcla homogénea de comprimidos de CFX pertenecientes a un mismo lote. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VI-2.

#	Masa recup. [mg/comp]	Xm [mg/comp]	SD [mg]	CV%
1	501,65			
2	503,15			
3	500,95			
4	501,96			
5	499,87			
6	498,6	500,55	2,06	0,412
7	501,23			
8	502,36			
9	500,15			
10	496,95			
11	502,56			
12	497,16			

Tabla VII-2: Ensayo de repetibilidad del método propuesto para CFX.

El método arrojó un coeficiente de variación (CV%) de 0,412%; menor al 2%, requerido para este tipo de determinaciones analíticas [4-6].

3.4.- Precisión Intermedia

El estudio se llevó a cabo en tres niveles de concentración, preparados a partir de una solución de muestra equivalente a 0,5 mg/mL de CFX, y siguiendo el método espectrofotométrico descrito. Cada análisis se realizó por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla VII-3, y están expresados como masa de CFX por comprimido.

El coeficiente de variación global obtenido en el ensayo de precisión intermedia resultó menor que el doble del coeficiente para la repetibilidad ($CV\%_{GLOBAL} < 2 \times CV\%_{Repetibilidad}$). La precisión evaluada es satisfactoria [4-6].

V _{CFX} , [mL]	ANALISTA 1	ANALISTA 2	REPRODUCIBILIDAD
-------------------------	------------	------------	------------------

0,5 mg/mL	DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2		
1,0	499,87	503,35	499,65	503,54		
	501,37	501,69	502,16	501,45		
	500,74	500,6	497,69	501,45	n	12
X [mg]	500,66	501,88	499,83	502,15	X [mg]	501,13
S [mg]	0,753	1,385	2,241	1,207	S [mg]	1,607
CV%	0,15	0,276	0,448	0,24	CV%	0,321
2,0	502,15	498,63	496,89	504,11		
	501,56	499,66	497,98	501,54		
	500,95	500,96	498,63	502,36	n	12
X [mg]	501,55	499,75	497,83	502,67	X [mg]	500,45
S [mg]	0,6	1,168	0,879	1,313	S [mg]	2,108
CV%	0,12	0,234	0,177	0,261	CV%	0,421
3,0	502,36	503,6	497,21	501,98		
	501,56	502,46	501,69	496,5		
	501,96	500,67	502,59	499,32	n	12
X [mg]	501,96	502,24	498,65	499,27	X [mg]	500,99
S [mg]	0,4	1,477	2,882	2,74	S [mg]	2,205
CV%	0,08	0,294	0,578	0,549	CV%	0,44

Resultados globales

X _{GLOBAL} [mg]	500,8
SD _{GLOBAL} [mg]	2,01
CV% _{GLOBAL}	0,401

Tabla VII-3: Ensayo de reproducibilidad para el método CFX-ninhidrina, realizado en 3 niveles de concentración, por dos analistas distintos y en dos días diferentes. V_{CFX}, volumen de cefalexina; X, masa promedio por comprimido; S, desviación estándar; y CV%, coeficiente de variación porcentual.

3.5.- Ensayo de Recuperación

El ensayo se realizó por triplicado y en tres niveles de concentración. Para la muestra, se utilizó una solución de placebo enriquecida con diferentes volúmenes de solución stock de CFX 1,0 mg/mL. Los resultados se muestran en la Tabla VII-4.

M_{CFX} agreg. [mg]	M_{CFX} recup. [mg]	%R	%R promedio	Precisión	
				Parámetro	Valor

1	1,03	103,0	101,3	X [mg] =	1,01
	1,02	102,0		S [mg] =	0,02
	0,99	99,0		CV% =	2,054
2	1,98	99,0	98,5	X [mg] =	1,97
	1,96	98,0		S [mg]=	0,01
	1,97	98,5		CV% =	0,508
3	3,03	101,0	100,0	X [mg] =	3,00
	2,99	99,7		S [mg]=	0,03
	2,98	99,3		CV% =	0,882

Tabla VII-4: Ensayo de recuperación de principio activo de CFX sobre placebo. M_{CFX} , masa de cefalexina; %R, porcentaje de recuperación; X, masa promedio; S, desviación estándar; y CV%, coeficiente de variación porcentual.

La recuperación se encuentra entre el 98,5 y el 101,3 %, valores comprendidos en el rango establecido por las Farmacopeas vigentes (98,0 – 102,0 %) [4-6].

3.6.- Comparación con el método oficial (CLAE-UV)

Los resultados obtenidos para seis determinaciones utilizando el método oficial se muestran en la Tabla VII-5.

RUN	SEÑAL [area]	M_{recup} [mg/comp]	X [mg/comp]	S [mg]	CV%
Std.	3051,6	-	-	-	-
1	3114,5	504,53	500,41	2,02	0,403
2	3074,9	499,59			
3	3178,3	499,59			
4	3082,1	499,59			
5	3089,7	499,59			
6	3068,5	499,59			

Tabla VII-5: Determinación de CFX en comprimidos por CLAE-UV. C, concentración; M, masa; X, masa promedio; S, desviación estándar; CV%, coeficiente de variación porcentual.

El método espectrofotométrico propuesto se comparó con el oficial utilizando la prueba t de Student y la F de Fischer (Tabla VII-6).

Parámetro	Método	
	CLAE-UV	Espectrofotométrico
$X \pm S$ [mg]	500,41 $\pm$ 2,02	500,55 $\pm$ 2,06

CV%	0,403	0,412
S²	4,067	4,252
Test F	1,045 (4,704)	
Test t	0,896 (2,228)	

Tabla VII-6: Resultados del análisis ANOVA entre el método oficial (CLAE-UV) y el método espectrofotométrico propuesto para CFX, para un nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$). Los valores entre paréntesis representan los valores críticos respectivos.

Estadísticamente, no se han encontrado diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos en la determinación de CFX en comprimidos, para un nivel de confianza del 95%.

4.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten la aplicación de la metodología espectrofotométrica para la cuantificación del principio activo CFX en comprimidos farmacéuticos que lo contengan, con una precisión y exactitud comparable con la metodología oficial, sin interferencia por parte de los excipientes, con claras ventajas en cuanto a costos y rapidez de análisis, y cumpliendo con los requerimientos establecidos por las Farmacopeas vigentes.

5.- REFERENCIAS

- [1] Yuste, M.; Romo, A.; Unamuno, P. Profilaxis Antibiótica en Cirugía Dermatológica. *Actas Dermosifiliorg* 99:9 (2008) 683-689.
- [2] Salgado Ordoñez, F.; Lozano Serrano, A.B.; Hidalgo Cone, A.; Verdugo Carballeda, J. Infecciones de la piel y partes blandas. *Med Clin* 133:14 (2009) 552-564.
- [3] Mandell, G.L.; Douglas, R.G.; Bennett, J.E.; Dolin, R.; *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Vol. I, 6ta Edición, Ed. Elsevier. Nueva York, 2005.
- [4] Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. *Farmacopea Argentina*, 8va Edición, 2011.
- [5] European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). *European Pharmacopoeia*, 8va. Edición, 2014.
- [6] US Pharmacopoeial Convention. *United State Pharmacopoeia 38 and National Formulary 32*. Rockville, Meryland. 2015.

- [7] Ayad, M.M.; Shalabay, A.A.; Abdellatef, H.E.; Elsaied, H.M. Spectrophotometric determination of certain cephalosporines through oxidation with cerium(IV) and I-chlorobenzotriazole. *J Pharm Biomed Anal* 20:3 (1999) 557-564.
- [8] Coran, S.A.; Bambagiotti Alberti, M.; Giannellini, V.; Baldi, A.; Picchioni, G.; Paoli, F. Development of a densitometric method for the determination of cephalexin as an alternative to the standard HPLC procedure. *J Pharm Biomed Anal* 18:1 (1998) 271-274.
- [9] Gallo Martinez, L.; Sevillano Cabeza, A.; Campins Falcó, P.; Bosch Reig, F. A new derivatization procedure for the determination of cephalexin with 1,2-naphtholquinone-4-sulphonate in pharmaceutical and urine samples using solid-phase extraction cartridges and UV-visible detection. *Anal Chim Acta* 370:2 (1998) 115-123.
- [10] Chailapakul, O.; Aksharanandana, P.; Frelink, T.; Einaga, Y.; Fujishima, A. A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode. *Talanta* 65:5 (2004) 1183-1188.
- [11] Xu, M.; Ma, H.; Song, J. Polarographic behavior of cephalexin and its determination in pharmaceuticals and human serum. *J Pharm Biomed Anal* 35:5 (2004) 1075-1081.
- [12] Yun, E.K.; Prince, A.J.; Mc Millin, J.E.; Welch, L.E. High performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of cephalosporins. *J Chromatogr B* 712 (1998) 145-152.
- [13] Kai, M.; Kinishita, H.; Hara, S.; Lee, M.K.; Lu, J. Sensitive determination of a β -lactam antibiotic by liquid chromatography with chemiluminiscence detection. *J Pharm Biomed Anal* 30 (2003) 1765-1770.
- [14] Oliveira, R.V.; De Pietro, A.C.; Cass, Q.B. Quantification of cephalexin as residue levels in bovine milk by high performance liquid chromatography with on-line sample clean-up. *Talanta* 71:3 (2007) 1233-1238.
- [15] Hsu, M.C.; Lin, Y.S.; Chung, H.C. High performance liquid chromatographic method for potency determination of cephalexin in commercial preparations and for stability studies. *J Chromatogr A* 692 (1995) 67-72.
- [16] Samanidu, V.F.; Hapeshi, E.A.; Papadoyannis, I.N. Rapid and sensitive high performance liquid chromatographic determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceutical and body fluids. *J Chromatogr B* 788 (2003) 147-158.
- [17] Mastovska, K.; Lightfield, A.R. Streamlining methodology for the multiresidue analysis of β -lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1202:2 (2008) 118-123.
- [18] Thongpoon, C.; Liawruangrath, B.; Liawruangrath, S.; Wheatly, R.A.; Townshend, A. Flow injection chemiluminiscence determination of cephalosporins in pharmaceutical preparations using tris-(2,2 α -bipyridyl)-ruthenium(II)-potassium permanganate system. *Anal Chim Acta* 533 (2005) 123-133.
- [19] Sun, Y.; Tang, Y.; Yao, H.; Zheng, X. Potassium permanganate-glyoxal chemiluminiscence system for flow injection analysis of cephalosporin antibiotics in pharmaceutical preparations. *Talanta* 64 (2004) 156-159.
- [20] Hefnawy, M.; El-Shabrawny, Y.; Balal, F. Spectrofluorimetric determination of α -aminocephalosporins in biological fluids and pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal*, 21 (1999) 703-707.
- [21] Thangadurai, S.; Shukla, S.K.; Anjaneyuku, V. Spectrofluorimetric determination of α -aminocephalosporins in biological fluids and pharmaceutical preparations. *Anal Sci* 18 (2002) 97-100.

- [22] David, A.; Takacsy, T.E. A simple new method for testing impurities in cephalexin. *J Pharm Pharmacolog* 27:10 (1995) 774-775.
- [23] Potter, J.L.; Timmons, G.D.; Kofron, W.G. Interferences by cephalosporins antibiotics in urinary test for metabolic disorders. *Clin Chem* 41:9 (1995) 1317-1318.
- [24] Gallo Martinez, L.; Campins Falcó, P.; Sevillano Cabeza, A. A comparison of several methods used for the determination of cephalosporins. Analysis of cephalexin in pharmaceutical samples. *J Pharm Biomed Anal* 29 (2002) 405-423.
- [25] Husain, S.W.; Ghoulipour, V; Sepahrin, H. Chromatographic behaviour of antibiotics on thin layer of an inorganic ion-exchanger. *Acta Chromatogr* 14 (2004) 102-109.

CAPÍTULO VIII

DETERMINACIÓN DE METOCLOPRAMIDA CON NITRITO

1.- INTRODUCCIÓN

La metoclopramida (MCA, Fig. VIII-1) –según IUPAC 4-amino-5-cloro-N-[2-(dietilamino)etil]-2-metoxibenzamida– es un antiemético y agente procinético, que tiene un amplio rango de aplicaciones clínicas en campos tan diversos como la gastroenterología, ginecología, radiología y cardiología [1-7]. Este medicamento es bien absorbido cuando se administra oralmente, sufre pequeñas transformaciones en el hígado y tiene una vida media plasmática de 2,5 a 6,0 horas en pacientes con una función renal normal [8]. El clorhidrato de metoclopramida (MCA.HCl) es comúnmente utilizado en la prevención y alivio de náuseas y vómitos. Además, es utilizado en combinación con drogas quimioterapéuticas, acompañando a la cisplatina, y otros agentes citotóxicos, que son altamente eméticos [9].

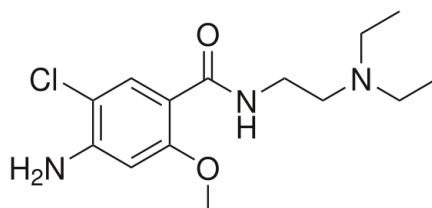


Fig. VIII-1: Estructura química de la metoclopramida ($C_{14}H_{22}N_3ClO_2$, PM 299,78).

Según lo establecen las Farmacopeas Argentina, Europea y de los Estados Unidos (USP), la metodología oficial para la determinación de MCA en comprimidos es CLAE con detección UV a 215 nm [10-12].

La gran importancia de la MCA, en medicina clínica y experimental, ha permitido un amplio desarrollo de métodos enfocados en su cuantificación en fluidos biológicos y en formulaciones farmacéuticas. Entre los métodos descritos se encuentran CLAE [13], GC con detector de captura electrónica [14], voltametría [15-16], potenciometría [17],

espectrometría quimioluminiscente [18-21], fluorimetría [22], espectrofotometría UV [23] y análisis espectrofotométrico de inyección en flujo [24-25]. Todos estos métodos requieren entrenamiento por parte del operador, equipamientos costosos, y no son sencillos de aplicar en los análisis de rutina que exige el control de calidad de las formulaciones farmacéuticas.

Se han propuesto varios métodos espectrofotométricos para la determinación de esta droga. Algunos de ellos se basan en la formación de un par iónico [26-27] o de complejos de transferencia de cargas [28-29]. Muchos otros métodos se basan en la diazotación del grupo amino primario del anillo bencénico de la MCA con ácido nitroso (HNO_2). Esta reacción genera un agente coloreado mediante la conjugación con otros reactivos como: dibenzoalmetano de sodio [30], p-dimetilaminocinnamaldehído [31], hidrocloreuro de imipramina [32], difenilamina [33], acetil acetona [34], N-(1-naftil)-etilendiamina [35], p-nitroanilina [36-37], y α -naftilamina [38]. La mayor dificultad que presentan estas metodologías radica en la inestabilidad de los reactivos, su almacenamiento bajo refrigeración y la necesidad de reemplazarlos frecuentemente; además de la generación de una cantidad importante de residuos tóxicos.

Para los análisis de rutina, es deseable que el método utilizado sea simple, rápido y sensible. Por ello, el método propuesto utiliza soluciones de nitrito para generar *in situ* el ácido nitroso, evitando los problemas asociados a la descomposición del ácido por oxidación. El HNO_2 generado es utilizado como agente cromogénico, obteniéndose un compuesto azo estable a temperatura ambiente que absorbe fuertemente a 380 nm (Fig VIII-2). La estabilidad del color se mantiene por más de dos horas, un período que excede el tiempo necesario para las lecturas espectrofotométricas.

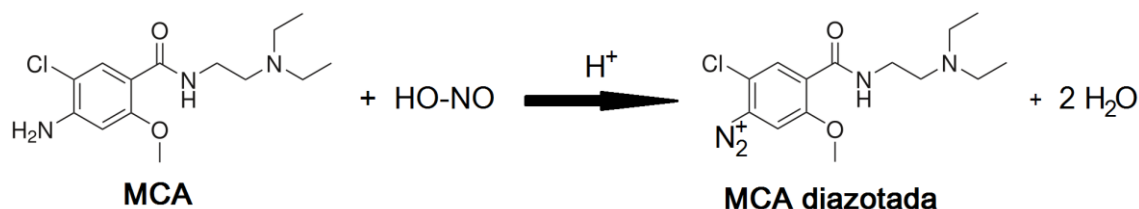


Fig. VIII-2: Diazotación de MCA con HNO_2 generado *in situ*.

2.- EXPERIMENTAL

2.1.- Reactivos y muestras

- Metoclopramida clorhidrato, principio activo: Lote 11MTH002, origen India, pureza >99,8%.
- Metoclopramida clorhidrato, comprimidos de 10 mg elaborados por PLAMECOR, Lote 039.
- Excipientes: polvo precompactado blanco, sílice fundida y talco.
- Nitrito de sodio, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Acetato de sodio anhidro, p.a. (Biopack, Argentina).
- Hidróxido de tetrametilamonio, 25% p/v (Merck, Alemania).
- Ácido clorhídrico 38%, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Ácido acético glacial, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Ácido fosfórico, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Metanol, grado HPLC (Biopack, Argentina).
- Acetonitrilo, grado HPLC (Biopack, Argentina).

2.2.- Equipamiento

- Espectrofotómetro UV-Visible Boeco S26, rango 190-900 nm.
- CLAE con detector de UV de longitud de onda variable Agilent 1120, controlado mediante software EZ Chrome Elite.
- Balanza analítica Acculab, precisión $\pm 0,1$ mg.
- Agitador magnético Decalab FBR con termostatizador.

2.3.- Procedimiento Espectrofotométrico

Se preparó una solución stock de MCA pesando 100 mg de MCA.HCl y disolviéndolo en 100 mL de agua destilada, a fin de obtener una solución 1 mg/mL. Las soluciones de trabajo fueron HCl 6 M y NaNO₂ 0,1 M. Las soluciones estándar contenían alícuotas de 1 a 5 mL de solución stock de MCA, 1 mL de HCl 6 M y 3 mL de NaNO₂ 0,1 M. La solución blanco fue preparada utilizando los mismos reactivos, pero sin el agregado de solución stock de MCA. La diazotación fue realizada a temperatura ambiente, sin necesidad de enfriamiento. Todas estas soluciones fueron llevadas a volumen final de 50 mL con agua

destilada. La absorbancia de los estándares fue registrada en función de la concentración de los mismos.

A partir de una mezcla homogénea de 20 comprimidos de MCA.HCl pulverizados, se pesó una masa de 250 mg y se disolvió con agitación en 50 mL de agua destilada. Una alícuota de 15 mL fue centrifugada a 2000 rpm durante 10'. Se tomaron 2 mL del sobrenadante y se aplicó el procedimiento ya descrito. La cantidad de principio activo presente en la muestra fue determinado mediante curva de calibrado y referido a la masa equivalente promedio de un comprimido (110,7 mg).

2.4.- Estabilidad del compuesto diazotado

La estabilidad del compuesto MCA diazotado fue monitoreada mediante medidas espectrofotométricas de una solución preparada como se indicó en el procedimiento anterior. Se consideró como tiempo cero el momento en el cual se mezclaron los reactivos con el principio activo. Las lecturas fueron realizadas cada 10' durante un periodo de 2 h.

2.5.- Procedimiento Cromatográfico (Método oficial)

La metodología oficial para la determinación de MCA en comprimidos es CLAE con detección UV a 215 nm. Se utilizó una columna RP-C18 (125 × 4,5 mm) y flujo de 1,5 mL/min. La fase móvil se preparó disolviendo 2,7 g de acetato de sodio en 500 mL de agua, y mezclándolo con 500 mL de acetonitrilo. A esta solución se le añadió 2 mL de una solución de hidróxido de tetrametilamonio en metanol (1:5). La fase móvil fue homogeneizada mediante agitación y el pH fue ajustado a 6,5 con ácido acético glacial.

Se preparó una solución stock de MCA 1,0 mg/mL en ácido fosfórico 0,01 M. Una alícuota de solución stock fue diluida con ácido fosfórico 0,01 M hasta obtener la solución estándar de concentración 50 µg/mL.

La solución de muestra se preparó pesando 150 mg de la mezcla homogénea de comprimidos, disolviendo dicha masa en 250 mL de solución de ácido fosfórico 0,01 M y agitándose durante 10 min. Una alícuota de 15 mL fue centrifugada durante 10 min y el sobrenadante fue inyectado directamente en el cromatógrafo (volumen de muestra = 50 µL) registrándose la señal correspondiente al pico de MCA ($t_R = 2,98$ min) a 215 nm.

2.6.- Atributos analíticos y validación

Para determinar los atributos analíticos del método espectrofotométrico y realizar la validación del mismo, se siguió el protocolo propuesto por las Farmacopeas vigentes [10-12].

3.- RESULTADOS

3.1.- Especificidad

Los espectros de absorción de las soluciones de reactivos y de placebo más reactivos, resultaron muy similares entre ellos, presentando una respuesta muy cercana a la línea de base (Fig. VIII-3). Por otro lado, la respuesta de la solución de muestra más reactivos, presentó un espectro con absorbancia máxima a 380 nm. Los excipientes que acompañan a la formulación son químicamente inertes a los reactivos utilizados, por lo que se confirma la especificidad del método.

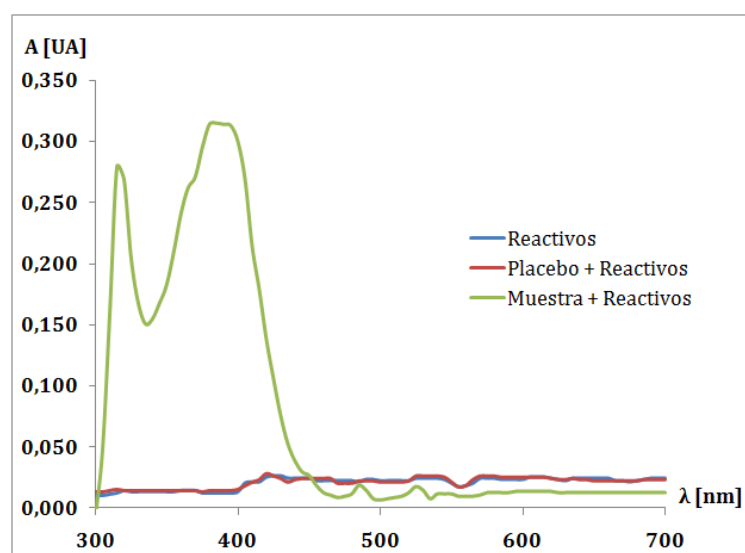


Fig. VIII-3: Ensayo de especificidad. Espectros de absorción para soluciones de reactivos, de placebo más reactivos, y de muestra más reactivos. [MCA] = 0,045 mg/mL.

3.2.- Estabilidad

Luego de la adición de reactivos, el diazocompuesto alcanza prontamente su intensidad máxima a temperatura ambiente. El color y la absorción resultaron estables durante un periodo de más de 2 h (Fig. VIII-4).

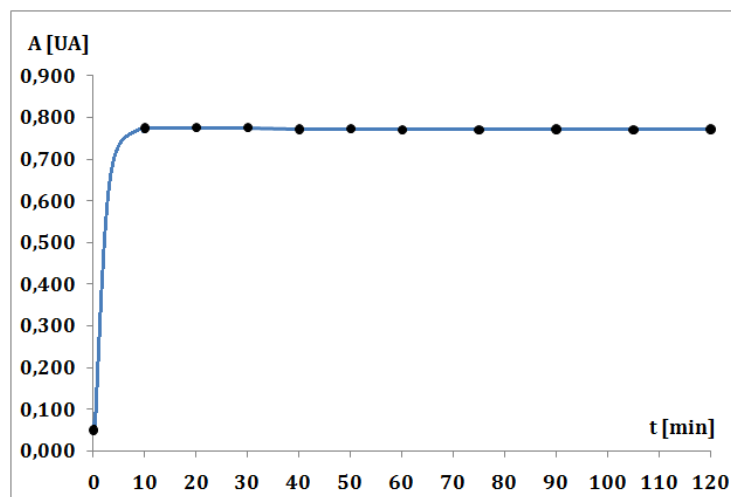


Fig. VIII-4: Ensayo de estabilidad. Monitoreo de la absorción a 380 nm en función del tiempo. [MCA] = 0,100 mg/mL.

No se monitoreó la estabilidad por tiempos más prolongados, considerando que 2 h es un tiempo holgadamente suficiente para realizar el análisis.

3.3.- Linealidad e intervalo

Para evaluar la linealidad del método propuesto, se construyó una curva de calibrado con patrones de MCA. Los datos obtenidos fueron graficados (Fig. VIII-5) y sometidos a un análisis de regresión lineal (Tabla VIII-1).

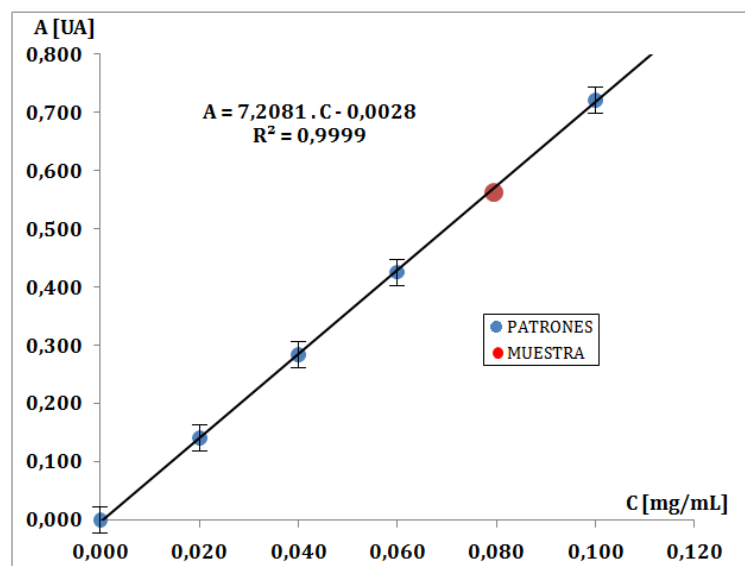


Fig. VIII-5: Curva de calibrado del método MCA con nitritos.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN	
Coefficiente de Correlación, R^2	0,9999
Ordenada al origen	-0,0028 ± 0,0036
Pendiente	7,2081 ± 0,0691

Tabla VIII-1: Análisis de varianza de la regresión para el método MCA-nitritos, para un nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).

La recta de calibrado responde a la ecuación $A = 7,2081 C - 0,0028$. La bondad del ajuste lineal (R^2) es 0,9999. De acuerdo al análisis de varianza de la regresión lineal (Tabla VIII-1), para un nivel de confianza del 95%, la ordenada al origen incluye al punto (0; 0).

El método resultó lineal en el rango de concentraciones estudiado. No fue necesario explorar un rango de respuesta mayor ya que su fin es el control de calidad del ingrediente activo.

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) calculados a partir de las ecuaciones Ec.IV-1 y Ec.IV-2 son 0,001 y 0,005 mg/mL, respectivamente

3.4.- Repetibilidad

Se analizaron 12 alícuotas preparadas a partir de la mezcla homogénea de comprimidos pulverizados, pertenecientes a un mismo lote. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VIII-2.

#	M _{recup} [mg/comp]	X [mg/comp]	SD [mg]	CV%
1	9,81			
2	10,02			
3	10,02			
4	9,81			
5	9,88			
6	9,74	9,85	0,10	0,994
7	9,70			
8	9,91			
9	9,81			
10	9,88			
11	9,77			
12	9,84			

Tabla VIII-2: Ensayo de repetibilidad del método propuesto para MCA.

El método arrojó un coeficiente de variación (CV) de 0,994 %; esto es menor al 2%, requerido para este tipo de determinaciones analíticas [4-6].

3.5.- Precisión Intermedia

El estudio se llevó a cabo en tres niveles de concentración, preparados a partir de una solución de muestra equivalente a 1,0 mg/mL de MCA. Se tomaron distintos volúmenes de muestra y se aplicó el método espectrofotométrico propuesto. Cada análisis se realizó por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla VIII-3, y están expresados como masa de MCA recuperada por comprimido.

V _{MCA} , [mL]	ANALISTA 1		ANALISTA 2		REPRODUCIBILIDAD	
1,0 mg/mL	DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2		
	10,12	10,06	10,43	9,94		
1,0	10,26	10,27	10,22	10,07		
	10,09	10,12	10,22	9,89	n	12
X [mg]	10,16	10,15	10,29	9,97	X [mg]	10,14
S [mg]	0,088	0,109	0,121	0,091	S [mg]	0,150

CV%	0,87	1,08	1,17	0,91	CV%	1,48
	9,75	10,12	10,10	10,37		
2,0	9,97	10,30	9,97	10,27		
	10,03	10,05	9,88	10,23	n	12
M [mg]	9,92	10,15	9,98	10,29	X [mg]	10,08
S [mg]	0,150	0,128	0,109	0,069	S [mg]	0,183
CV%	1,51	1,26	1,09	0,67	CV%	1,82
	9,86	10,15	10,36	10,25		
3,0	9,97	10,10	10,27	10,16		
	10,16	9,99	10,04	9,91	n	12
M [mg]	9,99	10,08	10,22	10,11	X [mg]	10,10
S [mg]	0,152	0,081	0,164	0,174	S [mg]	0,152
CV%	1,52	0,80	1,61	1,72	CV%	1,50

Resultados globales

X _{GLOBAL} [mg]	10,19
SD _{GLOBAL} [mg]	0,159
CV% _{GLOBAL}	1,58

Tabla VIII-3: Ensayo de reproducibilidad para el método MCA-nitritos, realizado en 3 niveles de concentración, por dos analistas distintos y en dos días diferentes. V_{CFX}, volumen de cefalexina; X, masa promedio por comprimido; S, desviación estándar; y CV%, coeficiente de variación porcentual.

El coeficiente de variación global obtenido en el ensayo de precisión intermedia resultó menor que el doble del coeficiente para la repetibilidad ($CV\%_{GLOBAL} < 2 \times CV\%_{Repetibilidad}$). La precisión evaluada mostró resultados satisfactorios [10-12].

3.6.- Ensayo de Recuperación

El ensayo se realizó por triplicado y en tres niveles de concentración. Para la muestra, se utilizó una solución de placebo enriquecida con diferentes volúmenes de una solución stock de MCA 1,0 mg/mL. Los resultados se muestran en la Tabla VIII-4.

M _{CFX} agreg.	M _{CFX} recup.	%R	%R	Precisión
-------------------------	-------------------------	----	----	-----------

	[mg]	[mg]	promedio	Parámetro	Valor
1,0		0,984	98,4	X [mg] =	0,988
		0,998	99,8	S [mg] =	0,008
		0,984	98,4	%CV =	0,811
2,0		2,024	101,2	X [mg] =	2,001
		1,976	98,8	S [mg]=	0,024
		2,003	100,2	%CV =	1,217
3,0		2,981	99,4	X [mg] =	2,984
		3,002	100,1	S [mg]=	0,017
		2,967	98,9	%CV =	0,585

Tabla VIII-4: Ensayo de recuperación de principio activo de MCA sobre placebo. M_{MCA} , masa de cefalexina; %R, porcentaje de recuperación; X, masa promedio; S, desviación estándar; y CV%, coeficiente de variación porcentual.

La recuperación se encuentra entre el 98,8 y el 100,5 %, valores comprendidos en el rango establecido por las Farmacopeas vigentes (98,0 – 102,0 %) [10-12].

3.7.- Comparación con el método oficial (CLAE -UV)

Los resultados obtenidos para seis determinaciones utilizando el método oficial se muestran en la Tabla VIII-5.

RUN	SEÑAL [area]	M_{recup} [mg/comp]	X [mg/comp]	SD [mg]	CV%
Std.	2041,9	-	-	-	-
1	2084,8	10,21			
2	2058,2	10,08			
3	2015,4	9,87			
4	2062,3	10,10	10,04	0,123	1,22
5	2027,6	9,93			
6	2054,2	10,06			

Tabla VIII-5: Determinación de MCA en comprimidos por CLAE-UV.

El método espectrofotométrico propuesto se comparó con el oficial utilizando la prueba t de Student y la F de Fischer (Tabla VIII-6).

Parámetro	Método	
	CLAE-UV	Espectrofotométrico
X ± SD [mg]	10,042 ± 0,123	9,925 ± 0,077
CV%	1,225	0,776
S²	0,0151	0,0059
Test F	2,554 (5,050)	
Test t	1,972 (2,228)	

Tabla VIII-6: Resultados del análisis ANOVA entre el método oficial (CLAE-UV) y el método espectrofotométrico propuesto para MCA, para un nivel de confianza del 95% (p = 0,05). Los valores entre paréntesis representan los valores críticos respectivos.

Estadísticamente, no se han encontrado diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos en la determinación de MCA en comprimidos, para un nivel de confianza del 95%.

4.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten la aplicación de la metodología espectrofotométrica para la cuantificación del principio activo metoclopramida en comprimidos farmacéuticos que lo contengan, con una precisión y exactitud comparable con la metodología oficial, sin interferencia por parte de los excipientes, con claras ventajas en cuanto a costos y rapidez de análisis, y cumpliendo con los requerimientos establecidos por las Farmacopeas vigentes.

5.- REFERENCIAS

- [1] Pittrè, D.; Stradi, R. Metoclopramide hydrochloride. *Analytical Profiles of Drug Substances*, Capítulo 16. Pag. 327-360. Editorial Academic Press. San Diego, 1987.
- [2] Prankerd, R.J. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, Capítulo 33 Ed. H.G. Brittain. Londres, 2007.

- [3] Manna, E.M.; Seif, S.A. Postoperative nausea and vomiting management in maxillofacial procedures: Dexamethasone combined with metoclopramide. *Egy J Anaesth* 28:2 (2012) 163-168.
- [4] Ho, C.S.; Yuan, R.Y.; Chen, H.H.; Yu, J.M.; Sheu, J.J. Metoclopramide therapy and movement disorders in a diabetic-uremic subject with bilateral basal ganglia lesions. *J Exp Clin Med* 3:1 (2011) 50-52.
- [5] Abdel Rahman, S.I.; Mahrous, G.M.; El Badry, M. Preparation and comparative evaluation of sustained release metoclopramide hydrochloride matrix tablets. *Sau Pharm J* 17:4 (2009) 283-288.
- [6] Grabnar, I.; Maggi, L.; Cocchietto, M.; Conte, U.; Voinovich, D. Bioavailability of metoclopramide from a new chewing gum device. *J Drug Deliv Sci Tech* 17:3 (2007) 173-176.
- [7] Bernardo Escudero, R.; Alonso Campero, R.; Francisco Doce, M.T.J.; Cortés Fuentes, M.; Villa Vargas, M.; Ángeles Uribe, J. Comparison of the pharmacokinetics of a new 15-mg modified-release tablet formulation of metoclopramide versus a 10-mg immediate-release tablet: a single- and multiple-dose, randomized, open-label, parallel-group study in healthy mexican male volunteers. *Clin Therap* 33:5 (2011) 630-643.
- [8] Korolkovas, A. *Diccionario Terapéutico Guanabara 2012/2013*. Ed. Guanabara Koogan, 2012.
- [9] Page, C.P.; Curtis, M.J.; Sutter, M.C.; Walker, M.J.A., Hoffman, B.B. *Farmacología Integrada*. Ed. Harcourt. Madrid, 1998.
- [10] Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. *Farmacopea Argentina*, 8va Edición, 2011.
- [11] European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). *European Pharmacopoeia*, 8va. Edición, 2014.
- [12] US Pharmacopoeial Convention. *United State Pharmacopoeia 38 and National Formulary 32*. Rockville, Meryland. 2015.
- [13] Chang, Y.S.; Ku, Y.R.; Wen, K.C.; Ho, L.K. Analysis of synthetic gastrointestinal drugs in adulterated traditional Chinese medicines by HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 23 (2000) 2009-2019.
- [14] Ross Lee, L.M.; Eadie, M.J.; Bochner, F.; Hooper, W.D.; Tyrer, J.H. Electron-capture gas chromatographic assay for metoclopramide in plasma. *J Chromatogr A* 183:2 (1980) 175-184.
- [15] Farghaly, O.A.; Taher, M.A.; Naggar, A.H.; El Sayed, A.E. Square wave anodic stripping voltammetric determination of metoclopramide in tablet and urine at carbon paste electrode. *J Pharm Biomed Anal* 35 (2005) 14-20.
- [16] Wang, Z.H.; Zhang, H.Z.; Zhou, S.P.; Dong, W.J. Determination of trace metoclopramide by anodic stripping voltammetry with nafion modified glassy carbon electrode. *Talanta* 53 (2001) 1133-1138.
- [17] Mostafa, G.A.E. PVC matrix membrane sensor for potentiometric determination of metoclopramide hydrochloride in some pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 31 (2001) 515-521.
- [18] Al Arfai, N.A. Flow-injection chemiluminescent determination of metoclopramide hydrochloride in pharmaceutical formulations and biological fluids using the [Ru(dipy)32+]-permanganate system. *Talanta* 62 (2004) 255-263.
- [19] Jia, B.X.; Li, Y.Q.; Liu, C.H.; Li, K.; Qi, Y.X. Flow injection determination of metoclopramide based on KMnO₄-HCHO chemiluminescence in a micellar médium. *J Lumin* 130 (2010) 2188-2191.
- [20] Fang, S.; Wu, Z.H.; Zhang, L.; Chao, L. Chemiluminescence determination of metoclopramide. *Anal Lett* 35 (2002) 1479-1489.

- [21] Hun, X.; Zhang, Z. Electrogenerated chemiluminescence sensor for metoclopramide determination based on Ru(bpy)₃²⁺-doped silica nanoparticles dispersed in nafion on glassy carbon electrode. *J Pharm Biomed Anal* 47 (2008) 670-676.
- [22] Buna, M.; Aaron, J.J.; Prognon, P.; Mahuzier, G. Effects of pH and solvent on the fluorescence properties of biomedically important benzamides. Application to determination in drugs and in human urine. *Analyst* 121 (1996) 1551-1556.
- [23] Wadher, S.J.; Pathankar, P.R.; Putanik, M.; Ganjiwale, R.O.; Yeole, P.G. Simultaneous Spectrophotometric estimation of paracetamol and metoclopramide hydrochloride in solid dosage form. *Indian J Pharm Sci* 70 (2008) 393-395.
- [24] Royo Herrero, M.; Mellado Romero, A.; Martinez Calatayud, J. Flow injection-spectrophotometric determination of metoclopramide hydrochloride. *Talanta* 47 (1998) 223-228.
- [25] Silva, I.D.; Saraiva, M.L.; Santo, J.L.M.; Lima, J.L.F. Sequential injection spectrophotometric determination of metoclopramide in pharmaceutical preparations. *Spectrosc Lett* 40 (2007) 51-61.
- [26] Abdel-Gawad, F.M.; El-Guindi, N.M. Spectrophotometric determination of metoclopramide and oxybuprocaine through ion pair formation with thiocyanate and molybdenum (V) or cobalt (II). *Analytical Letters* 28:8 (1995) 1437-1447.
- [27] Faridbod, F.; Ganjali, M.R.; abbafi, S.; Dinarvand, R.; Riahi, S.; Norouzi, P. A new metoclopramide potentiometric membrane sensor for analysis in pharmaceutical formulation and urine: concerns to theoretical study. *Int J Electrochem Sci* 4 (2009) 772 – 786.
- [28] El- Gendy, A. Spectrophotometric determination of metoclopramide via charge-transfer complexes. *Spectroscopy Letters* 25:8 (1992) 1297 – 1313.
- [29] Iêda de Souza Silva, M.; Saraiva, L. M. F. S.; Santos, J. L. M.; Lima, J. L. F. C. Sequential injection spectrophotometric determination of metoclopramide in pharmaceutical preparations. *Spectroscopy Letters*, Special Issue: Spectrometry and Automation 40:1 (2007) 51 – 61.
- [30] Revanasiddappa, H.D.; Manju, B.J. A spectrophotometric method for the determination of metoclopramide HCl and dapsone. *J Pharm Biomed Anal* 25 (2001) 631-637.
- [31] Güzel, O.; Salman, A. Spectrophotometric determination of drugs having primary amine group with p-dimethylaminocinnamaldehyde. *Turkish J Pharm Sci* 4:1 (2007) 31 – 39.
- [32] Revanasiddappa, H.D.; Veena, M.A. Sensitive spectrophotometric determination of metoclopramide hydrochloride and dapsone in bulk sample and dosage forms. *Science Asia* 32 (2006) 319-321.
- [33] Devi, O.Z.; Basavaiah, K.; Vinay, K.; Revanasiddappa, H.O. Determination of metoclopramide hydrochloride in pharmaceuticals and spiked human urine through diazotization reaction. *J Food Drug Anal* 20:2 (2012) 454-463.
- [34] Revanasiddappa, H.D.; Manju, B.J. Spectrophotometric determination of some chemotherapeutic agents using acetyl acetone. *Drug Devel Ind Pharm* 28:5 (2002) 515-521.
- [35] Resende Freitas, B.; Fernandes Magalhães, J. Avaliação de xaropes contendo cloridrato de metoclopramida, pelo método de Bratton-Marshall. *Braz J Pharm Sci* 41:2 (2005) 191 -197.
- [36] Revanasiddappa, H.D.; Kumar, K.; Bilwax, M. A facile spectrophotometric determination of nitrite using diazotization with p-nitroaniline and coupling with acetyl acetone. *Mikrochim Acta* 137 (2001) 249-253.

- [37] Alkhami, A.; Masahi, S.; Bohram, M. Spectrophotometric determination of nitrite based on its reaction with p-nitroaniline in the presence of diphenylamine in micellar media, *Bull. Korean Chem Soc* 25 (2004) 1009-1011.
- [38] Fan, J.; Chen, Y.; Ye, C.; Feng, S. Flow injection spectrophotometric determination of metoclopramide, *Chinese J Anal Chem* 29:2 (2001) 217-218.

DETERMINACIÓN DE MEBENDAZOL CON HIDRÓXIDO DE SODIO

1.- INTRODUCCIÓN

El ingreso de parásitos al organismo origina, en la mayoría de los casos, problemas de salud muy severos aunque las estadísticas de morbilidad y de mortalidad, como consecuencia de la parasitosis, no reflejan esta realidad. Algunos síntomas producidos por esta patología pueden ir desde convulsiones “de tipo epilépticas”, hasta un serio deterioro del sistema respiratorio. Se estima que el 50% de la población infantil de nuestro país está afectada de parasitosis [1]. Además, las enfermedades causadas por gusanos parásitos representan uno de los problemas más importantes de salud en el mundo [2].

Los benzimidazoles son una familia de drogas antihelmínticas que poseen un amplio espectro de acción contra nematodos parásitos del tracto intestinal [3]. Dentro de esta familia de drogas se encuentra el Mebendazol (MBZ, Fig. IX-1) –según IUPAC formiato de metil[(5-benzoil-3H-benzoimidazol-2-il)amino]- uno de los más utilizados, debido principalmente, a su baja absorción en el intestino, nivel de efectos adversos poco significativo, bajo costo, buena efectividad y ausencia de efectos sobre la microbiota intestinal [4].

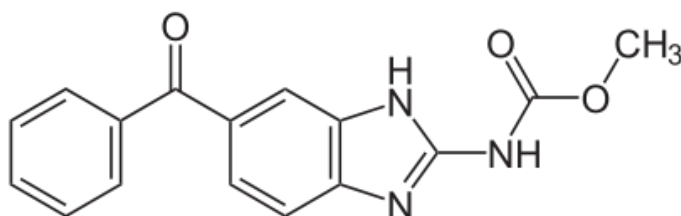


Fig. IX-1: Estructura química del mebendazol ($C_{16}H_{12}N_3O_3$, PM 295,29).

EL MBZ actúa inhibiendo la polimerización de tubulinas e interrumpiendo la función de los microtúbulos de las células de los parásitos. Además, produce el bloqueo irreversible de la captación de glucosa de los helmintos que parasitan el intestino del

huésped. Esto aparentemente conlleva al agotamiento de las reservas de glicógeno del parásito, provocando su muerte [5].

Se han reportado varias técnicas para la determinación de MBZ. Algunas de ellas comprenden métodos electroquímicos [6-8], cromatografía líquida [9-12], cromatografía acoplada a detectores de masas [13-14], métodos fluorimétricos [15] y espectroscopía Rayleigh [16].

Según lo establecen las Farmacopeas Argentina, Europea y de los Estados Unidos (USP), la metodología oficial para la determinación de MBZ en comprimidos es CLAE con detección UV [17-19].

Para los análisis de rutina, es deseable que la técnica utilizada sea simple, rápida y sensible. El método propuesto utiliza soluciones de hidróxido de sodio que interaccionan con la molécula de MBZ y generan un compuesto color amarillo que absorbe fuertemente a 400 nm. Debido a la ausencia de antecedentes bibliográficos, se realiza un estudio teórico de diseño y modelado para inferir la formación de productos que justifiquen esta absorción.

2.- EXPERIMENTAL

2.1.- Reactivos y muestras

- Mebendazol, principio activo: Lote 1010812-WC, origen India, pureza >99,8%.
- Mebendazol, comprimidos de 200 mg elaborados por PLAMECOR, Lote 039.
- Excipientes: polvo precompactado blanco, sílice fundida y talco.
- Etanol 98%, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Ácido clorhídrico 38%, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Hidróxido de sodio, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Fosfato de potasio monobásico, p.a. (Biopack, Argentina).
- Ácido fosfórico, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Metanol, grado HPLC (Biopack, Argentina).
- Ácido fórmico, p.a. (Cicarelli, Argentina).

2.2.- Equipamiento

- Espectrofotómetro UV-Visible Boeco S26, rango 190-900 nm.
- CLAE con detector de UV de longitud de onda variable Agilent 1120, controlado mediante software EZ Chrome Elite.
- Balanza analítica Acculab, precisión $\pm 0,1$ mg.
- Agitador magnético Decalab FBR con termostatizador.
- Software Gaussian 09, paquete de Química Computacional.

2.3.- Procedimiento Espectrofotométrico

Para la preparación de los estándares, se disolvieron 50 mg del principio activo en 50 mL de una solución etanólica de HCl (1:100). Alícuotas de 1 a 5 mL de dicha solución fueron trasvasadas a matraces de 10 mL. A cada matraz se le agrego una cantidad apropiada de solución de HCl en etanol a fin de que todas contuvieran una cantidad final de 5 mL de la misma. Luego se añadió 1 mL de NaOH 3 M a cada uno de los matraces y tras enrasar con agua destilada, se dejó reposar 10 min para el completo desarrollo de color. Para el blanco, se utilizó 5 mL de la solución etanólica de HCl y 1 mL de NaOH 3 M, se llevo a 10 mL con agua destilada y se homogenizó. La absorbancia fue registrada a 400 nm en función de la concentración de los estándares.

Para el análisis de la muestra, 20 comprimidos fueron pesados y se calculó el peso promedio del comprimido (797,2 mg). Luego se pulverizaron y redujeron a polvo fino, obteniéndose una mezcla homogénea. De dicha mezcla, una masa conteniendo la cantidad teórica de 50 mg de MBZ fue disuelta con agitación durante 10 min en solución etanólica de HCl (1:100) y llevada a volumen final de 50 mL. Una alícuota de 10 mL se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. El procedimiento ya descrito para los estándares fue aplicado a una alícuota de 2,5 mL del sobrenadante. La concentración de MBZ en la muestra fue determinada mediante curva de calibrado.

2.4.- Procedimiento Cromatográfico (Método oficial)

Para la fase móvil, se preparó una mezcla de metanol y fosfato de potasio monobásico 50 mM (40:60). Se ajustó su pH a $5,5 \pm 0,1$ con hidróxido de potasio 0,1 M o ácido fosfórico 0,1 M.

Para el estándar, se pesaron 25 mg de principio activo y se disolvieron en 10 mL de ácido fórmico. Se llevó a baño maría durante 15 min, se retiró, enfrió, trasvasó a matraz de 100 mL, enrasó con metanol y homogenizó. Una alícuota de 5 mL de esta solución se transfirió a matraz de 25 mL y se llevó a volumen final con fase móvil.

La muestra se preparó a partir de la mezcla homogénea obtenida al pulverizar 20 comprimidos de MBZ. Una masa equivalente a la de un comprimido promedio se disolvió en 50 mL de ácido fórmico, se calentó a baño maría, se agitó, enfrió, se llevó a volumen final en matraz aforado de 100 mL con agua destilada y se homogenizó. Una alícuota de 5 mL de esta solución fue transferida a matraz de 100 mL y enrasado con una solución de ácido fórmico en metanol (1:9). Con esta última solución se preparó la muestra a inyectar en el cromatógrafo: se transfirieron 5 mL a un matraz de 25 mL y se llevó a volumen final con fase móvil.

Para el ensayo se utilizó una columna RP-18C de $125 \times 4,5$ mm, flujo de fase móvil de 1,5 mL/min y detección a 247 nm. Se registró la señal correspondiente al pico de MBZ, en las soluciones estándar y muestra. Se determinaron las áreas de pico, con las que luego se determinaron las concentraciones en las muestras inyectadas.

2.5.- Atributos analíticos y validación

Para determinar los atributos analíticos del método espectrofotométrico y realizar la validación del mismo, se siguió el protocolo propuesto por las Farmacopeas vigentes [17-19].

2.6.- Estudio teórico de la interacción MBZ-NaOH

Con el objetivo de proponer un fundamento teórico que dé sustento a la evidencia experimental, puesta de manifiesto a través de la absorción del MBZ en la zona visible del

espectro, con características cuantitativas, se llevó a cabo un estudio teórico de diseño y modelado de productos. Los cálculos se realizaron con el Gaussian 09 [20], paquete de Química Computacional. La optimización de las geometrías del MBZ y de los productos más estables encontrados se realizaron con la versión híbrida del B3LYP [21] y el conjunto de base 6-311G (d, p) [22].

Las conformaciones mínimas más estables fueron reoptimizadas utilizando el mismo funcional y conjunto de base, junto con el modelo continuo (PCM) [22] para obtener la estructura cuya energía fuera mínima en solución, usando el mismo solvente experimental. La energía de excitación vertical se determinó con las estructuras más estables. El nivel de la teoría de cálculo de energías de excitación fue B3LYP / 6-311G (d, p). Para comparar los resultados teóricos con los datos experimentales detectados ($\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$), sólo se consideró la energía de excitación teórica ($\lambda_{\text{teor}}^{\text{excit}}$) con la más alta fortaleza del oscilador.

3.- RESULTADOS

3.1.- Especificidad

Los espectros de absorción para las soluciones de reactivo, y de reactivo más placebo, resultaron muy similares entre ellas y presentaron una respuesta muy cercana a la línea de base (Fig. IX-2). Por otro lado, la respuesta de la solución de muestra más reactivo presentó un espectro pronunciado con una absorbancia máxima a 400 nm. Los excipientes que acompañan la formulación son químicamente inertes a los reactivos utilizados, por lo que se confirma la especificidad del método.

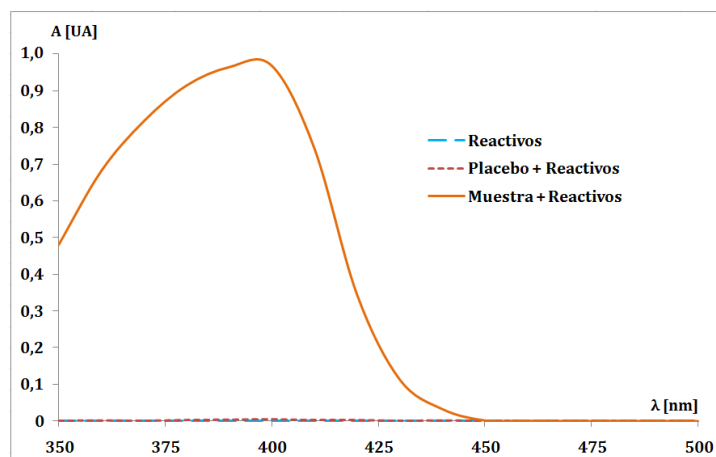


Fig. IX-2: Ensayo de especificidad. Espectros de absorción para soluciones de reactivos, de placebo más reactivos, y de muestra más reactivos. [MBZ] = 0,3 mg/mL.

3.2.- Linealidad

Para evaluar la linealidad del método propuesto, se construyó una curva de calibrado con patrones de MBZ. Los datos obtenidos fueron graficados (Fig. IX-3) y sometidos a un análisis de regresión lineal (Tabla IX-1).

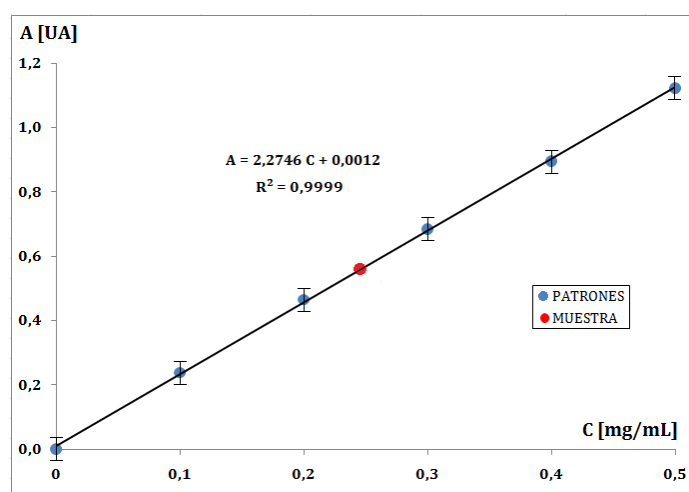


Fig. IX-3: Curva de calibrado del método MBZ-NaOH.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN

Coefficiente de Correlación, R^2	0,9999
Ordenada al origen	$0,0012 \pm 0,0068$
Pendiente	$2,2746 \pm 0,0224$

Tabla IX-1: Análisis de varianza de la regresión para el método MBZ-NaOH, para un nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).

La recta de calibrado responde a la ecuación $A = 2,2746 C + 0,0012$. La bondad del ajuste lineal (R^2) es 0,9999. De acuerdo al análisis de varianza de la regresión lineal (Tabla IX-1), para un nivel de confianza del 95%, la ordenada al origen incluye al punto (0; 0).

El método resultó lineal en el rango de concentraciones estudiado. No fue necesario explorar un rango de respuesta mayor ya que su fin es el control de calidad del ingrediente activo.

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) calculados a partir de las ecuaciones Ec.IV-1 y Ec.IV-2 son 0,009 y 0,030 mg/mL, respectivamente.

3.3.- Repetibilidad

Se analizaron 12 alícuotas preparadas a partir de un pool de comprimidos pertenecientes a un mismo lote. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IX-2.

#	Masa recup. [mg/comp]	X_m [mg/comp]	SD [mg]	CV%
1	198,87	200,79	1,93	0,961
2	199,81			
3	202,13			
4	201,64			
5	204,71			
6	200,96			
7	199,37			
8	197,56			
9	200,14			
10	203,16			
11	200,66			
12	200,47			

Tabla IX-2: Ensayo de repetibilidad del método propuesto para MBZ.

El método arroja un coeficiente de variación (CV) de 0,961 %; esto es menor al 2%, requerido para este tipo de determinaciones analíticas [4-6].

3.4.- Precisión Intermedia

El estudio se llevó a cabo en tres niveles de concentración, preparando soluciones artificiales de excipiente y principio activo. Se tomaron distintos volúmenes de muestra y se aplicó el método espectrofotométrico propuesto para dosar MBZ en comprimidos. Cada análisis se realizó por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla IX-3, y están expresados como masa de MBZ recuperada por comprimido.

El coeficiente de variación global obtenido en el ensayo de precisión intermedia resultó menor que el doble del coeficiente para la repetibilidad ($CV\%_{\text{GLOBAL}} < 2 \times CV\%_{\text{Repetibilidad}}$). La precisión evaluada mostró resultados satisfactorios [10-12].

V_{MBZ} [mL]	ANALISTA 1		ANALISTA 2		REPRODUCIBILIDAD	
	DIA 1	DIA 2	DIA 1	DIA 2		
1,0 mL	198,15	204,22	202,66	198,69		
	199,23	202,36	197,63	200,15		
	202,56	200,63	198,55	201,94	n	12
X [mg]	199,98	202,4	199,61	200,26	X [mg]	200,56
S [mg]	2,3	1,795	2,678	1,628	S [mg]	2,149
CV%	1,15	0,89	1,34	0,81	CV%	1,07
2,0 mL	198,64	203,98	202,75	203,36		
	203,87	200,54	200,67	201,46		
	201,34	201,01	197,96	199,64	n	12
M [mg]	201,28	201,84	200,46	201,49	X [mg]	201,27
S [mg]	2,615	1,865	2,402	1,86	S [mg]	1,959
CV%	1,3	0,92	1,2	0,92	CV%	0,97
3,0 mL	199,68	201,48	197,64	198,64		
	201,67	202,63	199,82	203,64		
	203,93	198,69	202,63	201,69	n	12
M [mg]	201,76	200,93	200,03	201,32	X [mg]	201,01
S [mg]	2,126	2,026	2,502	2,52	S [mg]	2,075
CV%	1,05	1,01	1,25	1,25	CV%	1,03

Resultados globales

X_{GLOBAL} [mg]	200,95
SD_{GLOBAL} [mg]	2,024

Tabla IX-3: Ensayo de reproducibilidad para el método MBZ-NaOH, realizado en 3 niveles de concentración, por dos analistas distintos y en dos días diferentes. Siglas utilizadas: V_{MBZ}, volumen de cefalexina; X, masa promedio por comprimido; S, desviación estándar; y CV%, coeficiente de variación porcentual.

3.5.- Ensayo de Recuperación

El ensayo se realizó por triplicado y en tres niveles de concentración. Para la muestra, se utilizó una solución de placebo enriquecida con diferentes volúmenes de una solución stock de MBZ 1,0 mg/mL (Tabla IX-4).

M _{MBZ} agreg. [mg]	M _{MBZ} recup. [mg]	% R	%R promedio	Precisión	
				Parámetro	Valor
1	0,995	99,5	99,2	X [mg] =	0,992
	0,988	98,8		S [mg] =	0,004
	0,992	99,2		%CV =	0,403
2	2,036	101,8	100,6	X [mg] =	2,011
	2,021	101,1		S [mg] =	0,031
	1,977	98,9		%CV =	1,541
3	2,965	98,8	99,9	X [mg] =	2,997
	3,009	100,3		S [mg] =	0,028
	3,016	100,5		%CV =	0,934

Tabla IX-4: Ensayo de recuperación de principio activo de MBZ sobre placebo. Siglas utilizadas: M_{MBZ}, masa de cefalexina; %R, porcentaje de recuperación; X, masa promedio; S, desviación estándar; y CV%, coeficiente de variación porcentual.

La recuperación se encuentra entre el 99,2 y el 100,6%, valores comprendidos en el rango establecido por las Farmacopeas vigentes (98,0 – 102,0 %) [17-19].

3.6.- Comparación con el método oficial (CLAE-UV)

Los resultados obtenidos para seis determinaciones utilizando el método oficial se muestran en la Tabla IX-5.

RUN	SEÑAL [area]	Conc. [mg/mL]	M _{recup} [mg/comp]	X [mg/comp]	SD [mg]	CV%
Std.	2641,9	1,000	-	-	-	-
1	2624,4	0,993	198,67	200,24	2,045	1,021

2	2630,8	0,996	199,15
3	2662,6	1,008	201,56
4	2675,8	1,013	202,56
5	2667,9	1,010	201,96
6	2609,8	0,988	197,56

Tabla IX-5: Determinación de MBZ en comprimidos por CLAE-UV.

El método espectrofotométrico propuesto se comparó con el oficial utilizando la prueba t de Student y la F de Fischer (Tabla IX-6).

Parámetro	Método	
	Espectrofotométrico	CLAE-UV
Xm ± SD [mg]	200,46 ± 1,31	200,24 ± 2,05
CV%	0,776	1,225
S²	1,714	4,184
Test F	2,441 (5,050)	
Test t	0,222 (2,228)	

Tabla IX-6: Resultados del análisis ANOVA entre el método oficial (CLAE-UV) y el método espectrofotométrico MBZ - NaOH. Nivel de confianza del 95% (p = 0,05). Los valores entre paréntesis representan los valores críticos respectivos.

Estadísticamente, no se han encontrado diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos en la determinación de MBZ en comprimidos, para un nivel de confianza del 95%.

3.7.- Resultados del estudio teórico

Los espectros de absorción UV-visible obtenidos en el laboratorio, que se muestran en la Fig. IX-4, fueron utilizados para confrontar los resultados experimentales con la teoría.

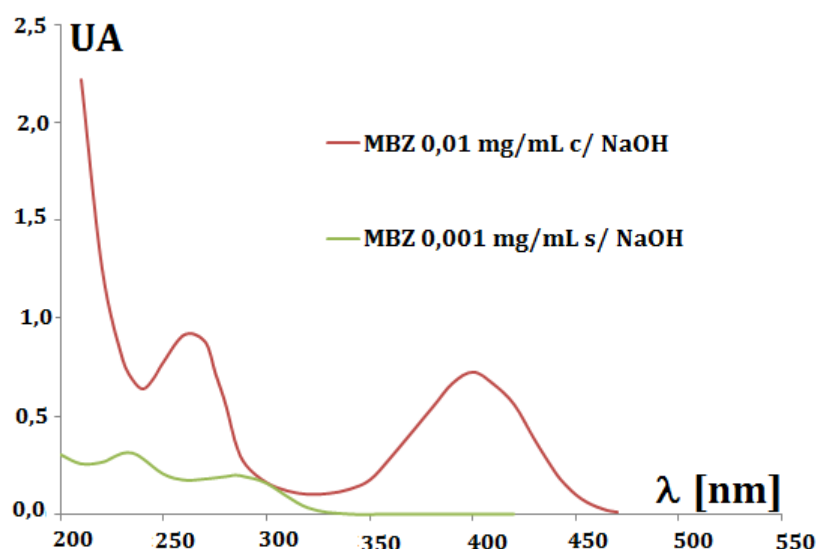


Fig. IX-4: Espectros de absorción UV-visible del MBZ y de su producto de interacción con NaOH.

Las interacciones más probables, que surgen de la comparación del estudio teórico con la evidencia experimental, se resumen en la Tabla IX-7:

MOLECULA	$\lambda_{\text{exp}}^{\text{max}}$ [nm]	$\lambda_{\text{teor}}^{\text{excit}}$ [nm]	OM	ASIGNACION
MBZ	285	290	82→83	$\pi \rightarrow \pi^*$
	235	240	82→84	$\pi \rightarrow \pi^*$
Producto 1	400	398	82→84	$\pi \rightarrow \pi^*$
	260	270	82→85	$\pi \rightarrow \pi^*$
Producto 2	400	345	82→84	$\pi \rightarrow \pi^*$
	260	279	82→85	$\pi \rightarrow \pi^*$

Tabla IX-7: Resultados de la comparación entre el estudio teórico y los datos experimentales.

Para el MBZ, las longitudes de onda teóricas propuestas por el modelado, son 290 nm y 240 nm, muy próximas a sus valores experimentales (285 y 235 nm, respectivamente). Los productos de interacción con el hidróxido de sodio que presentaron mejor concordancia con la experiencia, se muestran en la Fig. IX-5. El Producto 1, correspondiente a la interacción del átomo de sodio con dos átomos de nitrógeno de la molécula de MBZ, presenta picos de absorción a 398 nm (transición del orbital 82 → 84, HOMO → LUMO+1), y 270 nm (transición del orbital 82 → 85, HOMO → LUMO+2). En tanto, el Producto 2, que surge de la interacción del oxhidrilo con el anillo bencénico del MBZ, presenta picos de absorción a 345 nm (transición del orbital 82 → 84, HOMO→LUMO+1), y a 279 nm (transición del orbital 82 → 85, HOMO→LUMO+2).

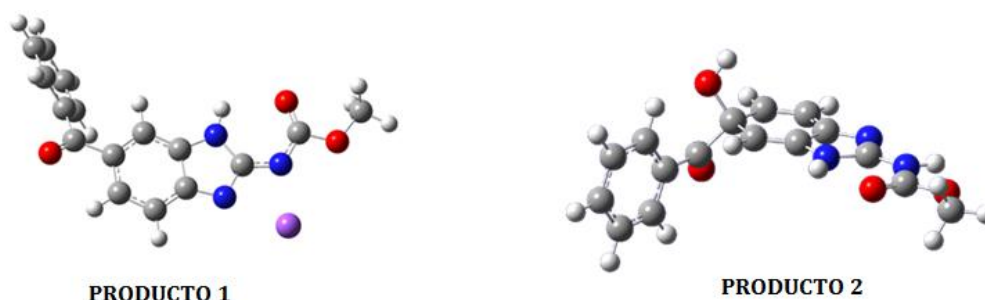


Fig. IX-5: Productos de interacción entre MBZ y NaOH.

4.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten la aplicación de la metodología espectrofotométrica a la cuantificación del principio activo MBZ en comprimidos farmacéuticos que lo contengan, con una precisión y exactitud comparable con la metodología oficial, sin interferencia por parte de los excipientes, con claras ventajas en cuanto a costos y rapidez de análisis, y cumpliendo con los requerimientos establecidos por las Farmacopeas vigentes.

Las mediciones de absorbancia se complementaron con la aplicación de la química teórica, usando la teoría del funcional de la densidad, B3LYP y la base 6-311G (d, p). Las energías de excitaciones B3LYP para el MBZ y para el producto de interacción del MBZ con el sodio concuerdan con los resultados experimentales.

5.- REFERENCIAS

- [1] Espíndola, J.H. Entrevista: "Parasitosis intestinal: una de las enfermedades de mayor influencia en la salud poblacional". Diario El Litoral. Corrientes, 29/07/2013.
- [2] Kroschwitz, J.I.; Howe-Grant, M. *Kirk-Othmer's Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 3, pp. 456–472. Ed. Wiley, New York, 1997.
- [3] Raeymackers, A.; Van Gelder, J.; Roevens, L.; Janssen, P. Synthesis and anthelmintic activity of alkyl-(5-acyl-1-benzimidazol-2-yl) carbamates, *Drug Res* 28 (1978) 586–594.
- [4] Cañete, R.; Escobedo, A.A.; Almirall, P.; González, M.E.; Brito, K.; Cimerman, S. Mebendazole in parasitic infections other than those caused by soil-transmitted helminths. *Transact Royal Soc Trop Med Hyg* 103 (2009) 437-442.

- [5] Lacey, E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 6 (1990) 107-112.
- [6] Ghalkhani, M.; Shahrokhian, S. Adsorptive stripping differential pulse voltammetric determination of mebendazole at a graphene nanosheets and carbon nanospheres/chitosan modified glassy carbon electrode. *Sens Actuators B-Chem* 185 (2013) 669-674
- [7] Conesa, A.J.; Pinilla, J.M.; Hernandez, L. Determination of mebendazole in urine by cathodic stripping voltammetry. *Anal Chim Acta* 331 (1996) 111-116.
- [8] Kumar, K.G.; John, S.; Augustine, P.; Paduval, R.; Saraswathyamma, B. Mebendazole Selective Membrane Sensor and Its Application to Pharmaceutical Analysis. *Anal Sci* 23 (2007) 291-294.
- [9] Al-Kurdi, Z.; Al-Jallad, T.; Badwan, A.; Jaber, A.M.Y. High performance liquid chromatography method for determination of methyl-5-benzoyl-2-benzimidazole carbamate (mebendazole) and its main degradation product in pharmaceutical dosage forms. *Talanta* 50 (1999) 1089-1097.
- [10] Raj Gomes, A.; Nagaraju, V. High-performance liquid chromatographic separation and determination of the process related impurities of mebendazole, fenbendazole and albendazole in bulk drugs. *J Pharm Biomed Anal* 26 (2001) 919-927.
- [11] Mottier, L.; Alvarez, L.; Lanusse, C. Quantitative chromatographic determination of several benzimidazole anthelmintic molecules in parasite material. *J Chrom B-Chem* 798 (2003) 117-125.
- [12] Argekar, A.P.; Raj, S.V.; Kapadia, S.U. Simultaneous determination of mebendazole and pyrantel pamoate from tablets by high performance liquid chromatography-reverse phase (RP-HPLC). *Talanta* 44 (1997) 1959-1965.
- [13] De Ruyck, H.; Daeseleire, E.; De Ridder, H.; Van Renterghem, R. Liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of mebendazole and its hydrolysed and reduced metabolites in sheep muscle. *Anal Chim Acta* 483 (2003) 111-123.
- [14] Chen, D.; Tao, Y.; Zhang, H.; Pan, Y.; Liu, Z.; Huang, L.; Wang, Y.; Peng, D.; Wang, X.; Dai, M.; Yuan, Z. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination of benzimidazole residues in edible tissues. *J Chrom B-Chem* 879 (2011) 1659-1667.
- [15] Fattah, F.A.; Baeyens, W.; De Moerloose, P. Fluorimetric Determination of Mebendazole and Flubendazole in Pharmaceutical Dosage Forms after Alkaline Hydrolysis. *Anal Chim Acta* 154 (1983) 351-354.
- [16] Tian, F.; Yang, J.; Huang, W.; Zhou, S.; Yao, G. Resonance Rayleigh scattering, frequency doubling scattering and absorption spectrum of the interaction for mebendazole with 12-tungstophosphoric acid and its analytical applications. *Spectrochim Acta A* 116 (2013) 57-64.
- [17] Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. *Farmacopea Argentina*, 8va Edición, 2011.
- [18] European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). *European Pharmacopoeia*, 8va. Edición, 2014.
- [19] US Pharmacopoeial Convention. *United State Pharmacopoeia 38 and National Formulary 32*. Rockville, Maryland, 2015.
- [20] Frisch, M. J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G.A; Gaussian 03, Revision C01. Gaussian Inc., Wallingford, 2004.

[21] Becke, A.D. *J Chem Phys* 98 (1993) 5648.

[22] Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J Comp Chem* 24 (2003) 669.

CAPÍTULO X

DESARROLLO DE UNA PASTA DE CARBONO PARA LA FABRICACIÓN DE ELECTRODOS

1.- INTRODUCCIÓN

Las técnicas electroquímicas han demostrado ser muy útiles para las determinaciones de moléculas orgánicas, incluyendo a compuestos farmacológicamente activos en preparados farmacéuticos y fluidos biológicos [1,2]. Las ventajas de estas técnicas en el análisis de drogas son atribuidas a la simplicidad, bajo costo y relativamente cortos tiempo de análisis involucrados, en comparación con otros métodos. Como resultado, la preparación de la muestra usualmente consiste en la disolución del fármaco en un solvente adecuado y el análisis directo de una alícuota de esta solución [3].

Para lograr estas ventajas comparativas es necesario contar, además de un equipo robusto, con un arreglo de electrodos confiable y que permita su modificación, preferentemente de una manera sencilla y rápida. Los Electrodos de Pasta de Carbono (EPC) comprenden un grupo heterogéneo de electrodos elaborados a partir de la mezcla de polvo de carbono (grafito u otro material carbonoso) y un adherente no conductor inmiscible en agua [4,5].

Los EPC son ampliamente utilizados, tanto en estudios electroquímicos como en electroanálisis, gracias a su baja corriente de fondo -en comparación con los electrodos de grafito sólido o de otros metales nobles-, bajo costo, facilidad de incorporar diferentes sustancias durante la preparación de la pasta -obteniéndose los llamados Electrodos de Pasta de Carbono Modificados, EPCM-, simplicidad en la preparación, sencillos de renovar su superficie y con claras posibilidades de miniaturización. Además de las ventajas mencionadas, los EPC permiten la preparación de electrodos con la composición deseada y, por lo tanto, con propiedades predeterminadas. La elección de los componentes de la pasta (polvo de carbono y adherente), su composición en la mezcla y la manera en que cada EPC es preparado (homogenización de la pasta, empaquetado de la misma en el

cuerpo del electrodo, condiciones de curado, etc.) son aspectos importantes que determinan las características y el comportamiento de los EPC [4-6].

Se han descrito diversos tipos de EPC, preparados a partir de distintas fuentes de polvo de carbono y materiales adherentes. Entre ellos, se pueden mencionar pastas obtenidas a partir de grafito [3, 7-10], grafeno [11-14] y nanotubos de carbono [15-19].

El objetivo de este trabajo fue la elaboración de una nueva pasta de carbono a partir de productos disponibles a nivel nacional, para la fabricación de un electrodo robusto para los análisis de rutina y que permita modificaciones, tanto en su superficie como en el seno del mismo. Para lograrlo, se trabajaron con dos marcas distintas de grafito (Merk y Aldrich) disponibles comercialmente y como adherente se utilizó barniz serigráfico de industria nacional, ya que esto permite la posibilidad de aplicar la pasta no solo a electrodos sólidos, sino también como base para la fabricación de electrodos serigrafiados y otros formatos propuestos. Se evaluaron la temperatura de secado, la relación grafito/barniz y las marcas de grafito utilizadas.

2.- EXPERIMENTAL

2.1- Reactivos y materiales

- Grafito en polvo (Merk, Darmstadt, Alemania).
- Grafito en polvo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Barniz serigráfico comercial, Argentina.
- Cloruro de potasio (Biopack, Argentina).
- Ferricianuro de potasio (Merk, Darmstadt, Alemania).
- Cloroformo p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Tubos de acrílico de 5 mm de d.i. y 2 cm de largo.
- Tubos de cobre de 4 mm de d.e. y 1,7 cm de largo.
- Soldadora y estañolín.
- Papel de lija N° 400, 600, 800 y 1500.

2.2.- Equipamiento

- Potenciostato/galvanostato BASi modelo Epsilon y software controlador Epsilon EC.
- Balanza Scientech Modelo SA120IW (precisión $\pm 0,1$ mg).
- Estufa.
- Cámara de cultivo.

2.3.- Construcción del cuerpo de los electrodos

Para la construcción del cuerpo de este tipo de transductor se utilizaron tubos de cobre de 4,5 mm de diámetro externo y 17 mm de largo. A uno de los extremos de cada tubo de cobre se lo cubrió con estaño mediante soldadura. Una vez frío, se pulió dicho extremo con papel de lija N° 1200 hasta obtener una superficie lisa y espejada. Cada tubo de cobre, así obtenido, se introdujo dentro de un cuerpo cilíndrico de acrílico de 5 mm de diámetro interno, de 8 mm de diámetro externo y de 20 mm de longitud.

La unión entre el cobre y el acrílico se realiza mediante la deposición de una gota de cloroformo; dejándose secar unos minutos bajo campana a temperatura ambiente. En una de los extremos, donde queda una cavidad de unos 3 mm, se introduce la pasta de grafito-barniz preparada.

Dentro del tubo de cobre se coloca un conector doble macho de cobre que permitirá transmitir el estímulo eléctrico entre el analizador electroquímico y la pasta de carbono una vez sumergida en la solución de trabajo.

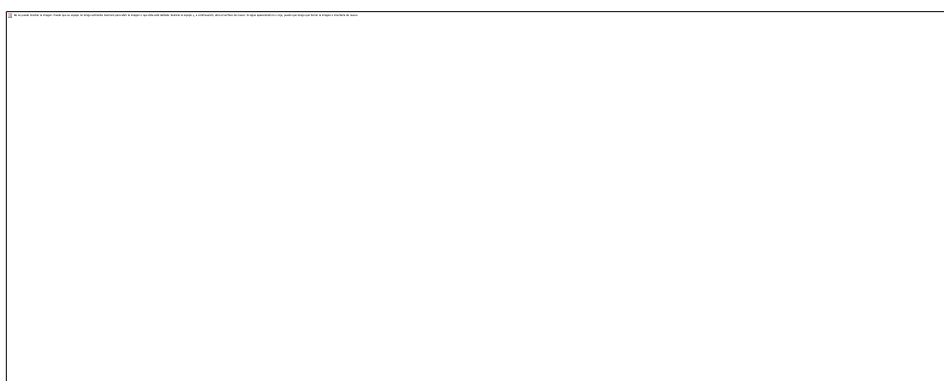


Fig. X-1: Construcción del cuerpo de electrodo de pasta de carbono.

2.4.- Pasta de grafito y barniz serigráfico

Estas pastas se preparan a partir de la mezcla de grafito en polvo (tamaño de partícula de 50 μm) y barniz serigráfico en la proporción adecuada (% p/p). En primer lugar una porción de grafito de cada marca fue llevada a estufa a 95 °C durante 48 h para eliminar la humedad. Mediante pesada, antes y después del tratamiento térmico, se aseguró que la humedad remanente en las porciones de grafito sea inferior al 0,5 %. Por cada electrodo a fabricar se estimó la utilización de 150 mg de pasta. Para prepararla, inicialmente se pesó el barniz (teniendo la precaución de homogenizar vigorosamente el contenedor previo a la pesada) y luego sobre este se pesó el grafito. En caso de no haber pesado exactamente la cantidad de barniz, se recalculó la cantidad de grafito a pesar, a fin de mantener la proporción. Se mezclan con espátula, cuidando de no perder material, durante unos minutos, hasta que se logra una mezcla homogénea. La homogenización del material es el paso crítico para la obtención de un transductor con propiedades electroquímicas óptimas. Finalmente, el material resultante se incorpora en la cavidad del transductor con ayuda de la espátula. Los electrodos son acomodados verticalmente en una bandeja perforada y sometidos a un tratamiento de curado, hasta obtener un material de rigidez adecuada. Una vez curados, los electrodos se pulen (disminuyendo el poder abrasivo) hasta obtener una superficie lisa y brillante, siguiendo la siguiente secuencia:

- a. papel de lija N° 600 u 800.
- b. papel de lija N° 1200 u 1500.

Los electrodos se conservan en lugar seco, limpio, al resguardo de la luz y a temperatura ambiente, hasta el momento de utilizarlos.

2.5.- Caracterización de los EPC

La caracterización electroquímica se realiza con el fin de conocer la operatividad y funcionalidad de los distintos tipos de electrodos. Generalmente, dicha caracterización se realiza mediante voltamperometría cíclica (VC), utilizando un sistema de referencia, en el cual el analito posea propiedades redox bien conocidas (por ej., utilizando ferricianuro de potasio). La información obtenida de un sistema mediante VC es de carácter cualitativo, y permite:

- a. identificar los potenciales de oxidación y reducción de la o las cuplas presentes en el sistema, que posteriormente podrán ser utilizados en otras técnicas;

- b. evaluar la reversibilidad de dichas cuplas a través de la relación de sus corrientes: $i_{p.ox} / i_{p.red}$ (valor teórico de 1 para una cupla reversible);
- c. analizar los aspectos cinéticos de la transferencia electrónica sobre la superficie del transductor a través de la medición de la separación de picos (separación teórica de 59 mV para una cupla reversible con $n = 1$);
- d. observar la influencia de la velocidad del barrido de potencial sobre dicha transferencia;
- e. estudiar fenómenos interfaciales como la absorción de sustancias electroactivas.

También se ensayaron las respuestas de los electrodos aplicando voltamperometría de onda cuadrada (VOC). En esta técnica diferencial de gran amplitud se aplicó un estímulo compuesto por ondas cuadradas simétricas, superpuestas con una escalera de potencial base, al electrodo de trabajo.

Dentro de las técnicas electroanalíticas, la VOC es una de las más utilizadas para los ensayos cuantitativos, por su mayor sensibilidad. Por ello es deseable evaluar la respuestas del electrodo frente a una sustancia electroactiva mediante esta técnica.

En ambos casos, para los ensayos se utilizó una solución de ferricianuro de potasio 2 mM disuelto en KCl 0,1 M. Para el sistema electroquímico se utilizaron un electrodo de referencia comercial de Ag/AgCl (en KCl saturado), un cable de platino como electrodo auxiliar y los EPC preparados como electrodos de trabajo.

En una celda electroquímica se añadieron 5 mL de la solución de trabajo de ferricianuro de potasio y se sumergieron los tres electrodos. Luego se realizaron las VC y VOC.

Los parámetros para cada técnica fueron:

- 1.- Voltametría cíclica: $E_{inicial} = 0 \text{ mV}$; $E_{cambio1} = -500 \text{ mV}$; $E_{cambio2} = 800 \text{ mV}$;
 $E_{final} = 0 \text{ mV}$; $V_{barrido} = 50 \text{ mV/s}$; Ciclos = 2 (Se recoge el segundo ciclo).
- 2.- Voltametría de onda cuadrada: $E_{inicial} = 50 \text{ mV}$; $E_{final} = 800 \text{ mV}$; $DE_s = 4 \text{ mV}$;
 $E_{sw} = 25 \text{ mV}$; $f_{sw} = 15 \text{ Hz}$.

2.6.- Evaluación de la relación grafito/barniz y de la temperatura de secado

Para la evaluación de los EPC contruidos se recurrió al Diseño Experimental, mediante el programa Design Expert® Ver.7.1.6 (Trial).

Se realizó la optimización mediante Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). La MSR es una técnica secuencial y su objetivo es determinar las condiciones de operación óptimas para un sistema, o determinar la región del espacio de los factores experimentales en la que se satisfacen las condiciones de operación [20]. En este trabajo se utilizó un diseño central compuesto, considerando tres factores y registrando cuatro respuestas.

Se utilizó la función deseabilidad (función D) [21] como criterio para establecer las condiciones experimentales satisfactorias que permitieran obtener las mejores respuestas. Para ello fueron especificados todos los criterios de optimización, y seleccionadas las coordenadas de las variables independientes donde la función D tomó su mayor valor.

A partir del conocimiento previo del sistema, los factores estudiados fueron:

- 1.- Tipo de grafito utilizado.
- 2.- Relación grafito-barniz (G/B).
- 3.- Temperatura de secado (T_s).

Para el primer parámetro se ensayaron los grafitos Merck y Aldrich. Se descartaron otras marcas como Cicarelli, Biopack, etc, ya que ensayos anteriores con dichos grafitos no condujeron a resultados satisfactorios.

Se propusieron tres relaciones G/B (45:55; 50:50; 55:45). De acuerdo a ensayos preliminares, las pastas que contenían cantidades de grafito menores al 40% presentaban una resistencia muy alta, por lo que no conducían adecuadamente la corriente eléctrica; mientras que aquellas pastas con concentraciones de grafito mayores al 60% resultaban quebradizas y de difícil manejo en las etapas de homogenización y deposición en el soporte.

Para el secado se establecieron tres condiciones:

- Temperatura ambiente, 25 °C (± 1 °C) en habitación acondicionada y al resguardo de la luz;
- 37 °C (± 2 °C), en habitación oscura;
- 60 °C (± 1 °C) en estufa.

Las respuestas analizadas fueron:

- 1.- Intensidad y relación de las corrientes correspondientes a los picos de oxidación y reducción ($i_{p.ox}/i_{p.red}$) en la VC;
- 2.- diferencia entre los potenciales correspondientes a dichos picos (ΔE_p);
- 3.- intensidad de corriente del pico de oxidación ($i_{p.ox}$) en las VOC;
- 4.- potencial correspondiente al pico de oxidación ($E_{p.ox}$) en la VOC.

En todos los casos, los electrodos construidos se encontraban dentro de desecadores de vidrio. Se fijó como número total de muestras $N = 100$ unidades experimentales y con el programa Design Expert® se obtuvo una planilla con los 100 experimentos agrupados según cada tratamiento.

3.- RESULTADOS

Una vez efectuados los experimentos, se analizaron los modelos matemáticos polinomiales que explicaban el comportamiento de las respuestas. Los coeficientes del modelo se calcularon mediante regresión múltiple con eliminación por retroceso (eliminación backward) [22]. Este procedimiento consiste en realizar la regresión con todos los términos del modelo, luego quitar el término con el valor de probabilidad parcial más alto. Finalmente, el proceso se detiene cuando el valor de probabilidad del siguiente término satisface el valor de α especificado. El modelo seleccionado se validó mediante el análisis de varianza (ANOVA).

Mediante el uso de la función deseabilidad, se optimizaron simultáneamente las 4 respuestas: intensidad y relación de las corrientes correspondientes a los picos de oxidación y reducción ($i_{p.ox}/i_{p.red}$), diferencia entre los potenciales correspondientes a dichos picos (ΔE_p) obtenidos por VC; y potencial ($E_{p.ox}$) e intensidad de corriente del pico de oxidación ($i_{p.ox}$) obtenidos por VOC. Los criterios de optimización establecidos fueron:

Método	Respuesta	Criterio	Límite superior	Límite inferior	Importancia
VC	$i_{p.ox}/i_{p.red}$	Valor fijo de 1,00	0	12,27	+
VC	ΔE_p	Valor fijo de 300	0	834 mV	+

VOC	$i_{p.ox}$	Mantener en el rango	0	44,83 μA	-
VOC	$E_{p.ox}$	Mantener en el rango	0	262 mV	-

Tabla X-1: Criterios de optimización.

Se procedió a la optimización obteniendo como resultado las condiciones experimentales que generan el máximo de la función deseabilidad:

- Relación G/B: 2,81; correspondiente a una proporción grafito-barniz de 54:46.
- Grafito utilizado: Aldrich, proporciona los resultados que mejor se ajustan a los criterios establecidos para la función deseabilidad.
- Secado: Tratamiento 1, correspondiente a un curado a temperatura ambiente (25 °C) en habitación acondicionada y al resguardo de la luz.
- Relación de las intensidades de las corrientes correspondientes a los picos de oxidación y reducción ($i_{p.ox}/i_{p.red}$): 1,00
- Diferencia de potencial correspondientes a dichos picos (ΔE_p): 322,91
- Función Deseabilidad: **0,978**

En la Fig. X-2 se muestra la superficie de respuesta obtenida para la función deseabilidad global. Esta gráfica se obtuvo para dos factores manteniendo constantes en sus valores óptimos, los restantes.

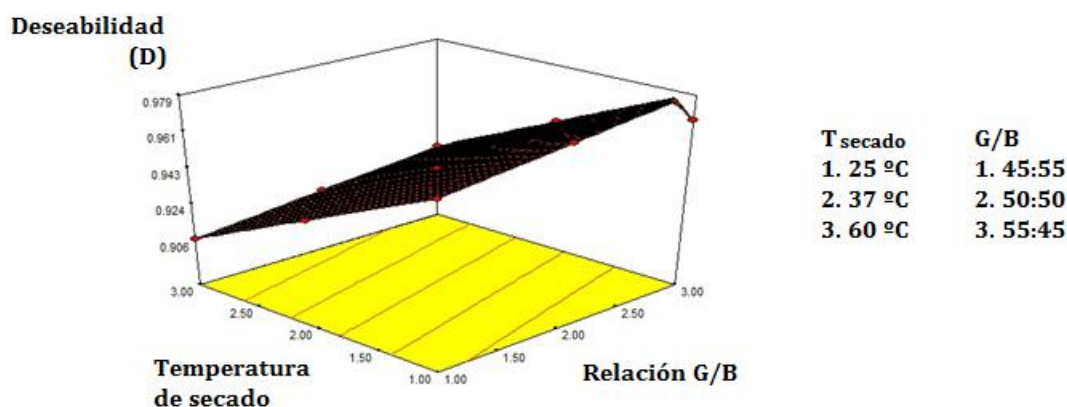


Fig. X-2: Superficie de respuesta de la función deseabilidad para los factores

(a) Temperatura de secado y (b) Relación G/B, para el grafito Aldrich.

Luego, se analizaron los resultados de las respuestas estudiadas en función de las variables temperatura de secado y relación grafito-barniz, para electrodos fabricados con grafito Aldrich, ya que el diseño experimental sugiere que con éste se obtienen los resultados que mejor se ajustan a los criterios establecidos para la función deseabilidad.

En la Fig. X-3 se observa la respuesta de intensidad de corriente obtenida por VOC en función de los parámetros temperatura de secado y relación grafito-barniz. En ella las mejores intensidades se alcanzan con electrodos que tienen un tratamiento de secado a 25 °C y una relación G/B correspondiente a 55:45. Esto es acorde con los resultados obtenidos en la superficie de respuesta de la función deseabilidad (Fig. X-2).

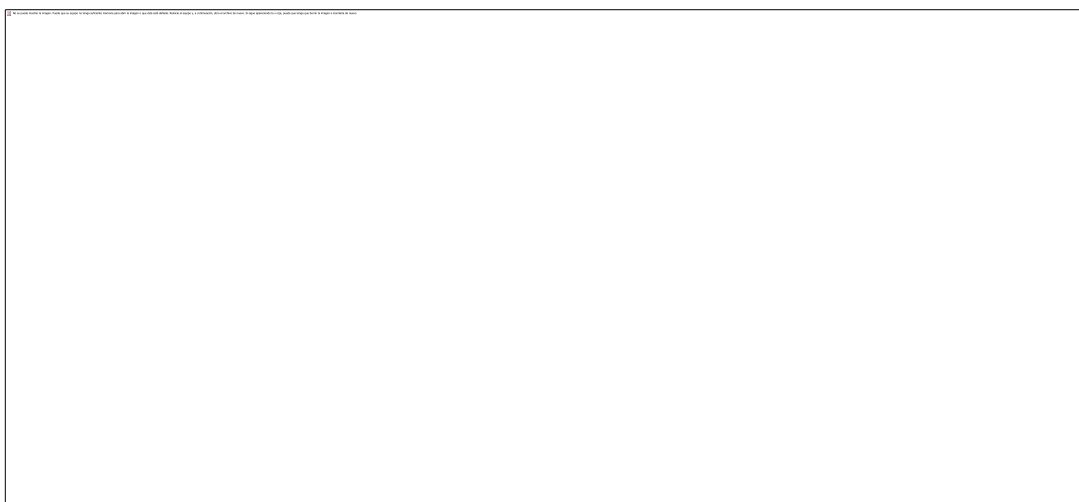


Fig. X-3: Intensidad de corriente (VOC) en función de la temperatura de secado y la relación grafito-barniz, para electrodos realizados con grafito Aldrich.

Análogamente, en la Fig. X-4 se observa la respuesta intensidad de corriente obtenida por VC en función de la temperatura de secado y la relación grafito-barniz. Nuevamente, las mejores intensidades se alcanzan con un tratamiento de secado a 25 °C y relación G/B de 55:45.



Fig. X-4: Intensidad de corriente (VC) en función de la temperatura de secado y la relación grafito-barniz, para electrodos realizados con grafito Aldrich.

En la Fig. X-5 se evaluó la relación de intensidades de corrientes de oxidación y reducción, obtenidas mediante VC, en función de la temperatura de secado y la relación grafito-barniz.

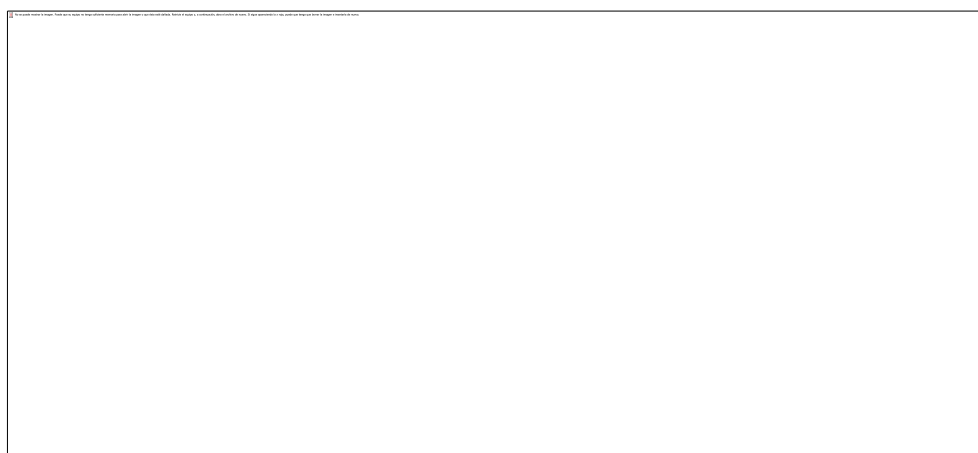


Fig. X-5: Relación de intensidades de corriente (VC) en función de la temperatura de secado y la relación grafito-barniz, para electrodos realizados con grafito Aldrich.

Se observa que los electrodos preparados con una composición 55:45 presentaron una relación de intensidades cercana a la unidad, para los tres tratamiento de curado. Se puede inferir que la pasta de carbono preparada con esta relación grafito-barniz presenta una buena transferencia electrónica y su desempeño resulta prácticamente independiente del tratamiento de secado.

Se evaluó también la diferencia de potencial entre los picos de oxidación y reducción, obtenidos mediante VC, para los parámetros estudiados. La Fig. X-6 muestra un comportamiento parecido a la situación anterior. Los electrodos fabricados a partir de

una composición grafito-barniz de 55:45 presentaron menor diferencia de potencial entre los picos de oxidación y reducción. Además, este comportamiento no dependería significativamente del tratamiento de secado utilizado.

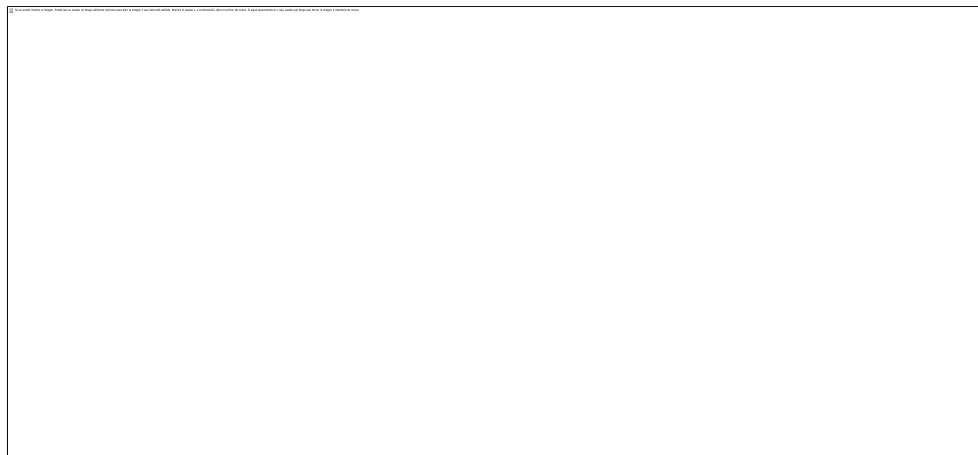


Fig. X-6: Diferencia de potencial entre los picos de oxidación y reducción (VC) en función de la temperatura de secado y la relación grafito-barniz, para electrodos realizados con grafito Aldrich.

Al evaluar individualmente los parámetros de respuesta en función de las variables estudiadas temperatura de secado y relación grafito-barniz (Fig. X-3 a X-6) se encontró que estos concuerdan con los resultados obtenidos mediante la función deseabilidad y su superficie de respuesta (Fig. X-2). Desde el punto de vista de la respuesta y la transferencia electrónica, los mejores resultados se encontraron con electrodos que presentaban una composición grafito-barniz de 55:45. Por otro lado, se puede inferir que, si bien los mejores resultados se correlacionan con electrodos curados a temperatura ambiente (25 °C), la temperatura de secado pareciera no influir significativamente en el desempeño posterior del electrodo.

Desde un punto de vista práctico, el curado debería realizarse de tal manera que se asegure que toda la pasta seque uniformemente. Una plataforma cilíndrica como la utilizada en el presente estudio no permitiría un secado a altas temperaturas, ya que la formación de capas secas exteriores ofrecerían una resistencia para el curado del seno de la pasta. En cambio, una plataforma que utilice electrodos de trabajo con mucha superficie en relación de la cantidad de pasta utilizada permitiría un curado a temperaturas mayores, siempre y cuando esto no provoque que la pasta seca se quiebre.

4.- CONCLUSIONES

Se logró la confección de una pasta de carbono apta para la construcción de electrodos de trabajo. Se optimizaron los parámetros correspondientes a la proporción de grafito y barniz serigráfico y al tratamiento de secado. El método RSM indicó que las mejores respuestas se obtenían con el grafito Aldrich. El barniz serigráfico de industria nacional seleccionado resultó satisfactorio para los ensayos realizados, permitiendo obtener una pasta consistente y con buena conductividad.

5.- REFERENCIAS

- [1] Hajjizadeh, M.; Jabbari, A.; Heli, H.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Shafiee, A.; Karimian, K. *Anal Biochem* 373 (2008) 337–348.
- [2] Vidotti, M.; Torresi, S.C.; Kubota, L.T. *Sens Actuators B* 135 (2008) 245–249.
- [3] Ojani, R.; Raoof, J.B.; Zamani, S. *Bioelectrochemistry* 85 (2012) 44–49.
- [4] Nossol, E.; Zarbin, A.J.G. *Electrochimica Acta* 54 (2008) 582–589.
- [5] Svancara, I.; Vytras, K.; Barek, J.; Zima, J. *Crit Rev Anal Chem* 31 (2001) 311.
- [6] Wang, J.; Kirgöz, U.A.; Mo, J.W.; Lu, J.; Kawde, A.N.; Muck, A. *Electrochem Commun* 3 (2001) 203.
- [7] Mendes, R.K.; Claro-Neto, S.; Cavaleiro, E.T.G. *Talanta* 57 (2002) 909–917.
- [8] Zhou, Y.; Tang, W.; Dang, F.; Chai, S.; Zhang, L. *Colloid Surface B* 118 (2014) 148–153.
- [9] Serra, B.; Jiménez, S.; Mena, M.L.; Reviejo, A.J.; Pingarrón, J.M. *Biosens Bioelectron* 17 (2002) 217–226.
- [10] Al-Qaim, F.F.; Mussa, Z.H.; Othman, M.R.; Abdullah, M.P. *J Hazard Mater* 300 (2015) 387–397.
- [11] Li, F.; Li, J.; Feng, Y.; Yang, L.; Du, Z. *Sens Actuators B* 157 (2011) 110–114.
- [12] Vidya, H.; Kumara Swamy, B.E. *J Mol Liq* 211 (2015) 705–711.
- [13] Afkhami, A.; Khoshshafar, H.; Bagheri, H.; Madrakian, T. *Sens Actuators B* 203 (2014) 909–918.
- [14] Sun, W.; Wang, Y.; Gong, S.; Cheng, Y.; Shi, F.; Sun, Z. *Electrochimica Acta* 109 (2013) 298–304.
- [15] Zhenga, J.; Zhanga, Q.; Hea, X.; Gaoa, M.; Ma, X.; Lic, G. *Procedia Engineering* 36 (2012) 235 – 245
- [16] Khaled, E.; Kamel, M.S.; Hassan, H.N.A.; Haroun, A.A.; Youssef, A.M.; Aboul-Enein, H.M. *Talanta* 97 (2012) 96–102.
- [17] Manso, J.; Mena, M.L.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J.M. *Electrochim Acta* 53 (2008) 4007–4012
- [18] Norouzi, P.; Gupta, V.K.; Larijani, B.; Rasoolipour, S.; Faridbod, F.; Ganjali, M.R. *Talanta* 131 (2015) 577–584.
- [19] Farinha Valezi, C.; Duarte, E.H.; Mansano, G.R.; Dall’Antonia, L.H.; Teixeira Tarley, C.R.; Romão Sartori, E. *Sens Actuators B* 205 (2014) 234–243.
- [20] Myers, R.H.; Montgomery, D.; Anderson Cook, C.M. *Response Surface Methodology: Process and product optimization using designed experiments*, 3rd Ed. New Jersey, 2009.

- [21] Almeida Bezerra, M.; Erthal Santelli, R.; Padua Oliveira, E.; Silveira Villar, L.; Escaleira, L.A. *Talanta* 76 (2008) 965-972.
- [22] Vera Candiotti, L.; Cámara, M.; De Zan, M.M.; Goicoechea, H. *Talanta* 124 (2014) 123-138.

CONSTRUCCIÓN DE UNA PLATAFORMA PARA ANÁLISIS EN FLUJO CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA

1.- INTRODUCCIÓN

Para afrontar los distintos desafíos que enfrenta la Química Analítica, una de las tendencias que intenta dar solución es la de la automatización, miniaturización y simplificación de los procesos analíticos [1]. Estas tres características comparten objetivos minimizantes: reducción de la intervención por parte del operador, del tamaño de las muestras, de los reactivos a utilizar, del tiempo de análisis, de los costos y de la envergadura de los procesos. Siempre manteniendo la calidad de los datos analíticos obtenidos.

Entre todas las ventajas mencionadas en capítulos anteriores respecto a los Métodos Electroquímicos de Análisis, se destacan las posibilidades de automatización y miniaturización ahora expuestas. Para lograrlo, es preciso contar no sólo con sensores (electrodos) confiables, sino también con plataformas donde utilizar dichos electrodos de manera que permitan un análisis rápido, preferentemente *on line*, empleando la menor cantidad de reactivos y ofreciendo datos confiables.

El objetivo planteado en este trabajo fue el diseño y construcción de una plataforma de análisis de inyección en flujo (FIA, por sus siglas en inglés *Flow Injection Analysis*) y un nuevo diseño de electrodos que permita realizar análisis en tiempo real.

2.- EXPERIMENTAL

2.1.- Reactivos y materiales

- Placas de acrílico de 3 mm de espesor.
- Imanes de Neodimio cilíndricos (4 x 6 mm).
- Tornillos de acero inoxidable.
- Mangueras plástica (d.i 0,90 mm; d.e 2,62 mm y pared de 0,86 mm; volumen interno 6,22 $\mu\text{L}/\text{cm}$), marca Cole Parmer modelo Tygon tubing.
- Alambre de platino y de plata.
- Agar-agar (Merk, Darmstadt, Alemania).
- Cloruro de potasio p.a. (Biopack, Argentina).
- Ferricianuro de potasio p.a. (Merk, Darmstadt, Alemania).
- Ácido nítrico p.a. (Merk, Darmstadt, Alemania).
- Tolueno p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Grafito en polvo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Barniz serigráfico industria nacional, Argentina.
- Papel de lija N° 400, 600, 800 y 1500.

2.2.- Equipamiento

- Cortadora y grabadora láser, marca Consys Laser modelo 5030.
- Bomba peristáltica de dos canales, marca Cole Palmer modelo Masterflex C/L.
- Válvula de inyección con bucle de 20 μL , marca Rheodyne modelo 7725i.
- Balanza analítica (precisión $\pm 0,1$ mg), marca Scientech modelo SA120IW.
- Potenciostato/galvanostato, marca BASi modelo Epsilon y software controlador Epsilon EC.
- Potenciómetro, marca ORION modelo 720.
- Electrodo de referencia comercial de Ag/AgCl (KCl 3 M).
- Microscopio electrónico de barrido, marca Jeol modelo 5800LV, acoplado a un digitalizador de imagen marca Gatan modelo Digiscan II.
- Metalizador, marca Denton model Vaccum Desk II.

2.3.- Diseño y fabricación de la plataforma

Una vez presentado un bosquejo con las dimensiones que debía presentar la plataforma, el mismo fue vectorizado con el programa CorelDRAW® (Fig. XI-1). El archivo generado fue exportado a la cortadora laser, obteniéndose las piezas necesarias para ensamblar la plataforma.

La plataforma consta de una base de acrílico (Fig. XI-1Aa) que tiene una cavidad rectangular en donde se alojó el electrodo de referencia (un cable plata recubierto por cloruro de plata sumergido en agar-agar 8% en KCl 3 M), y un surco lineal donde se colocó el alambre de platino que se utilizó como contraelectrodo. Además, posee dos pequeñas cavidades centrales en las que se colocaron las mangueras plásticas que se utilizaron para el ingreso y egreso de solución para el sistema FIA. Sobre esta primera placa, se colocaron otras dos: un sello o junta de goma (Fig. XI-1Ab) y otra de acrílico (Fig. XI-1Ac), quedando así constituido el cuerpo de la plataforma. Cuatro tornillos de acero inoxidable (Fig. XI-1Ad) mantenían las tres placas juntas.

En la cavidad central de la parte superior de la plataforma, se colocó el electrodo de trabajo (Fig. XI-1Ae) y a ambos lados de esta cavidad se colocaron dos imanes de neodimio (Fig. XI-1Af). El electrodo de trabajo se lo fijó mediante la una pieza (Fig. XI-1Ag) que también poseía dos imanes. Un último tornillo de acero inoxidable ofrecía de contacto eléctrico entre la pasta de carbono del electrodo de trabajo y las conexiones del potencióstato.

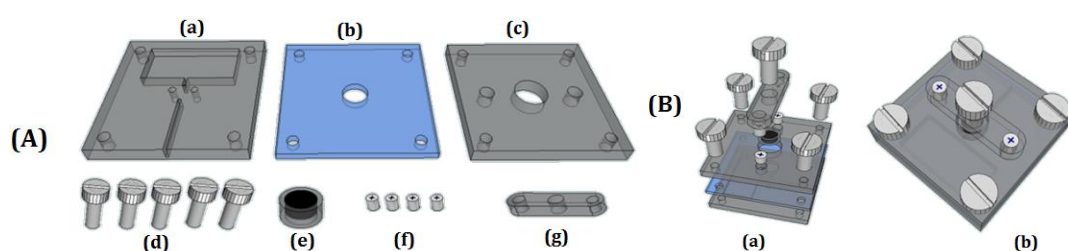


Fig. XI-1: Componentes (A, a-f) y diagrama de ensamblado de la plataforma (B), vistas lateral (Ba) y superior (Bb)

2.4.- Construcción del electrodo de trabajo

En esta plataforma se utilizó un nuevo diseño del electrodo de trabajo, el cual presenta forma de discos o pastillas. Para ello, se realizaron cortes circulares en una plancha de acrílico, de manera de obtener anillos de 10 mm de diámetro externo y 8 mm de diámetro interno. Estos anillos se dispusieron sobre una placa de vidrio y se reservaron hasta la preparación de la pasta de carbono.

La pasta utilizada consistió en la formulada anteriormente a partir de grafito Sigma-Aldrich y barniz serigráfico comercial de industria nacional. La proporción utilizada para la relación G/B fue 55:45. Para mejorar la fluidez de la pasta, a la misma se le agregó tolueno en una proporción (volumen a peso) de 15:100; es decir, 150 μL de tolueno por cada gramo de pasta. Se homogenizó vigorosamente con espátula durante 5 min y finalmente con ayuda de una micropipeta automática se añadieron 200 μL de la pasta fluida dentro de cada anillo. El secado se realizó en estufa a 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 h. A diferencia de los electrodos tubulares, que necesitaban un secado a baja temperatura para asegurar el secado completo en el interior de la pasta, en los electrodos disco o pastilla, el secado puede realizarse más rápidamente y a mayor temperatura debido a su amplia superficie y fino espesor.

Finalmente, la superficie del electrodo fue pulida con papel de lija N $^{\circ}$ 600 primero y luego con N $^{\circ}$ 1500 hasta tener una superficie lisa y brillante.

2.5.- Microscopía electrónica de barrido (MEB) del electrodo de trabajo

Se utilizó un lote de electrodos, contruidos de acuerdo al ítem anterior, para evaluar la efectividad del tratamiento de pulido. Para ello, a dos grupos de electrodos (con y sin pulido) se les retiró el soporte circular de acrílico, se los depositó sobre una placa de aluminio y se los sometió a un proceso de recubrimiento con oro metálico.

La placa con los electrodos ya metalizados se colocó en el portamuestras del microscopio electrónico y se tomaron imágenes de la superficie a una resolución de 1000x. La aceleración del haz (potencia) fue de 15 kV.

2.6.- Ensamblado del electrodo de referencia

Previo al ensamblado final de la plataforma se preparó el electrodo de referencia interno de Ag/AgCl. Para ello, se procedió a pulir el cable de plata con papel de lija N $^{\circ}$

1500 y enjuagar en solución de ácido nítrico diluido. Con el cable limpio, se realizaron dos tratamientos mediante Electrólisis a Potencial Controlado en solución de KCl 0,5 M. En el Potenciostato se conectó como electrodo de referencia al electrodo comercial de Ag/AgCl, un cable de platino como electrodo auxiliar y al cable de plata en el correspondiente al electrodo de trabajo. Se aplicó la siguiente secuencia dos veces:

1.- $E_1 = +1500$ mV durante 30 s

2.- $E_2 = -1500$ mV durante 30 s

3.- $E_3 = +1500$ mV durante 30 s

Por otro lado, en tubo de ensayo, se preparó una solución de agar-agar al 8 % p/v disuelto en KCl 3 M. Se llevó a baño María hasta la disolución completa del agar y luego se reservó en agua tibia hasta su uso.

En el depósito que presenta la plataforma de acrílico se colocó el electrodo de plata recubierto con cloruro de plata, y se cargó con la solución de agar-agar al 8% en KCl 3 M, cuidando que el electrodo de plata permanezca sumergido en la solución. Se dejó reposar la plataforma en posición horizontal hasta que se enfrió el agar, luego se colocó el cable de platino en la ranura destinada al electrodo auxiliar y por último se completó el ensamblado de la plataforma.

Finalmente, para comprobar el correcto funcionamiento del electrodo de referencia construido, se midió la diferencia de potencial generada frente a un electrodo comercial de Ag/AgCl (KCl 3 M). Para ello se llenó con solución de KCl 0,1 M el compartimiento correspondiente al electrodo de trabajo y se sumergió el puente del electrodo de referencia comercial. Con el potenciómetro, conectando el electrodo de referencia de la plataforma como electrodo de trabajo y enfrentado al comercial, la diferencia de potencial debe ser cercana a cero (0).

2.7.- Utilización de la plataforma para un sistema FIA

La plataforma fue acondicionada para su uso, como detector electroquímico, en análisis en flujo. Para ello, se conectaron dos mangueras en la parte inferior de la plataforma: una para el ingreso de solución fresca y otra para su egreso.

Se utilizó un sistema de inyección Rhodyne para la carga de muestras. A su vez, el sistema inyector estaba conectado a un recipiente conteniendo la muestra, y a un segundo recipiente que contenía la solución portadora o *carrier*. Un tercer recipiente, adosado al detector, recogía el descarte al final del recorrido (Fig. XI-2).

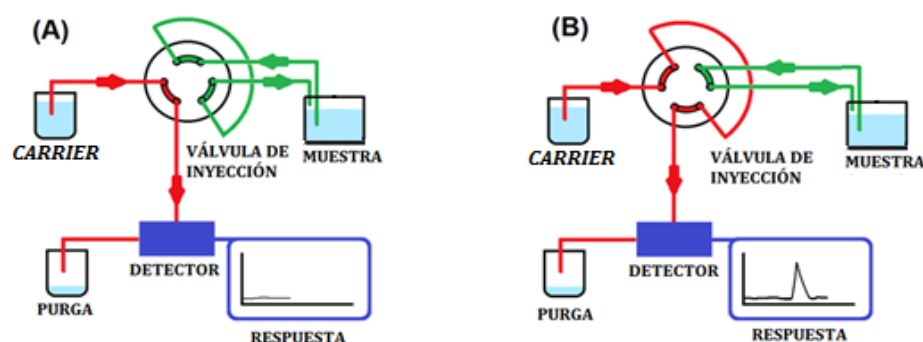


Fig. XI-2: Esquema de la configuración del sistema de análisis en flujo con la plataforma electroquímica desarrollada.

Las mangueras que iban de la muestra al inyector y del recipiente del *carrier* al inyector pasaban por la bomba peristáltica de dos canales. Por simplicidad, la bomba no está representada en la Fig. XI-2.

2.8.- Ensayos para la respuesta del electrodo

Para chequear la respuesta del electrodo se realizaron voltametrías cíclicas con ferricianuro de potasio 2 mM en KCl 0,1 M.

La carga de la solución de trabajo se realizó encendiendo la bomba peristáltica y sumergiendo la manguera en el recipiente de la muestra donde se había añadido previamente la solución de ferricianuro de potasio, manteniendo el inyector en la posición de “inyección”. Una vez que se llenó el espacio de la plataforma destinado a la muestra, se cortó la circulación del flujo apagando la bomba. En ese momento se realizaron las medidas voltamétricas. Luego se purgó el sistema, girando el inyector a la posición de carga, encendiendo la bomba y dejando correr abundante agua destilada.

Con los voltamperogramas cíclicos obtenidos se calculó la relación de intensidades de corriente para los picos de oxidación y reducción y la diferencia de potencial entre ellos. Además, el potencial formal correspondiente se obtuvo mediante la expresión:

$$E_{\text{formal}} = (E_{p1} + E_{p2})/2$$

Ec. XI-1

donde, E_{p1} y E_{p2} son los potenciales (contra electrodo de referencia) de los picos de oxidación y reducción, respectivamente.

2.9.- Evaluación del flujo en el sistema FIA

La bomba peristáltica, al permitir el uso de distintos tipos de mangueras de diferentes diámetros para análisis en flujo, no posee una escala en su regulador de velocidad, por lo que el flujo debe ser determinado empíricamente.

Para determinar la magnitud de los flujos a los que trabajaba la bomba, se realizaron ensayos que consistieron en medir el volumen de *carrier* consumido, en un tiempo dado, para distintas posiciones de la perilla que regula la velocidad. Se eligieron 3 posiciones: inicial (la mínima), final (la máxima) e intermedia. Fijada una posición, y con el sistema purgado y sin burbujas, se prendía la bomba durante 10 s (20 s en la posición más lenta), y luego se medía el volumen de *carrier* remanente. El cociente del volumen consumido durante el tiempo transcurrido, da la velocidad de flujo a la que funcionó el sistema. Cada posición fue evaluada por triplicado.

Por otro lado, se calculó el volumen total (V_T) del sistema (el volumen correspondiente al recorrido desde la toma de muestra hasta el detector) y el tiempo muerto (t_M) -el tiempo correspondiente desde que se inyecta muestra hasta que llega al detector. Para V_T , se midió el tiempo que demoraba una pequeña burbuja de aire en recorrer el sistema hasta el detector a un flujo determinado, mientras que para t_M se midió el tiempo desde la inyección hasta el pico de señal.

3.- RESULTADOS

3.1.- Electrodo de referencia de la plataforma FIA

Luego de preparar el electrodo de referencia de la plataforma, según el procedimiento detallado anteriormente, se midió, por triplicado, la diferencia de potencial frente a un electrodo comercial de Ag/AgCl (KCl 3 M). Como medio se utilizó una solución de KCl 0,1 M. Entre mediciones se retiraba el electrodo comercial, se enjuagaba con

abundante agua destilada, se renovaba la solución de KCl 0,1 M y se realizaba una nueva lectura.

Las mediciones obtenidas se detallan en la Tabla XI-1:

Medición	ddp, [mV]	X_{media} , [mV]	S, [mV]
1	-4,00		
2	-3,80	-3,80	0,15
3	-3,70		

Tabla XI-1: Evaluación de la diferencia de potencial del electrodo de referencia de la plataforma FIA, respecto a uno comercial de Ag/AgCl.

La diferencia de potencial encontrada entre los electrodos de referencia resultó ser de -3,8 mV. Esto representa una variabilidad menor al 2% en relación al potencial formal para el electrodo comercial (Ag/AgCl, KCL 3 M), por lo tanto consideramos que no condiciona significativamente las futuras lecturas.

3.2.- Electrodo de trabajo de la plataforma FIA

En la Fig. XX se observan los lotes de electrodos de trabajo obtenidos, de acuerdo a lo descrito anteriormente.

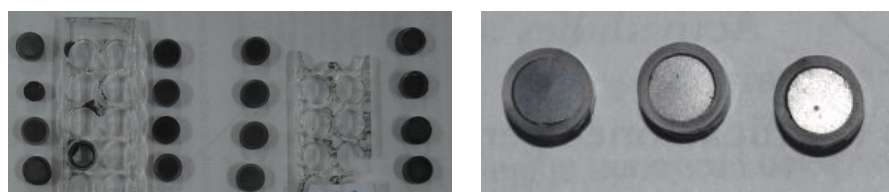


Fig. XI-3: A la izquierda, imágenes de los lotes de electrodos de disco fabricados con la pasta de carbono desarrollada. A la derecha, imagen ampliada de los electrodos.

Para evaluar el comportamiento de los electrodos desarrollados para la plataforma FIA se realizaron VC con soluciones de ferricianuro de potasio 2 mM en KCl 0,1 M.

Los parámetros experimentales para las VC fueron:

- $E_{inicial} = -600$ mV
- $E_{cambio} = 600$ mV
- $E_{final} = -600$ mV
- Velocidad de barrido = 50 mV/s

La relación de intensidades (i_1/i_2) entre las corrientes catódica y anódica, para el electrodo de trabajo utilizado en el VC representado en la Fig XI-4, resultó ser de 1,016 y

la diferencia de potencial entre ambos (ΔE_p) fue de 296,6 mV. El potencial formal de la cupla fue 148,3 mV.

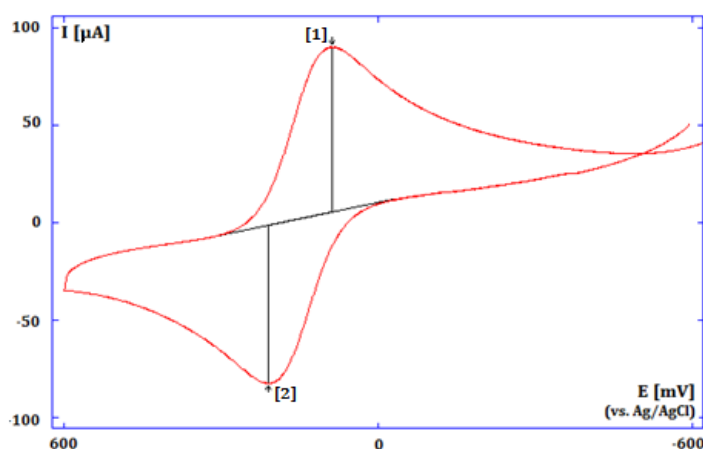


Fig. XI-4: Voltamperograma cíclico típico obtenido para un electrodo de trabajo.

Para [1], se obtuvo una corriente de 99,2 μA y potencial de +87,6 mV (contra Ag/AgCl).

Para [2], se obtuvo una corriente de -97,6 μA y potencial de +209,0 mV (contra Ag/AgCl).

Si bien el ΔE_p calculado difiere del valor teórico de 59 mV (correspondiente a cuplas reversibles en las que interviene un electrón transferido, $n = 1$), las corrientes correspondientes a los picos de oxidación y reducción poseen una intensidad considerable y su relación (i_1/i_2) es muy cercana a la unidad. Además, el voltamperograma presenta buena morfología. Teniendo en cuenta los valores de estas magnitudes en su conjunto, se infiere que los electrodos desarrollados presentan una buena transferencia electrónica.

3.3.- Visualización de la superficie de los electrodos mediante MEB

Se realizó una MEB a la superficie de la pasta de carbono de los electrodos desarrollados. Las imágenes obtenidas se muestran a continuación:



Fig. XI-5: Electrodos recubiertos con oro, sobre una placa de aluminio. La superficie superior, recubierta en oro, es la que se observó por MEB.

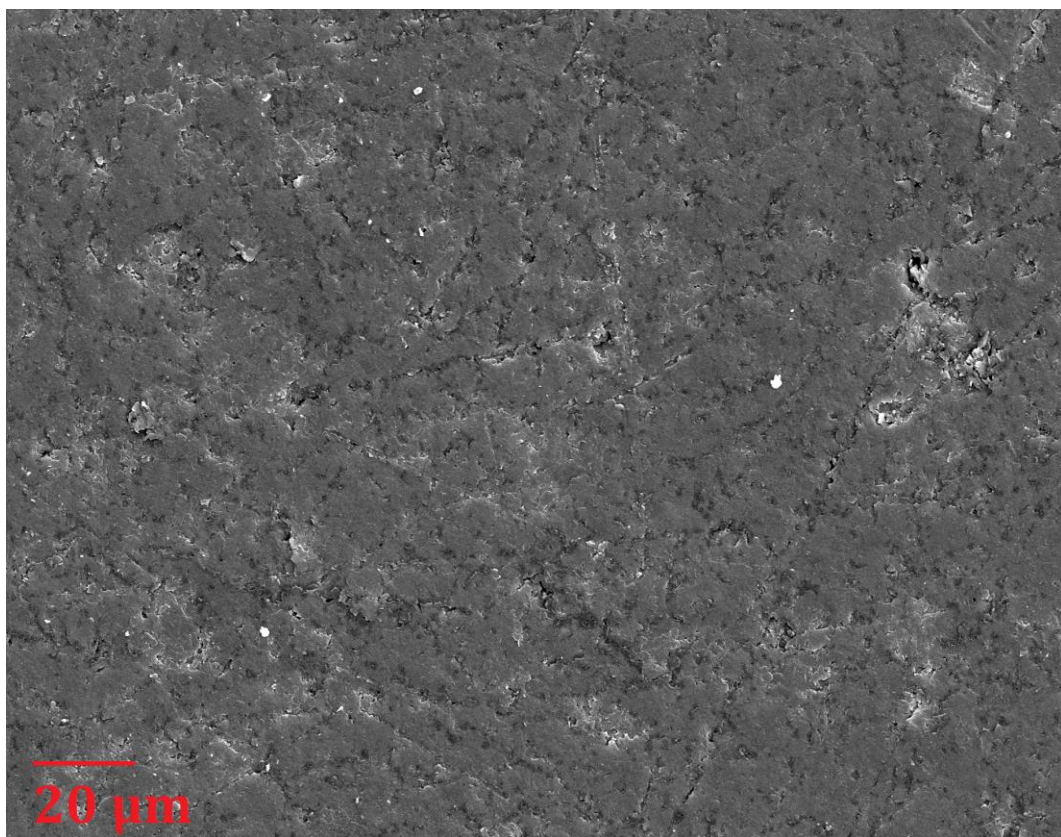


Fig. XI-6: Imagen de la superficie de un electrodo de pasta de carbono con tratamiento de pulido. Resolución 1000x.

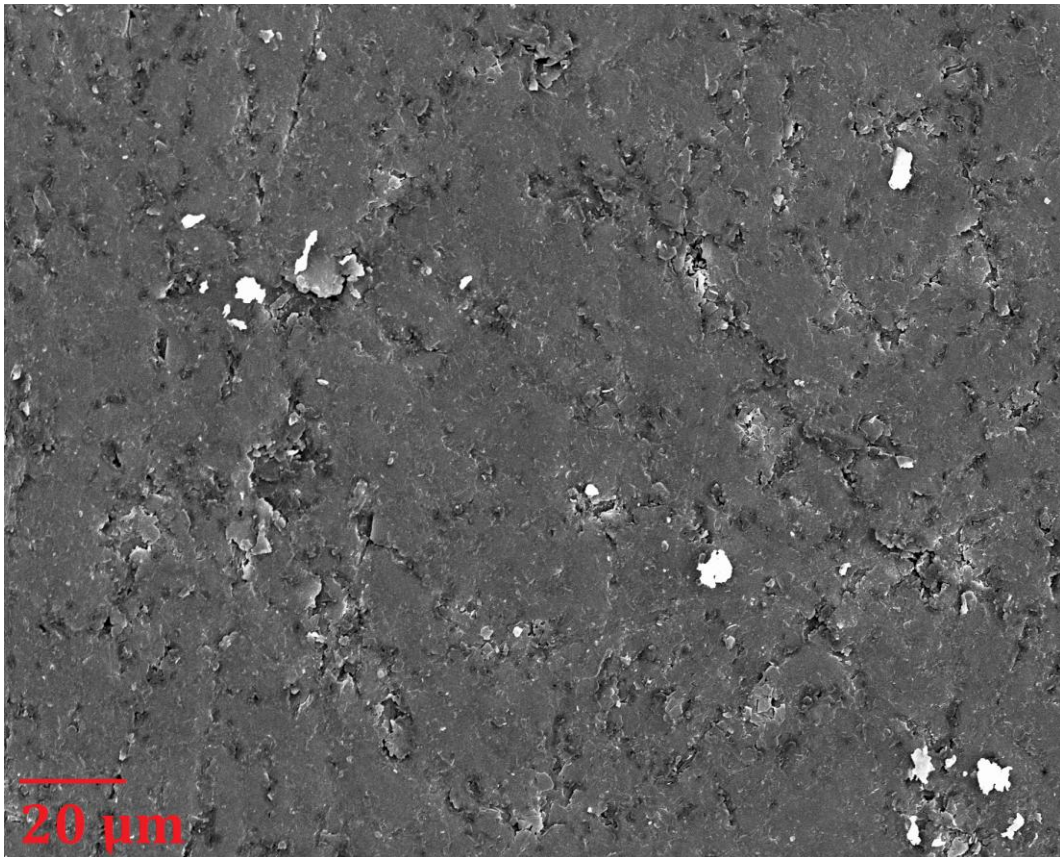


Fig. XI-7: Imagen de la superficie de un electrodo de pasta de carbono sin tratamiento de pulido. Resolución 1000x.

De acuerdo a lo observado en las imágenes obtenidas por MEB de los electrodos con y sin tratamientos de pulido (Fig. XI-6 y XI-7, respectivamente), se puede inferir que el pulido contribuye a lograr una superficie electródica mas lisa y uniforme, remueve las imperfecciones como grietas o superficies superpuestas, o “escamas de pasta” que pudieran haber quedado luego del curado.

Por otro lado, en los ensayos preliminares de caracterización de las superficies mediante VC, con soluciones de ferricianuro de potasio 2 mM en KCl 0,1 M, se observaron mejores comportamientos electroquímicos en aquellos electrodos con tratamiento de pulido que en los lotes sin pulir.

3.4.- Velocidad de flujo y tiempo muerto del sistema FIA

La velocidad de flujo de la bomba peristáltica fue evaluada para 3 posiciones de la perilla que la regula. Los resultados se resumen en la Tabla XI-2:

Posición	Volumen, [mL]			Tiempo, [min]	Flujo	
	Inicial	Final	Consumido		[mL/min]	[μ L/s]
Inicial	50	28	22	10	2,20	36,7
Intermedia	50	35	15	10	1,50	25,0
Final	50	33	17	20	0,85	14,2

Tabla XI-2: Evaluación de las velocidades de flujo para 3 posiciones del regulador de velocidad.

Para evaluar el volumen total del sistema FIA, se realizaron 5 ensayos a velocidad intermedia (1,5 mL/min o 25 μ L/s). Con el sistema purgado con agua destilada, se midió el tiempo que demoraba una burbuja en recorrer el sistema hasta el detector. Los resultados se muestran en la Tabla XI-3:

Ensayo	Tiempo, [s]	Volumen, [μ L]
1	20,5	512,5
2	21,0	525,0
3	20,6	515,0
4	20,5	512,5
5	20,7	517,5
X_{media}	20,7	516,5
S	0,2	5,2
CV%	1,00	1,00

Tabla XI-3: Ensayo para la evaluación del volumen total (V_T) del sistema FIA.

La plataforma presenta un V_T de 516,5 μ L (CV% = 1,00 para 5 determinaciones).

El tiempo muerto (t_M), se determinó en una corrida amperométrica utilizando carrier de KCl 0,1 M y realizando sucesivas inyecciones de solución de ferricianuro de potasio 2 mM en KCl 0,1 M. El flujo se mantuvo en 1,5 mL/min. Con un cronometro se midió el tiempo transcurrido desde que se accionaba el inyector para ingresar la muestra hasta el registro del pico de respuesta (Fig. XI-8). Los resultados se muestran en la Tabla XI-4.

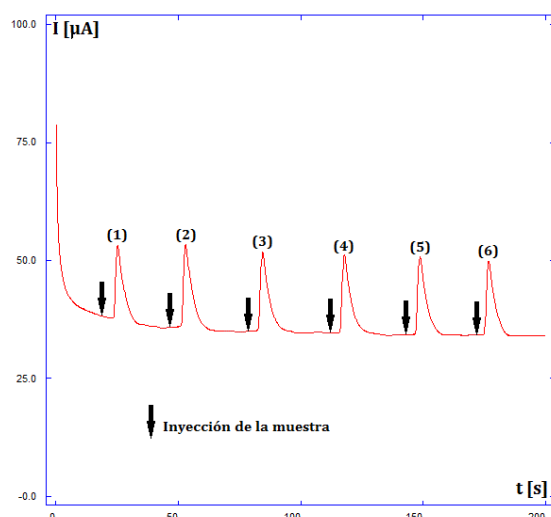


Fig. XI-8: Amperograma del ensayo para la determinación del tiempo muerto, t_M .

Medición	Tiempo, [s]	Volumen, [μ L]
1	4,72	118,00
2	4,81	120,25
3	5,09	127,25
4	4,83	120,75
5	5,01	125,25
6	4,96	124,0
X_{media}	4,90	122,58
S	0,14	3,48
CV%	2,84	2,84

Tabla XI-4: Ensayo para la evaluación del tiempo muerto (t_M) del sistema FIA.

El tiempo muerto (t_M) de la plataforma es de 4,90 s, equivalente a un volumen de 122,58 μ L.

4.- CONCLUSIONES

Se logró el desarrollo de una plataforma FIA adecuada a determinaciones en microescala, mediante técnicas electroquímicas. Para ello, se diseñaron electrodos de trabajo de pasta de carbono y electrodos de referencia adecuados a la metodología de inyección en flujo. Se calcularon los parámetros operativos de volumen muerto y velocidad de flujo.

5.- REFERENCIAS

[1] Valcárcel, M.; Cárdenas, M.S. *Automatización y Miniaturización en Química Analítica*. Cap. I: Tendencias de la Química Analítica, pag. 11. Editorial Springer. Barcelona (España), 2000.

CAPÍTULO XII

DETERMINACIÓN DE METRONIDAZOL MEDIANTE ANÁLISIS EN FLUJO CON DETECCIÓN AMPEROMÉTRICA

1.- INTRODUCCIÓN

El Metronidazol (MNZ, Fig. XII-1) -según IUPAC 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etanol- es una droga perteneciente a la familia de los nitroimidazoles. Es considerado antibiótico y antiparasitario, ya que se lo utiliza comúnmente para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias, amebas y protozoarios anaeróbicos [1], como *Entamoeba histolytica* [2], *Giardia lamblia* [3] y *Trichomonas vaginalis* [4]. Además de ser utilizado en humanos, el MNZ es incorporado como aditivo en alimentos para eliminar parásitos en peces y aves de corral [1].

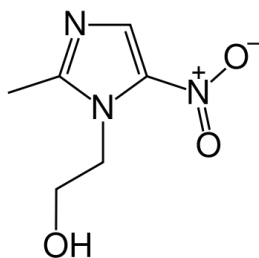


Fig. XII-1: Estructura química del metronidazol ($C_6H_9N_3O_3$, PM 171,15).

El MNZ es un profármaco, cuya forma activa se produce cuando es absorbido y modificado por microorganismos anaeróbicos. El grupo nitro ($-NO_2$) es reducido químicamente por la ferredoxina y los productos de la reacción son los responsables de desestabilizar la estructura del ADN, inhibiendo así la síntesis de ácidos nucleicos. Los microorganismos sensibles al MNZ son bacterias anaeróbicas y protozoos con la habilidad de reducirlo intracelularmente, a diferencia de las células humanas y organismos aeróbicos que son indiferentes a dicho fármaco [5].

Se han reportado diferentes técnicas para la determinación de MNZ. Estas incluyen métodos espectrofotométricos UV-visible [6-9], fluorimétricos [10] e infrarrojo [11]; cromatográficos [12-15] y electroquímicos [16-23]. Las farmacopeas vigentes [24-26] proponen CLAE-UV para la cuantificación de MNZ en comprimidos y espectrofotometría UV para el ensayo de disolución. Éstas técnicas necesitan equipamiento costoso, largos tiempos de análisis, y altas diluciones que incrementan las probabilidades de error en los resultados. Es por ello que, aprovechando la presencia de un grupo electroquímicamente activo factible de ser reducido, en la molécula de MNZ, se propone un método amperométrico para su cuantificación. El desarrollo de un sistema continuo, de inyección en flujo permite que sea utilizado tanto para el dosaje de MNZ en formulaciones farmacéuticas, como para el monitoreo del perfil de disolución de comprimidos. Este último parámetro permite visualizar *in vitro*, el comportamiento en cuanto a la solubilidad, del principio activo, MNZ, *in vivo*.

2.- EXPERIMENTAL

2.1.- Reactivos y muestras

- Metronidazol, principio activo: Lote: 20120657; origen China ; pureza >99,7
- Comprimidos de Metronidazol 500 mg, elaborados por PLAMECOR.
- Excipientes: celulosa microcristalina, almidón glicolato de sodio, polivinilpirrolidona, estearato de magnesio, talco (provistos por PLAMECOR).
- Ácido clorhídrico, 38%, p.a. (Cicarelli, Argentina).
- Agua, grado HPLC (Biopack, Argentina).
- Metanol, grado HPLC (Biopack, Argentina).

2.2.- Equipamiento

- Potenciostato/galvanostato BASi modelo Epsilon y software controlador Epsilon EC.
- Bomba peristáltica de dos canales Cole Palmer modelo Masterflex C/N.
- Sistema inyector Rheodyne 7756i.

- Disolutor Varian Vk-7000.
- Espectrofotometro UV-Visible Boeco S-26, rango 190-900 nm.
- CLAE Agilent 1100 Series detector UV variable y software controlador EZ Chrome Elite.
- Balanza analítica (precisión $\pm 0,1$ mg), marca Scientech Modelo SA120IW.

2.3.- Comportamiento electroquímico del MNZ

Para evaluar el comportamiento electroquímico del MNZ se ensayan dos medios de disolución, y dos tipos de electrodos: el tradicional electrodo de carbón vítreo (ECV) comercial y un electrodo con la pasta de carbono (EPC) desarrollado, en formato pastilla. Los medios elegidos fueron buffer fosfato 50 mM pH 2 en KCl 0,1 M por un lado, y el medio correspondiente a los ensayos de disolución, HCl 0,1 M. Este último actuó como electrolito soporte, otorgando, además, el medio fuertemente ácido necesario para el proceso de reducción.

Se ensayaron dos dispositivos experimentales:

- Un sistema de tres electrodos, constituido por un electrodo de referencia comercial de Ag/AgCl (solución de KCl 3 M), un electrodo indicador de platino (Pt) y el ECV.
- Una celda de flujo que cuenta con la pastilla EPC, un electrodo de referencia de Ag/AgCl (solución KCl 3 M en agar 8 % p/v), y el electrodo indicador de platino (Fig. XII-2).

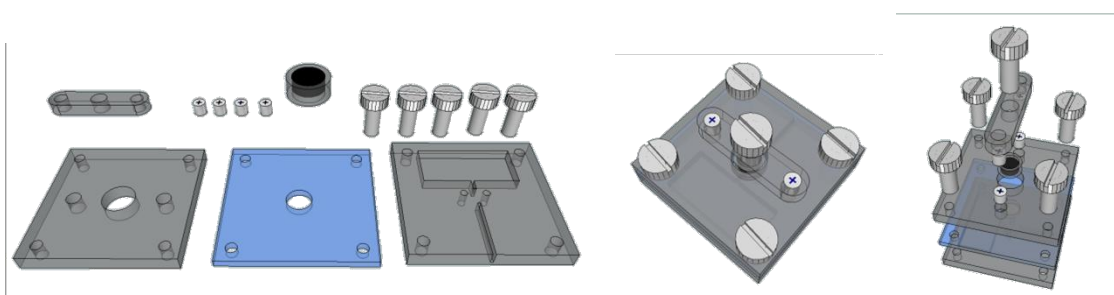


Fig. XII-2: Componentes y diagrama de ensamblado de la celda de flujo para la determinación amperométrica de MNZ.

Para los ensayos se utilizaron soluciones 2,5 mM en MNZ, disuelto en los dos medios seleccionados. En la voltametría cíclica se trabajó con los siguientes valores de potencial aplicado: $0,0 \text{ V} \rightarrow -0,3 \text{ V} \rightarrow +0,6 \text{ V} \rightarrow 0,0 \text{ V}$; y velocidad de barrido 100 mV/s .

El procedimiento en la celda de flujo consistió en ingresar al detector continuamente la solución de MNZ 2,5 mM con el medio deseado hasta que se llena el compartimiento donde se encuentran los electrodos. En dicho momento se detiene el flujo para que la solución de MNZ permanezca en reposo y a continuación se realiza la VC.

2.4.- Descripción del sistema FIA para los ensayos con MNZ

El sistema FIA de monitoreo de la disolución de MNZ se ensambla de acuerdo al esquema de la Fig. XII-3. Un tubo de goma une el vaso que contiene la solución portadora o *carrier*, HCL 0,1 M, con una de las entradas del sistema de inyección. Otro tubo flexible conecta el contenido de la vasija del disolutor, desde una profundidad acorde a lo establecido en las Farmacopeas [24-26] para la toma de muestra, con el inyector. Dos tubos flexibles emergen del sistema de inyección, pasando por la bomba peristáltica y finalizando su recorrido, uno en la vasija del disolutor y otro en la plataforma de detección.

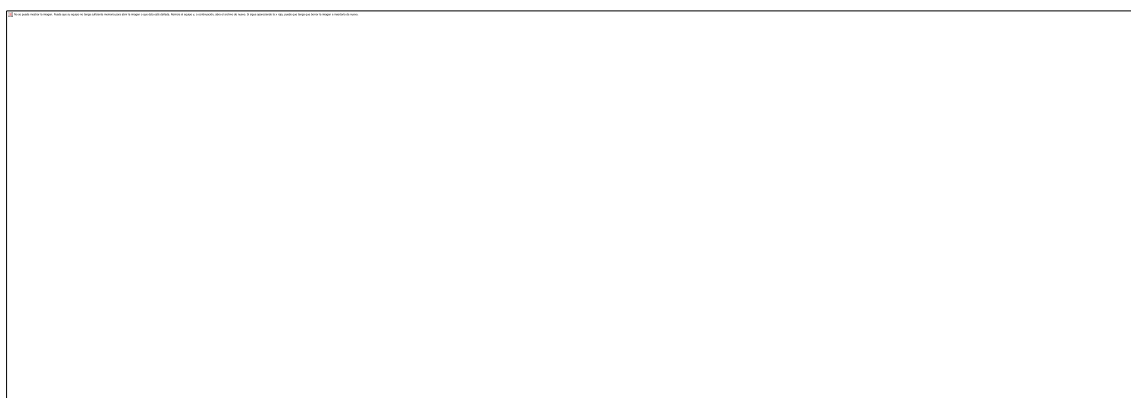


Fig. XII-3: Descripción del sistema FIA utilizado. Se muestran los recorridos de las soluciones *carrier* (rojo) y muestras (verde) para las posiciones de carga (A) e inyección (B). La muestra se introduce en la vasija del disolutor para los ensayos de disolución y monitoreo del perfil de disolución, y dentro de un vaso con agitador magnético para los ensayos de cuantificación en comprimidos.

Se coloca el sistema en posición de carga (Fig. XII-3A), se enciende la bomba peristáltica a una velocidad de 1,5 mL/min y se configura el sistema detector a potencial aplicado (E_{apl}) de -300 mV. En esta posición, la solución *carrier* pasa por el inyector y luego por el detector, registrándose sólo la línea de base, para finalizar en la purga. Al mismo tiempo, la solución de muestra recorre un circuito cerrado, pasando por el inyector, luego por el bucle o *loop* de muestra, regresando a la vasija.

A un tiempo dado, se acciona el sistema de inyección y se pasa de la posición de carga a la de análisis (Fig. XII-3B). En esta configuración, la solución de muestra sigue recorriendo el mismo circuito cerrado; solo que no pasa por el bucle. A su vez el *carrier* ingresa al inyector y pasa por el bucle arrastrando la pequeña alícuota de muestra (20 μ L) hasta el detector, para finalizar en la purga.

2.5.- Muestras

2.5.1.- Cuantificación de MNZ en comprimidos

A partir de una mezcla homogénea de 15 comprimidos previamente pulverizados, se pesa una masa adecuada y se disuelve en HCl 0,1 M a fin de obtener una solución que sea aproximadamente 4 mM respecto al principio activo MNZ. Para ello se considera el contenido teórico de MNZ por comprimido y el peso promedio de un comprimido. Además, se prepara una solución stock de MNZ 90 mM en HCl 0,1 M y se acondiciona el sistema FIA ya descrito.

Se colocan 100 mL de HCl 0,1 M en el vaso de la solución *carrier* y 25 mL de la misma solución se cargan en el vaso para la muestra. Se enciende el sistema y se registra la corriente cuando el potencial aplicado es de -300 mV (contra electrodo de Ag/AgCl, KCl 3 M). A un tiempo dado, se acciona el sistema inyector para leer el blanco. Se vuelve a la posición de carga, y en la vasija de muestra se agregan 250 μ L de la solución de MNZ 90 mM en HCl 0,1 M y se agita durante 30 s. Se acciona el sistema inyector y se registra la respuesta. Este procedimiento se repitió 6 veces.

Una vez registrada la respuesta de los estándares, se purga el sistema de muestra con agua destilada y se sumerge el tubo flexible en el vaso de muestra, que contiene la solución preparada a partir del pool de comprimidos. Se repite el procedimiento, para obtener seis (6) lecturas de la muestra.

Para calcular la recta que mejor ajusta a los datos obtenidos mediante regresión por mínimos cuadrados, se tuvo en cuenta de la variación de volumen en el recipiente de muestra donde se realiza el agregado de solución stock. Para ello se utilizó una planilla de cálculo.

2.5.2.- Seguimiento del perfil de disolución de comprimidos de MNZ

Se pone a punto el sistema FIA tal como se describió anteriormente. El tubo flexible correspondiente al circuito de muestra se introduce en la vasija del disolutor, el otro tubo se sumerge en el recipiente que contiene el *carrier*, 100 mL de HCl 0,1 M.

Se carga la vasija del disolutor con 900 mL de HCl 0,1 N, tal como lo especifican las farmacopeas [24-26], se introduce un comprimido en el agitador tipo canasta (Aparato 2) y se activa la agitación a 100 rpm. A tiempo cero se sumerge la canasta y comienza a monitorearse el perfil de disolución del comprimido.

Cada 3 min se acciona el inyector y se registra la señal obtenida. Pasados los 60 min se retira el tubo flexible de la vasija del disolutor, se purga con agua destilada y se lo coloca en un recipiente que contiene una solución testigo de MNZ 3 mM en HCl 0,1 M. Se registraron dos lecturas de esta solución, y en base al valor obtenido se calculan los porcentajes de disolución alcanzados, en función del tiempo.

Para el seguimiento mediante la metodología oficial, se introduce el comprimido en la canasta y se activa la agitación a 100 rpm. Se sumerge la canasta y se toman alícuotas de muestra de 1 mL cada 3 min, reponiendo el volumen tomado con solución fresca de HCl 0,1 M. Se diluyen las alícuotas extraídas con agua destilada (1:25) y se centrifuga a 2000 rpm por 5 min. Una porción del sobrenadante se transfiere a una cubeta de cuarzo y se realiza la lectura espectrofotométrica a 278 nm. Como referencia del 100% de disolución se utiliza una alícuota de 1 mL de solución de MNZ 0,56 mg/mL en HCL 0,1 M, al que se la somete a la misma dilución y centrifugación previo a su lectura. La tolerancia establecida para el comprimido establece que no menos del 85% deberá disolverse en al menos 60 min.

2.6.- Procedimiento Cromatográfico (Método oficial)

Para la fase móvil, se preparó una mezcla de metanol-agua (20:80). El estándar consistió en una solución de MNZ 0,5 mg/mL disuelto en fase móvil. Se llevó a baño maría durante 15 min, se retiró, enfrió trasvasó a matraz de 100 mL, enrasó con metanol y homogenizó. Una alícuota de 5 mL de esta solución se transfirió a matraz de 25 mL y se llevó a volumen final con fase móvil.

La muestra se preparó a partir de la mezcla homogénea obtenida al pulverizar 20 comprimidos de MNZ. Se pesó una masa apropiada y se disolvió en metanol hasta obtener una solución de concentración teórica 10 mg/mL de MNZ.

Esta solución fue agitada vigorosamente y luego se tomaron 5 mL del sobrenadante y se llevaron a un matraz de 100 mL. Se llevó a volumen final con fase móvil.

Para el ensayo se utilizó una columna RP-18C de 125 × 4,5 mm, flujo de fase móvil de 1,0 mL/min y detección a 254 nm. Se registró la señal correspondiente al pico de MNZ, en las soluciones de estándar y muestra. Se determinaron las áreas de pico, con las que luego se determinaron las concentraciones en las muestras inyectadas.

3.- RESULTADOS

3.1.- Puesta a punto del sistema FIA

El recorrido de la alícuota de muestra desde la vasija al bucle de inyección es mínimo, demorando unos 20 s según el cálculo del volumen muerto del sistema FIA. Para los ensayos de disolución y el seguimiento de sus perfiles, el volumen de muestra utilizado (20 µL) es despreciable frente al volumen total de 900 mL, por lo que no se necesitaría realizar reposición de volumen. Además, ofrece la ventaja adicional que la lectura se realiza *in situ*, sin ningún tipo de pretratamiento, acortando considerablemente el tiempo de análisis.

Se ensayaron las tres velocidades de flujo (0,85; 1,50 y 2,20 mL/min) calculadas empíricamente en el Capítulo anterior. Se seleccionó una velocidad de flujo de 1,50 mL/min (equivalentes a 25 µL/s) para los ensayos. Se encontró que la respuesta obtenida a menor velocidad presentaba ancho de base muy grande, demorando su salida del compartimiento del detector; mientras que a mayor velocidad, la respuesta no mostraba buena repetibilidad por su corto tiempo en el detector.

3.2.- Mecanismo de reducción

El MNZ presenta un grupo nitro ($-\text{NO}_2$) electroquímicamente activo. Estudios anteriores [22, 23, 27-30] sugieren que el mecanismo de reducción es complejo y

fuertemente dependiente de la naturaleza del medio en el que se encuentra disuelto. Entre las técnicas más utilizadas para estudiar este comportamiento se encuentra la voltametría cíclica. De hecho, en medio acuoso y en ausencia de inhibidores, aparece un solo pico irreversible de reducción, que correspondería a la formación de un derivado hidroxilamina del MNZ, con intervención de cuatro protones y cuatro electrones:

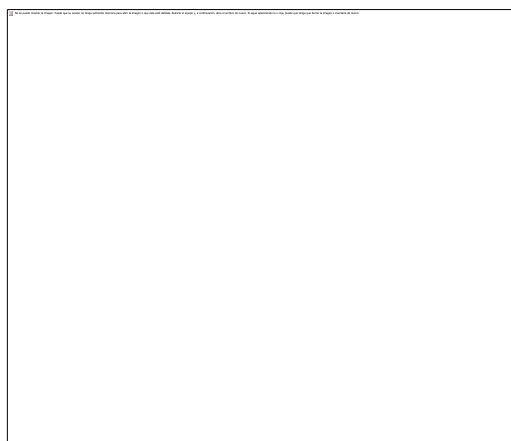


Fig. XII-4: Voltametría cíclica de MNZ en distintos medios, con distintos electrodos:
 (a) EPC pastilla y HCl 0,1 N; (b) EPC pastilla y buffer fosfato pH 2 en KCl 0,1 M;
 (c) ECV y HCl 0,1 N; y (d) ECV y buffer fosfato pH 2 en KCl 0,1 M.

3.3.- Especificidad del método

Para evaluar la especificidad del método se ensayaron tres soluciones: a) la solución *carrier*, HCl 0,1 M; b) solución de excipientes en HCl 0,1 M; y c) solución de muestra, preparada a partir de la mezcla homogénea de comprimidos, en HCl 0,1 M (Fig. XII-5). Para cada solución, se realizó un seguimiento durante 250 min, inyectando solución a intervalos regulares de tiempo y registrando la respuesta en el detector.

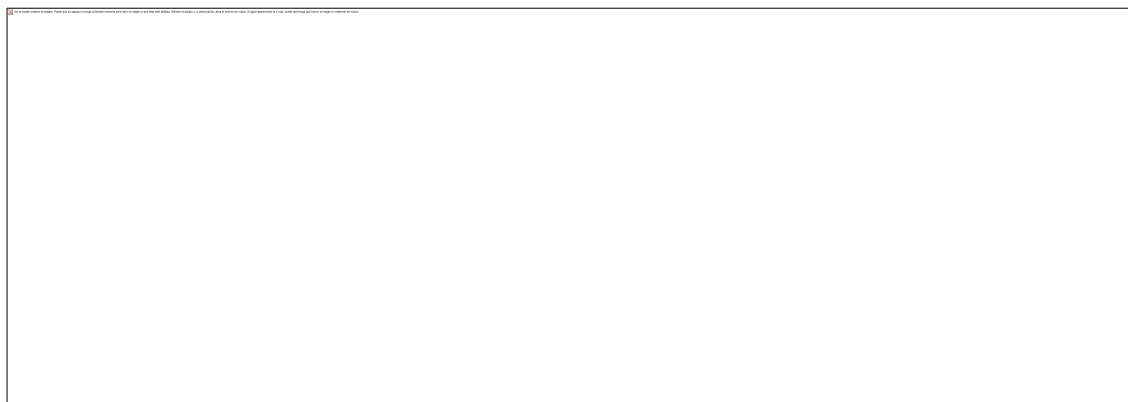


Fig. XII-5: Ensayo de especificidad del método propuesto.

Las respuestas correspondientes a las soluciones *carrier* y de excipientes no presentaron ningún pico de respuesta, y se mantuvieron muy cercanas, constituyendo una línea de base. En cambio, la solución de muestra presentó picos regulares, muy similares entre ellos, a los tiempos correspondientes a las inyecciones de muestra.

3.4.- Linealidad

Para evaluar la linealidad del método propuesto, se construyeron cinco curvas de calibrado con patrones de MNZ. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de regresión lineal. En la Fig. XII-6 se observa la respuesta obtenida en una calibración típica y su posterior análisis de regresión (Tabla XII-1).

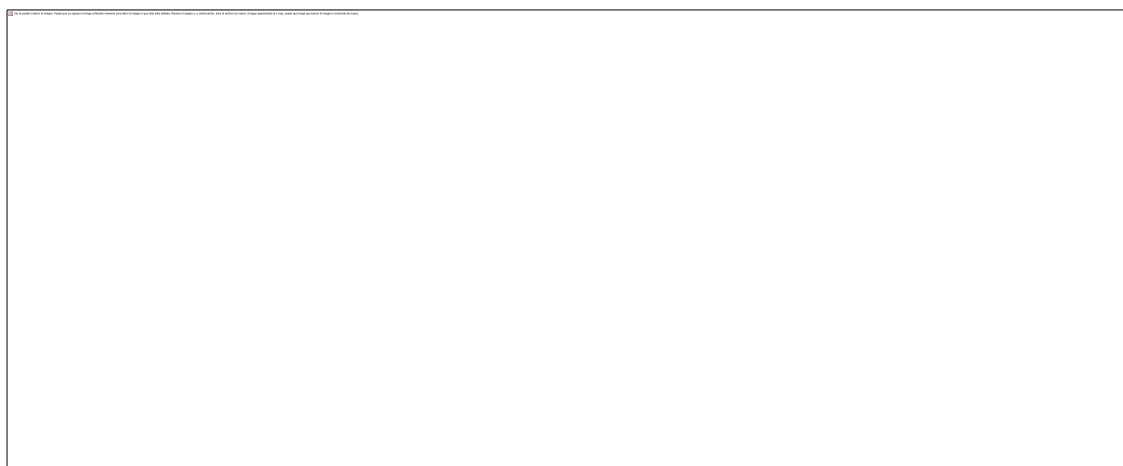


Fig. XII-6: Respuesta obtenida a partir de los estándares para la construcción de la curva de calibrado y respuesta de las alícuotas de muestra por sextuplicado. Inserto, curva de calibrado obtenida por regresión de mínimos cuadrados. La bondad del ajuste (R^2) fue de 0,9995.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN	
Coefficiente de Correlación, R^2	0,9995
Ordenada al origen	0,019 $\pm$ 0,465
Pendiente	5,6498 $\pm$ 0,1501

Tabla XII-1: Análisis de varianza de la regresión lineal para la curva de calibrado. Nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).

La recta de calibrado responde a la ecuación $i = 0,019 + 5,6498 C$. La bondad del ajuste lineal (R^2) es 0,9995. De acuerdo al análisis de varianza de la regresión lineal, para un nivel de confianza del 95 %, la ordenada al origen incluye al punto (0; 0).

El método resultó lineal en el rango de concentraciones estudiado. No fue necesario explorar un rango de respuesta mayor ya que su fin es el control de calidad del ingrediente activo.

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) calculados a partir de las ecuaciones Ec. VI-1 y Ec. VI-2 son 0,025 mM y 0,82 mM, respectivamente.

3.5.- Repetibilidad

Se analizaron 12 alícuotas preparadas a partir de un pool de comprimidos pertenecientes a un mismo lote. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XII-2.

#	M_{recup} [mg/comp]	X [mg/comp]	S [mg]	CV%
1	502,33	500,28	2,33	0,467
2	497,58			
3	503,11			
4	498,66			
5	498,76			
6	501,23			
7	500,89			
8	496,23			
9	501,65			
10	500,93			
11	498,28			
12	503,67			

Tabla XII-2: Ensayo de repetibilidad del método propuesto. X: contenido promedio; S: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación porcentual; M: masa.

El método arroja un coeficiente de variación (CV) de 0,467%; menor al 2%, requerido para este tipo de determinaciones analíticas [24-26].

3.6.- Ensayos de recuperación

El análisis de recuperación MNZ fue realizado en tres niveles de concentración, mediante el agregado de una alícuota de solución stock de MNZ sobre una solución de placebo de manera de obtener una concentración final de 1,5; 3,0 y 4,5 mM, realizando tres replicas por cada nivel. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla XII-3, en términos de porcentaje de recuperación (%R).

$C_{\text{MNZ}} \text{ agreg.}$ [mM]	$C_{\text{MNZ}} \text{ recup.}$ [mM]	%R	%R promedio
1,5	1,48	98,7	99,8
	1,48	98,7	
	1,53	102,0	
3	3,06	102,0	99,4
	2,97	99,0	
	2,92	97,3	
4,5	4,47	99,3	100,4
	4,56	101,3	
	4,52	100,4	

Tabla XII-3: Resultados del ensayo de recuperación de MNZ utilizando el sistema FIA con detección amperométrica.

El método arroja una recuperación entre 99,8 y 100,4 %; valores comprendidos en el rango establecido por las farmacopeas (98 – 102 %) [24-26].

3.7.- Dosaje de MNZ en comprimidos: Comparación con el método de referencia

Los resultados obtenidos para seis determinaciones utilizando el método oficial se muestran en la Tabla XII-4.

<u>RUN</u>	SEÑAL	M_{recup}	X	<u>S [mg]</u>	CV%
------------	-------	--------------------	---	---------------	-----

	[area]	[mg/comp]	[mg/comp]		
Std.	3741,5	-	-	-	-
1	3730,8	498,57			
2	3748,9	500,99			
3	3752,1	501,42			
4	3732,7	498,82	500,37	1,36	0,27
5	3755,2	501,83			
6	3746,1	500,61			

Tabla XII-4: Determinación de MNZ en comprimidos por CLAE-UV. C, concentración; M, masa; X, masa promedio; S, desviación estándar; CV%, coeficiente de variación porcentual.

El método electroquímico propuesto se comparó con el oficial utilizando la prueba t de Student y la F de Fischer (Tabla XII-5)

Parámetro	Método	
	CLAE-UV	FIA-AMP
X ± S [mg]	500,37 ± 1,36	500,29 ± 1,41
CV%	0,272	0,282
S²	1,864	1,977
Test F	1,061 (5,050)	
Test t	0,919 (2,228)	

Tabla XII-5: Resultados del análisis ANOVA entre el método de referencia (CLAE-UV) y el método amperométrico propuesto, para un nivel de confianza del 95% (p = 0,05). Los valores entre paréntesis representan los valores críticos respectivos.

Estadísticamente, no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos (cromatográfico y electroquímico) para la determinación de MNZ en comprimidos, con un nivel de confianza del 95%.

3.8.- Seguimiento del perfil de disolución de comprimidos de MNZ

Se realizó el seguimiento del perfil de disolución de MNZ en comprimidos, utilizando el método propuesto. Se utilizó una vasiija estándar y un agitador tipo canasta (Aparato 2) operado en las condiciones establecidas por las farmacopeas vigentes [24-26]. En la Fig. XII-7 se muestra la respuesta obtenida y un perfil de disolución típico (porcentaje de disolución, %D, en función del tiempo).

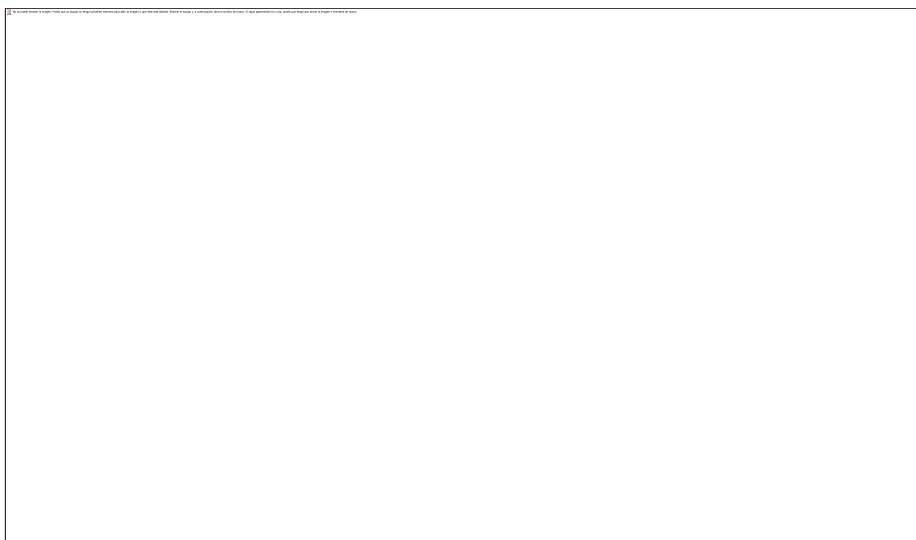


Fig. XII-7: Seguimiento del perfil de disolución de comprimidos de MNZ mediante el método FIA con detección amperométrica ($E_{\text{apl}} = -300$ mV contra Ag/AgCl en KCL 3 M). Respuesta obtenida en función del tiempo. Inserto: perfil de disolución obtenido, porcentaje de disolución en función del tiempo.

3.9.- Comparación de métodos para el monitoreo del perfil de disolución de comprimidos de MNZ

Para comparar los perfiles obtenidos por ambos métodos, amperométrico (FIA-AMP) y espectrofotométrico (S-UV), se realizaron dos procedimientos. El primero consistió en comparar la morfología de las curvas de disolución mediante los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2), Tabla XII-5.

t, [min]	%D		f_1 (n = 15)	f_2 (n = 15)
	FIA-AMP	S-UV		
0	0,00	0,00		
3	9,74	10,09		
6	18,39	17,89		
9	27,04	28,50		
12	33,29	32,88		
15	41,23	41,83		
18	48,80	48,02	1,27	94,60
21	54,33	54,98		
24	60,70	61,18		
27	66,35	67,59		
30	71,39	72,13		
33	77,16	76,96		
36	83,05	84,07		

39	85,58	86,22
42	86,66	87,25

Tabla XII-6: Porcentajes de disolución obtenidos (%D) por ambos métodos, utilizados para los cálculos de los factores de diferencia (f_1) y de similitud (f_2).

Los resultados obtenidos resultaron satisfactorios. Los valores encontrados para los factores de diferencia y similitud se encuentran dentro de los rangos de aceptación para ambos: 0-15 para f_1 y 50-100 para f_2 .

En segundo lugar, se compararon las respuestas obtenidas por ambos métodos a iguales tiempos, graficando en ordenadas los resultados obtenidos por el método propuesto, y en abscisas los resultados obtenidos por el método oficial. Los datos así representados fueron sometidos a un análisis de regresión, Fig. XII-8 y Tabla XII-3.

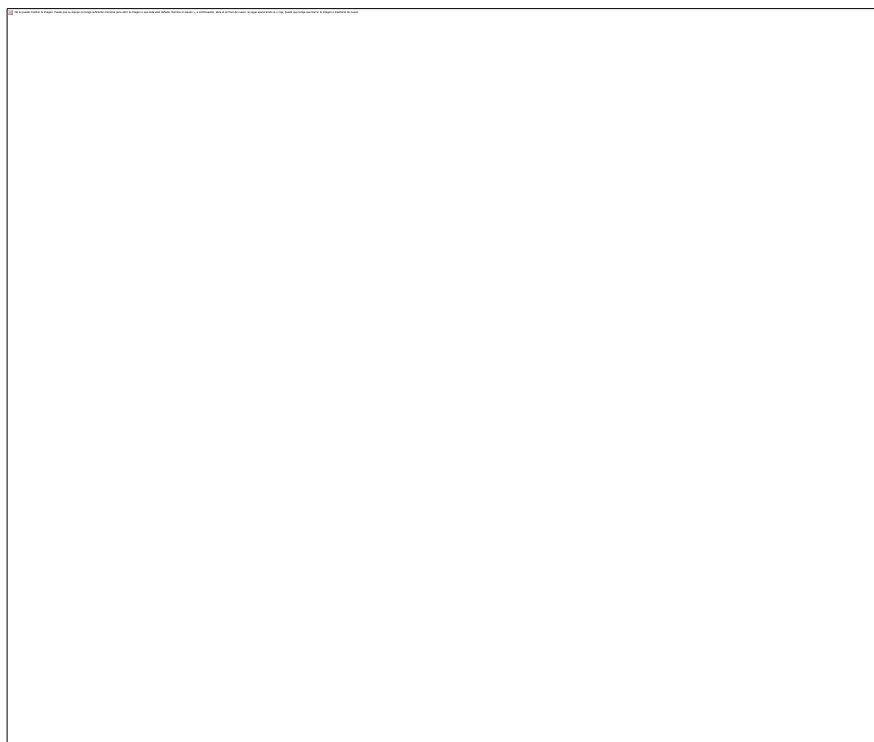


Fig. XII-8: Comparación entre método oficial y propuesto para el seguimiento del perfil de disolución de comprimidos de MNZ.

ANÁLISIS DE VARIANZA

Correlación ajustada, R^2	0,9997
Ordenada al origen	- 0,017 $\pm$ 0,608
Pendiente	0,993 $\pm$ 0,009

Tabla XII-7: Análisis de varianza de la regresión lineal para la comparación entre los métodos espectrofotométrico y amperométrico para el seguimiento del perfil de disolución de comprimidos de MNZ. Nivel de confianza del 95% ($p = 0,05$).

La recta responde a la ecuación $y = 0,993x - 0,017$. La bondad del ajuste lineal (R^2) es 0,9997. De acuerdo al análisis de varianza de la regresión lineal, para un nivel de confianza del 95%, la ordenada al origen incluye al punto (0; 0) y la pendiente, en su intervalo, al valor identidad, 1.

El método amperométrico presentó una exactitud comparable a la del método de referencia.

4.- CONCLUSIONES

Se desarrolló una plataforma electroquímica para análisis en flujo de metronidazol. El método se aplicó satisfactoriamente tanto a la cuantificación del principio activo en comprimidos como al monitoreo de su perfil de disolución. La metodología fue validada y presenta ventajas en cuanto a menor consumo de reactivos, tiempos de análisis más breves, no es necesario efectuar tratamientos previos y reducción de los costos de análisis. La metodología desarrollada adhiere a la tendencia de miniaturización de los sistemas de detección, permite el análisis *on - line* y ofrece, por lo tanto, posibilidades de automatización.

5.- REFERENCIAS

- [1] Fang, Z.; Chen, J.; Qiu, X.; Qiu, X.; Cheng, W.; Zhu, L. Effective removal of antibiotic metronidazole from water by nanoscale zero-valent iron particles. *Desalination* 268 (2011) 60–67.
- [2] Freeman, C.D.; Klutman, N.E.; Lamp, K.C. Metronidazole: a therapeutic review and update. *Drugs* 54 (1997) 679-708.
- [3] Lau, A.H.; Lam, N.P.; Piscitelli, S.C.; Wilkes, L.; Danziger, L.H. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin Pharmacokinet* 23 (1992) 328–364.
- [4] Tally, F.P.; Sullivan, C.E. Metronidazole: in vitro activity, pharmacology and efficacy in anaerobic bacterial infections. *Pharmacotherapy* 1 (1981) 28–38.
- [5] King, M.N.; Andres, T.R.; Navarrete, C.; Smith, D.K. A Comparison of the Non-Aqueous Electrochemistry of Nitrobenzenes and Nitroimidazoles upon Addition of L-Cysteine. 218th ECS Meeting of The Electrochemical Society, 2010, Abstract #57.
- [6] El-Ghobashy, M.R.; Abo-Talib, N.F. Spectrophotometric methods for the simultaneous determination of binary mixture of metronidazole and diloxanide furoate without prior separation. *J Adv Res* 1 (2010) 323–329.

- [7] Saffaj, T.; Charrouf, M.; Abourriche, A.; Aboud, Y.; Bennamara, A.; Berrada, M. Spectrophotometric determination of metronidazole and Secnidazole in pharmaceutical preparations based on the formation of dyes. *Dyes Pigm* 70 (2006) 259-262.
- [8] Saffaj, T.; Charrouf, M.; Abourriche, A.; Abboud, Y.; Bennamara, A.; Berrada, M. Spectrophotometric determination of metronidazole and secnidazole in pharmaceutical preparations. *Il Farmaco* 59 (2004) 843-846.
- [9] Vega, E.; Sola, N. Quantitative analysis of metronidazole in intravenous admixture with ciprofloxacin by first derivative spectrophotometry. *J Pharm Biomed Anal* 25 (2001) 523-530.
- [10] Çava, T.; Ergene-Gözükara, S. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. *Environ Toxicol Pharmacol* 19 (2005) 107-111.
- [11] Baratieri, S.C.; Barbosa, J.M.; Freitas, M.P.; Martins, J.A. Multivariate analysis of nystatin and metronidazole in a semi-solid matrix by means of diffuse reflectance NIR spectroscopy and PLS regression. *J Pharm Biomed Anal* 40 (2006) 51-55.
- [12] Ashour, S.; Kattan, N. Simultaneous determination of miconazole nitrate and metronidazole in different pharmaceutical dosage forms by gas chromatography and flame ionization detector (GC-FID). *Int J Biomed Sci* 6:1 (2010) 13-18.
- [13] Bempong, D.K.; Manning, R.G.; Mirza, T.; Bhattacharyya, L. A stability-indicating HPLC assay for metronidazole benzoate. *J Pharm Biomed Anal* 38 (2005) 776-780.
- [14] Erk, N.; Altun, M.L. Spectrophotometric resolution of metronidazole and miconazole nitrate in ovules using ratio spectra derivative spectrophotometry and RP-LC. *J Pharm Biomed Anal* 25 (2001) 115-122.
- [15] Menelaou, A.; Somogyi, A.A.; Barclay, M.L.; Bochner, F. Simultaneous quantification of amoxycillin and metronidazole in plasma using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Chrom B* 731 (1999) 261-266.
- [16] Gholivand, M.B.; Torkashvand, M. A novel high selective and sensitive metronidazole voltammetric sensor based on a molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode. *Talanta* 84 (2011) 905-912.
- [17] Josepha, R.; Kumara, K.G. Electrochemical reduction and voltammetric determination of metronidazole benzoate at modified carbon paste electrode. *Anal Letters* 42:14 (2010) 2309-2321.
- [18] Bartletta, P.N.; Ghoneima, E.; El-Hefnawy, G.; El-Hallagb, I. Voltammetry and determination of metronidazole at a carbon fiber microdisk electrode. *Talanta* 66 (2005) 869-874.
- [19] Lu, S.; Wu, K.; Danga, X.; Hua, S. Electrochemical reduction and voltammetric determination of metronidazole at a nanomaterial thin film coated glassy carbon electrode. *Talanta* 63 (2004) 653-657.
- [20] Gong, F.C.; Zhang, X.B.; Guo, C.C.; Shen, G.L.; Yu, R.Q. Amperometric metronidazole sensor based on the supermolecular recognition by metalloporphyrin incorporated in carbon paste electrode. *Sensors* 3 (2003) 91-100.
- [21] Yañez, C.; Bollo, S.; Nuñez-Vergara, L.J.; Squella, J.A. Voltammetric determination of nitroimidazolpyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Anal Letter* 34:13 (2001) 2335-2341.
- [22] La-Scalea, M.A.; Serrano, S.H.P.; Gutz, I.G.R. Voltammetric behaviour of metronidazole at mercury electrodes. *J Braz Chem Soc* 10:2 (1999) 127-135.

- [23] Ozkan, S.A.; Ozkan, Y.; Senturk, S. Electrochemical reduction of metronidazole at activated glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal* 17 (1998) 299-305.
- [24] Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. *Farmacopea Argentina*, 8va Edición, 2011.
- [25] European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). *European Pharmacopoeia*, 8va. Edición, 2014.
- [26] US Pharmacopoeial Convention. *United State Pharmacopoeia 38 and National Formulary 32*. Rockville, Meryland. 2015.
- [27] Oliveira Brett, A.M.; Serrano, S.H.P.; Gutz, I.G.R.; Lu-Scalea, M.A. Comparison of the voltammetric behavior of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode, a mercury thin film electrode and a glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 9:2 (1997) 110-114.
- [28] Squella, J.A.; Bollo, S.; Núñez Vergara, L.J. Recent developments in the electrochemistry of some nitro compounds of biological significance. *Curr Org Chem* 9:6 (2005) 565-581.
- [29] Goldman, P.; Ramos, S.M.; Wuest, J.D. Reactions of nitroimidazoles with hydrazine. *J Org Chem* 49 (1984) 932-935.
- [30] Goldman, P.; Wuest, J.D. Reactions of nitroimidazoles: nucleophilic substitution of the nitro group. *J Am Chem Soc* 103 (1981) 6224-6226.
- [31] Aguilar Ros, A.; Caamaño Somoza, M.; Matín Martín, F.R.; Montejo Rubio, M.C. *Biofarmacia y Farmacocinética*. Ed. Elsevier. Barcelona, 2008.

CAPÍTULO XIII

DETERMINACIÓN DE NELFINAVIR MEDIANTE VOLTAMETRÍA DE ONDA CUADRADA CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS MODIFICADOS CON NANOTUBOS DE CARBONO

1.- INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ha sido la principal causa de muerte referida a enfermedades infecciosas en el mundo y se estima que 34 millones de personas conviven con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en todo el globo. Además, se calcula que cada año ocurren 2,5 millones de infecciones nuevas, de las cuales al menos el 10% corresponden a niños [1]. A pesar del esfuerzo y las iniciativas para evitar la transmisión madre-hijo, sólo un tercio de los niños infectados recibe algún tipo de tratamiento [2]. Esta Terapia Antirretroviral Altamente Activa (o HAART, por sus siglas en inglés: Highly Active Antiretroviral Therapy) consiste en la administración oral diaria de un conjunto de drogas antirretrovirales (ARV). Actualmente, las drogas ARV comprenden tres importantes familias terapéuticas: Inhibidores Nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa (INTR), Inhibidores No-nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa (INNTR) e Inhibidores de Proteasa (IP). Usualmente, las terapias consisten en la administración de uno o dos INTRs, uno o dos IPs y un INNTR [3]

El Nelfinavir (NFV, Fig. XIII-1) -según IUPAC 2-[2-hidroxi-3-(3-hidroxi-2-metilbenzoil)amino-4-fenilsulfanil-butil]-N-terbutil-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-decahidroisquinolin-3-carboxamida- es una droga perteneciente al grupo de las IPs, que inhibe la escisión de la poliproteína GAG-POL (Fig. XIII-2), permitiendo la producción de un virus HIV inmaduro y no infeccioso. El NFV también es utilizado en combinación con otras drogas, con la particularidad haber iniciado la aplicación de ARVs a formulaciones pediátricas.

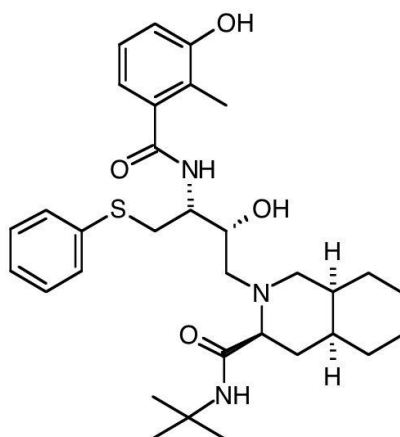


Fig. XIII-1: Estructura química del nelfinavir ($C_{32}H_{45}N_3O_4S$, PM 567,78).

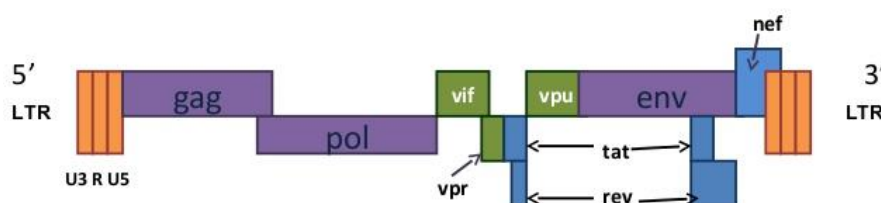


Fig. XIII-2: Genoma del HIV: gag (proteínas del núcleo), pol (glicoproteínas de la envoltura), env (enzimas), tat, rev, nef, vif, vpu, vpr (proteínas que modifican a la célula huésped para el crecimiento y regular la expresión genética del virus).

Se han reportado varios métodos para la determinación de NFV, pero la mayoría de ellos utilizan técnicas cromatográficas complejas como: HPLC-UV [4-6], HPLC-UV acoplado a fluorescencia [7], HPLC-MS [8-12], cromatografía de capa delgada de alta eficiencia [13], cromatografía líquida micelar [14] y UPLC-MS [15]. Otras técnicas analíticas incluyen electroforesis capilar [16], espectroscopía IR [17]. Todas estas metodologías incluyen una instrumentación muy costosa y pretratamientos, como extracciones en fase sólida, que incrementan los tiempos de análisis y la manipulación de las muestras, lo que puede conducir a errores y contaminación.

No se han descrito métodos electroquímicos para la determinación de NFV. Estos métodos presentan importantes ventajas, como su alta sensibilidad, bajos límites de detección, respuesta rápida, relativa simpleza y bajo costo de equipamiento [18].

Los electrodos serigrafados (o SPE, por sus siglas en inglés: Screen-Printed Electrodes) son dispositivos planos contruidos con capas de tintas conductoras y aislantes que poseen un espesor controlado. Esta tecnología ha hecho posible la producción en masa de electrodos descartables para su utilización en instrumentos

electroquímicos portátiles y de bajo costo. La versatilidad de los SPEs reside en su amplio rango de posibles modificaciones [19-21].

Los nanotubos de carbono (NTC, Fig. XIII-3) han recibido una atención considerable en los últimos años, por lo que han sido ampliamente utilizados en la construcción de sensores químicos y bioquímicos. Estos compuestos presentan un interesante acrecentamiento de la actividad electroquímica, aumentando los picos de corriente y disminuyendo el sobrepotencial, para la oxidación o reducción de muchos compuestos. Los nanomateriales muestran una estructura π conjugada con una gran superficie hidrofóbica. Esta propiedad de los NTC le permite interactuar con algunos compuestos orgánicos aromáticos a través de interacciones hidrofóbicas e interacciones electrónicas π - π [22-23].

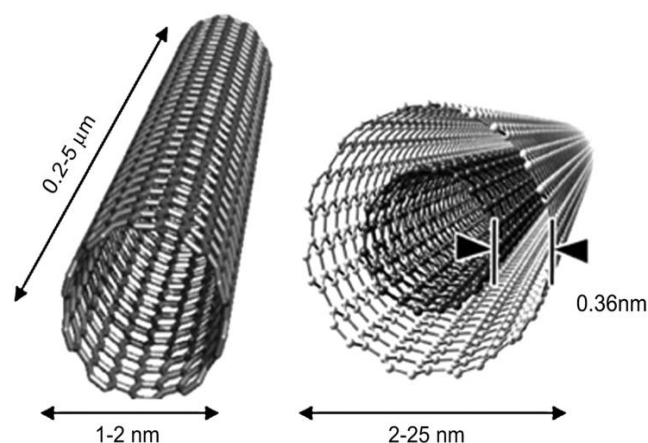


Fig. XIII-3: Representación de nanotubos de carbono y sus dimensiones aproximadas

Según el Compendio de Medicinas de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la metodología de referencia para la determinación de NFV en comprimidos es HPLC con detección UV a 215 nm [24]. Al ser una droga relativamente nueva, la monografía para su determinación aún no se encuentra establecida ni en la Farmacopea Argentina ni en la Europea.

El objetivo del presente trabajo consistió en diseñar, optimizar, validar y proponer un método electroquímico para la cuantificación de NFV en formulaciones farmacéuticas comerciales y en muestras biológicas, utilizando SPE modificados con NTC.

2.- EXPERIMENTAL

2.1.- Reactivos y muestras

- Nelfinavir, principio activo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Comprimidos de Viracept® Nelfinavir 250 mg, fueron provistos amablemente por Roche Ltd.
- Tintas comerciales para serigrafiar electrodos: tinta de carbono C2000802P2, tinta de oro C2041206D2, tinta de carbono platinizado C2050804D9 y tinta dieléctrica D2071120D1 (Gwent Group, Torfaen, Reino Unido); tinta de plata Electrodag 418 y tinta de Ag/AgCl Electrodag 6037 SS (Acheson Colloiden, Scheemda, Holanda) y tinta dielectrica 242-SB (ESL Europe, Agmet Limited, Reading, Reino Unido).
- Nanotubos de carbono (DropSens S.L., Oviedo, España).
- Dimetilformamida, DMF (Panreac, Barcelona, España).
- Etanol absoluto, p.a. (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Francia).
- Cloruro de potasio, p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).
- Fosfato diácido de sodio, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, p.a. (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Hidróxido de sodio, p.a. (J.T. Baker, Deventer, Holanda).
- Ácido clorhídrico, 38%, p.a. (VWR Prolabo, Fontenay sous Boris, Francia).
- Ferricianuro de potasio, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, p.a. (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Nitrato de potasio, p.a. (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Acetonitrilo, grado HPLC (Merk, Darmstadt, Alemania).
- Metanol, grado HPLC (Merk, Darmstadt, Alemania).
- Dimetilamina 20% en agua, p.a. (Merk, Darmstadt, Alemania).
- Acetato de amonio, p.a. (PRS Panreac, Barcelona, España).
- Ácido acético glacial, p.a. (VWR Prolabo, Fontenay sous Boris, Francia).

2.2.- Equipamiento

- Impresora serigráfica DEK-248 (DEK, Weymouth, Reino Unido).
- Potenciostato/galvanostato μ Autolab Type II con software controlador GPES (Eco Chemie, Utrecht, Holanda).
- Peachímetro Crison modelo 2002 (Barcelona, España).

- HPLC Perkin-Elmer modelo Flexar con detector UV-Visible, bomba binaria y degasificador, con software controlador Chromera (Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

2.3.- Fabricación de los SPE

Los SPE utilizados fueron contruidos en el laboratorio mediante la deposición secuencial de las diferentes tintas comerciales sobre placas poliméricas, seguidas por un proceso de curado que consistió en colocar las placas en estufa a 60 °C durante 90 min [25]. Se fabricaron electrodos de diferente naturaleza, utilizando distintos tipos de tintas. De esta manera, se construyeron dos tipos de SPE:

- Para mediciones voltamétricas: se construyeron SPEs con arreglos de 3 electrodos (de trabajo, de referencia de Ag/AgCl e indicador de carbono, todos de 12,6 mm² de superficie). Para ello se siguieron los procedimientos descritos en los trabajos de Domínguez Renedo *et al.* Se utilizaron tintas de oro, carbono y carbono platinizado para los electrodos de trabajo [26-28]. De esta manera se obtuvieron 3 dispositivos diferentes: electrodos serigrafiados de oro (SPAuE), electrodos serigrafiados de carbono (SPCE) y electrodos serigrafiados de carbono platinizado (SPCPtE), (Fig. XIII-4).
- Para mediciones cronocolumbimétricas se imprimió un electrodo de trabajo de carbono (144 mm² de superficie) sobre placas poliméricas. Éste fue utilizado junto con un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo indicador de platino, ambos convencionales.

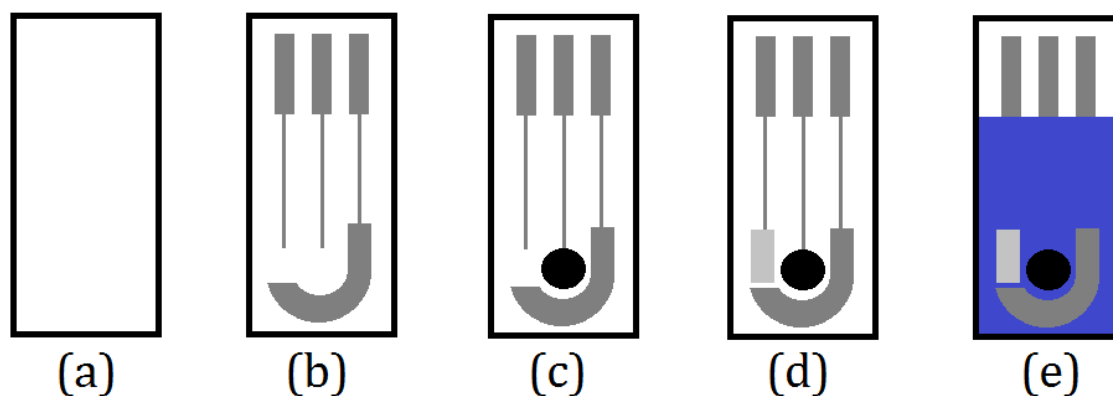


Fig. XIII-4: Construcción de los electrodos serigrafiados: (a) placa polimerica limpia, lista para imprimir; (b) con tinta de carbón platinizado se establecen los conectores, las vías y el electrodo auxiliar; (c) se imprime

el electrodo de trabajo con la tinta deseada (oro, carbono, carbono platinizado, etc.); (d) se imprime el electrodo de referencia con tinta de Ag/AgCl; por último (e) se aplica la tinta aislante.

Debido a la naturaleza de las tintas de oro, los SPAuE debieron ser mecánica y electroquímicamente activados [26]. Inicialmente, el electrodo de trabajo de oro fue pulido con papel de lija fina hasta obtener una superficie brillante. Luego, fue activado mediante voltametría. Para ello se depositó una gota (100 μ L) de solución de ferricianuro de potasio 5,7 mM en KNO_3 100 mM sobre los electrodos y se realizaron 8 ciclos de +800 a -800 mV (contra Ag/AgCl SPE), a una velocidad de 100 mV/s. Los dispositivos SPCE y SPCPtE fueron utilizados sin ningún pretratamiento.

2.4.- Modificación de electrodos de trabajo

Para la modificación de la superficie de los electrodos de trabajo se utilizó una dispersión de NTC en DMF, 3 mg/mL en un tubo ependorf. Se agitó vigorosamente y luego se sonicó durante 150 min. Por último, se depositaron 5 μ L sobre los electrodos de trabajo y se dejaron reposar a temperatura ambiente bajo campana hasta la evaporación del solvente (3 h aproximadamente).

2.5.- Mediciones electroquímicas

Las mediciones que se efectuaron por voltametría de onda cuadrada (VOC), fueron llevadas a cabo en una celda electroquímica conteniendo 5 mL de solución de electrolito soporte al pH seleccionado (KCl 100 mM en solución buffer fosfato 50 mM). Los parámetros experimentales fueron: potencial aplicado, +0,5 a +1,5 V; frecuencia, 25 Hz; salto de potencial, 12 mV; y amplitud, 25 mV. Adicionalmente, se optimizó el proceso de acumulación, que resultó en la aplicación de +200 mV (contra Ag/AgCl SPE) durante 50 s bajo agitación, y 10 s de reposo previo a la medición por VOC.

Las medidas cronoamperométricas y cronoculombimétricas fueron realizadas bajo agitación constante en una celda electroquímica conteniendo 5 mL de solución de electrolito soporte a pH 2 y NFV 10 μ M. Se aplicó un potencial de +950 mV (contra Ag/AgCl SPE) durante 60 min.

Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente.

2.6.- Preparación de muestras para VOC

2.6.1.- NFV en comprimidos comerciales

Viracept® es la marca comercial de comprimidos de NFV utilizados en las HAART, con una dosis de 250 mg de NFV por comprimido. Para la muestra se pesaron 15 comprimidos y se calculó la masa promedio de un comprimido. Luego, se pulverizaron en mortero con pilón hasta obtener un polvo homogéneo. El pool de comprimidos así obtenido se utilizó para preparar las soluciones de muestra, disolviendo la cantidad de pool necesaria en etanol como para obtener una solución con una concentración teórica de 5 mM en NFV.

De acuerdo al prospecto que acompaña al medicamento, los excipientes utilizados en la formulación del comprimidos son silicato cálcico crospovidona, estearato de magnesio e indigotina en polvo.

2.6.2.- NFV en orina

A fin de demostrar la aplicabilidad del método propuesto a la determinación de NFV en matrices complejas, se analizaron muestras de orina provenientes de individuos sanos, que no estaban bajo ningún tipo de tratamiento médico que incluyera medicación. Para ello, alícuotas de 25 mL de orina fueron dopadas con 500 µL de solución stock de NFV 5 mM. Luego fueron diluidas a 50 mL en matraz aforado con solución 200 mM de KCl en 100 mM de buffer fosfato pH 2.

Para la determinación de NFV se procedió de acuerdo a la metodología explicada más arriba.

2.7.- Procedimiento cromatográfico (Método de referencia).

Para el análisis cromatográfico se utilizó HPLC con detector UV a 225 nm; flujo de 1,0 mL/min en modo isocrático y columna RP-C18 de 15 × 4,6 mm. El volumen de inyección fue de 20 µL.

Para la fase móvil se preparó una solución de dimetilamina 0,05% p/v disuelta en acetato de amonio 10 mM. Esta solución se mezcló con metanol y acetonitrilo en proporción 35:20:45, respectivamente. La misma mezcla se utilizó para disolver la muestra y los estándares.

El estándar consistió en una solución 0,3 mg/mL de NFV disuelto en fase móvil. Para la muestra se preparó una mezcla homogénea a partir de 15 comprimidos, previamente pulverizados de Viracep®. Se pesó una masa adecuada para preparar una solución de aproximadamente 0,3 mg/mL de NFV. Se agitó durante 10 min y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue inyectado directamente en el cromatógrafo.

3.- RESULTADOS

Estudios previos han demostrado que el NFV es una molécula electroquímicamente activa, presentando un pico de oxidación a 1,0 V (contra electrodo de referencia de Ag/AgCl SPE) en medio ácido.

3.1.- Influencia de la naturaleza de electrodo de trabajo serigrafiado en el comportamiento voltamétrico de NFV

Debido a que la naturaleza del electrodo de trabajo influye en el comportamiento electroquímico del NFV, se ensayaron determinaciones utilizando SPEAuE, SPCPtE, SPCE y SPCE-NTC. Se registraron voltamogramas de onda cuadrada a partir de soluciones de NFV 150 μ M, en solución de electrolito soporte a pH 2, utilizando los diferentes SPE preparados.

Los SPAuE presentaban un pico a +1,0 V (contra Ag/AgCl SPE) debido a la oxidación de la superficie de oro, muy cerca del pico correspondiente a la oxidación de NFV, por lo que se descartó este SPE para el análisis.

Por otro lado, los electrodos SPCE, SPCPtE y SPCE-NTC presentaron picos cercanos a +0,9 V cuyas intensidades de corriente fueron 3,6; 6,2 y 70,0 μ A, respectivamente (Fig. XIII-5). En base a estos resultados, los electrodos elegidos para continuar el estudio

fueron los electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanotubos de carbono (SPCE-NTC).

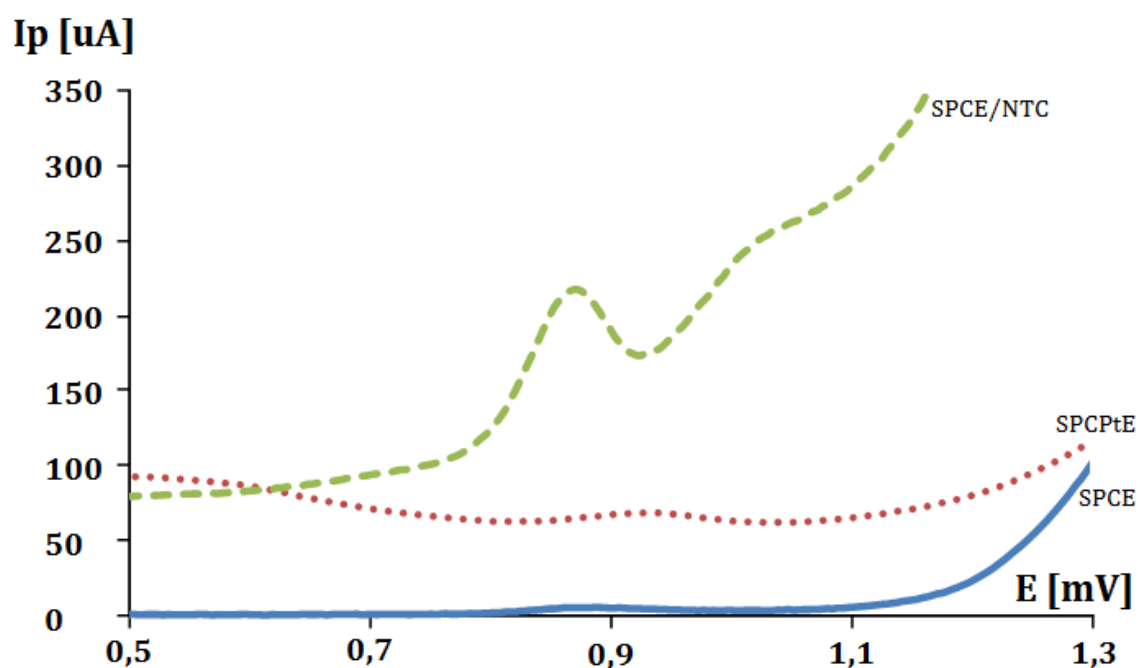


Fig. XIII-5: Voltamograma de onda cuadrada, I_p vs E (vs Ag/AgCl SPE) para los distintos electrodos preparados.

3.2.- Optimización de variables experimentales

La respuesta electroquímica del NFV en los SPCE-NTC es función del pH de la solución y del proceso de acumulación. A fin de obtener una buena señal analítica que permita la cuantificación de NFV, las variables pH, tiempo de acumulación (t_{ac}) y potencial de acumulación (E_{ac}) fueron optimizadas mediante diseño experimental. Los datos obtenidos fueron procesados con Statgraphic Plus [29-32].

Se realizó un diseño central compuesto 2^3 , que permitió analizar 5 niveles de cada una de las tres variables de influencia. Se seleccionaron dos niveles para cada variable: alto (+) y bajo (-). Luego, se realizaron diecisiete experimentos correspondientes a las posibles combinaciones. Para estimar el valor residual se necesitaron tres réplicas del valor central. Los valores altos (+), bajos (-) y los puntos centrales (0) para cada factor fueron los siguientes:

$$E_{ac} (+) = +300 \text{ mV}$$

$$t_{ac} (+) = 90 \text{ s}$$

$$\text{pH} (+) = 4$$

$$\begin{array}{lll} E_{ac} (-) = +100 \text{ mV} & t_{ac} (-) = 30 \text{ s} & \text{pH} (-) = 2 \\ E_{ac} (0) = +200 \text{ mV} & t_{ac} (0) = 60 \text{ s} & \text{pH} (0) = 3 \end{array}$$

Los valores óptimos obtenidos a partir del diseño experimental fueron 200 mV para el potencial de acumulación, E_{ac} ; 50 s para el tiempo de acumulación, t_{ac} ; y pH = 2.

3.3.- Linealidad, precisión y capacidad de detección

El desempeño de los SPCE/NTC desarrollados fue evaluado en términos de linealidad, precisión y capacidad de detección. Se registraron varias curvas de calibrado en el rango de 10 a 110 μM de NFV en condiciones óptimas (Fig. XIII-6). Los datos que no se ajustaron correctamente fueron descartados mediante el programa PROGRESS, que evalúa la presencia de puntos anómalos utilizando regresión de mínimos cuadrados de las medianas [33]. De esta manera, dichos puntos, que podrían alterar los valores de pendiente y ordenada al origen llevando a conclusiones erróneas, fueron detectados y eliminados. Luego, se efectuó una regresión ordinaria por mínimos cuadrados utilizando los datos remanentes.

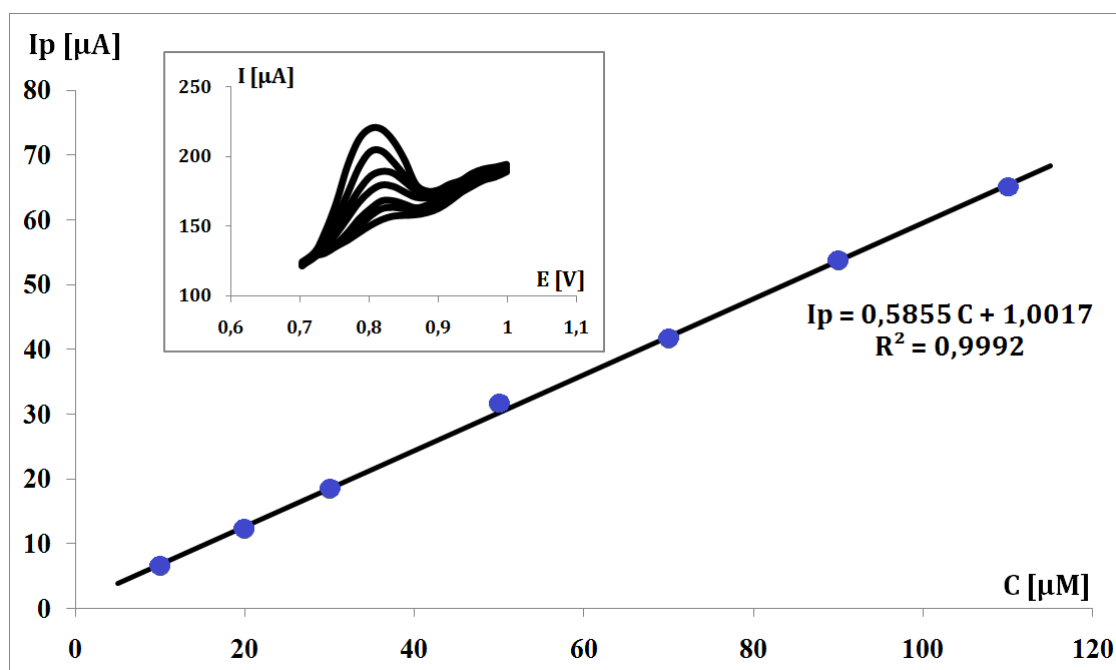


Fig. XIII-6: Curva de calibrado para la determinación de NFV por voltametría de onda cuadrada con electrodos serigrafiados modificados con nanotubos de carbono. Inserto, voltamogramas para diferentes concentraciones de NFV en condiciones óptimas.

Para estimar la reproducibilidad de los electrodos desarrollados, en términos de coeficiente de variación (CV), se utilizaron las pendientes de las curvas de regresión. La reproducibilidad obtenida, a partir de distintas curvas de regresión, utilizando distintos SPCE/NTC fue de 5,05% ($n = 5$) para un rango lineal de 10 a 110 μM .

Para evaluar la repetibilidad se llevó a cabo el mismo procedimiento que para la reproducibilidad, pero utilizando un mismo electrodo. Se observó que no resultaba posible realizar más de una curva de calibrado con el mismo electrodo, posiblemente debido a la adsorción del producto oxidado de NFV en la superficie del electrodo de trabajo, lo que disminuía considerablemente su sensibilidad. De todas maneras, este hecho no resultó significativo debido a la naturaleza descartable del dispositivo y a su buena reproducibilidad.

La capacidad de detección fue calculada utilizando el programa DETARCHI, teniendo en cuenta la probabilidad de falso positivo (α) y falso negativo (β) [34-36]. La mínima concentración detectada fue $10,99 \pm 0,87 \mu\text{M}$ ($n = 5$ y $\alpha = \beta = 0,05$).

3.4.- Mecanismo de oxidación

Debido a que el NFV no ha sido estudiado electroquímicamente en profundidad, se propone un mecanismo de reacción considerando distintos aspectos, a partir de la información recabada en los ensayos realizados.

En primer lugar, la comparación de la señal voltamétrica del NFV con otras señales encontradas en la bibliografía muestra que su comportamiento es similar al encontrado para la reacción de oxidación de fenol propuesta por Gil y Couto, 2013 [37]. Como se muestra en la Fig. XIII-7, en el primer ciclo se observa un pico de oxidación alrededor de +0,86 V en el primer tramo del barrido, y aparecen dos picos de reducción en el sentido opuesto. En el segundo ciclo aparecen dos picos de oxidación adicionales, mientras que el pico de oxidación del primer ciclo decrece. Teniendo esto en cuenta, se puede inferir que el grupo fenol sea responsable de la respuesta voltamétrica en la oxidación de la molécula de NFV.

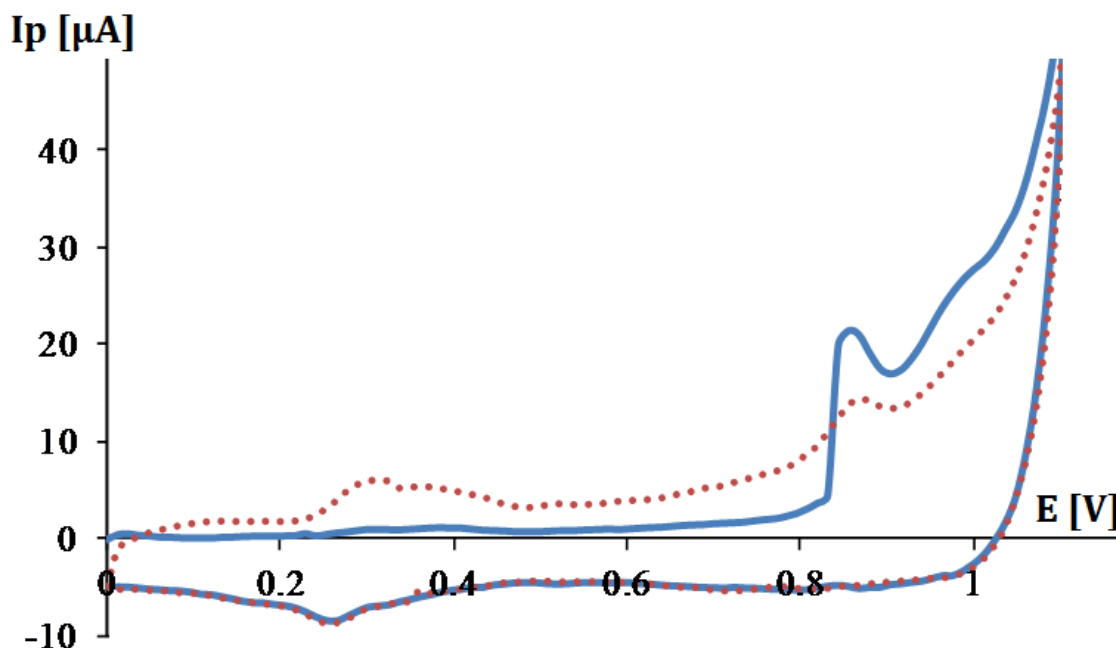


Fig. XIII-7: Voltametría cíclica de NFV. La línea azul continua corresponde al primer ciclo, y la línea roja punteada corresponde al segundo ciclo.

De acuerdo a la bibliografía, la oxidación del grupo fenólico requiere un electrón y un protón [36]. Para comprobarlo, se realizó una cronoculombimetría en presencia y ausencia de NFV para determinar el número de electrones que toman parte en la oxidación del analito. Utilizando la Ley de Faraday, el número de electrones transferidos fue 1. Esta estimación también fue llevada a cabo también mediante un gráfico de Tafel. Se representaron los valores de $\log I_p$ vs. E_{aplicado} registrados en una voltametría cíclica de una solución de NFV 5 mM. De dicha gráfica se obtuvo el valor de $n(1-\alpha)$, que resultó igual a 0,65 para los potenciales de oxidación. Como este sistema es irreversible, para $0 < \alpha < 0,5$, el número de electrones (n) será alrededor de 1.

El número de protones que requiere la reacción de oxidación de NFV fue estudiada registrándose la variación del potencial correspondiente al pico de oxidación en función del pH. Este estudio fue limitado por el hecho que el intervalo de pH en el que el NFV es soluble y su pico de oxidación es visible, es muy acotado, entre pH 2 y 4,5. De todas maneras, se realizó el ensayo con electrodos SPCPtE obteniéndose como resultado que es necesario un protón para el proceso de oxidación.

Teniendo en cuenta los experimentos y la información obtenida de la bibliografía, el mecanismo sugerido para la oxidación electroquímica de NFV es presentado en la Fig. XIII-8. La oxidación del grupo fenol del NFV produce o- y p-quinonas, las cuales pueden reducirse a sus respectivas hidroquinonas. Este comportamiento se puede explicar con la

representación de la Fig. XIII-5, donde en el primer tramo del primer ciclo sólo aparece la oxidación del grupo fenólico, y en el segundo tramo se observan dos picos correspondientes a la reducción de las quinonas. En el segundo ciclo, estos productos son oxidados y por ello aparecen dos picos de oxidación que no fueron registrados en el primer ciclo.

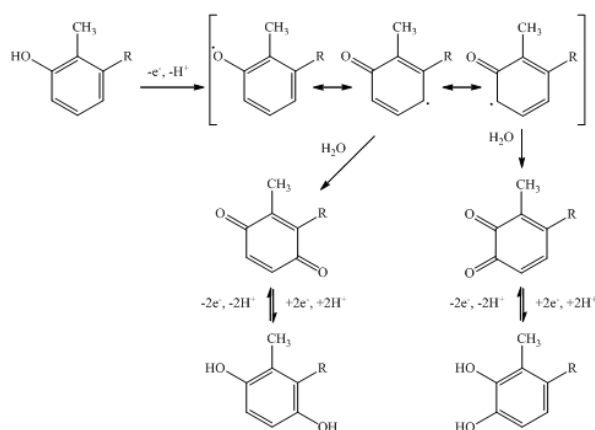


Fig. XIII-8: Mecanismo de oxidación propuesto para la molécula de NFV.

Para facilitar el esquema sólo se muestra el grupo fenólico.

El grupo -R representa el resto de la molécula.

3.5.- Aplicación del método a muestras de orina y de comprimidos comerciales

Para la cuantificación de NFV en muestras de orina y de comprimidos comerciales se utilizaron los métodos de adición de estándar y curva de calibrado, respectivamente, mediante VOC con los electrodos SPCE/NTC desarrollados.

Para los comprimidos de Viracept® se procedió tal lo explicado más arriba. La cantidad de NFV encontrada fue de $249,26 \pm 2,92$ mg/comp ($n = 5$, $\alpha = 0,05$). Esta cantidad es acorde con los valores rotulados por el laboratorio farmacéutico, y los valores de tolerancia concuerdan con los establecidos por el compendio médico de la USP ($\pm 10\%$ del valor declarado).

Para comprobar la exactitud del método propuesto se realizaron cinco determinaciones por HPLC y por VOC con los electrodos desarrollados, a partir de un mismo lote de muestra de pool de comprimidos. Los resultados de ambos métodos (propuesto y de referencia) se compararon mediante una prueba F para precisión y prueba t para las medias, Tabla XIII-1.

Parámetro	HPLC-UV	VOC-SPE/CNT
X ± S [mg]	249,72 ± 4,29	250,49 ± 3,59
n	5	5
CV%	1,72	1,43
S²	18,38	12,91
Test F	0,3703 (6,3882)	
Test t	0,7659 (2,3060)	

Tabla XIII-1: Resultados del análisis ANOVA entre el método de referencia (HPLC-UV) y para el método voltamétrico propuesto, para un nivel de confianza del 95% (p = 0,05). Los valores entre paréntesis representan los valores críticos respectivos.

Estadísticamente, no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos (cromatográfico y electroquímico) para la determinación de NFV en comprimidos, con un nivel de confianza del 95%.

El análisis de NFV en muestras de orina se realizó mediante la adición de cantidades establecidas de la droga en orina provenientes de individuos sanos, según lo detallado en apartados anteriores. Estos ensayos se realizaron en dos niveles, mediante el sobreagregado de NFV en orina, de manera de obtener una concentración final de 40 y 50 μM , realizándose tres replicas por cada nivel. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla XIII-2, en términos de porcentaje de recuperación (%Recup).

C_{NFV} [μM]	C_{Recup} [μM]	%Recup	%Recup promedio
40	39,75	99,4	100,6
	40,55	101,4	
	40,43	101,1	
50	50,04	100,1	99,7
	49,19	98,4	
	50,27	100,5	

Tabla XIII-2: Resultados del ensayo de recuperación de NFV en muestras de orina.

4.- CONCLUSIONES

El uso de un sensor basado en un electrodo de trabajo de carbono modificado con nanotubos de carbono permitió la determinación voltamétrica de NFV en muestras de orina y de comprimidos comerciales. La optimización de las principales variables

experimentales se logró mediante un diseño central compuesto, que incluyó la interacción entre variables. La reproducibilidad de los electrodos fue satisfactoria (CV% = 5,05 %). Se propuso un mecanismo basado en la oxidación del grupo fenólico de la molécula de NFV, en el cual participan un electrón y un protón. No se necesitaron tratamientos previos al procedimiento de medida.

5.- REFERENCIAS

- [1] Doherty, M.; Ford, N.; Victoria, M.; Weiler, G.; Hirnschall, G. The 2013 WHO's guidelines for antiretroviral therapy: evidence-based recommendations to face new epidemic realities, *Curr Opin HIV AIDS* 8 (2013) 528-534.
- [2] Chiappini, E.; Berti, E.; Giancesin, K.; Petrara, M.R.; Galli, L.; Giaquinto, C.; de Martino, M.; De Rossi, A. Pediatric human immunodeficiency virus infection and cancer in the Highly Active Antiretroviral Treatment (HAART) era. *Cancer Lett* 347 (2014) 38-45.
- [3] Checa, A.; Oliver, R.; Hernández Cassou, R.; Saurina, J. Determination of HIV drugs in biological matrices: a review. *Anal Chim Acta* 647 (2009) 1-13.
- [4] Checa, A.; Oliver, R.; Hernández Cassou, S.; Saurina J. Reversed-phase liquid chromatographic method with spectrophotometric detection for the determination of antiretroviral drugs, *Anal Chim Acta* 616 (2008) 85-94.
- [5] Weller, D.R.; Brundage, R.C.; Balfour Jr, H.H.; Vezina, H.E. An isocratic liquid chromatography method for determining HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor and protease inhibitor concentrations in human plasma. *J Chromatogr B* 848 (2007) 369-373.
- [6] Choi, S.O.; Rezk, N.L.; Kashuba, A.D.M. High-performance liquid chromatography assay for the determination of the HIV-protease inhibitor tipranavir in human plasma in combination with nine other antiretroviral medications. *J Pharm Biomed Anal* 43 (2007) 1562-1567.
- [7] Verbesselt, R.; Van Wijngaerden, E.; de Hoon, J. Simultaneous determination of 8 HIV protease inhibitors in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography with combined use of UV and fluorescence detection: Amprenavir, indinavir, atazanavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, nelfinavir and M8-nelfinavir metabolite. *J Chromatogr B* 845 (2007) 51-60.
- [8] Marzinke, M.A.; Breaud, A.; Parsons, T.L.; Cohen, M.S.; Piwowar Manning, E.; Eshleman, S.H.; Clarke, W. The development and validation of a method using high-resolution mass spectrometry (HRMS) for the qualitative detection of antiretroviral agents in human blood. *Clin Chim Acta* 433 (2014) 157-168.
- [9] D'Avolio, A.; Simiele, M.; Siccardi, M.; Baietto, L.; Sciandra, M.; Oddone, V.; Stefani, F.R.; Agati, S.; Cusato, J.; Bonora, S.; Di Perri, G. A HPLC-MS method for the simultaneous quantification of fourteen antiretroviral agents in peripheral blood mononuclear cell of HIV infected patients optimized using medium corpuscular volume evaluation. *J Pharm Biomed Anal* 54 (2011) 779-788.

- [10] Tiwari, R.N.; Bonde, C.G.; LC, LC-MS/TOF and MSn studies for the identification and characterization of degradation products of nelfinavir mesylate. *J Pharm Biomed Anal* 55 (2011) 435-445.
- [11] Elens, L.; Veriter, S.; Yombi, J.C.; Di Fazio, V.; Vanbinst, R.; Lison, D.; Wallemacq, P.; Vandercam, B.; Haufroid, V. Validation and clinical application of a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the quantitative determination of 10 anti-retrovirals in human peripheral blood mononuclear cells. *J Chromatogr B* 877 (2009) 1805-1814.
- [12] ter Heine, R.; Davids, M.; Rosing, E.; van Gorp, E.C.M.; Mulder, J.W.; van der Heide, Y.T.; Beijnen, J.H.; Huitema, A.D.R. Quantification of HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in peripheral blood mononuclear cell lysate using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 877 (2009) 575-580.
- [13] Kaul, N.; Agrawal, H.; Paradkar, A.R.; Mahadik, K.R. Stability indicating high-performance thin-layer chromatographic determination of nelfinavir mesylate as bulk drug and in pharmaceutical dosage form. *Anal Chim Acta* 502 (2004) 31-38.
- [14] Raviolo, M.A.; Breva, I.C.; Esteve Romero, I.C. Screening and monitoring antiretrovirals and antivirals in the serum of acquired immunodeficiency syndrome patients by micellar liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1216 (2009) 3546-3552.
- [15] Watanabe, K.; Varesio, E.; Hopfgartner, G. Parallel ultra high pressure liquid chromatography-mass spectrometry for the quantification of HIV protease inhibitors using dried spot sample collection format. *J Chromatogr B* 965 (2014) 244-253.
- [16] Pereira, E.A.; Micke, G.A.; Tavares, M.F.M. Determination of antiretroviral agents in human serum by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1091 (2005) 169-176.
- [17] Singh, P.; Mehrotra, R.; Bakhshi, A.K. Stress degradation studies of nelfinavir mesylate by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 53 (2010) 287-294.
- [18] Zhu, Y.; Zeng, G.; Zhang, Y.; Tang, L.; Chen, J.; Cheng, M.; Zhang, L.; He, L.; Guo, Y.; He, X.; Lai, M.; He, Y. Highly sensitive electrochemical sensor using a MWCNTs/GNPs-modified electrode for lead (II) detection based on Pb²⁺-induced G-rich DNA conformation. *Analyst* 139 (2014) 5014-5020.
- [19] Molinero Abad, B.; Alonso Lomillo, M.A.; Domínguez Renedo, O.; Arcos Martínez, M.J. Sulfite oxidase biosensors based on tetrathiafulvalene modified screen-printed carbon electrodes for sulfite determination in wine. *Anal Chim Acta* 812 (2014) 41-44.
- [20] Asturias Arribas, L.; Alonso Lomillo, M.A.; Domínguez Renedo, O.; Arcos Martínez, M.J. Sensitive and selective cocaine electrochemical detection using disposable sensors. *Anal Chim Acta* 834 (2014) 30-36.
- [21] Calvo Pérez, A.; Domínguez Renedo, O.; Alonso Lomillo, M.A.; Arcos Martínez, M.J. Speciation of chromium using chronoamperometric biosensors based on screen-printed electrodes. *Anal Chim Acta* 833 (2014) 15-21.
- [22] Herrero Latorre, C.; Álvarez Méndez, A.; Barciela García, J.; García Martín, S.; Peña Crecente, R.M. Characterization of carbon nanotubes and analytical methods for their determination in environmental and biological samples: a review. *Anal Chim Acta* 853 (2015) 77-94.
- [23] Tang, C.; Yogeswaran, U.; Chen, S.M. Simultaneous determination of adenine guanine and thymine at multi-walled carbon nanotubes incorporated with poly(new fuchsin) composite film. *Anal Chim Acta* 636 (2009) 19-27.

- [24] USP Medicine Compendium, Nelfinavir Mesylate, Final Authorized Version 1.0, in: US Pharmacopoeial Convention, Sept. 2012.
- [25] Domínguez Renedo, O.; Arcos-Martínez, M.J. Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Anal Chim Acta* 589 (2007) 255-260.
- [26] Alonso Lomillo, M.A.; Yardimci, C.; Domínguez Renedo, O.; Arcos-Martínez, M.J. CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers. *Anal Chim Acta* 633 (2009) 51-56.
- [27] del Torno de Román, L.; Alonso Lomillo, M.A.; Domínguez Renedo, O.; Arcos Martínez, M.J. Gluconic acid determination in wine by electrochemical biosensing. *Sensor Actuat B-Chem* 176 (2013) 858-862.
- [28] del Torno de Román, L.; Alonso Lomillo, M.A.; Domínguez Renedo, O.; Merino Sánchez, C.; Merino Amayuelas, M.P.; Arcos Martínez, M.J. Fabrication and characterization of disposable sensors and biosensors for detection of formaldehyde. *Talanta* 86 (2011) 324-328.
- [29] STATGRAPHICS, STATGRAPHICS PLUS for Windows, Statistical Graphics Corp., 1994-2001.
- [30] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, Estadística para Jóvenes Investigadores: Introducción al Diseño de Experimentos, Análisis de Datos y Construcción de Modelos, Reverté, Barcelona, 1999, pp. 675.
- [31] G.A. Lewis, D. Mathieu, R.T.L. Phan, Pharmaceutical Experimental Design, New York, 1999.
- [32] D.L. Massart, Chemometrics: A Textbook, Elsevier, Amsterdam, 1988, pp. 488.
- [33] P.J. Rousseeuw, A.M. Leroy, Robust Regression and Outlier Detection Wiley, New York, 1989.
- [34] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, Compendium of Analytical Nomenclature, 3rd ed., Port City Press Inc, Baltimore, 2000.
- [35] ISO 11843-2, Capability of Detection, Part I, 1997 and Part II, 2000, Genève, Switzerland.
- [36] Ortiz, M.C.; Sanabria, L.A. DETARCHI, a program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection. *Trac Trend Anal Chem* 13 (1994) 1-6.
- [37] E.S. Gil, R.O. Couto, Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications, *Braz J Pharmacog* 23 (2013) 542-558.

CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de este trabajo de tesis se ha logrado el desarrollo de los siguientes métodos de análisis de formulaciones farmacéuticas de medicamentos esenciales, alternativas a las establecidas por las Farmacopeas:

- 1.- Determinación de cefalexina con ninhidrina
- 2.- Determinación de metoclopramida con nitrito
- 3.- Determinación de mebendazol con hidróxido de sodio
- 4.- Determinación de metronidazol mediante análisis en flujo con detección amperométrica
- 5.- Determinación de nelfinavir mediante voltametría de onda cuadrada con electrodos serigrafiados modificados con nanotubos de carbono

Adicionalmente, el método desarrollado para metronidazol fue aplicado satisfactoriamente al monitoreo del perfil de disolución de comprimidos. Se efectuó el estudio farmacocinético para caracterizar estos perfiles mediante análisis modelístico y amodelístico.

Estos métodos cuentan con las ventajas de ser simples, rápidos y de bajo costo. Han demostrado ser específicos y lineales en las condiciones estudiadas y permiten la cuantificación de los principios activos sin procesos extractivos preliminares, siendo por ello de fácil automatización.

Se consideraron relevantes los parámetros analíticos de exactitud, precisión, especificidad y reproducibilidad, los que se ajustan a los criterios de aceptabilidad establecidos para las técnicas de referencias y completan la validación de los métodos propuestos.

Este conjunto de métodos desarrollados ha alcanzado, en todos los casos, los parámetros de validación suficientes para su aplicación en el control de calidad de las formulaciones farmacéuticas que los contienen, lo cual constituyó el objetivo primordial de esta tesis.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

1.- PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

1.1.- “Desarrollo de un Sensor Electroquímico con Nanopartículas de Carbono para la Determinación Voltamétrica del Antirretroviral Nelfinavir”. M.R. Delfino (h) - L. Asturias Arribas – M.J. Arcos Martínez.

- Presentado en la XXI Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Resistencia, Chaco, Argentina. 03-04/06/2015.
- Presentado en la XXIII Jornada de Jóvenes Investigadores. La Plata, Bs.As., Argentina. 24-26/08/2015
- Presentado en el IX Congreso de Química Analítica. La Plata, Bs.As., Argentina. 06-09/11/2015.

1.2.- “Determinación Espectrofotométrica de Mebendazol. Uso de Herramientas Quimiométricas”. N.I. Costilla – M.R. Delfino (h) - C.M. Monzón – M.C.T. Sarno. Presentado en el XXX Congreso Argentino de Química. Bs.As., Argentina. 22-24/10/2014.

1.3.- “Dissolution Profile of Metronidazole Tablets by Flow Injection Analysis with Amperometric Detection”. M.R. Delfino (h) – G.A. Gómez – C.M. Monzón – M.C. Sarno – S.R. Hernández. Presentado en la XXXV Meeting of Electrochemistry of the Spanish Royal Society of Chemistry & 1st E3 Mediterranean Symposium of Electrochemistry for Environment and Energy. Burgos, España. 14-16/07/2014.

1.4.- “Desarrollo de un Sistema de Análisis en Flujo (FIA) con Detección Electroquímica para el Monitoreo del Perfil de Disolución de Comprimidos de Metronidazol. Primera Parte”. M.R. Delfino (h) – G.A. Gómez – S.R. Hernández. Presentado en la XX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Corrientes, Argentina. 17-19/06/2014.

1.5.- “Seguimiento del Perfil de Disolución de Diclofenac por CE”. C.M. Monzón – L. Vera Candiotti - M.R. Delfino (h) – M.C.T. Sarno. Presentado en el VII Congreso Argentino de Química Analítica. Mendoza, Argentina. 01-04/10/2013.

1.6.- “Determinación de Mebendazol en Comprimidos Genéricos por Espectrofotometría en el Visible”. M.R. Delfino (h) – M.C.T. Sarno. Presentado en el VII Congreso Argentino de Química Analítica. Mendoza, Argentina. 01-04/10/2013.

1.7.- “Coeficiente de Reparto del Ibuprofeno en Presencia de Surfactante”. M.R. Delfino (h) – M. Gangemi – C.M. Mozón. Presentado en la XIX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Resistencia, Chaco, Argentina. 12-14/06/2013.

1.8.- “Disolución de Comprimidos Genéricos de Ibuprofeno Almacenados en Condiciones de Estrés. Primer Etapa”. M.C. Castro – M.R. Delfino (h) – M.C.T. Sarno. Presentado en la XIX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Resistencia, Chaco, Argentina. 12-14/06/2013.

1.9.- “Determinación Espectrofotométrica de Mebendazol para su Aplicación en Comprimidos Genéricos”. M.R. Delfino (h) – C.M. Monzón – M.C.T. Sarno. Presentado en la XIX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Resistencia, Chaco, Argentina. 12-14/06/2013.

1.10.- “Fotoestabilidad de Comprimidos de Ciprofloxacina a la Luz UV”. M.C. Castro – M.R. Delfino (h) – M.C.T. Sarno. Presentado en el XXIX Congreso Argentino de Química. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 03-05/10/2012.

1.11.- “Fotodegradación de Ciprofloxacina en Formulaciones Sólidas Orales”. M.C. Castro – M.R. Delfino (h) – M.C.T. Sarno. Presentado en las XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Corrientes, Argentina. 27-29/06/2012.

1.12.- “Construcción de Electrodos de Pasta de Carbono Utilizando Barniz Serigráfico”. M.R. Delfino (h) – E. Chaves – G.A. Gomez – S.V. Kergarabat – S.R. Hernández. Presentado en la XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Corrientes, Argentina. 27-29/06/2012.

1.13.- “Caracterización de Electrodos de Pasta de Carbono Utilizando Barniz Serigráfico”. M.R. Delfino (h) – E. Chaves – G.A. Gomez – S.V. Kergarabat – S.R. Hernández. Presentado en la

XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Corrientes, Argentina. 27-29/06/2012.

1.14.- “Determinación Espectrofotométrica de Metoclopramida en Comprimidos”. M.R. Delfino (h), S.R. Hernández, M.C.T. Sarno. Presentado en el VI Congreso Argentino de Química Analítica. Santa Fe, Argentina. 26-29/09/2011.

1.15.- “Desarrollo de un Método Espectrofotométrico para la Determinación de Metoclopramida en Comprimidos”. M.R. Delfino (h), S.R. Hernández, M.C.T. Sarno. Presentado en la XVII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Resistencia, Chaco, Argentina. 06-08/07/2011.

1.16.- “Cuantificación de Clorhidrato de Metoclopramida en Comprimidos Farmacéuticos por Micro-Kjeldahl ”. M. Delfino (h), M.C.T. Sarno y M. Delfino. Presentado en el XXVI Congreso Argentino de Química y IV Workshop de Química Medicinal. Lanús, Buenos Aires, Argentina, del 13-16/09/2010.

1.17.- “Metoclopramida: Propuesta de un Método Alternativo para su Cuantificación en Formulaciones Farmacéuticas”. M. Delfino (h), M.C.T. Sarno y M. Delfino. Presentado en la XVI Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Corrientes, Argentina. 09-11/06/2010.

1.18.- “Reacción Ninhidrina-Cefalexina con Fines Cuantitativos”. M.R. Delfino (h), M.C.T. Sarno. Presentado en el V Congreso Argentino de Química Analítica. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. 02-06/11/2009.

2.- PUBLICACIONES

2.1.- “Validation of a Quantitative Method for Cephalexin Generics Tablets Using a Chromophoric Reagent”. M.R. Delfino (h), C.M. Monzón, M.C.T. Sarno. *Current Pharmaceutical Analysis*, ISSN 1573-4129, 9(1), pp.13-19, 2013.

2.2.- “Metoclopramide–Nitrite Reaction. Validation of its Application to the Spectrophotometric Analysis of Generic Tablets”. M.R. Delfino (h), C.M. Monzón, S.R. Hernández, M.C.T. Sarno. *IOSR Journal of Pharmacy*, ISSN 2250-3013, 2 (5), pp. 27-34, 2012.

2.3.- “Electrochemical Oxidation of the Antiretroviral Drug Nelfinavir on Modified Screen-Printed Electrodes”. M.R. Delfino (h), L. Asturias Arribas, M.J. Arcos Martinez. *Electroanalysis*, ISSN 1521-4109, 28 (4), pp. 1-7, 2016. DOI: 10.1002/elan.201600073.

2.4.- “Spectrophotometric Determination of Mebendazol in Generic Tablets”. M.R. Delfino (h), C.M. Monzón, M.C.T. Sarno, M.R. Delfino. *En redacción*.

2.5.- “Novel Composite for Carbon Paste Electrodes. Application in a Flow Injection Analysis Plataform for the Dissolution Assay of Metronidazole Tablets”. M.R. Delfino (h), S.V. Kergarabat, G. Gomez, S.R. Hernández. *En redacción*.

CAPITULO XVI

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Mi agradecimiento a las siguientes instituciones que hicieron posible el presente trabajo de tesis:



UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS
ELAN



