

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
FACULTAD DE QUÍMICA.

Introducción al desarrollo y validación de un método analítico por
polarografía diferencial de pulsos, para la cuantificación de
metronidazol en materia prima y producto terminado

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGO

PRESENTA

29 9483

Martín Daniel Guadarrama Atrizco



REGIONALES
QUÍMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Rosa Lorenia Mora-Tovar y Chávez

Vocal José Alejandro Baeza Reyes

Secretario María Teresa Buentello Rodríguez

1^{er}. Suplente Juan Manuel Rodríguez

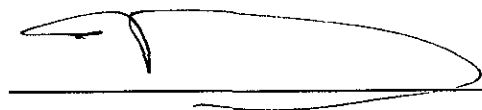
2^o. Suplente Juan Ramírez Balderas

Lugar donde se realizó el trabajo experimental:

Laboratorio de electroquímica analítica, investigación y enseñanza experimental. Anexo 3-F. Facultad de Química. UNAM.

José Alejandro Baeza Reyes

Asesor



Martín Daniel Guadarrama Atrizco

Sustentante



Índice.

Introducción	2
Planteamiento del problema	4
Hipótesis y objetivos	5
Generalidades	6
Propiedades del metronidazol	6
Farmacología	8
Principios de electroquímica	10
Polarografía	20
Polarografía diferencial de pulsos	22
Validación	25
Desarrollo experimental	28
Material y equipo	33
Resultados	34
Discusión de resultados	55
Conclusiones	57
Anexo I	58
Bibliografía	64

Introducción.

Se puede decir que el motor de la sociedad actual es la información. En la vida diaria, organizaciones e individuos toman decisiones en base a los datos obtenidos mediante un proceso analítico. De esta manera se requieren metodologías para procesos diversos como análisis de aguas residuales en química ambiental, control microbiológico de alimentos en la industria alimentaria, o de proteínas y fármacos en fluidos biológicos para un diagnóstico clínico. Es imperativo entonces, asegurar la calidad en los resultados obtenidos.

En la actualidad existen organizaciones nacionales e internacionales, que emiten normas y recomendaciones para asegurar la calidad de los resultados de los análisis^(1-2,18). En México, las metodologías analíticas utilizadas en la industria farmacéutica son contempladas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), así como en la normas emitidas por la Secretaría de Salud (SSA).

Así se establece que una metodología analítica debe cumplir, dependiendo del uso para el que fue diseñado, con características básicas. Estos parámetros son de tipo estadístico-matemático como precisión, exactitud y linealidad (Tabla 1). Además, se debe documentar y comprobar experimentalmente, mediante un estudio de validación, que se cumple con los requisitos especificados.

Sin embargo, dentro de una organización o sistema de calidad, existen otros parámetros para la evaluación de un método⁽³⁻⁴⁾. Estos son de tipo operatorio-económico como inversión y mantenimiento (Tabla 1).

Tipo matemático-estadístico	Tipo operatorio-económico
Exactitud	Inversión
Precisión	Mantenimiento
Sensibilidad	Rapidez
Selectividad	Facilidad de uso
Representatividad	Simplicidad
Linealidad	Gastos directos
Robustez	Gastos indirectos

Tabla 1. Parámetros de calidad de un método.

Cuando se desarrolla una nueva metodología o se optimiza una metodología establecida, se deben tomar en cuenta los parámetros anteriores. Aunado a esto, un profesional de la química debe considerar la seguridad del trabajador o analista y el impacto que tendrá sobre el ambiente el proceso desarrollado.

Planteamiento del problema.

En la fabricación de medicamentos se requiere realizar controles en materia prima, durante el proceso de fabricación y en producto terminado. Trabajos anteriores han demostrado que los métodos electroquímicos son una buena opción para la determinación y control de fármacos en medios diversos⁽⁵⁻⁷⁾.

La polarografía diferencial de pulsos, en particular, es una técnica analítica sensible. Se pueden manejar cantidades de muestra mínimas y se obtienen resultados rápidos y confiables, por lo que es adecuada para el desarrollo de metodologías analíticas para el control farmacéutico.

El objetivo del presente trabajo es demostrar lo anterior, desarrollando una metodología analítica por polarografía diferencial de pulsos, para la cuantificación de metronidazol materia prima y en las tabletas que se fabrican en la práctica: *compresión vía húmeda* del laboratorio de tecnología farmacéutica⁽²²⁾.

Hipótesis:

Un método analítico desarrollado para la cuantificación de metronidazol en materia prima(Metronidazol MP) y producto terminado(Tabletas) por polarografía diferencial de pulsos, produce resultados seguros, confiables y precisos.

Objetivos:

- Desarrollar un método para la cuantificación de metronidazol en materia prima y producto terminado (Tabletas), por polarografía diferencial de pulsos.
- Obtener evidencia experimental de que el método analítico desarrollado es lineal, exacto y preciso (evaluando repetibilidad y reproducibilidad), bajo las condiciones de trabajo establecidas.

Generalidades.

El estudio de los nitroimidazoles como agentes terapéuticos comienza a finales de los 50's con el descubrimiento de la Azomicina. La Azomicina (2-nitroimidazol), demostró poseer propiedades triconomicidas. Más tarde se observó que el metronidazol (1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol) poseía actividad *in vitro* e *in vivo* contra *T. vaginalis* y *E. histolytica*. Desde entonces, es utilizado con éxito en el tratamiento de diversos padecimientos.

En México existen diversos productos en el mercado que contienen metronidazol como principio activo. Las presentaciones incluyen tabletas, óvulos cápsulas, suspensiones y soluciones inyectables⁽⁹⁾.

Propiedades del Metronidazol^(6-7,10).

Es un compuesto heterocíclico formado por un anillo imidazólico. Su nombre químico es 1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (figura 1). El grupo funcional imida le proporciona propiedades ácido-base a la molécula. Las propiedades de óxido-reducción están determinadas por el grupo nitro en la posición 5.

Generalidades.

El estudio de los nitroimidazoles como agentes terapéuticos comienza a finales de los 50's con el descubrimiento de la Azomicina. La Azomicina (2-nitroimidazol), demostró poseer propiedades triconomicidas. Más tarde se observó que el metronidazol (1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol) poseía actividad *in vitro* e *in vivo* contra *T. vaginalis* y *E. histolytica*. Desde entonces, es utilizado con éxito en el tratamiento de diversos padecimientos.

En México existen diversos productos en el mercado que contienen metronidazol como principio activo. Las presentaciones incluyen tabletas, óvulos cápsulas, suspensiones y soluciones inyectables⁽⁹⁾.

Propiedades del Metronidazol^(6-7,10).

Es un compuesto heterocíclico formado por un anillo imidazólico. Su nombre químico es 1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol (figura 1). El grupo funcional imida le proporciona propiedades ácido-base a la molécula. Las propiedades de óxido-reducción están determinadas por el grupo nitro en la posición 5.

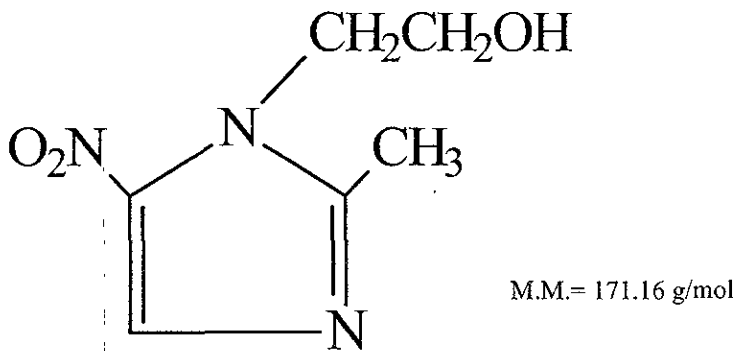


Figura 1. Estructura del metronidazol.

Es estable al aire, pero se oscurece al exponerse a la luz. Son cristales blancos con ligera coloración amarilla, funde entre 159°C y 162 °C. La solubilidad en agua es de 10.5 mg/mL a 25°C, 32.5 mg/mL en metanol y 15.4 mg/mL en etanol. Muy soluble en acetona.

Se ha estudiado el mecanismo de reducción del grupo nitro del metronidazol en agua⁽⁷⁾. Esto es importante, ya que la actividad antiparasitaria requiere la reducción de este grupo. Además, el estudio del comportamiento electroquímico del metronidazol es la base para el desarrollo de una metodología analítica por polarografía.

Se proponen nuevos métodos para la determinación de metronidazol pero no hay un estudio estadístico de estos. Se proponen métodos cromatográficos⁽²⁶⁾, electroquímicos con electrodos modificados^(25,28) y espectrofotométricos⁽²⁷⁾. Las metodologías son complicadas para un análisis de rutina.

Farmacología^(8,23).

El metronidazol es activo contra diversos protozoos y bacterias anaerobias. Tiene acción triconomicida directa (0.05 µg/mL en medio anaeróbico). Posee actividad amebicida contra *E. histolytica* y a concentraciones de 1 a 50 µg/mL *in vitro*, afecta de manera directa a trofozoitos de *G. lamblia*. Posee actividad antibacteriana contra cocos anaerobios, bacilos Gramnegativos anaerobios, incluyendo especies de *Bacteroides*, y bacilos Grampositivos anaerobios productores de esporas.

Farmacocinética.

Una vez ingerido se absorbe de manera completa y rápida. Con una dosis de 500 mg se obtienen concentraciones plasmáticas de 10 µg/mL aproximadamente (la concentración efectiva es de 8 µg/mL o menos en la mayoría de los casos). La vida media es de aproximadamente 8 h y el valor de distribución es cercano al del agua corporal total. 10 % del compuesto se encuentra ligado a proteínas. Se distribuye a líquidos y tejidos corporales incluyendo secreciones vaginales, líquido seminal, saliva y leche materna. En el líquido cefalorraquídeo también se alcanzan niveles terapéuticos. El hígado es el principal órgano donde se metaboliza el metronidazol. Los metabolitos producto de la oxidación del metronidazol, poseen actividad antimicrobiana.

Farmacodinamia.

Posee actividad selectiva contra microorganismos anaerobios o microaerófilos. Se puede considerar un profármaco, ya que se necesita una activación metabólica por parte del microorganismo. Una vez que se ha difundido al interior de la célula, el grupo nitro acepta electrones de proteínas transportadoras como la ferredoxina o su equivalente en protozoos y bacterias. La actividad antimicrobiana del metronidazol, quizá es consecuencia de diversas especies reactivas que se forman durante la reducción del grupo nitro, hasta la formación de la hidroxilamina. Se postula que estos intermediarios reaccionan con macromoléculas como DNA, proteínas y membranas.

Aplicaciones terapéuticas.

Debido a la toxicidad del metronidazol, así como a las precauciones que se deben tomar durante el embarazo y con pacientes pediátricos, las indicaciones para el uso del metronidazol son muy específicas:

Indicaciones.

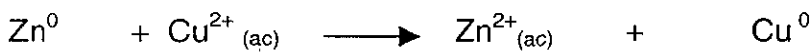
- 1.- Infecciones causadas por *Bacteroides fragilis* usualmente se administra junto con un amino glucósido o algún fármaco específico para bacterias Gram negativas.
- 2.- Vaginosis bacterial.
- 3.- Infecciones causadas por *Tricomonas vaginalis*.
- 4.- Giardiasis.
- 5.- De primera elección para colitis causada por *Clostridium difficile*.
- 6.- Profilaxis para cirugía colorrectal.
- 7.- Meningitis anaeróbica (junto con beta lactámicos).
- 8.- Infecciones causadas por *Entamoeba histolytica*: disentería y absceso hepático.
- 9.- Tratamiento de úlcera / gastritis causada por *Helicobacter pylori*. (Se administra junto con amoxicilina, tetraciclina o doxiciclina).

Principios de electroquímica⁽¹¹⁻¹⁴⁾.

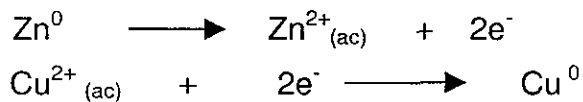
Reacciones de óxido-reducción.

Una reacción de óxido-reducción se puede dividir en dos partes o semirreacciones: una en la cual la especie reactiva se oxida (pierde electrones), y otra en la cual la especie reactiva se reduce (gana electrones).

Un ejemplo es el siguiente:



En esta reacción el Zn se oxida y el Cu^{2+} se reduce. Las semirreacciones son:



Se habla de un sistema homogéneo cuando las especies reactivas se encuentran en la misma fase, por ejemplo en solución acuosa. En un sistema heterogéneo existen dos o más fases. En electroquímica, la primera fase puede estar constituida por un electrolito, como una solución líquida o una sal fundida. La segunda fase puede ser otro electrolito o bien un conductor sólido. Los conductores pueden ser metales o bien, semiconductores.

Celdas electroquímicas.

Experimentalmente se trabaja con una colección de interfases llamada celda electroquímica, que de manera general se define como dos electrodos separados por al menos una fase electrolítica.

La reacción de Zn^0 con Cu^{2+} se puede esquematizar de la siguiente manera:



La línea vertical representa una interfase, la doble línea vertical indica el puente salino que cierra el circuito eléctrico sin que se pongan en contacto ambas soluciones. Para indicar que dos componentes se encuentran en la misma fase se utiliza una coma.

Las celdas electroquímicas en las que interviene una corriente de electrólisis se pueden clasificar como galvánicas o electrolíticas (figura 2). En una celda galvánica, la reacción electroquímica ocurre de manera espontánea. La energía química se transforma en energía eléctrica. En una celda electrolítica la reacción electroquímica se lleva a cabo por la imposición de un voltaje mayor al del potencial reversible de celda. Este tipo de celdas se utilizan en la electrosíntesis de diversos compuestos. En ambas celdas, el electrodo en el que ocurre la reducción se llama cátodo y el electrodo en el que ocurre la oxidación se llama ánodo.

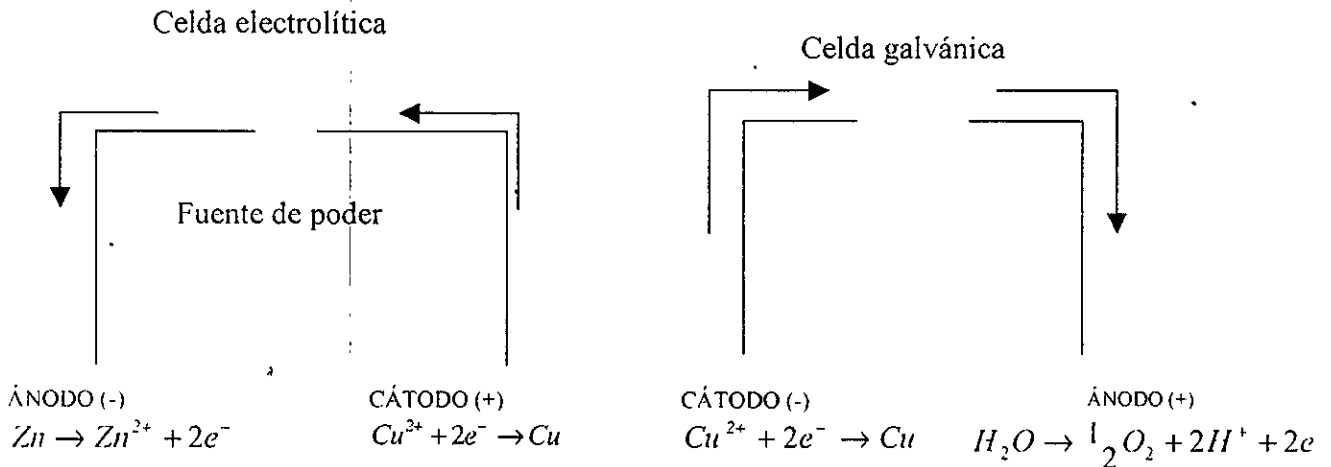
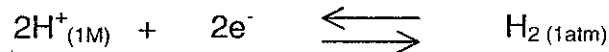


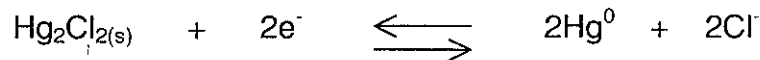
Figura 2. Celdas electroquímicas.

Potencial de celda.

En la mayoría de los casos, sólo interesa la reacción que ocurre en uno de los electrodos, el cual es llamado electrodo de trabajo o indicador. Para realizar este estudio se toma como referencia una media celda. La referencia primaria aceptada internacionalmente es el electrodo estándar de hidrógeno (EEH) o electrodo normal de hidrógeno (ENH).



Sin embargo, se emplean con mayor frecuencia otras dos referencias: calomel y plata-cloruro de plata. El nombre de calomel se empleaba para referirse al cloruro mercurioso Hg_2Cl_2 . La reacción redox de semicelda es:

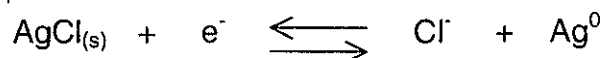


Cuando la solución de cloruro que se emplea es KCl acuoso saturado y contiene exceso de cristales de KCl presentes, el electrodo se llama de calomel saturado (ECS). Se representa de la siguiente manera:

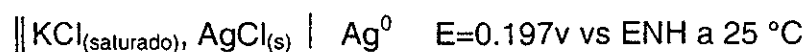


El valor de potencial con respecto al ENH a 25°C es de 0.241 v.

En la referencia de plata-cloruro de plata, la semireacción es la siguiente:



esta celda puede ser un alambre de plata recubierto con AgCl y sumergido en una solución de KCl, la reacción de semicelda se representa así:



El potencial del electrodo de referencia es fijo, por lo que cualquier cambio en la celda es atribuible al electrodo de trabajo. De esta manera, decimos que observamos o controlamos el potencial del electrodo de trabajo con respecto a la referencia.

Considérese el siguiente sistema:



Por convención: $E_{\text{registrado}} = E_{\text{Zn}^{2+}} + E_{\text{referencia}}$

Por definición: $E_{\text{referencia}} = 0.$

Si la actividad de Zn^{2+} es igual a la unidad, se le denomina potencial estándar de media celda E^0 .

Electroquímica.

El principio básico para estudiar un sistema, es la aplicación de una excitación (por ejemplo potencial, E) y la observación de la respuesta, (por ejemplo variación de la intensidad con el tiempo).

La reacción electroquímica depende de cuatro variables: el potencial, la intensidad de corriente, la concentración de las especies electroactivas y el tiempo $F(E, i, C, t) = 0.$

Si se utilizan microelectrodos, la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución no cambia de manera significativa. Si el proceso es independiente del tiempo, entonces la función anterior se puede expresar así:

$$F(E, i) = 0 \quad \text{ó} \quad E = F(i)$$

Para monitorear una reacción electroquímica se utiliza un electrodo para la caracterización de la reacción (electrodo de trabajo), un electrodo para cerrar el circuito electroquímico (electrodo auxiliar) y un electrodo de composición constante y conocida (electrodo de referencia). La siguiente figura muestra un esquema de este sistema:

C: celda de electrólisis

T= electrodo de trabajo

A= electrodo auxiliar

R= electrodo de referencia

E= potenciómetro para medir
El potencial de T con respecto a R

I = microamperímetro para medir
la corriente en la celda.

V= potencioestado para imponer una
diferencia de potencial constante
entre T y A.

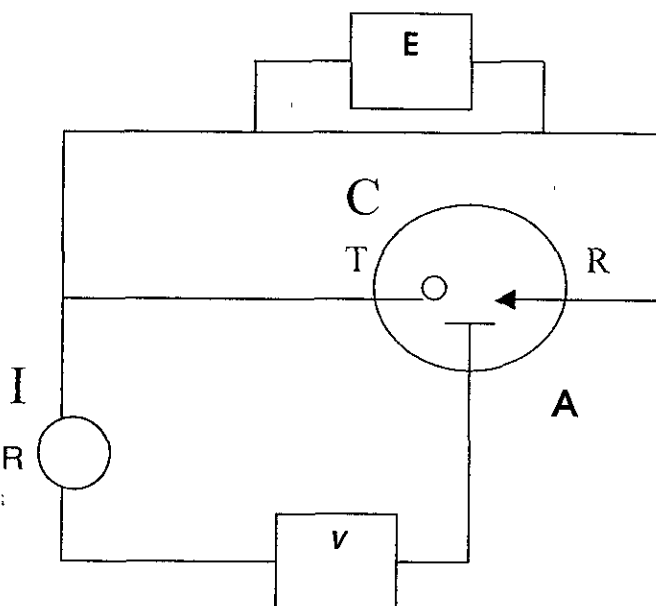


Figura 3. Sistema electroquímico.

En este contexto, cuando no hay reacción química ni transferencia de carga, $E = E_{eq}$, es decir, el sistema se encuentra en equilibrio. Termodinámicamente se espera que al imponer un potencial diferente a E_{eq} , se produzca un cambio en la relación $|Ox| / |Red|$, hasta llegar nuevamente al equilibrio.

La ecuación que relaciona el potencial E y la concentración de las especies que participan en la semireacción (Ox y Red) es la ecuación de Nernst:

$$E = E^{0'} + \frac{0.0591}{n} \log \frac{Ox}{Red}$$

donde:

E = potencial de celda o electroquímico.

$E^{0'}$ = potencial normal de reducción del par redox, con respecto al electrodo de referencia.

n = número de electrones en la reacción.

|Ox| = Concentración de la especie Ox al electrodo.

|Red| = Concentración de la especie Red al electrodo.

De esta manera, si el potencial impuesto E es mayor a E_{eq} , se espera lo siguiente: dado que $E \propto \log \frac{C_{Ox}}{C_{Red}}$ si $E \uparrow \Rightarrow C_{Ox} \uparrow$ es decir, se favorece la reacción de oxidación ($Red \rightarrow Ox + ne^-$).

Si el potencial impuesto E es menor que E_{eq} , se espera lo siguiente: si $E \downarrow \Rightarrow C_{Ox} \downarrow$, es decir, se favorece la reacción de reducción ($Ox + ne^- \rightarrow Red$).

Curvas I/E.

Determinando la corriente como una función del potencial, se obtiene información acerca de la reacción al electrodo y ciertos nombres son asociados con la forma de las curvas obtenidas. De este modo, polarización se refiere a la desviación del potencial del electrodo de su valor de potencial de equilibrio (reversible) con el paso de una corriente faradaica (figura 4a). Un electrodo ideal polarizado, es aquel que muestra un cambio considerable en el potencial con el paso de una corriente infinitesimal. Un electrodo ideal no polarizado es aquel cuyo potencial no cambia con el paso de una corriente, es decir, es un electrodo de potencial fijo (figura 4b). Una medida del grado de polarización es el sobrepotencial, η , el cual es la desviación del potencial de su valor de equilibrio:

$$\eta = E - E_{eq}$$

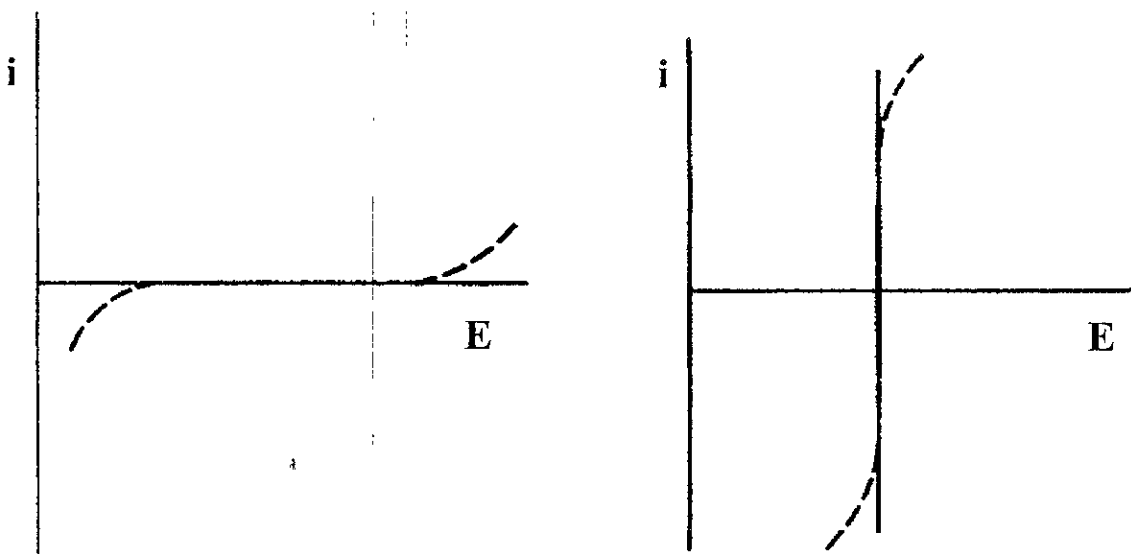


Figura 4. a) Electrodo ideal polarizado. b) Electrodo ideal no polarizado.

Cuando se mide la diferencia de potencial, no sólo se mide la que se impone entre los electrodos, esto es:

$$\Delta E_{medido} = (E_i + E_j + IR) - E_{ref}$$

donde E_i es el potencial que se impone mediante un potenciostato. E_j es el potencial de unión líquida, el cual se forma cuando dos fases iónicas separadas en forma semipermeable se ponen en contacto; IR es el potencial debido a la resistencia de todo el circuito (Ley de Ohm) y E_{ref} es el potencial del electrodo de referencia. Los valores de IR y de E_j tienen valores muy pequeños si se usan membranas de separación adecuadas o si se usan microelectrodos y si se trabaja en presencia de sales iónicas concentradas para disminuir la resistencia de la celda.

De igual manera, cuando se mide la intensidad de corriente su valor es el resultado de diferentes aportes:

$$i_{medida} = i_{capacitiva} + i_{faradaica}$$

donde $i_{capacitiva}$ es la corriente que aparece al formarse la doble capa eléctrica en la interfase electrodo solución. La $i_{faradaica}$ es la corriente faradaica o de electrólisis, la cual es un indicativo de la velocidad de la reacción electroquímica.

La cinética de la reacción electroquímica está determinada por la cinética de procesos como:

- Transferencia de masa: de la especie electroactiva del seno de la disolución, a la superficie del electrodo.
- Transferencia de electrones a la superficie del electrodo.
- Presencia de reacciones químicas antes o después del proceso de transferencia de electrones.
- Otras reacciones. Adsorción o electrodeposición.

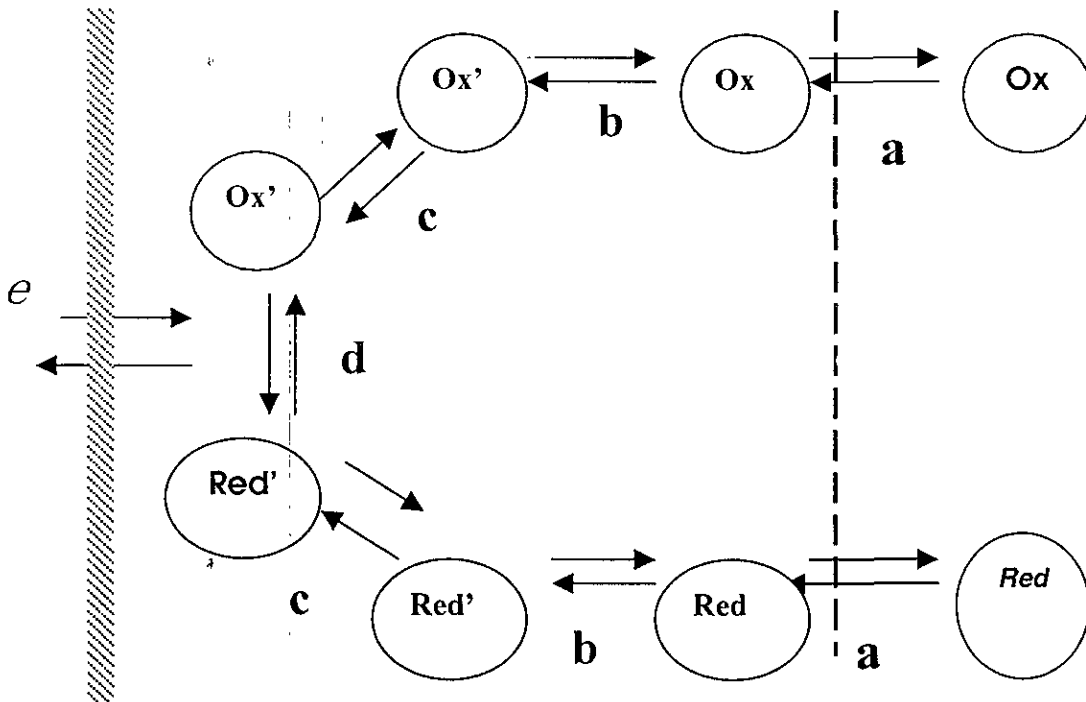


Figura 5. Etapas de la reacción $Ox + ne \leftrightarrow Red$ al electrodo. a) Transferencia de masa. b) Reacción química. c) Fenómenos de adsorción. d) Transferencia de electrones.

Transporte de masa.

El transporte de masa juega un papel importante en electroquímica. Los mecanismos de transporte de masa son:

- Migración: movimiento de iones en la solución bajo la influencia de un campo eléctrico (un gradiente de potencial eléctrico).
- Difusión: movimiento de una especie bajo la influencia de un gradiente de concentración.
- Convección: movimiento causado por agitación o bien como un efecto de gradiente de temperatura.

La ecuación de Nernst-Planck, describe el transporte de masa al electrodo, en una dimensión sobre un eje x:

$$J_i(x) = -D_i \frac{\partial C_i(x)}{\partial x} - \frac{z_i F}{Rt} D_i C_i \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} + C_i v(x)$$

donde $J_i(x)$ es el flujo de la especie i ($\text{mol s}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a una distancia x de la superficie, D_i es el coeficiente de difusión (cm^2/s), $\partial C_i(x)/\partial x$ es el gradiente de concentración a la distancia x , $\partial \phi(x)/\partial x$ es el gradiente de potencial, z_i y C_i son la carga y la concentración de la especie i respectivamente, y $v(x)$ es la velocidad (cm/s) hidrodinámica en la dirección x .

Debido a que la corriente eléctrica es proporcional al flujo de materia (J) que llega al electrodo para efectuar una reacción electroquímica, la corriente que se registra estará en función de los aportes de difusión, migración y convección.

$$i = -nFAJ \quad A \text{ es el área del electrodo}$$

Para relacionar el valor de corriente con la concentración del analito o del compuesto de interés, se pueden realizar manipulaciones experimentales a fin de controlar o minimizar el transporte por migración (agregando sales iónicas concentradas) y el transporte por convección (utilizando una disolución sin agitar o bien con agitación constante); bajo estas condiciones, el flujo de materia está determinado por difusión:

$$J(x,t) = -D \frac{\partial C(x,t)}{\partial x}$$

de esta manera, la corriente registrada está determinada por la difusión de la especie y será proporcional al gradiente de concentración de la especie electroactiva:

$$i = nFAD \frac{\partial C(x,t)}{\partial x}$$

Voltamperometría.

La Voltamperometría se refiere al conjunto de métodos electroanalíticos en los cuales la información sobre el analito se obtiene a partir de medidas de la intensidad de corriente en función de un potencial aplicado, en condiciones que favorezcan la polarización del electrodo indicador o de trabajo. Experimentalmente se tienen diferentes programas de perturbación que dan lugar a una respuesta característica y que es la base del método:

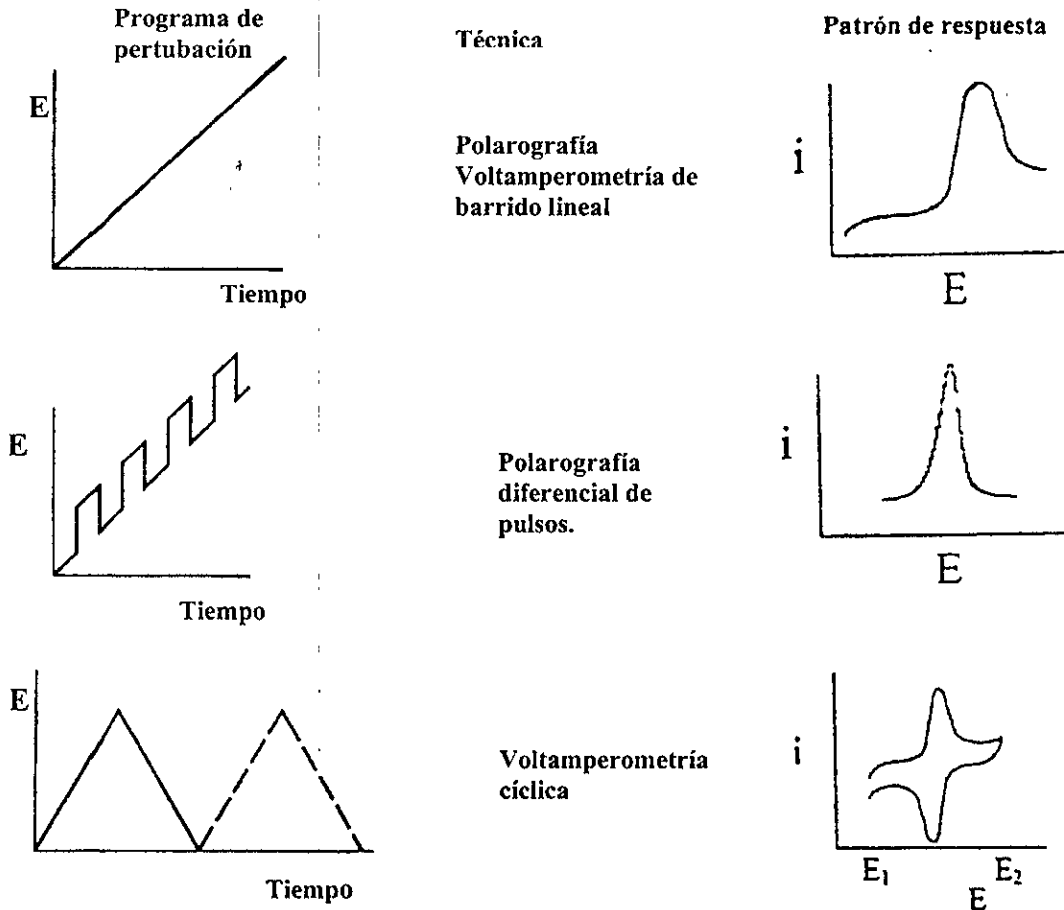


Figura 6. Programas de perturbación utilizados en Voltamperometría.

Polarografía.

La Polarografía es una técnica voltamperométrica que utiliza el electrodo goteante de mercurio (DME) como electrodo de trabajo, en una solución sin agitación mecánica. Se obtiene un *polarograma* al registrar la corriente obtenida en el sistema al realizar un barrido de potencial lineal. Se observa que a determinado potencial, dependiendo de la especie electroactiva, hay un aumento de la corriente registrada hasta llegar a un valor límite que está determinado por la difusión de la especie a la superficie del electrodo. Las fluctuaciones de la corriente corresponden al crecimiento y pérdida de la gota de mercurio del electrodo.

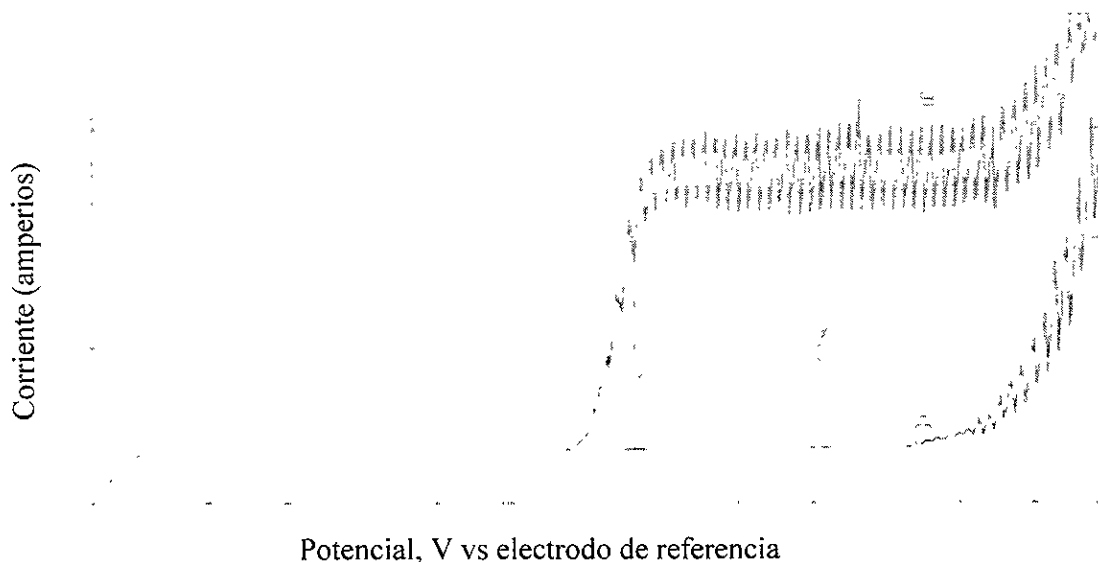


Figura 7. Polarograma. A) Electrolito soporte. B) Especie electroactiva.

La corriente residual en ausencia del analito, es decir, sólo el electrolito soporte, es utilizada como una línea base para calcular el valor de i_d . La ecuación de la onda polarográfica que define la parte sigmoidea para un sistema reversible es:

$$E = E_{1/2} + \frac{0.0591}{n} \log \frac{i_d - i}{i}$$

donde i es la corriente que corresponde a un potencial particular E . El potencial de media onda $E_{1/2}$ es el potencial al cual $i = i_d/2$.

El potencial de media onda se relaciona con el potencial formal de reducción $E^{0'}$ de la siguiente manera:

$$E_{1/2} = E^{0'} + \frac{0.059}{n} \log \frac{D_{Red}^{1/2}}{D_{Ox}^{1/2}} - E_{ref}$$

donde D es el coeficiente de difusión de la especie. $E_{1/2}$ es característico de la especie y se utiliza para identificación cualitativa.

La ecuación de Ilkovic que define la corriente i_d es la siguiente:

$$i_d = knm^{2/3} D^{1/2} t_d^{1/6} C$$

donde:

- i_d = Corriente de difusión, μA .
- n = Número de electrones.
- D = Coeficiente de difusión de la especie, cm^2/s .
- m = Velocidad de flujo de mercurio del electrodo, mg/s .
- k = Constante (708 para corriente máxima. 607 para corriente promedio).
- C = Concentración, $mmol/L$.

El oxígeno disuelto en la solución, da lugar a dos ondas en el polarograma. La primera es la reducción del O_2 a H_2O_2 y la segunda a H_2O . El límite en el potencial negativo está definido por la reducción del electrolito soporte; el límite en el potencial positivo es la oxidación del mercurio. El oxígeno disuelto se desplaza con el burbujeo de N_2 para evitar que interfiera con alguna señal de interés. Otro fenómeno que se observa en polarografía, es la aparición de máximos polarográficos. Estos pueden resultar del flujo hidrodinámico de solución alrededor de la gota de mercurio en expansión. Se caracteriza por una corriente elevada que disminuye de manera abrupta durante el barrido de potencial. Usualmente se eliminan por la adición de un agente surfactante como Triton-X.

Polarografía diferencial de pulsos.

En esta técnica se utiliza el electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo, sin embargo, el barrido de potencial, se realiza imponiendo un pequeño pulso coordinado, de tal manera que corresponda a una gota de mercurio exactamente antes de la caída de la gota (figura 8). El tiempo de goteo es controlado por un martillo que puede ser ajustado para que el tiempo de vida de la gota corresponda al período de generación del pulso. El pulso es aplicado antes de la caída de la gota, cuando la superficie de la gota se encuentra en su valor máximo. El periodo de aplicación del pulso y de tiempo de goteo, es usualmente de 0.5 a 5 segundos. La magnitud del pulso típicamente se encuentra entre 5 y 100 mV.

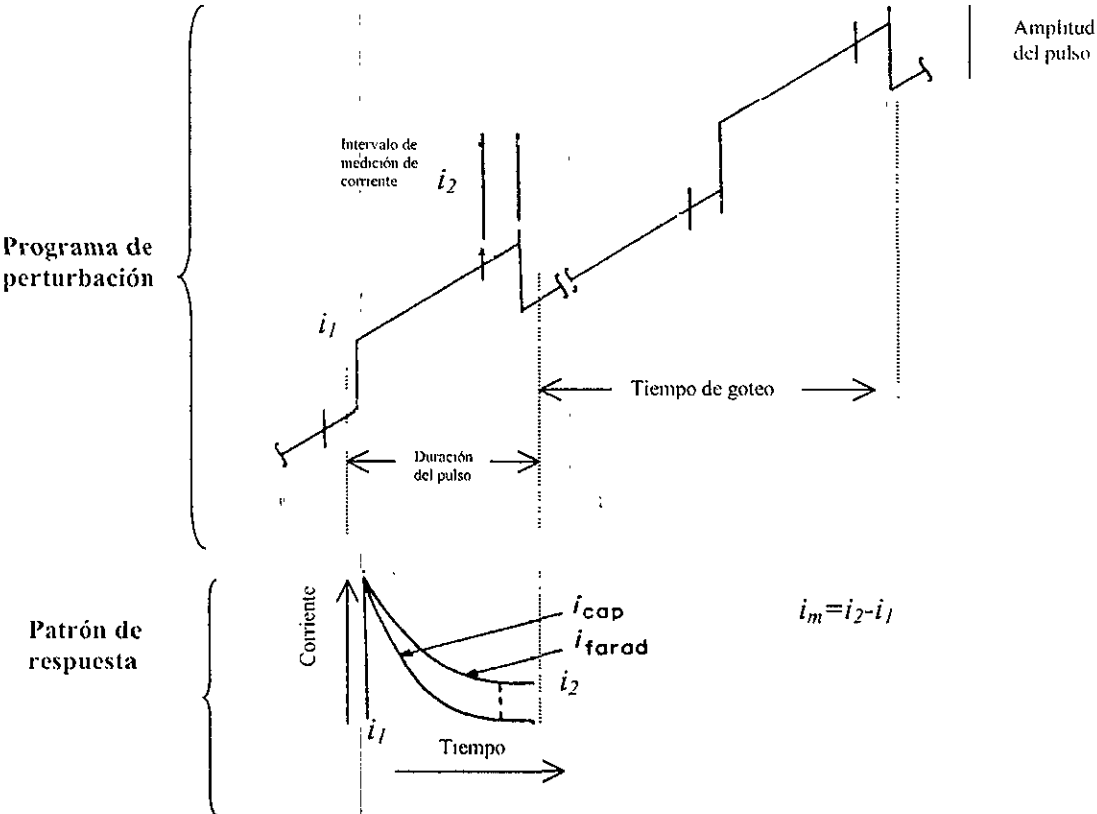


Figura 8. Perturbación por aplicación de pulso y corriente generada con respecto al tiempo.

La corriente se mide antes de cada pulso (i_1) y al final del pulso (i_2). La diferencia de estas dos corrientes, es registrada para cada pulso (Figura 8). Cuando el pulso es aplicado, se registra un valor de corriente que posteriormente decae con el tiempo. La corriente capacitiva decae rápidamente (i_{cap}). La corriente faradaica decae de manera más lenta (i_{farad}). Al medir la corriente al final del pulso, cuando la corriente capacitiva ha decaído, se minimiza la interferencia debida a i_{cap} . Esto resulta en un menor límite de detección, en comparación con la polarografía clásica.

El polarograma obtenido se observa como un pico a determinado potencial (E_p) que corresponde al $E_{1/2}$ de la polarografía clásica (Figura 9). La estequiometría de intercambio de e^- , se relaciona con el valor de w y la altura del pico es proporcional a la concentración. De esta manera, se pueden realizar determinaciones cuantitativas midiendo i_p .

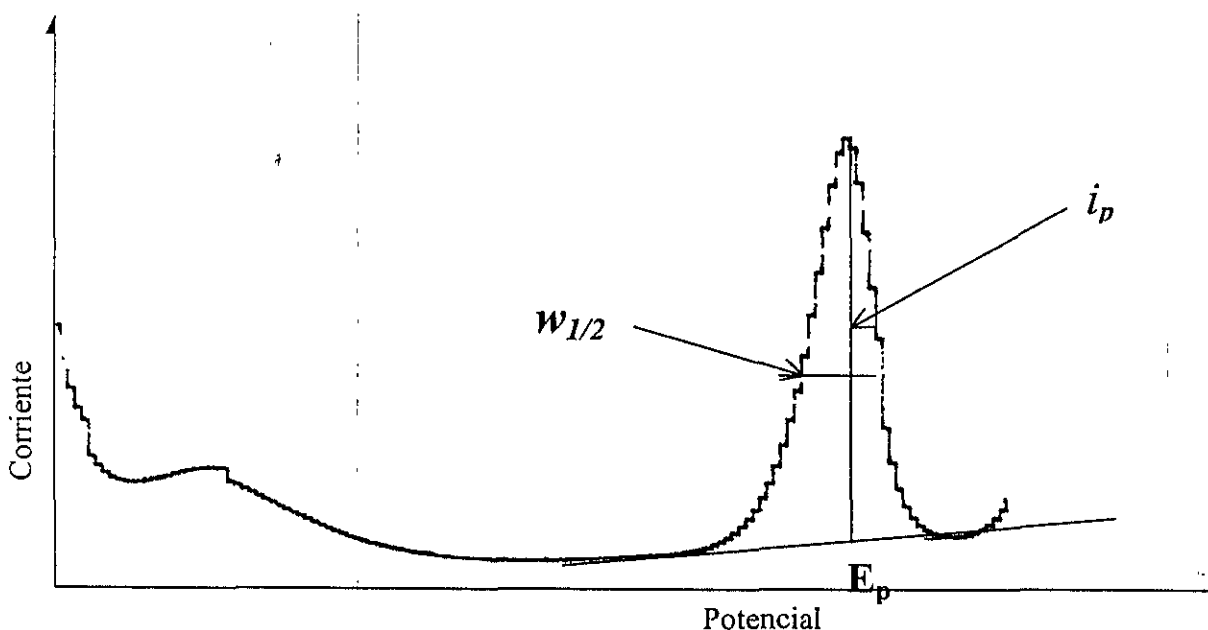


Figura 9. Polarograma obtenido por polarografía diferencial de pulsos. Metronidazol 0.01 mol/L en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH=2.0.

En el caso de metodologías para cuantificar un determinado analito, la polarografía diferencial de pulsos (PDP), presenta ciertas ventajas respecto a la polarografía clásica (PC):

- Debido a que se minimiza el aporte de corriente capacitiva, la PDP presenta un menor límite de cuantificación, por lo que se pueden manejar cantidades menores de muestras.
- Ya sea en comparación directa (curva de calibración) o adición de estándar, en PDP, sólo se determina I_p , lo que facilita su interpretación y disminuye la aportación de error de otras mediciones. En PC se determina i_l , i_r , E e i_d (Figuras 7 y 9).
- Por otra parte, la PDP es una técnica rápida, ya que se pueden emplear velocidades de barrido hasta de 100 mV/s.

Validación⁽¹⁵⁻¹⁹⁾

La validación se define como el proceso mediante el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros que se aplican de acuerdo a una clasificación basada en su uso o finalidad.

Tabla 2. Requerimientos mínimos para la validación de un método analítico⁽¹⁷⁾.

Parámetro	Biodisponibilidad	Indicadores de estabilidad		Control de calidad
		Bajas concentraciones	Altas concentraciones	
Exactitud	Si	Si	Si	Si
Precisión (repetibilidad)	Si	Si	Si	Si
Precisión (reproducibilidad)	Si	Si	Si	Si
Especificidad	Si	Si	Si	Si
Límite de detección	Si	Si	No	No
Límite de cuantificación	Si	Si	No	No
Linealidad	Si	Si	Si	Si
Intervalo	Si	Si	Si	Si
Tolerancia	Si	Si	Si	No

De acuerdo a la tabla 2, los parámetros a evaluar para un método indicador de control de calidad, son los siguientes:

Exactitud	Linealidad
Precisión (repetibilidad)	Intervalo
Precisión (reproducibilidad)	Especificidad

Definiciones.

Linealidad. La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Intervalo. Está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es exacto, preciso y lineal.

Exactitud. Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Precisión. Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

- a) *Repetibilidad.* Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).
- b) *Reproducibilidad.* Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

Especificidad. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Tolerancia. La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, condiciones ambientales, etc.

Estabilidad de la muestra analítica. Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

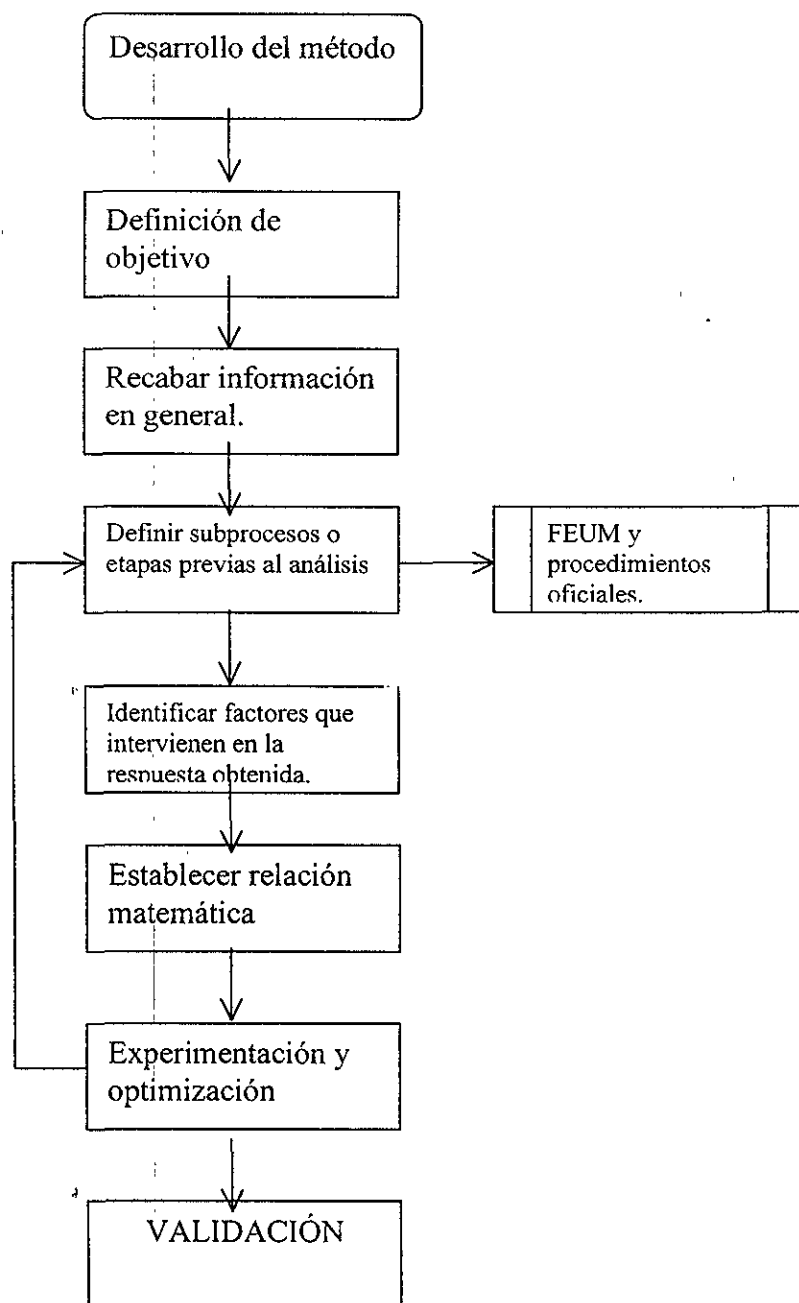
Límite de detección. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación. Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Desarrollo experimental.

1.- Desarrollo del método.

El proceso de desarrollo del método se puede esquematizar de la siguiente manera:



Definición de objetivo.

- Muestra. Identificación de analito: Metronidazol materia prima(MP) y Metronidazol en tabletas.
- Propiedades físicoquímicas (solubilidad, pKa).
- Técnica analítica: en este caso Polarografía diferencial de Pulsos.
- Alcance. Método para la cuantificación de Metronidazol MP y metronidazol en producto terminado (Tabletas).

Información general:

Se reporta que los polarogramas por PC y PDP para el metronidazol en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (pH=2), presentan una onda asociada a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina. Se observa que la altura registrada es proporcional a la concentración. $E = -168 \text{ mV/ ECS}$ y $-430 \text{ mV/ (Ag/AgCl/KCl)}$.

Subprocesos.

Tratamiento de la muestra:

Materia prima.- Pesar 50 mg de Metronidazol MP, transferir a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver en agua destilada y llevar al aforo con agua destilada (temperatura ambiente).

Tabletas.- Determinar el peso promedio de 20 tabletas, triturar finamente y homogeneizar el polvo. Pesar el equivalente a 50 mg de metronidazol. Debido a que los excipientes de la tableta no se disuelven en agua, dan un aspecto turbio a la muestra. Por esta razón se estudia el proceso de disolución del metronidazol con respecto al tiempo:

- El equivalente a 50 mg de Metronidazol se transfiere a un vaso de precipitados con 40 mL de agua destilada temperatura ambiente.
- Se cuantifica el Metronidazol en solución a diferentes tiempos (5,10,15,20,25,30 y 35 minutos).

- Se comparan con el Metronidazol disuelto a $t = 0$ y con la cantidad de metronidazol en solución después de realizar una extracción con acetona.

Identificación de factores que influyen en la respuesta obtenida.

- Para el desarrollo de la metodología se utiliza Metronidazol BP, el cual se utilizó como estándar. Se traza el polarograma utilizando como medio solución amortiguadora de fosfatos 0.1M (pH = 2.0). Se ajustan las condiciones del equipo para obtener una respuesta adecuada (intensidad de corriente).
- Se realiza una curva intensidad de corriente vs concentración en la celda de trabajo para encontrar la concentración a la que se obtiene una respuesta adecuada.
- El oxígeno presente en solución interfiere con la señal asociada al Metronidazol, por lo que previo al registro del polarograma para el Metronidazol, se burbujea N_2 para desplazar al oxígeno de la solución. Se desea encontrar el tiempo óptimo de burbujeo de N_2 .

Relación matemática.

- Se evalúan las metodologías a utilizar: adiciones de estándar o curva de calibración.
- Se establece la relación matemática entre respuesta obtenida y la cantidad de metronidazol en la muestra.

Experimentación y Optimización.

- Se establece el número de polarogramas por muestra, réplicas y el número de adiciones del estándar para la metodología analítica.
- Se seleccionan las condiciones adecuadas de tiempo de disolución, tiempo de burbujeo de N_2 y tiempo de agitación.

2.- Validación del método.

Pruebas del sistema.

Linealidad del sistema.- Se construye una curva de calibración utilizando 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón que contiene solamente el analito. Las diluciones son al 50, 75, 100,125 y 150 % de la concentración del principio activo. Se considera el 100% como la concentración de la muestra en la solución final a analizar, que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación. Ésta se determinó previamente en la etapa de desarrollo. Cada dilución se analiza por triplicado.

Precisión del sistema.- Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución del analito correspondiente al 100 %.

Pruebas del método.

Linealidad del método.- Se determina a partir de placebos adicionados de Metronidazol BP al 50, 75, 100,125 y 150 % de manera independiente. El análisis se realiza por triplicado.

Exactitud y repetibilidad.- Se determinan en 6 placebos adicionados de Metronidazol BP de manera independiente, con la cantidad necesaria para obtener el 100%.

Precisión (evaluada como reproducibilidad).- Se determina a partir del análisis de un lote de placebo adicionado de Metronidazol BP, en la concentración del 100% , analizado por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

Especificidad.- Se analizan los placebos que contienen todos los componentes de la formulación, excepto metronidazol, y placebos cargados con metronidazol al 100%. Se identifican las respuestas del activo y de los excipientes.

Estabilidad de la muestra analítica.- se comparan los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones de almacenaje: refrigeración en frasco oscuro (24h), temperatura ambiente en frasco oscuro (24h) y refrigeración (72h) en frasco oscuro.

Tabla 3. Criterios de aceptación para la validación del método analítico.

Característica	Criterio de aceptación
Linealidad del sistema	CV \leq 1.5% $r^2 \geq$ 0.98
Precisión del sistema	CV \leq 1.5%
Linealidad del método	$r^2 \geq$ 0.98, $m \approx$ 1, $b \approx$ 0
Exactitud	Recobro 98-102 %
Repetibilidad	CV \leq 2%
Reproducibilidad	CV \leq 2%
Especificidad	No hay interferencia.
Estabilidad de la muestra analítica	$C_1 - C_2 \approx$ 0 o menor a 2%
Intervalo	*

*El intervalo se define a partir de los resultados de linealidad del sistema y linealidad del método.

Material.

- Matraces volumétricos de 10, 25, 50, 100 y 1000 mL.
- Pipetas volumétricas de 5 mL.
- Vasos de precipitados de 10, 50, y 100 mL.
- Mortero con pistilo.
- Agitador magnético.
- Tubos Ependorf.
- Celdas polarográficas.
- Micropipetas de 50 a 200 μL
- Piseta.
- Espátula.

Reactivos y disoluciones.

- Disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 mol/L, pH = 2.0.
- Agua destilada.
- Nitrógeno.
- Metronidazol BP.
- Metronidazol materia prima.
- Metronidazol tabletas.
- Placebos.

Equipo.

- Polarógrafo Metrohm 626 AGCH – 9100 Herisau Series 01.
- Electrodo Metrohm 663 VA Stand Series 05.
- Electrodo de trabajo: electrodo goteante de mercurio.
- Electrodo de referencia: electrodo de plata-cloruro de plata.
- Electrodo auxiliar: alambre de oro.

Resultados.

Condiciones de trabajo:

5 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH = 2.0 (0.1 mol/L).

15 minutos de burbujeo de N₂.

V₁= 0.5 V, V₂ = -1.35 V.

Sensibilidad: 5 nA/mm.

Tiempo de goteo: 1 gota/s.

Velocidad de barrido de potencial: 10 mV/s.

Velocidad de papel: 100 mV/cm.

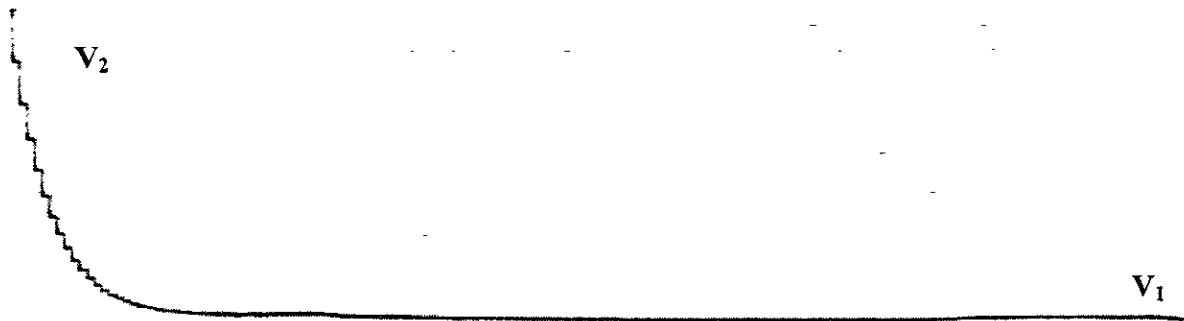
Pulso: DP50.

Tamaño de gota: drop size 2.

SMDE.

Dominio de electroactividad.

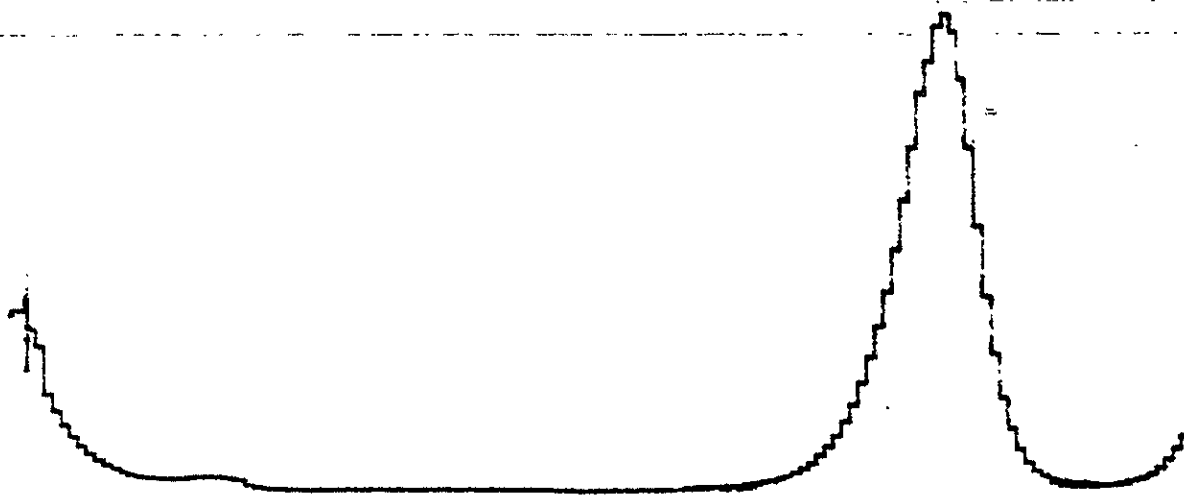
En la siguiente figura se observa que después de 5 minutos de burbujeo no se presenta señal de reducción en las condiciones establecidas.



Polarograma: solución de Metronidazol BP.

Concentración final en la celda: 1.73×10^{-4} mol/L (29.6 µg/mL).

En esta figura se observa la señal de reducción asociada al metronidazol. E_p se presenta aproximadamente a -0.12V vs el electrodo de plata-cloruro de plata.



V₁= 0.15 V, V₂= -1.35 V

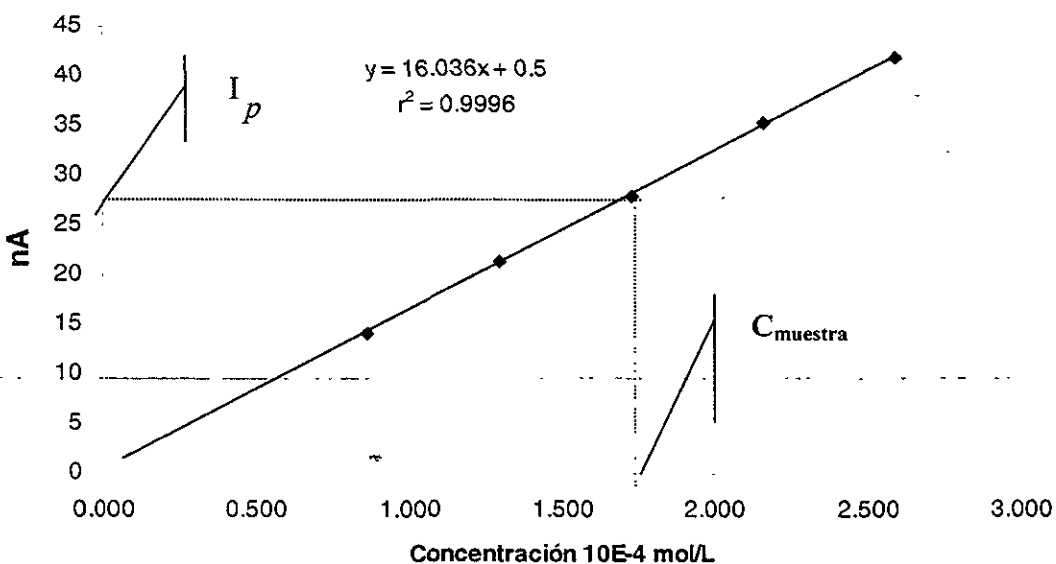
Curva de calibración.

Para encontrar la metodología adecuada a utilizar, se construye una curva de calibración utilizando Metronidazol BP.

mg/mL	%	mmol/mL	$\times 10^{-4}$ mol/L	$\mu\text{g/mL}$	nA
0.0148	50	0.000087	0.866	14.8	14.3
0.0222	75	0.000130	1.298	22.2	21.5
0.0296	100	0.000173	1.731	29.6	28.0
0.0370	125	0.000216	2.164	37.0	35.5
0.0444	150	0.000260	2.597	44.4	42.0

Una vez que se tiene la curva de calibración, se interpola el valor de concentración de la muestra teniendo el valor de I_p .

Curva de calibración



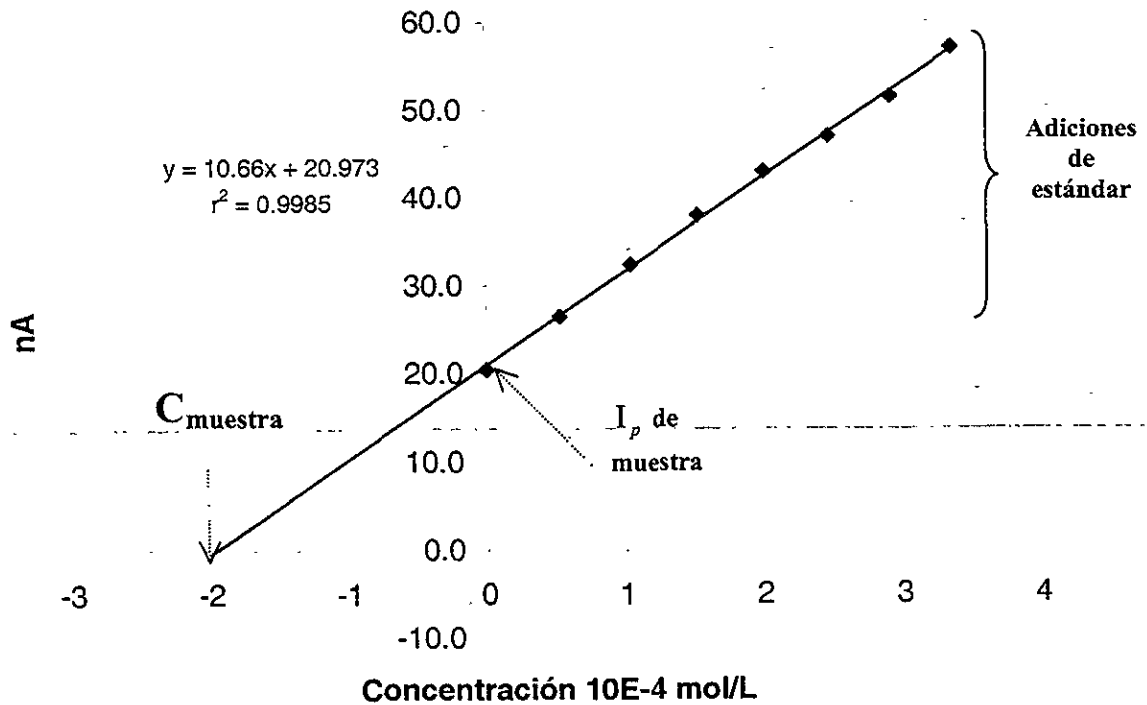
Adiciones de estándar.

Concentración final en la celda: 1.96×10^{-4} mol/L ($33.6 \mu\text{g/mL}$).

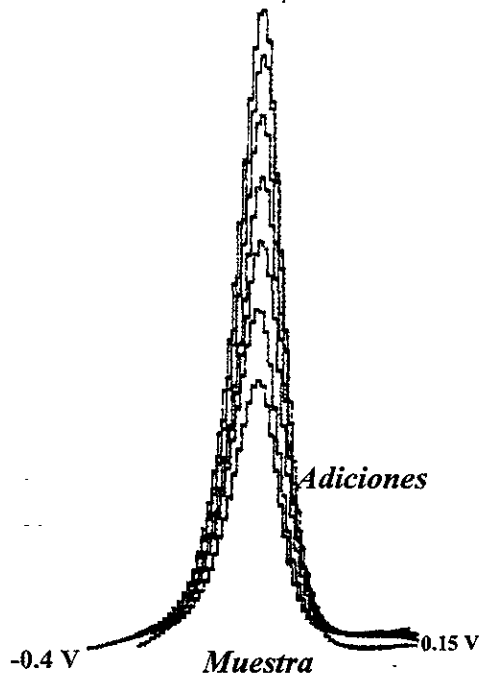
Adiciones de $100 \mu\text{L}$ solución de metronidazol 2.9×10^{-3} mol/L (0.501 mg/mL).

Adición Muestra	$\mu\text{g/mL}$	$\times 10^{-4} \text{ mol/L}$	nA
	0.0	0	20.5
1	9.1	0.532	26.5
2	17.9	1.045	32.5
3	26.4	1.541	38.0
4	34.6	2.019	43.0
5	42.5	2.481	47.0
6	50.1	2.927	51.5
7	57.5	3.359	57.0

En el caso de adiciones de estándar, el valor de concentración asociado a la muestra se extrapola de la curva obtenida.

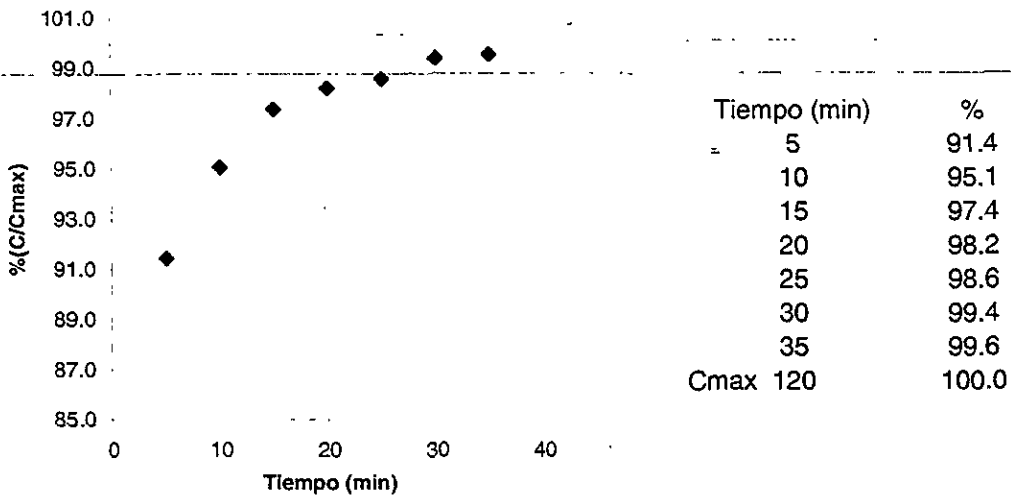


En la siguiente figura se muestran los polarogramas de la muestra y las adiciones del estándar, se observa proporcionalidad entre I_p y la concentración.



Disolución del Metronidazol con respecto al tiempo.

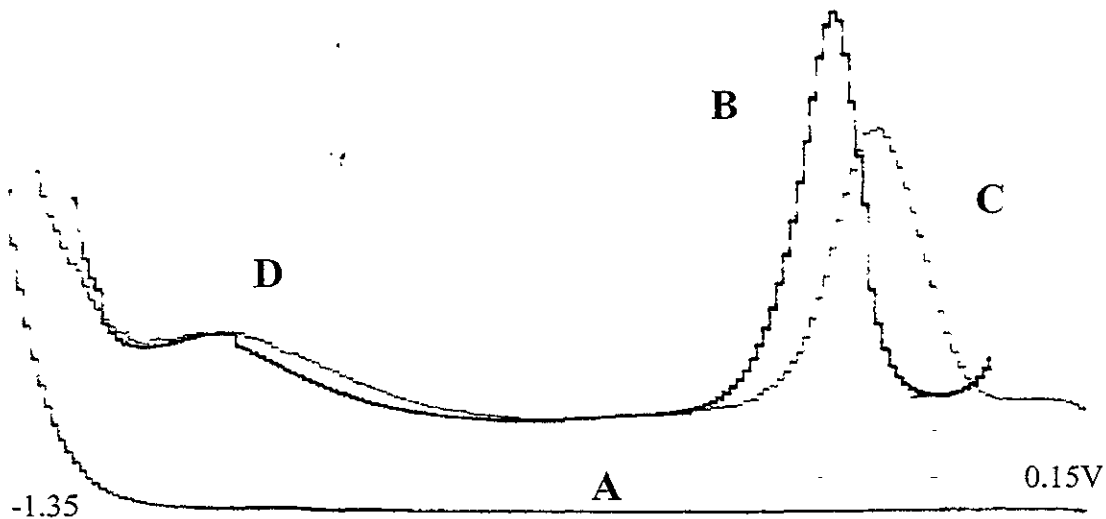
En esta figura se observa que, bajo las condiciones establecidas, la disolución del metronidazol está en función del tiempo. A partir de los 30 minutos, la concentración del metronidazol en solución, varía en menor proporción.



C_{max} = concentración a tiempo ∞ (2hrs.)

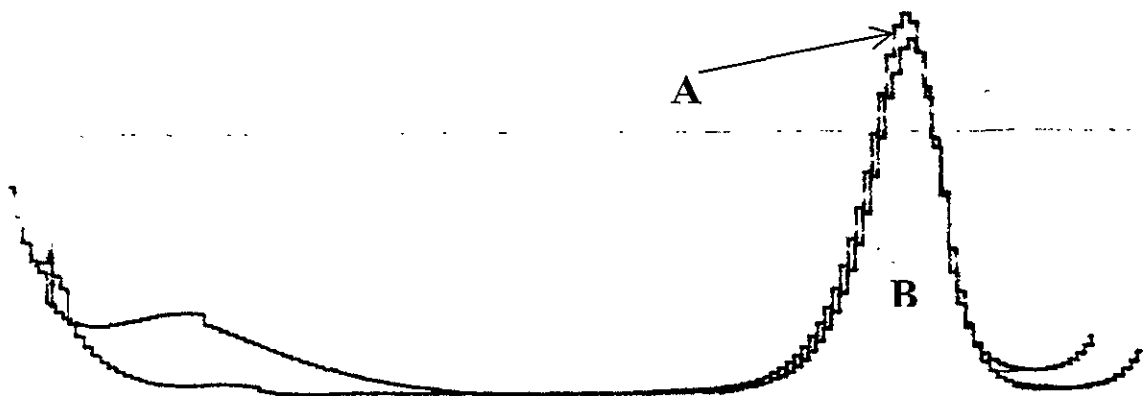
Interferencia del oxígeno en el análisis.

En la siguiente figura se observa que la primera onda de reducción del oxígeno se encuentra casi al mismo valor de E que para el metronidazol. Esta onda se elimina con el burbujeo de N_2 .



A: Solución de fosfatos. Burbujeo de N_2 por 5 minutos.
C y D: ondas de reducción del O_2 en medio de fosfatos sin burbujear N_2 .
B: onda de reducción del metronidazol + O_2 , sin burbujear N_2 .

El oxígeno disuelto en la muestra analítica, aumenta el valor de I_p registrado para el metronidazol. Esta interferencia se elimina si se burbujea N_2 después de adicionar la alícuota.

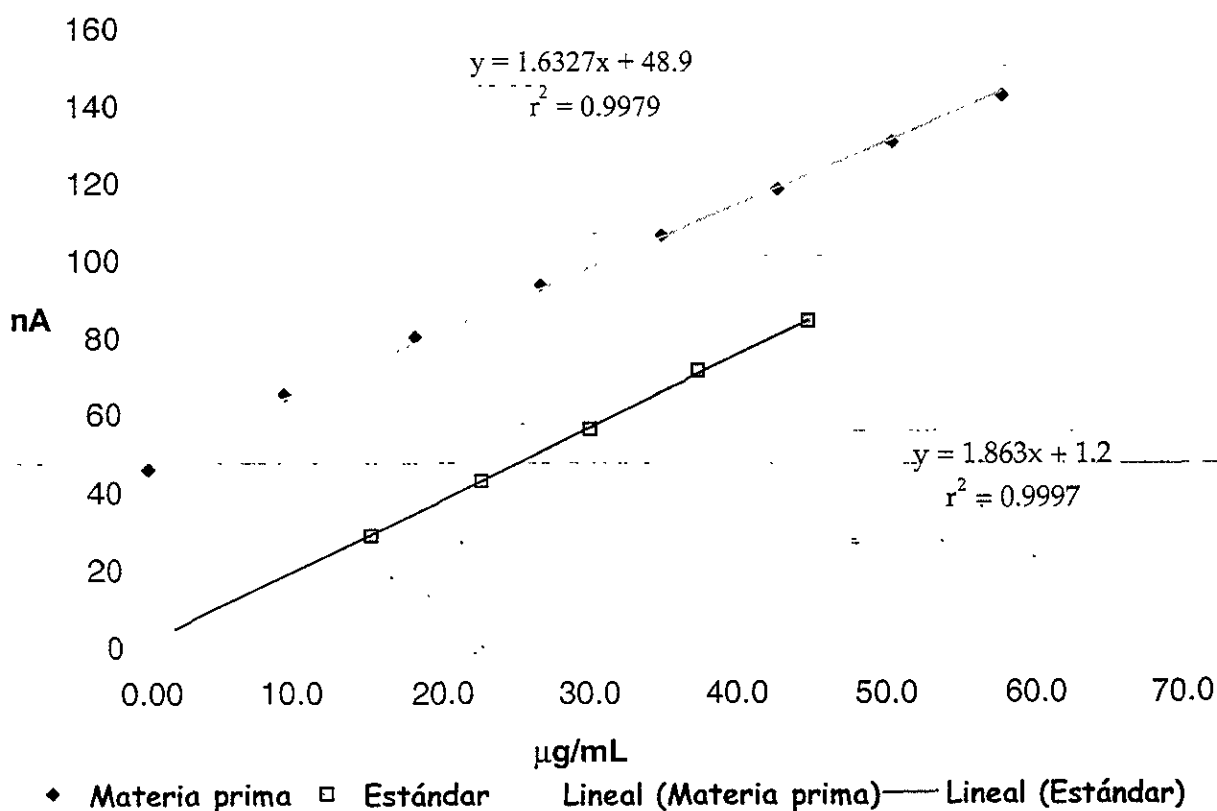


A: Onda de reducción del metronidazol (1.73×10^{-4} mol/L). Se burbujea N_2 por 5 minutos antes de adicionar muestra. Posteriormente se agita por 30 segundos, sin volver a burbujear N_2 .
B: Onda de reducción del metronidazol (1.73×10^{-4} mol/L). Se burbujea N_2 por 5 minutos antes de adicionar muestra. Posteriormente se agita por 2 minutos burbujeadando N_2 .

Interferencia de la matriz en el análisis de metronidazol.

Materia prima.

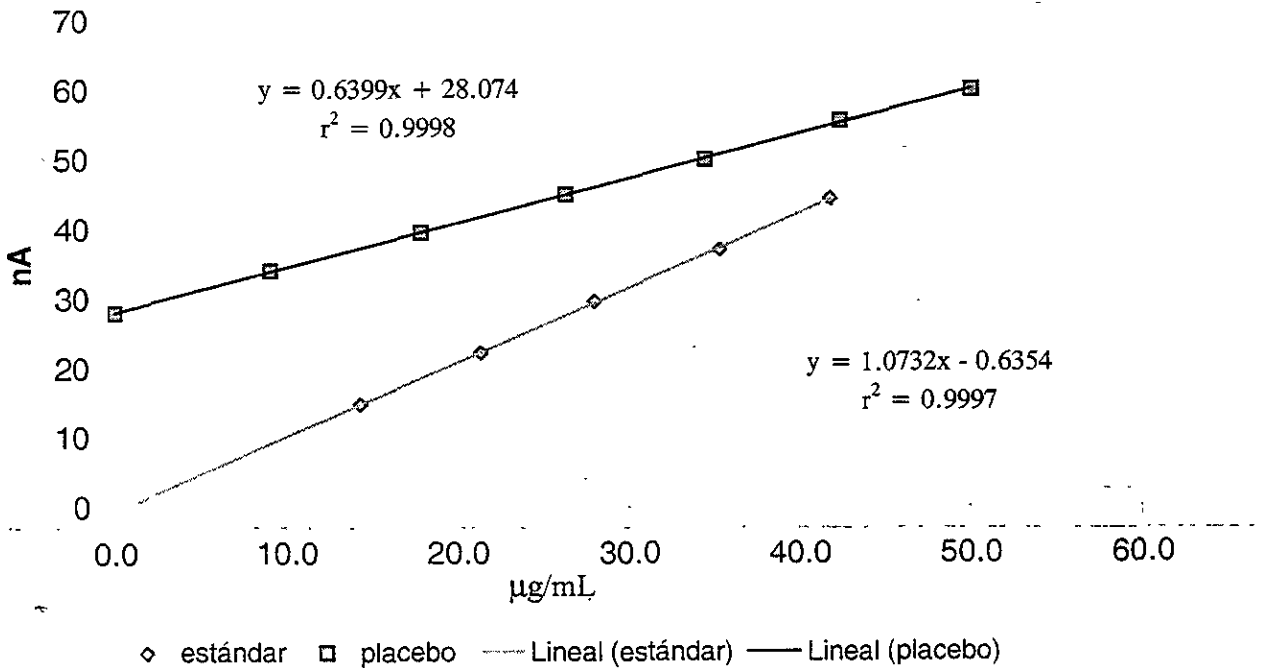
En la siguiente gráfica se observa que la presencia de metronidazol MP interfiere con el valor de I_p registrado, esto se observa por la ecuación de la recta para el Metronidazol BP solo, y para el Metronidazol BP + Metronidazol MP. Las pendientes de las rectas presentan una variación, por lo que si se desea utilizar el método de curva de calibración para la cuantificación de Metronidazol MP, se debe evaluar el intervalo de concentración adecuado y estimar el error originado por la interferencia de la matriz.



Tabletas de metronidazol.

Lote: TNF070201-X. 250

Las ecuaciones obtenidas de intensidad vs concentración para el caso de Metronidazol BP y de Metronidazol BP + Metronidazol (tabletas) son diferentes. Se observa una respuesta menor a la esperada. Si se interpolara la concentración de Metronidazol de una curva de calibración realizada con estándar, no se estaría tomando en cuenta el efecto de los excipientes presentes en la muestra. En este caso es adecuado utilizar la metodología de adición de estándar.



Validación del método.

Cuantificación de metronidazol en tabletas por polarografía diferencial de pulsos.

Procedimiento.

Preparación de la solución de la muestra.

Pesar 20 tabletas y registrar el peso promedio. Pulverizar. Transferir el equivalente a 50mg de metronidazol a un vaso de precipitados y agregar 40 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Mantener con agitación constante por 30 minutos. Transferir a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar al aforo con agua destilada.

Preparación de la solución del estándar.

Pesar aproximadamente con exactitud 50mg de Metronidazol BP. Transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver en agua destilada y llevar al aforo.

Procedimiento.

Transferir 5 mL de medio de fosfatos pH=2.0(0.1 mol/L) a la celda polarográfica.

Burbujear N₂ por 5 minutos. Trazar dominio de electroactividad. Adicionar 200µL de la solución de la muestra. Agitar y burbujear N₂ por 2 minutos. Trazar polarograma.

Adicionar 200µL de la solución del estándar. Agitar y burbujear N₂ por 2 minutos. Trazar el polarograma. Determinar los valores de I_p para la muestra y para la adición del estándar.

El contenido de metronidazol en tabletas se obtiene con la siguiente fórmula:

$$C_{\text{celda}} = \frac{C_{\text{estándar}} \times 0.2\text{mL}}{5.4\text{mL}} \times \frac{I_m}{I_a - I_m}, \text{ donde } C_{\text{celda}} \text{ es la concentración del metronidazol en la celda.}$$

C_{celda} y C_{estándar} en mg/mL.

$$\% \text{metronidazol} = C_{\text{estándar}} \times \frac{I_m}{I_a - I_m} \times \frac{P_p}{P_m} \times 100 \times \frac{5.2\text{mL} \times 50\text{mL}}{5.4\text{mL}}$$

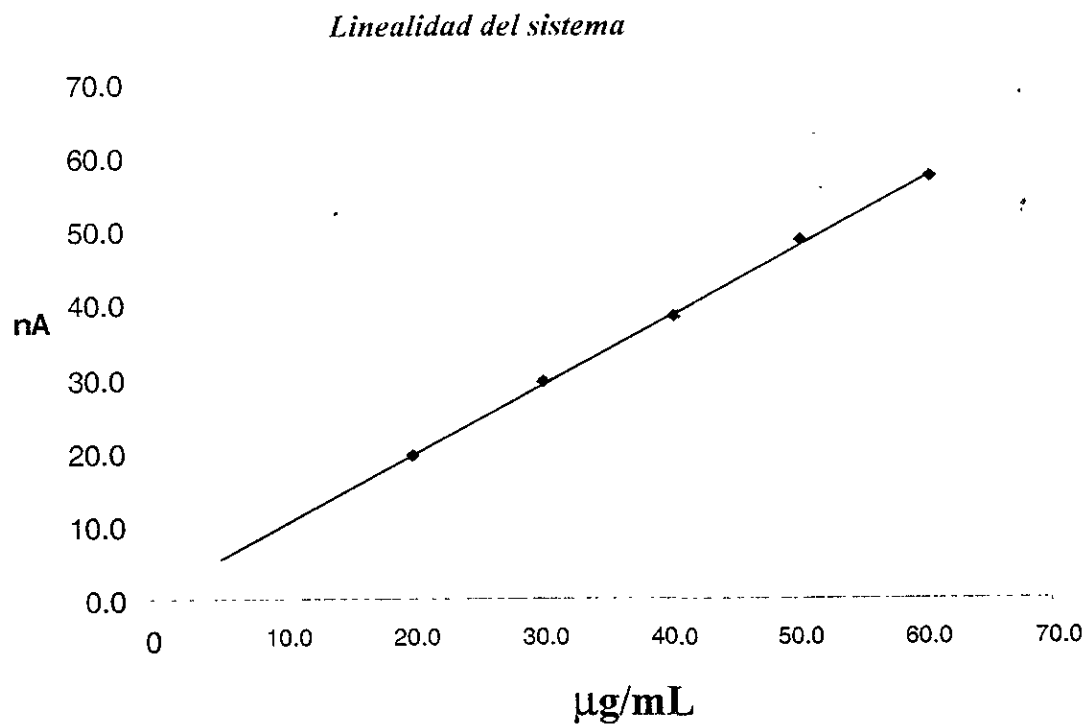
donde:

P_p= peso promedio de tabletas (en mg), P_m= peso de muestra (en mg), I_m e I_a intensidad de corriente de muestra y adición, respectivamente.

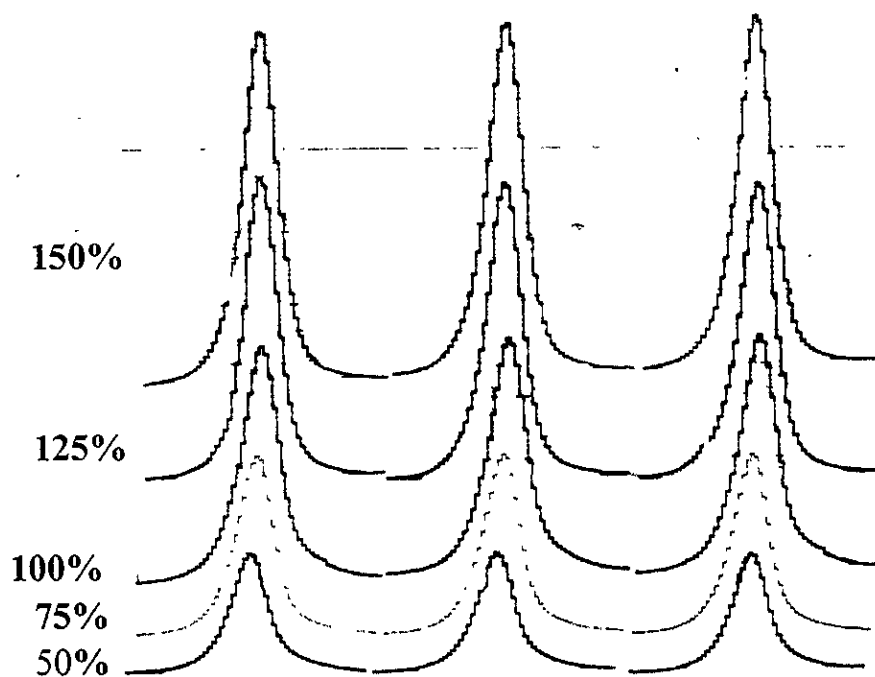
1.- Linealidad del sistema. Se muestran los valores de concentración en µg/mL y los valores de intensidad de corriente registrados.

Concentración del estándar(µg/mL).	20.2	30.3	40.4	50.5	60.6	
%	50	75	100	125	150	
Réplica 1	nA	19.1	29.3	38.3	49.1	57.3
Réplica 2		19.8	29.3	38.3	48.4	57.3
Réplica 3		19.8	29.3	38.3	48.4	57.3
Media	19.5	29.3	38.2	48.6	57.3	
DE	0.013387					
CV	1.3 %					
r ²	0.9990					

Gráfica para linealidad del sistema. I vs C. Los valores de la ecuación de la recta aparecen en la tabla anterior.



Polarogramas para linealidad del sistema. Se muestran los polarogramas de las tres réplicas para cada punto de concentración.



2.- Precisión del sistema.

Valores de intensidad registrados para la solución del estándar.

Concentración de la solución de estándar: 40.4 $\mu\text{g/mL}$

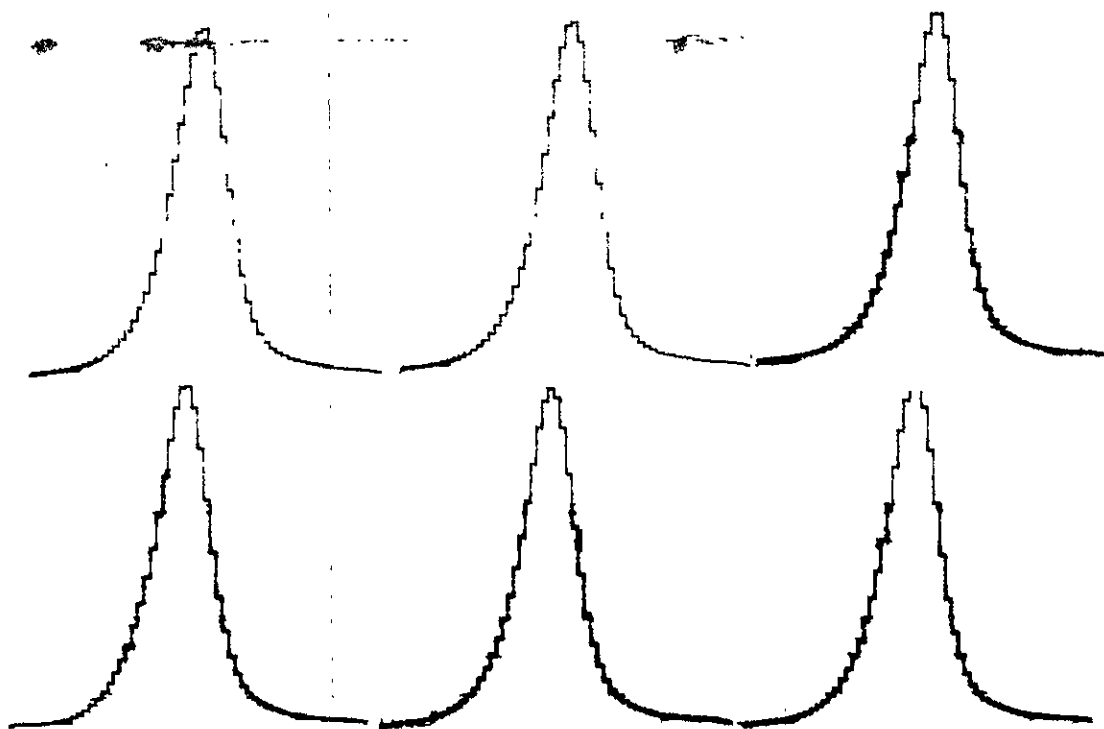
Réplica	1	2	3	4	5	6
Valor (nA)	38.9	38.3	39.4	38.9	39.5	38.9

Media: 38.9

DE: 0.4267

CV: 1.1%

Polarogramas para precisión del sistema. Se muestran los polarogramas de las seis réplicas.



Linealidad del Método.

3.- Linealidad del método: Se presentan los valores de cantidad agregada y cantidad recuperada ($\mu\text{g/mL}$). Las fórmulas para calcular los parámetros presentados se encuentran en el anexo I.

Concentración del estándar $\mu\text{g/mL}$	20.19	30.28	40.38	50.47	60.57
%	50	75	100	125	150
Réplica 1	19.99	31.00	40.49	50.47	60.54
Réplica 2 $\mu\text{g/mL}$	20.32	30.40	40.44	51.49	59.76
Réplica 3	19.99	30.40	39.87	51.49	59.65
Media	20.10	30.60	40.27	51.15	59.98
DE	0.1892	0.3442	0.3473	0.5902	0.4847
CV %	0.9413	1.1247	0.8626	1.1538	0.8081

$$m = 0.9938$$

$$b = 0.2941$$

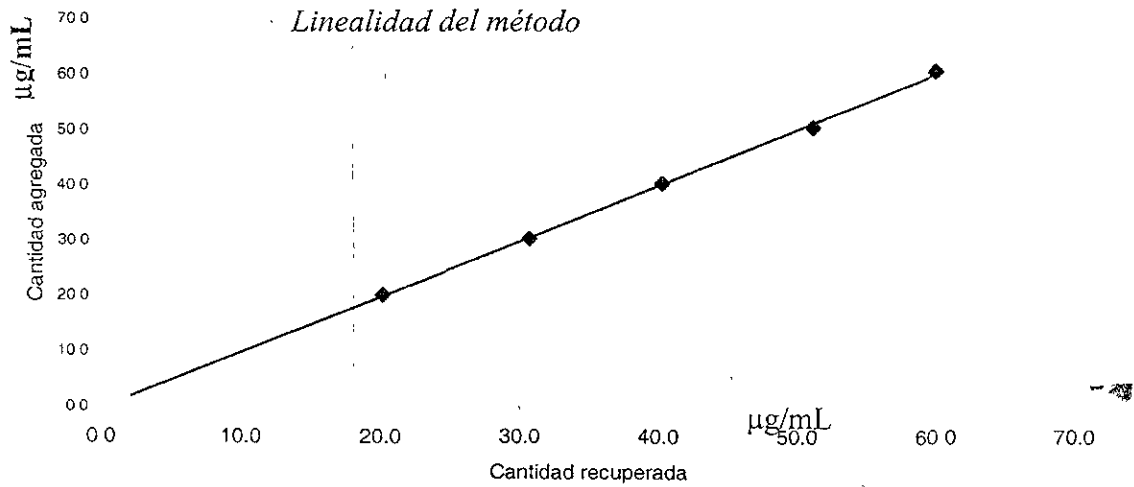
$$r^2 = 0.9986$$

Concentración de solución muestra $\mu\text{g/mL}$	Cantidad recuperada %
19.99	99.01
20.32	100.64
19.99	99.01
31.00	102.36
30.40	100.39
30.40	100.39
40.49	100.28
40.44	100.17
39.87	98.74
50.47	99.99
51.49	102.01
51.49	102.01
60.54	99.95
59.76	98.67
59.65	98.48

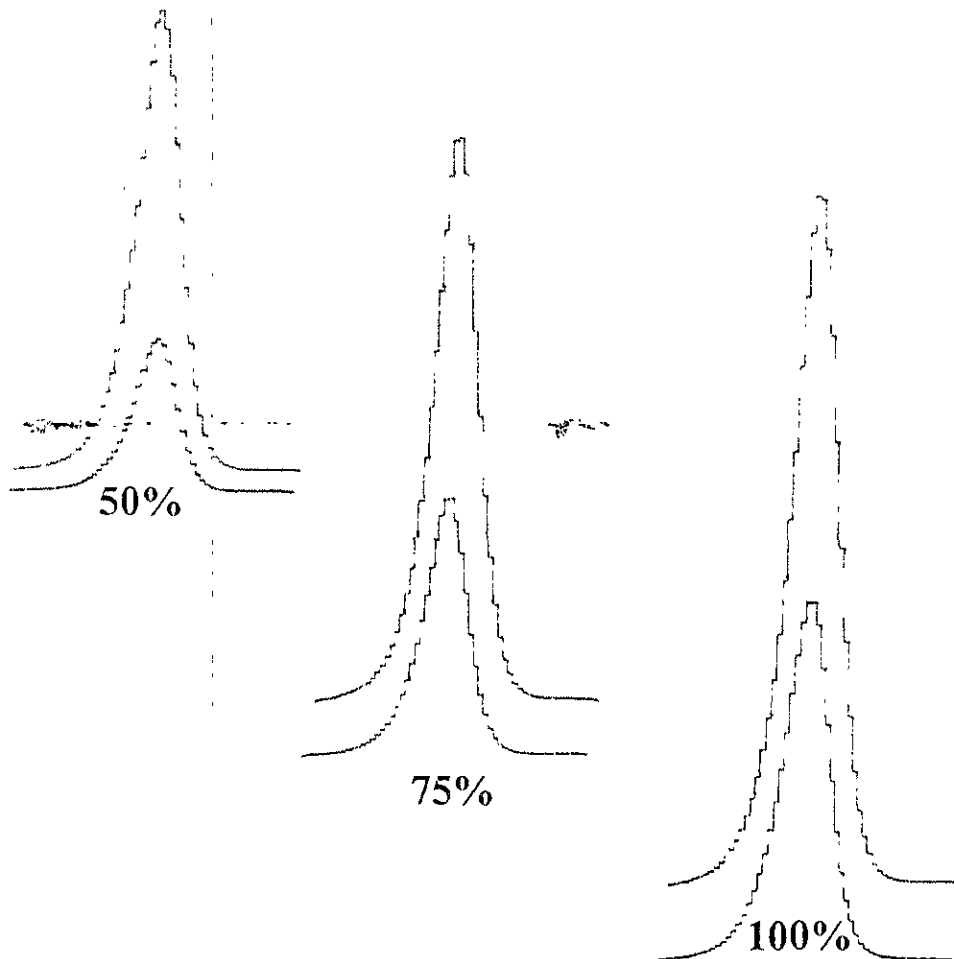
$$\text{DE} = 1.249$$

$$\text{CV} = 1.2 \%$$

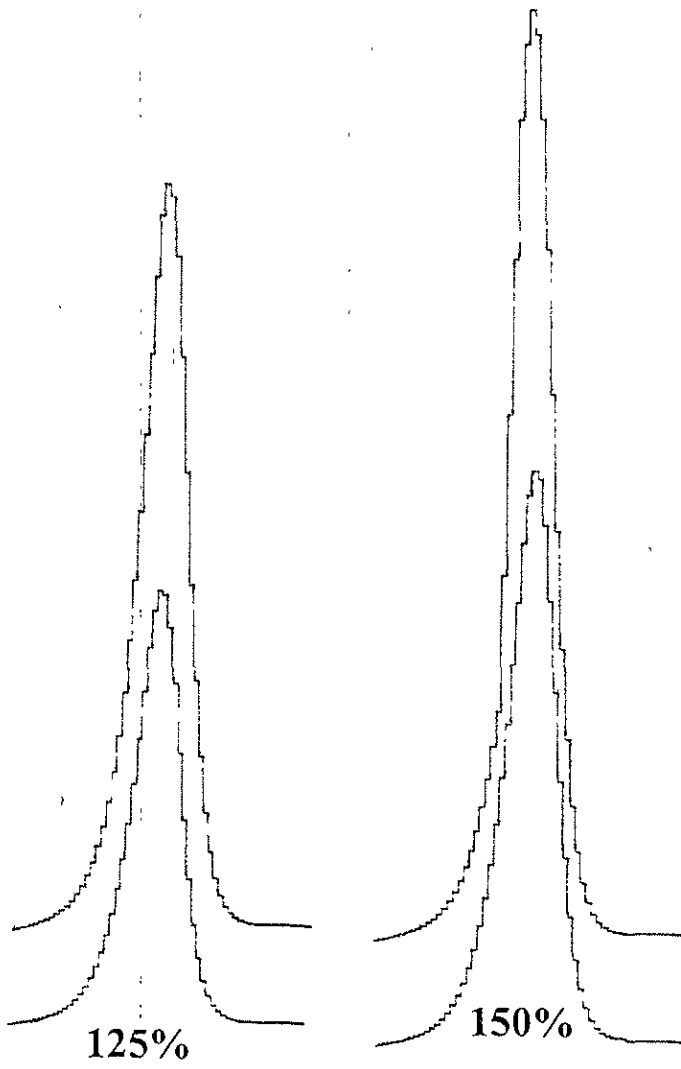
Se presentan los valores de cantidad agregada vs cantidad recuperada en $\mu\text{g/mL}$ de la solución final en la celda polarográfica.



Polarogramas para linealidad del método. Se presentan los polarogramas de la muestra y de la muestra + estándar para cada concentración. Sólo se presentan los polarogramas de una réplica.



Polarogramas para concentración al 125 % y 150 %.



4.- Exactitud y repetibilidad al 90%, 100% y 110%.

Se muestran los valores de concentración de metronidazol en la celda polarográfica en $\mu\text{g/mL}$.

Concentración del estándar $\mu\text{g/mL}$	36.34	40.38	44.41
%	90	100	110
Réplica 1	36.32	40.92	44.53
Réplica 2	35.28	40.32	45.18
Réplica 3	36.36	40.28	44.34
Réplica 4	36.32	39.78	44.28
Réplica 5	36.94	40.82	44.38
Réplica 6	36.32	39.80	44.53

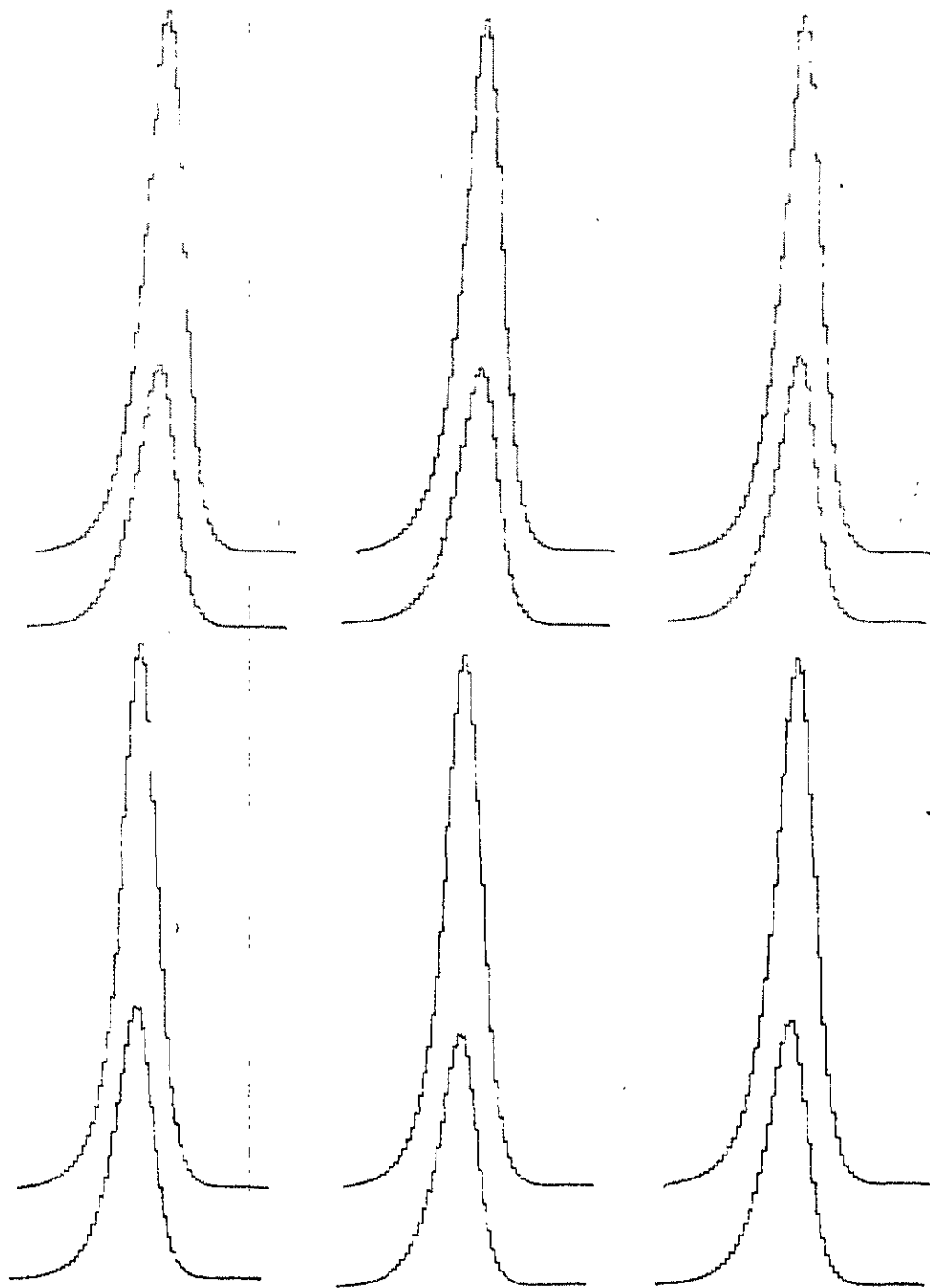
Tabla de porciento recuperado para el ensayo de exactitud del método. Las fórmulas utilizadas se encuentran en el anexo I.

Porciento recuperado.		
99.94	101.34	100.20
97.083	99.85	101.73
100.06	99.75	99.84
99.94	98.54	99.70
101.65	101.09	99.93
99.94	98.56	100.27

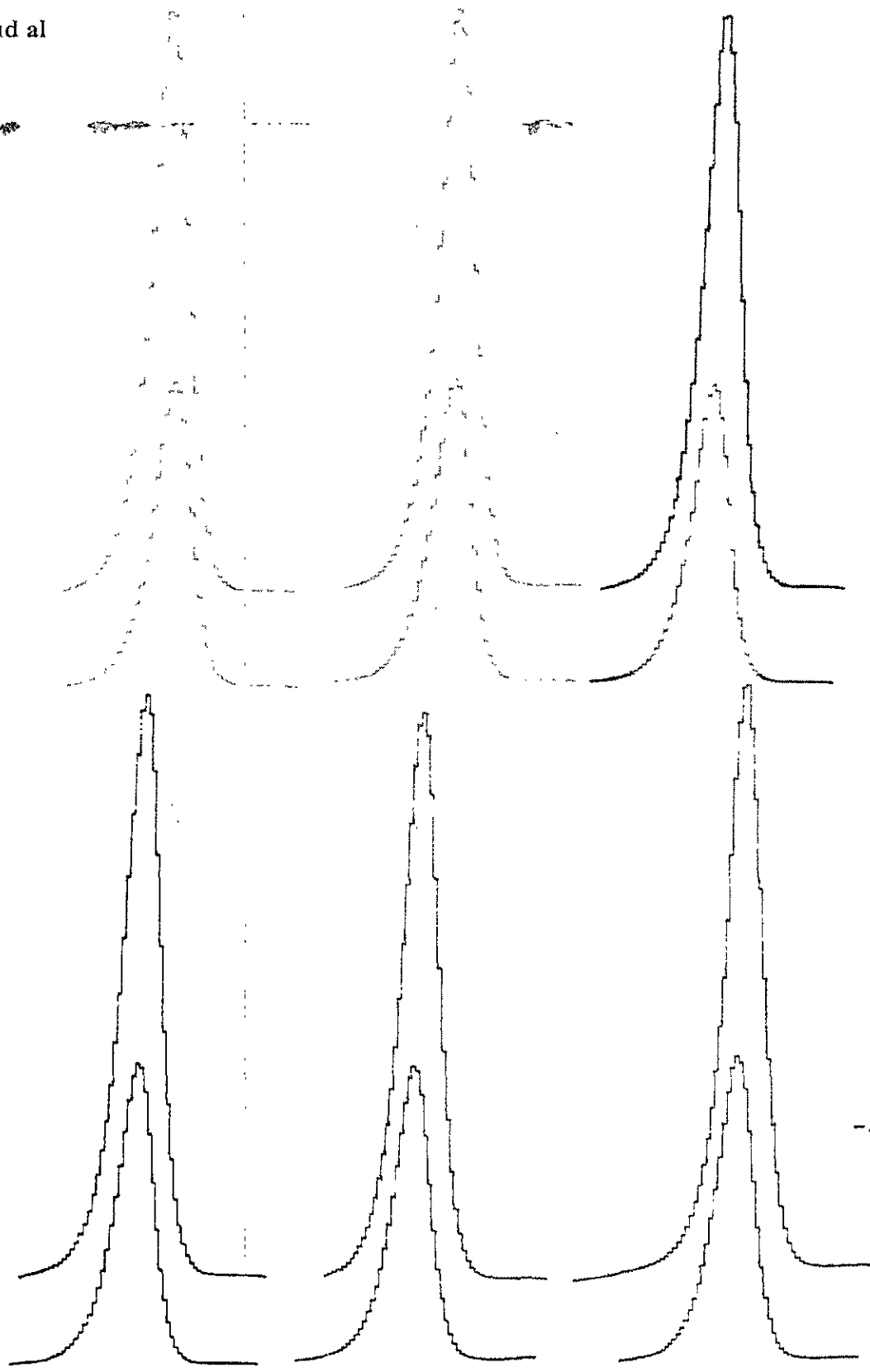
DE = 1.1
CV = 1.1 %

Polarogramas para exactitud y repetibilidad del método. Se muestran las seis réplicas de muestra y muestra + adición para concentración al 90%, 100% y 110%.

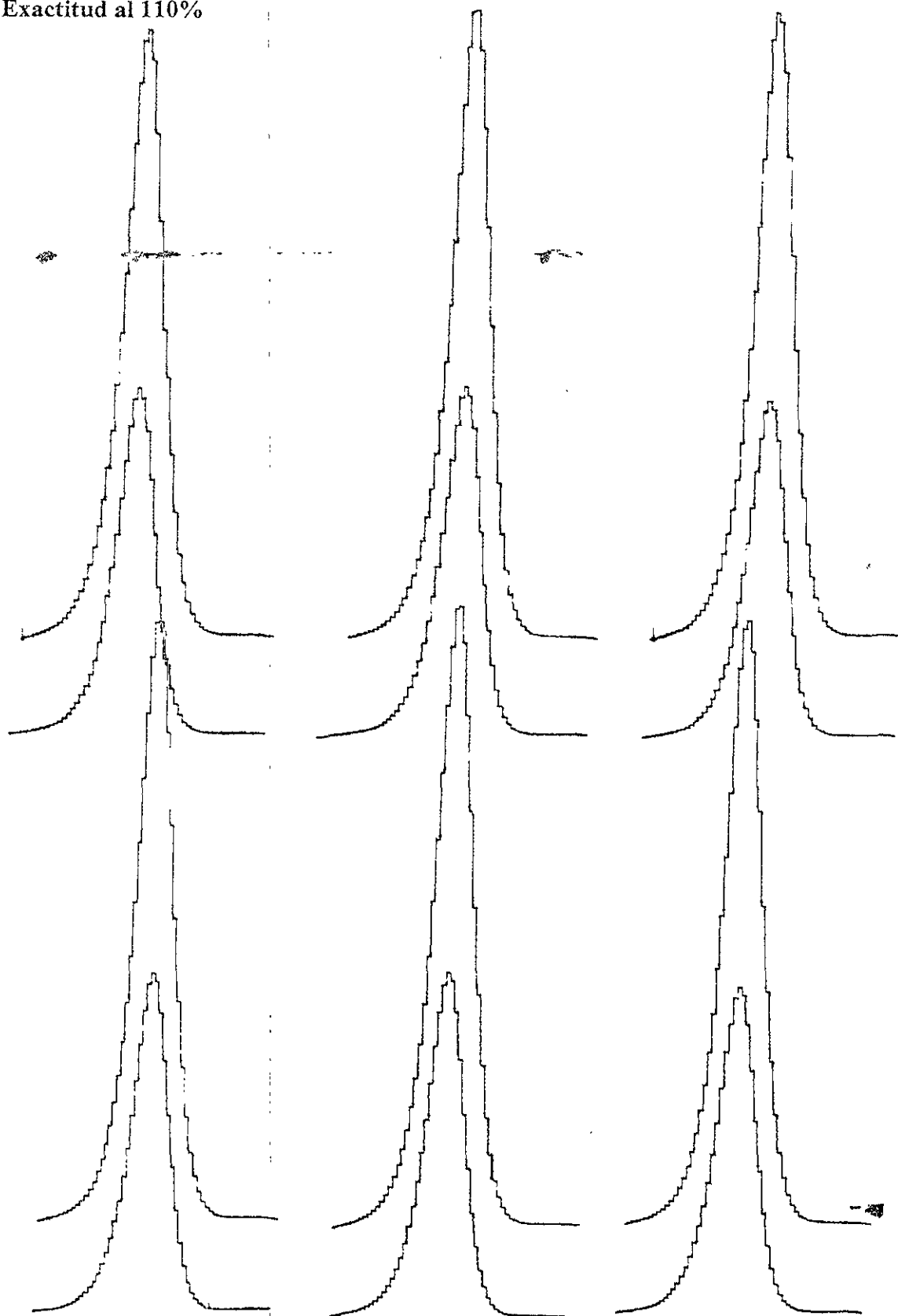
Exactitud al 90%.



reactitud al
0%



Exactitud al 110%



5.-Reproducibilidad.

Ensayo de reproducibilidad, se expresan porcentajes de acuerdo a la cantidad nominal para el lote de tabletas. El análisis se realizó en el mismo laboratorio y con el mismo equipo.

Metronidazol. Tabletas 500 mg. Lote TNF 070201-X

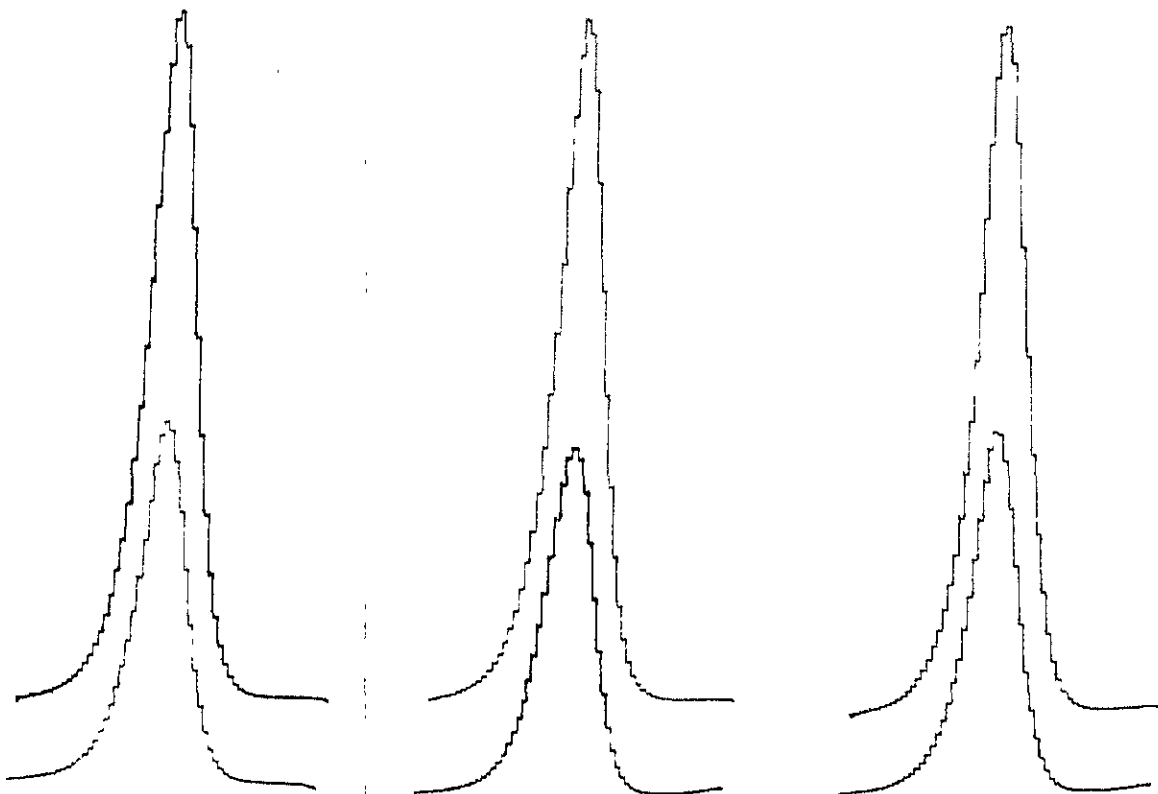
	Analista 1 (%)	Analista 2 (%)
Día 1	107.36	108.74
	106.73	108.24
	105.70	107.97
Día 2	107.86	106.47
	107.29	107.12
	106.73	106.73

DE= 1.269

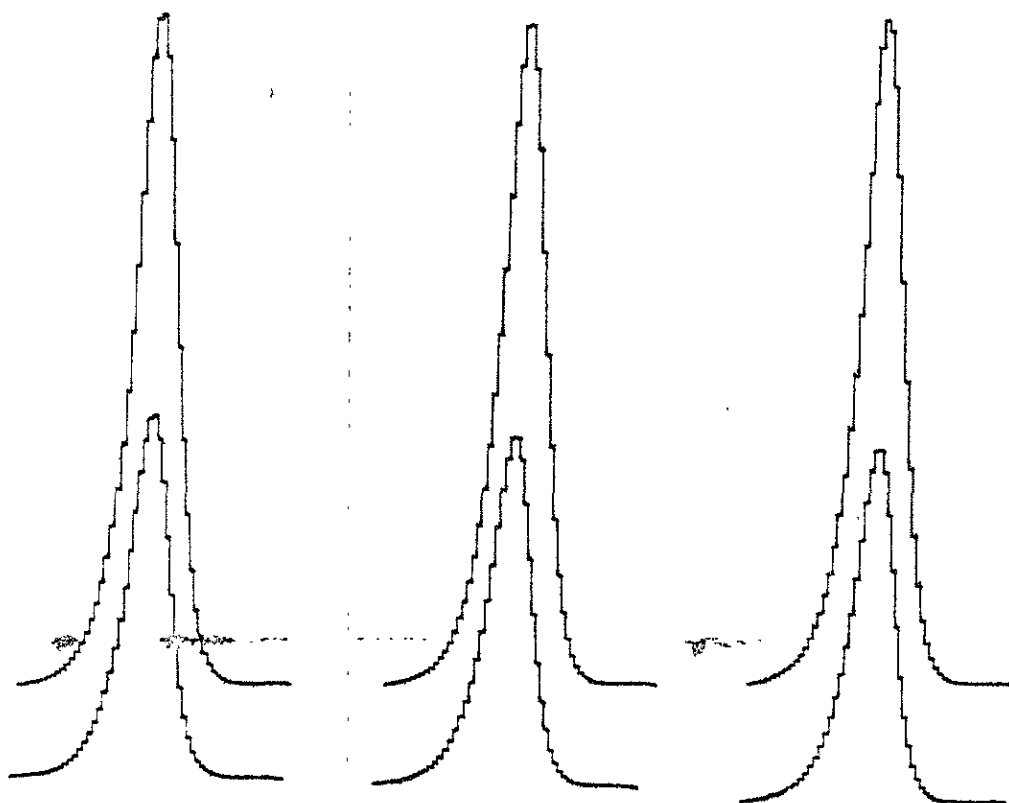
CV= 1.2%

Polarogramas para reproducibilidad del método.

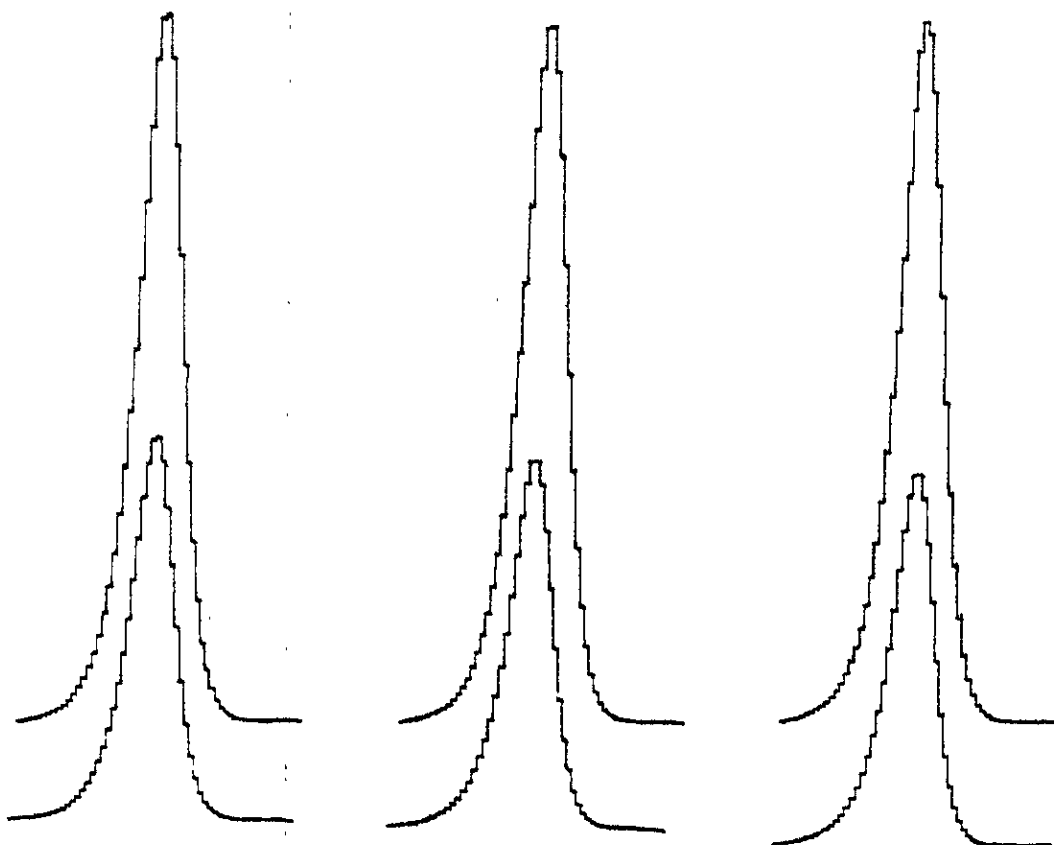
Analista 1. Día 1.



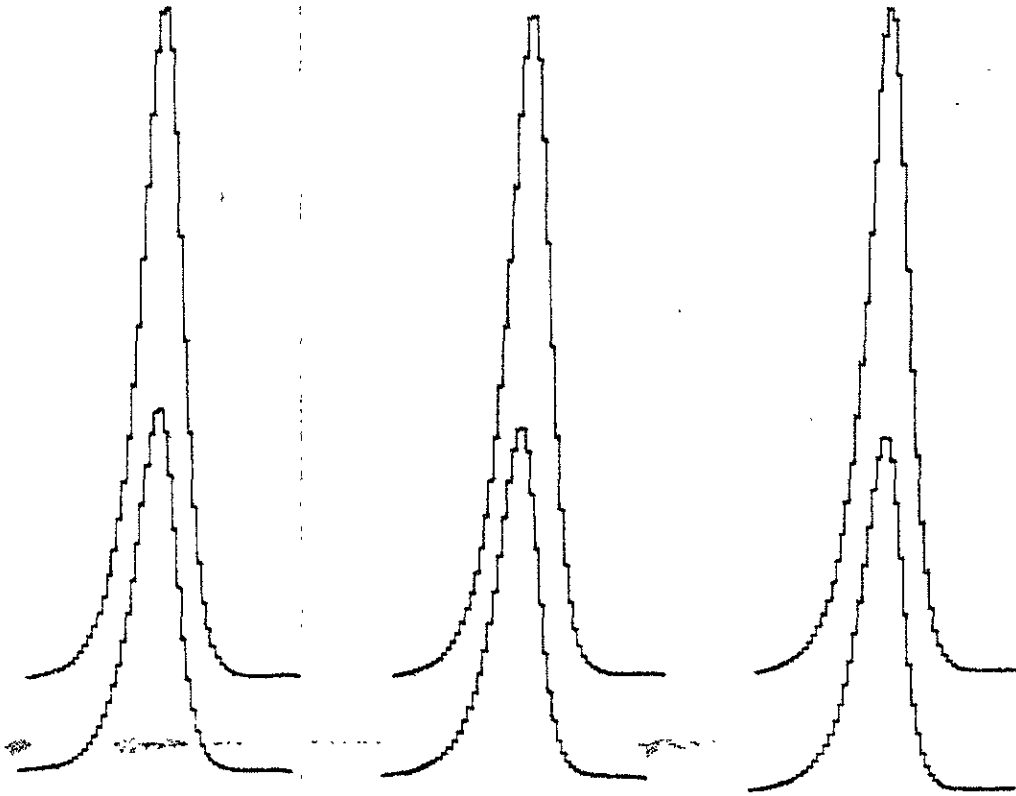
Analista 1. Día 2.



Analista 2. Día 1.



Analista 2. Día 2.



6.-Estabilidad de la muestra analítica:

Para determinar la estabilidad de la muestra analítica se utilizaron tabletas de metronidazol lote TNF 070201-X. Se expresan porcentajes de metronidazol de acuerdo a la cantidad nominal. Los valores de I.C. e I promedio, se calcularon de acuerdo a las fórmulas presentes en el anexo I.

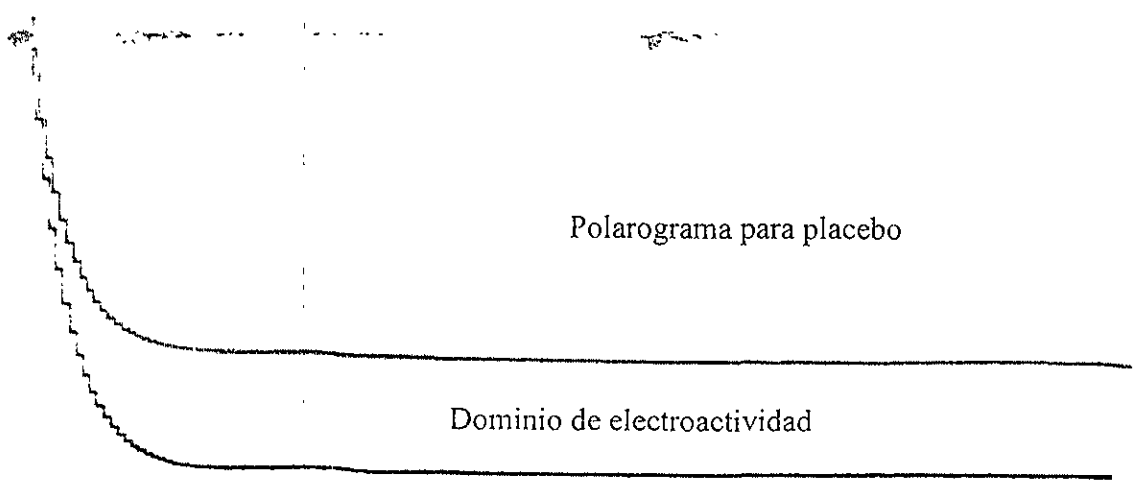
Inicial %	A %	B %	C %
108.1	106.8	107.5	106.6
106.7	107.7	106.6	107.8
108.1	106.8	104.6	104.8
I. C.	-1.8421 a 0.7528	-3.5897 a 0.8846	-3.5348 a 1.1035
\bar{I}	99.5 %	98.8 %	98.9 %

Muestra A: Refrigeración. Frasco oscuro. 24 horas.
 Muestra B: Temperatura ambiente. Frasco oscuro. 24 horas.
 Muestra C: Refrigeración. Frasco oscuro. 72 horas.

7.-Tolerancia: Para este ensayo se utilizó el placebo cargado al 100%. El ensayo se realizó por triplicado. Se presentan valores de concentración en la celda polarográfica en $\mu\text{g/mL}$, utilizando el método propuesto.

	-	0	+	C.V. (%)
Tiempo de disolución	39.67 25 minutos	40.77 30 minutos	41.07 35 minutos	1.8
Tiempo de burbujeo de N_2	41.01 sin burbujeo de muestra.	40.22 2 minutos después de adición.	40.60 4 minutos después de adición.	1.0
Presión de N_2	39.98 $2 \vec{\text{Kg}} / \text{cm}^2$	39.67 $3 \vec{\text{Kg}} / \text{cm}^2$	40.77 $4 \vec{\text{Kg}} / \text{cm}^2$	1.4
Tamaño de gota de Hg.	40.97 dp=1	40.77 dp=2	40.02 dp=3	1.2
pH del medio	40.34 pH=1.9	40.24 pH=2.0	40.28 pH=2.1	0.1

8.-Especificidad. Para este ensayo se utiliza una solución de placebo sin estándar y se compara con el dominio de electroactividad sin muestra. Los placebos utilizados no generan respuesta detectable en las condiciones establecidas.



Discusión de resultados.

En el caso de materia prima, la disolución no presenta problema ya que 50 mg de metronidazol se disuelven fácilmente en 40 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Sin embargo, para el caso de tabletas, por no observarse de manera visual la disolución del metronidazol debido a la turbidez causada por los excipientes, se hicieron pruebas con respecto al tiempo; se encontró que después de los 30 minutos y hasta dos horas, hay cambios menores en la concentración observada. A los 30 minutos se observa una diferencia promedio de 0.4% por lo que se escogió como tiempo de disolución de la muestra para el análisis.

La primera onda de reducción del O_2 casi coincide con la de reducción del metronidazol en las condiciones establecidas. Para eliminar el oxígeno del medio bastan 5 minutos de burbujeo de N_2 .

Se observa que el oxígeno presente en las alícuotas de la muestra y de la solución del estándar, interfiere con la respuesta obtenida, dando un resultado mayor al esperado. Una opción es disminuir la sensibilidad del equipo y concentrar la solución de metronidazol para disminuir el aporte del O_2 . La limitante en este caso, es la solubilidad del metronidazol y los volúmenes utilizados en la celda (5mL). Otra opción sería burbujear N_2 por 2 minutos entre cada adición. Si se realizan 7 adiciones, como estaba planeado inicialmente el método, aumentaría el tiempo del análisis. Se optó por burbujear N_2 por dos minutos entre cada adición, realizando sólo una adición de estándar de manera que genere una respuesta al doble de la muestra y realizando el análisis por triplicado.

Respecto a la metodología a utilizar para el análisis, se encontró que no hay interferencia de matriz para el caso de materia prima, por lo que se puede utilizar una curva de calibración e interpolar el valor de concentración de la curva obtenida. Para el caso de tabletas se observa una disminución de la respuesta obtenida (amperios) debido a los excipientes presentes. Ésto se relacionó con los componentes de la formulación de las tabletas que contiene entre otros, estearato de magnesio y aerosil.

Dichos componentes actúan como tensoactivos en el sistema electrodo-solución. Por esta razón, es conveniente utilizar la metodología de adición de estándar.

En el trabajo de validación se observa que el sistema es lineal y preciso en las condiciones establecidas ($CV = 1.3\%$, $r^2 = 0.99$ y $CV = 1.1\%$ respectivamente). En la linealidad del método la relación cantidad agregada-cantidad recuperada es lineal ($r^2 = 0.99$) con pendiente de 0.99; el valor de la ordenada al origen es de 0.3 que se relaciona con una interferencia positiva en el método. El método es exacto y preciso en concentraciones al 90, 100 y 110 %; cumple con los requisitos establecidos. Utilizando el mismo equipo y en el mismo laboratorio, el método es reproducible entre analistas y en días diferentes ($CV = 1.2\%$).

La muestra analítica es estable en las condiciones establecidas ($\Delta C < 2\%$). Se observa que la temperatura afecta la estabilidad de la muestra analítica y que a las 72 horas se observó un cambio promedio de 1.2%.

En la tolerancia del método se encuentra el tiempo de disolución es crítico en el método, por lo que se debe considerar la evaluación de un intervalo aceptable. Cambios en la presión de N_2 y el tamaño de la gota afectan la respuesta obtenida. Debido a que la metodología es por adición de estándar, el cambio es proporcional y no afecta el valor final reportado.

En el caso de excipientes y placebos analizados no se observó señal bajo las condiciones establecidas por lo que la onda polarográfica se asocia sólo al metronidazol.

El análisis es rápido; el mayor tiempo es consumido en la etapa de disolución de la muestra. Para una etapa de optimización sería conveniente disolver el metronidazol en el medio ($pH = 2$) ya que se reporta que es más soluble en medio ácido, de esta manera se disminuiría el tiempo de análisis.

Conclusiones.

La polarografía diferencial de pulsos es una técnica adecuada para la cuantificación de metronidazol en el producto ensayado, tabletas, ya que, utilizando la metodología por adición de estándar, se obtienen resultados lineales, exactos y precisos bajo las condiciones establecidas.

Para completar el estudio de diseño y validación se propone lo siguiente:

- Realizar el estudio de validación del método para la cuantificación de materia prima por polarografía diferencial de pulsos utilizando la metodología de curva de calibración.
- Realizar el estudio de especificidad con la muestra bajo condiciones de degradación, o bien, con los productos de degradación y evaluar la posibilidad de utilizarlo como método analítico para pruebas de estabilidad.
- Realizar el estudio de tolerancia del método efectuando un diseño de experimento para detectar y en su caso, corregir, las fuentes mayores de variación del método.
- Comparar el método utilizando diferentes equipos y/o ambientes de trabajo y sistemas de calidad.

Apéndice I.

Cálculos y fórmulas utilizadas.

● Linealidad del sistema.

Se tabulan los resultados en base al siguiente formato:

Concentración de la dilución de la solución patrón (x)	Propiedad medida (y)
x ₁	y ₁₁ , y ₁₂ , ..., y _{1n}
x ₂	y ₂₁ , y ₂₂ , ..., y _{2n}
⋮	⋮ ⋮ ⋮
⋮	⋮ ⋮ ⋮
⋮	⋮ ⋮ ⋮
x _t	y _{t1} , y _{t2} , ..., y _{tn}

t = número de diluciones

n = número de réplicas (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

$$\sum x = n(x_1 + x_2 + \dots + x_t)$$

$$\sum y = y_{11}, y_{12}, \dots, y_{1n} + y_{21}, y_{22}, \dots, y_{2n} + \dots + y_{t1}, y_{t2}, \dots, y_{tn}$$

$$\sum x^2 = n(x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_t^2)$$

$$\sum y^2 = y_{11}^2, y_{12}^2, \dots, y_{1n}^2 + y_{21}^2, y_{22}^2, \dots, y_{2n}^2 + \dots + y_{t1}^2, y_{t2}^2, \dots, y_{tn}^2$$

$$\sum xy = x_1(y_{11}, y_{12}, \dots, y_{1n}) + x_2(y_{21}, y_{22}, \dots, y_{2n}) + \dots + x_t(y_{t1}, y_{t2}, \dots, y_{tn})$$

$$r = \left[\frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]} \right]^{1/2}$$

$$r^2 = \left[\frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]} \right]$$

Coefficiente de variación:

$$F = \frac{\text{Propiedad medida (y)}}{\text{Conc. de la dilución de la solución patrón}}$$

$$F_{11} = \frac{Y_{11}}{X_1}$$

$$F_{12} = \frac{Y_{12}}{X_1}$$

$$F_{1n} = \frac{Y_{1n}}{X_1}$$

$$F_{t1} = \frac{Y_{t1}}{X_t}$$

$$F_{t2} = \frac{Y_{t2}}{X_t}$$

$$F_{tn} = \frac{Y_{tn}}{X_t}$$

$$\sum F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + F_{t1} + F_{t2} + F_{tn}$$

$$\sum F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + F_{t1}^2 + F_{t2}^2 + F_{tn}^2$$

$$F = \frac{\sum F}{N} \quad \text{donde } N = \text{número de puntos de la linealidad del sistema.}$$

$$DE = \left[\frac{N(\sum F^2) - (\sum F)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

DE = desviación estándar

$$CV = \frac{DE}{F} * 100$$

CV = coeficiente de variación

o **Precisión del sistema.**

o Tabular los resultados: $y_1, y_2, y_3, \dots, y_n$

o Cálculos preliminares:

$$\sum y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n$$

$$\sum y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_n^2$$

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

$$DE = \left[\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

o Cálculos finales:

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} * 100$$

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

• **Linealidad del método.**

A.-Cantidad adicionada- cantidad recuperada.

Tabular resultados:

Cantidad adicionada (x)	Cantidad recuperada (y)
$X_{11}, X_{12}, \dots, X_{1n}$	$Y_{11}, Y_{12}, \dots, Y_{1n}$
$X_{21}, X_{22}, \dots, X_{2n}$	$Y_{21}, Y_{22}, \dots, Y_{2n}$
\dots	\dots
$X_{t1}, X_{t2}, \dots, X_{tn}$	$Y_{t1}, Y_{t2}, \dots, Y_{tn}$

t= número de cantidades adicionadas

n= número de réplicas (cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada.

• Cálculos preliminares.

$$\begin{aligned} \sum X &= X_{11}, X_{12}, \dots, X_{1n} + X_{21}, X_{22}, \dots, X_{2n} + \dots + X_{t1}, X_{t2}, \dots, X_{tn} \\ \sum Y &= Y_{11}, Y_{12}, \dots, Y_{1n} + Y_{21}, Y_{22}, \dots, Y_{2n} + \dots + Y_{t1}, Y_{t2}, \dots, Y_{tn} \\ \sum X^2 &= X^2_{11}, X^2_{12}, \dots, X^2_{1n} + X^2_{21}, X^2_{22}, \dots, X^2_{2n} + \dots + X^2_{t1}, X^2_{t2}, \dots, X^2_{tn} \\ \sum Y^2 &= Y^2_{11}, Y^2_{12}, \dots, Y^2_{1n} + Y^2_{21}, Y^2_{22}, \dots, Y^2_{2n} + \dots + Y^2_{t1}, Y^2_{t2}, \dots, Y^2_{tn} \\ \sum XY &= X_1(Y_{11}, Y_{12}, \dots, Y_{1n}) + X_2(Y_{21}, Y_{22}, \dots, Y_{2n}) + \dots + X_t(Y_{t1}, Y_{t2}, \dots, Y_{tn}) \end{aligned}$$

• Cálculos finales:

$$m = \frac{nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{nt(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{\sum y - m(\sum x)}{nt}$$

$$r^2 = \frac{[nt(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[nt(\sum x^2) - (\sum x)^2][nt(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

B.- Porciento recuperado.

Calcular el porciento recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación: $R = (x_i/y) * 100$.

• Tabular resultados: $R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$

• Cálculos preliminares:

$$\sum R = R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

$$\sum R^2 = R^2_1, R^2_2, R^2_3, \dots, R^2_n \quad DE = \left[\frac{n(\sum R^2) - (\sum R)^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

$$\bar{R} = (\sum R) / n$$

- Cálculos finales: coeficiente de variación.

$$CV = \left(DE / \bar{R} \right) * 100$$

• **Exactitud y repetibilidad al 100%.**

- Tabular los resultados del porcentaje recuperado (R): $R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$
- Cálculos preliminares:

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\sum R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = \frac{\sum R}{n}$$

$$DE = \left[\frac{n(\sum R^2) - (\sum R)^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

- Cálculos finales: coeficiente de variación.

$$CV = \left(DE / \bar{R} \right) * 100$$

• **Precisión (Reproducibilidad).**

- Tabular los resultados con base al siguiente formato:

		ANALISTA	
		1	2
DÍA	1	y_{111}	y_{211}
		y_{112}	y_{212}
		y_{113}	y_{213}
	2	y_{121}	y_{221}
		y_{122}	y_{222}
		y_{123}	y_{223}

- Cálculos preliminares:

$$y_{...} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123} + y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

$$\sum y^2_{...} = y^2_{111} + y^2_{112} + y^2_{113} + y^2_{121} + y^2_{122} + y^2_{123} + y^2_{211} + y^2_{212} + y^2_{213} + y^2_{221} + y^2_{222} + y^2_{223}$$

$$\bar{y} = y_{...} / n$$

$$DE = \left[\frac{n(\sum y^2_{...}) - (y_{...})^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

n= número de determinaciones

- Cálculos finales: coeficiente de variación.

$$CV = \left(\frac{DE}{\bar{y}} \right) * 100$$

○ **Estabilidad de la muestra analítica.**

- Tabular los resultados:

Inicial	Condición / tiempo		
	1	2	m
y_1	y_4	y_7	y_{n-2}
y_2	y_5	y_8	y_{n-1}
y_3	y_6	y_9	y_n

- Cálculos preliminares para el intervalo de confianza:

Media:	\bar{y}_0	\bar{y}_1	\bar{y}_2	\bar{y}_m
Varianza	s_0^2	s_1^2	s_2^2	s_m^2

Varianza ponderada:

$$s_{p1}^2 = \frac{2s_0^2 + 2s_1^2}{2(c+1)}$$

$$s_{p2}^2 = \frac{2s_0^2 + 2s_2^2}{2(c+1)}$$

$$s_{pm}^2 = \frac{2s_0^2 + 2s_m^2}{2(c+1)}$$

- Cálculos finales para el intervalo de confianza: para cada condición por tiempo.

$$IC = \left(\bar{y}_i - \bar{y}_0 \right) \pm t^* \times \left[s_{pi}^2 \frac{2}{3} \right] \quad \text{donde } t^* = \text{valor de } t \text{ de Dunnett con } c$$

comparaciones y $2(c+1)$ grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975.

- Cálculos preliminares para el coeficiente de variación: para cada condición/tiempo/muestra, se calcula el factor (I) con la siguiente fórmula:

$$I_i = \frac{(\text{análisis_muestra / condición / tiempo})_i}{(\text{análisis_inicial})_i} \times 100$$

Ejemplos:

$$I_1 = \frac{y_4}{y_1} \times 100$$

$$I_2 = \frac{y_5}{y_2} \times 100$$

$$I_3 = \frac{y_6}{y_3} \times 100$$

- Para cada condición/tiempo se calcula la media del factor (I) con la siguiente fórmula :

$$\bar{I} = \frac{\sum I(\text{condición / tiempo})}{n}$$

donde n= número de muestras para cada condición/tiempo.

$$I_a = \frac{I_1 + I_2 + I_3}{3} \quad I_b = \frac{I_4 + I_5 + I_6}{3} \quad I_c = \frac{I_7 + I_8 + I_9}{3}$$

La media del Factor I para cada condición/tiempo (a.b.c), deberá cumplir con los criterios establecidos.

Bibliografía.

1. NMX-CC-001: 1995 IMNC. ISO 8402: 1994. *Administración de la calidad y aseguramiento de la calidad. Vocabulario.*
2. NOM-059-SSA1-1993. *Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.*
3. Rius X. *La validación de métodos analíticos.* IEA. Universitat Rovira i Virgili. <http://www.quimica.urv.es/quimio>.
4. Díaz J., et al. *Garantía de calidad y control de calidad en química analítica.* Madrid, 1996. Serie ponencias.CIEMAT.
5. Woodson A. *Direct current and alternating current polarographic response of some pharmaceuticals in an aprotic organic solvent system.* Anal. Chem.,42, (2) 1970, pp. 242-248.
6. Sankar S., Reddy S. *Electrochemical behaviour of metronidazole.* Contemporary Electroanalytical Chemistry. 1990. pp.339-345.
7. Medina A. *Propuesta inicial para la dosificación electroanalítica de metronidazol en medicamentos.* México, 1991. Tesis. Facultad de Química UNAM.
8. Limbird Lee, et al. *Goodman and Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica.* 9ª edición. Vol II. Mc Graw Hill. México 1996.
9. *Diccionario de especialidades farmacéuticas (PLM).* 42ª edición. Ediciones PLM S. A. México 1999. pp. 126, 904-907.
10. Susan Budavari, ed... [et al.] *The merck index : An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Metronidazol (6242)..* 11ª edición. Rahway Merck, 1990.
11. Day R., Underwood A., *Quantitative Analysis.* 6a edición. Prentice hall. 1991. pp. 253-387.
12. Bard A., Faulkner L. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications.* 1980. Jhon Wiley and Sons. USA. pp. 1-43.
13. Skoog D., Leary J. *Análisis Instrumental.* 4a edición. Mc Graw Hill. México 1994. pp. 539-661.

14. Sawyer D. *Chemistry experiments for instrumental methods*. John Wiley and Sons. New York 1984. pp. 73-160.
15. Green M. *A practical guide to analytical method validation*. Analytical Chemistry 1996, (68) 305A-309A.
16. Castillo B., González R. *Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos*. Rev. Cubana Farm. 1997, 30(1).
17. *Requisitos mínimos para la validación de un método analítico*. Colegio nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, Secretaría de Salud. México, 1991.
18. *International Conference on Harmonization Guideline on Validation of Analytical Procedure: Definitions and Terminology*. 60 FR 11260, Marzo. 1995.
19. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, *Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas*. México 1999. SSA.
20. Medina A. Desarrollo y validación de un método analítico por polarografía diferencial de pulsos para la cuantificación de Acido nalidíxico en materia prima y producto terminado. Tesis. Facultad de Química. UNAM. México, 1992.
21. Lawerys R., Perrine H. *Industrial Chemical Exposure. Guidelines for Biological Monitoring*. 2a edición. Lewis Publishers. 1993. USA. pp. 74-83.
22. Laboratorio de Tecnología farmacéutica II. Manual de prácticas. Facultad de Química. UNAM. México, 1992. pp. 43-49.
23. Antibiotic Guide. Johns Hopkins División of Infectious Diseases.
<http://hopkins-abxguide.org>
24. Palomeque, M.; Bautista, J.A. García; García Mateo, J.V.; Calatayud, J. Martínez. *Flow injection biampometric determination of metronidazole with on-line photodegradation* (Analytica Chimica Acta, Volume: 401, Issue: 1-2, November 29, 1999, pp. 229-236).

25. Özkan, S.A.; Özkan, Y.; Sentürk, Z. *Electrochemical reduction of metronidazole at activated glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical dosage forms* (*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume: 17, Issue: 2, June, 1998, pp. 299 - 305).
26. López-de-Alba, Pedro Luís; Wróbel, Katarzyna; López-Martínez, Leticia; et. al. *Application of the bivariate spectrophotometric method for the determination of metronidazole, furazolidone and di-iodohydroxyquinoline in pharmaceutical formulations* (*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume: 16, Issue: 2, October, 1997, pp. 349-355)
27. Bari, Viddesh R.; Dhorda, U.J.; Sundaresan, M. *Simultaneous estimation of nalidixic acid and metronidazole in dosage forms using packed column supercritical fluid chromatography* (*Analytica Chimica Acta*, Volume: 376, Issue: 2, December 11, 1998, pp. 221-225).
28. Brett, Ana María Oliveira; Serrano, S.H.P.; Gutz, I.; La-Scalea, M.A. *Electrochemical reduction of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode* (*Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Volume: 42, Issue: 2, May, 1997, pp. 175-178).