



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DEL ANTIBIÓTICO TOBRAMICINA Y
FORMACIÓN DE COMPLEJOS CON CATIONES METÁLICOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

KARLA FERNÁNDEZ MACARIO

DIRECTOR DE TESIS

Dr. EUGENIO OCTAVIO REYES SALAS

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas

VOCAL: M. en C. Francisco Rojo Callejas

SECRETARIO: Q. Ricardo Flores Hernández

1er. SUPLENTE: M. en C. Erik Alberto Rodríguez Morales

2° SUPLENTE: Q. Luis Daniel Sifuentes Vázquez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DEPG.
LABORATORIO 114. SÓTANO DEL EDIFICIO B.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas

SUSTENTANTE:

Karla Fernández Macario

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Fibrosis quística	2
2.2 Conjuntivitis	5
2.3 Tobramicina	
2.3.1 Antecedentes históricos	6
2.3.2 Propiedades	7
2.3.3 Cuantificación en formulaciones farmacéuticas	8
2.4 Fundamentos de electroquímica	
2.4.1 Voltamperometría	10
2.4.2 Polarografía	11
2.4.3 Polarograma	13
2.4.4 Polarografía clásica	15
2.4.5 Polarografía diferencial de impulsos	16
2.4.6 Potenciometría	18
2.4.7 Conductimetría	18
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	20

3.2 Objetivos particulares	20
4. METODOLOGÍA	
4.1 Reactivos y soluciones	21
4.2 Equipo	22
4.3 Valoración ácido-base de la Tobramicina	22
4.4 Pruebas cualitativas de Tobramicina con algunos cationes metálicos	22
4.5 Valoración potenciométrica de la Tobramicina con nitrato de plata, sulfato de cobre y nitrato de mercurio	23
4.6 Estudio electroquímico fundamental de la Tobramicina	23
4.7 Valoración complejométrica	24
4.8 Cuantificación de la Tobramicina en una muestra de materia prima en polvo mediante una valoración complejométrica	25
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	
5.1 Conductimetría	26
5.2 Valoración ácido-base de la Tobramicina	26
5.3 Pruebas cualitativas de Tobramicina con algunos cationes metálicos	28
5.4 Valoración potenciométrica de la Tobramicina con nitrato de plata	30
5.5 Valoración complejométrica de la Tobramicina con sulfato de cobre	31
5.6 Valoración potenciométrica de la Tobramicina con nitrato de mercurio	33

5.7 Dominio de electroactividad	34
5.8 Electroquímica de la Tobramicina	
5.8.1 Polarografía clásica (PC)	35
5.8.2 Polarografía diferencial de impulsos (PDI)	38
5.9 Equilibrios de complejación	39
5.9.1 Complejos de Ag(I) con Tobramicina	40
5.9.2 Complejos de Hg(II) con Tobramicina	47
5.9.3 Complejos de Cu(II) con Tobramicina	49
5.10 Complejos metálicos de Tobramicina	50
5.11 Cuantificación de la Tobramicina en una muestra de materia prima mediante una valoración complejométrica	50
6. CONCLUSIONES	54
7. PERSPECTIVAS	56
8. BIBLIOGRAFÍA	57
9. ANEXOS	
9.1 Determinación de la concentración del ácido clorhídrico	60
9.2 Titulación ácido-base de la Tobramicina con ácido clorhídrico	62
9.3 Determinación de la concentración del nitrato de plata	63
9.4 Determinación de la concentración del sulfato de cobre	64
9.5 Determinación del límite de detección y linealidad del método	66
9.6 Curva de calibración y límite de detección de la plata	69

9.7 Estudio logarítmico de las curvas i/E para la obtención del potencial de media onda ($E_{1/2}$) de la Tobramicina	71
9.8 Gráficos de Tafel	73
9.9 Determinación de la estabilidad de los complejos formados	
9.9.1 Determinación de la constante de disociación condicional utilizando el método de relación de corrientes	76
9.9.2 Determinación de la constante condicional de formación	79
9.9.3 Determinación de las constantes de formación globales y la obtención de las constantes de disociación con $Hg(II)$	82
9.10 Cuantificación de Tobramicina en una muestra mediante una valoración complejométrica con $Cu(II)$	84



Hipócrates (Padre de la medicina) atendiendo un niño

1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son usados para tratar enfermedades en humanos y animales. Su mecanismo de acción radica en matar a los microbios o al menos detener su crecimiento. El sistema inmune humano también es importante para curar la infección^[1].

Los aminoglucósidos son antibióticos de amplio espectro altamente potentes, con muchas propiedades deseables para el tratamiento de infecciones que amenazan la vida.

La Tobramicina es un antibiótico aminoglucósido usado comúnmente para tratar la osteomielitis causada principalmente por *Staphylococcus aureus*; también se emplea en casos de conjuntivitis, contra la fibrosis quística y en enfermedades pulmonares crónicas debido a *Pseudomonas aeruginosa*, ya que tiene actividad especialmente contra las bacterias Gram-negativas^[2].

En la industria farmacéutica, se debe tener un riguroso control de calidad en cuanto a la producción de los medicamentos y su administración, ya que una mala dosificación en el principio activo, puede traer graves consecuencias al paciente. Algunos de los métodos analíticos usados para la cuantificación de la tobramicina es por medio de inmunoensayos, métodos espectrofotométricos, cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masas (LC-MS-MS) y cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UPLC); sin embargo, estas metodologías tienen la desventaja de ser muy costosas en el caso de los métodos cromatográficos, o muy laboriosas como en los inmunoensayos o métodos espectrofotométricos^[3].

En este trabajo se presenta un método alternativo para el control de calidad de la tobramicina usando un método polarográfico, además de que se incluye el estudio de la formación de complejos entre este antibiótico con los cationes Ag(I), Hg(II) y Cu(II). Para realizar este estudio, se utilizó el método de relaciones molares aplicado a la polarografía.



Oftalmología en la práctica de la medicina general (siglo XVI)

1. ANTECEDENTES

2.1 Fibrosis quística

Alrededor del siglo XV, se creía que cuando una persona presentaba sabor salado en el sudor, se encontraba bajo un hechizo, así por ejemplo podemos encontrar en un libro titulado "German Children's Songs and Games from Switzerland", una frase del folclor suizo la cual dice "Ay, de aquel niño que al ser besado en la frente sabe salado. Él está embrujado y pronto va a morir". De igual manera, en el año de 1595, un profesor holandés de nombre Peter Pauw al realizarle la autopsia a una niña de 11 años, en su informe concluyó: "... se suponía que la niña estaba hechizada... la niña estaba muy flaca... el páncreas estaba abultado, cirroso y color blanco brillante..."^[4]. Este tipo de historias se encontraron sobre todo en pueblos de Europa de países como Polonia, Eslovaquia, Hungría, Rumania, Italia y otros.

En 1905, el patólogo y biólogo austriaco Karl Landsteiner, describe una asociación entre el meconio espeso de un recién nacido y la fibrosis que presentaba el páncreas, y especuló que ambas enfermedades se deben a la deficiencia de una enzima^[5].

Guido Fanconi era un pediatra suizo que en 1936, fue el primero en utilizar el término fibrosis quística para describir la combinación de la enfermedad pulmonar crónica en niños y la insuficiencia pancreática^[6].

En 1938, Dorothy Andersen escribió un artículo, en el cual describía la muerte de bebés, ocasionada por daños severos al páncreas así como por enfermedad pulmonar. Ella nombró a la enfermedad fibrosis cística del páncreas. Cístico hacía referencia a los quistes que están infectados y sacos llenos de fluido, mientras que fibrosis, se usó para las fibras de la cicatriz del tejido, siendo todo lo que encontró en el páncreas de los niños que murieron^[7].



Figura 1. Dorothy H. Andersen aceptando un premio por el descubrimiento de la fibrosis cística.

Darling, Di Sant'Agnese, Perera y Anderson en 1953, establecieron un valor diagnóstico para la cantidad de cloruro de sodio en el sudor, en la cual estos iones se encuentran en concentraciones elevadas (cloruros $> 60\text{mmol/L}$), además de que debe estar unido a enfermedad obstructiva crónica típica e insuficiencia pancreática^[8].

La fibrosis quística es una enfermedad autosómica recesiva que afecta preferentemente a la población de origen caucásico. Esta enfermedad es causada por una mutación en el gen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) en el cromosoma 7, la mutación más frecuente se lleva a cabo en la pérdida del aminoácido fenilalanina. La naturaleza de las mutaciones se relaciona con la gravedad de la alteración pancreática y el grado anormal de cloruro en el sudor. La proteína CFTR es una glicoproteína transportadora de membrana responsable de una de las vías de transporte de iones Cl^- en las células epiteliales y también puede controlar la función de otras proteínas de membrana como los canales auxiliares de cloro y sodio. Se localiza en la membrana apical de diferentes células epiteliales, tales como las células epiteliales de las vías aéreas, glándulas submucosas del tracto gastrointestinal, hígado, vesícula biliar y páncreas. Las manifestaciones clínicas más habituales son por enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia pancreática exocrina y elevación de cloruro en sudor^[9].

A través de los movimientos de los iones cloruro, se facilita la hidratación de los fluidos de la superficie de la cavidad aérea, los cuales forman una capa de moco que recubre las células epiteliales y así se facilita la captura de bacterias. En las personas afectadas, la hidratación de estos fluidos se ve disminuida, lo que resulta en un moco más delgado y pegajoso que provee del ambiente ideal para que las bacterias infecten y se reproduzcan^[10].

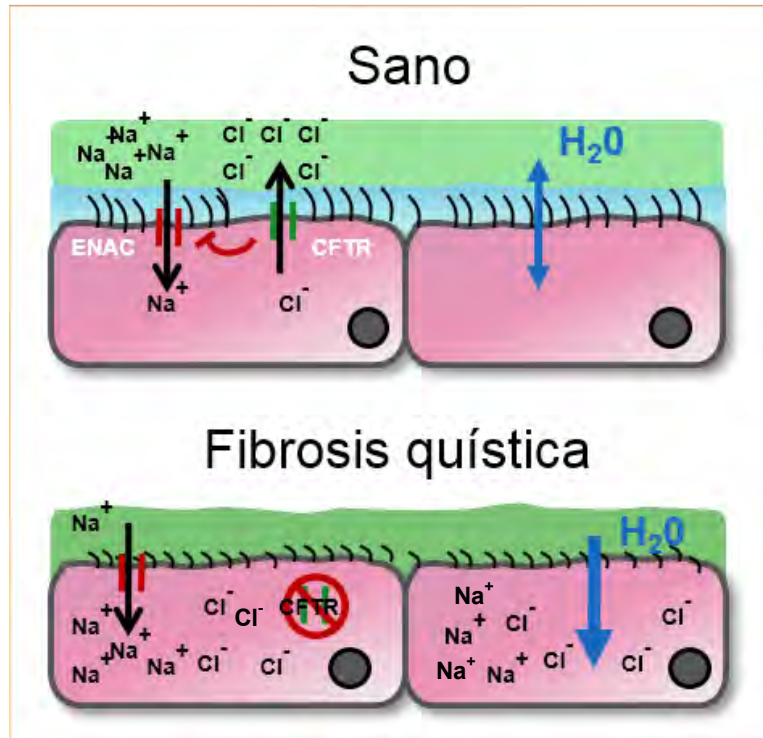


Figura 2. Regulación del fluido de superficie de las vías aéreas.

Las CFTR secretan iones Cl^- e inhiben la absorción de Na^+ , permitiendo el movimiento de agua a través de procesos de ósmosis. En los afectados, se retienen los Cl^- y Na^+ en la célula provocando la entrada de agua a la célula y deshidratando el moco^[10].



Figura 3. Pulmones de un paciente con fibrosis quística y pulmones de un paciente sano.

El diagnóstico para la fibrosis quística, se ha basado en una prueba cuantitativa del sudor positiva, la cual fue propuesta por L. Gibson y R. Cooke en 1959^[11], en donde se utiliza el método de iontoforesis con pilocarpina; consiste en recuperar el sudor y hacer el posterior análisis químico de su contenido en cloruros, siendo hoy en día la prueba de diagnóstico estándar. La determinación de los iones sodio, es para validar el contenido de cloruros; no debe exceder de 20 mmol L^{-1} de diferencia entre ambos iones^[12].

2.2 Conjuntivitis

Bostock en 1819, fue el primero en establecer la conjuntivitis atópica como una entidad clínica. MacCulloch años más tarde en 1928, asoció esta condición con los cultivos de heno. En 1883 el médico Robert Koch en un viaje a Egipto, logró diferenciar dos tipos de conjuntivitis bacteriana. John Weeks en 1886 descubrió el virus que causaba la enfermedad del ojo rosado.

La conjuntivitis bacteriana es la segunda más común infección de conjuntivitis; sin embargo, la afección no presenta muchas complicaciones y se puede tratar de una a dos semanas, con antibióticos para disminuir la duración de la enfermedad.

Puede contraerse directamente de una persona infectada, o ser resultado de una proliferación anormal de la biota nativa, difusión oculogenital y fómites

contaminados. Los patógenos más comunes causantes de la conjuntivitis bacteriana en adultos, pertenecen a las especies de *staphylococcal*, seguidas por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.

Todos los antibióticos de amplio espectro parecen en general ser efectivos en el tratamiento de la conjuntivitis bacteriana, no hay diferencias significativas en la cura clínica entre cualquiera de los antibióticos tópicos de amplio espectro. Los factores que influyen en la elección del antibiótico son disponibilidad local, alergias del paciente, patrones de resistencia y costo^[13].

2.3 Tobramicina

2.3.1 Antecedentes históricos

El descubrimiento de la estreptomina por el químico y microbiólogo Selman A. Waksman en 1944 contribuyó significativamente a la terapia de la tuberculosis siendo así el primer antimicrobiano activo contra *Mycobacterium tuberculosis* y el inicio de la era de la investigación de los antibióticos aminoglucósidos. Tras el descubrimiento de la estreptomina la cual se aisló a partir de una cepa de *Streptomyces griseus*, se fueron obteniendo de otras especies de *Streptomyces* los antibióticos neomicina (1949), y kanamicina (1957), que fueron descubiertos y aplicados para el control de infecciones causadas por bacterias gram-negativas. Para mejorar la actividad antibacteriana y disminuir la toxicidad se continuó investigando y así surgieron: tobramicina (1974), amikacina (1972), dibekacina (1971) y netilmicina (1975) que son semisintéticos, excepto la tobramicina^[13].

La tobramicina, inicialmente denominada “nebramicina factor 6”, es un antibiótico aminoglucósido aminociclitol. Se trata de uno de los componentes del complejo antibiótico nebramicina, producido por *Streptomyces tenebrarius*.



Figura 4. Actinobacteria *Streptomyces tenebrarius*

In vitro resulta más activa que la gentamicina frente a cepas de *Acinetobacter* spp. Y *P. aeruginosa*, pero menos activa contra *Serratia marcescens*, aunque estos hallazgos no han sido confirmados *in vivo*.

Algunos estudios plantean el uso beneficioso de la tobramicina inhalatoria en pacientes con fibrosis quística e infección crónica por *P. aeruginosa*, con mejoría de la función pulmonar y reducción sustancial de la frecuencia de hospitalización. Es menos nefrotóxica y más costosa que la gentamicina^[14].

2.3.2 Propiedades

La Tobramicina tiene la fórmula química molecular $C_{18}H_{37}N_5O_9$, es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro compuesto por 2 aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un núcleo de aminociclitol, es un bactericida que inhibe la síntesis proteica de los microorganismos, especialmente los gram-negativos aerobios y enterobacterias.

La Tobramicina es un polvo blanco opaco, fácilmente soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol, presenta un punto de fusión de 178 °C y

presenta un carácter básico debido principalmente a los grupos amino que posee^[14].

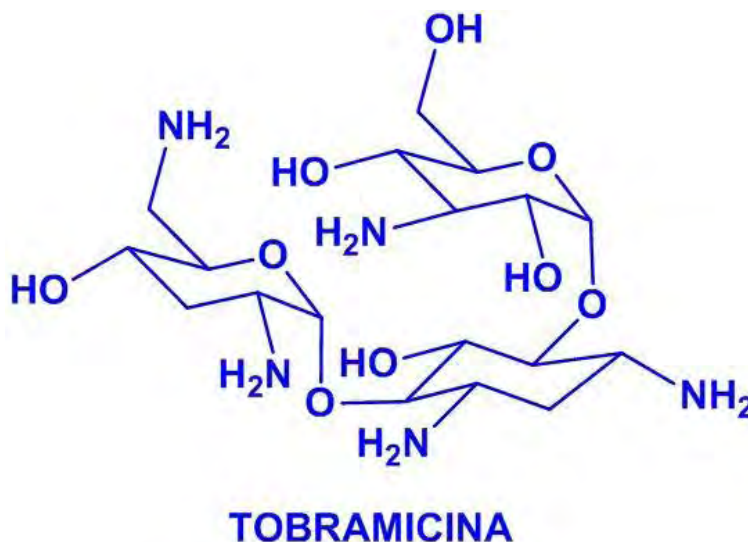


Figura 5. Tobramicina

Las propiedades fisicoquímicas reportadas para la tobramicina son las siguientes:

- ❖ Nombre IUPAC: 4-amino-2-[4,6-diamino-3- [3-amino-6-(aminomethyl) -5-hydroxy-tetrahydropyran-2-yl]oxy-2-hydroxy-cyclohexoxy]-6-(hydroxymethyl) tetrahydropyran-3,5-diol.
- ❖ Presenta dos pKa's de 13.1 y 9.8.
- ❖ Clase: aminoglucósidos.
- ❖ Peso molecular de la tobramicina: 467.5 g/mol
- ❖ Identificación: Cromatografía en capa fina con revelador de ninhidrina en butil alcohol y piridina (1:100), mancha color rosa.

2.3.3 Cuantificación en formulaciones farmacéuticas

La cantidad de Tobramicina que debe contener el medicamento es de no menos de 90% y no más de 120% de lo que marca el membrete. Las presentaciones farmacéuticas en las que se puede encontrar son: inyección de Tobramicina (solución estéril de sulfato de tobramicina en agua para inyección o tobramicina en agua para inyección), Tobramicina para inyección (sulfato de tobramicina para

reconstituir), solución para inhalación (tobramicina en agua para inyección que contiene NaCl), ungüento oftálmico, suspensión oftálmica de Tobramicina con Dexametasona y ungüento oftálmico de Tobramicina con Dexametasona^[15].

El método espectroscópico es uno de los usualmente empleados para cuantificar la Tobramicina y sus impurezas; sin embargo, el inconveniente que presenta es que los aminoglucósidos así como la mayoría de los carbohidratos, carecen de un buen cromóforo y por lo tanto requieren de altas concentraciones para poder ser detectados por absorbancia UV, aunado a que muchos de los ingredientes usados en la fabricación como intermedarios o en el producto final de la formulación, son cromóforos y pueden interferir con la detección directa de la Tobramicina^[16]. El método está basado en una reacción llevada a cabo entre la Tobramicina y una solución de sulfato de cobre^[17].

El método que establece la USP 39-NF 34 para la valoración de la Tobramicina en cualquiera de sus presentaciones farmacéuticas, es la cromatografía de líquidos y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida^[18].

Aunque el método de HPLC con detección espectroscópica es el usado convencionalmente, se dificulta debido a la falta de cromóforos fuertes en la estructura molecular. Por lo tanto, tradicionalmente se ha realizado el análisis utilizando la derivatización pre-columna con detección UV o fluorescente o la derivatización post-columna con detección fluorescente. Sin embargo, estos métodos de derivatización requieren un proceso complicado de la preparación de la muestra y si la derivatización es incompleta o inestable puede ser una fuente de error en el método, además de que la sensibilidad en estas técnicas es relativamente baja (del orden de 10^{-6} mol L⁻¹)^[19].

El método de HPLC-MS consiste en usar el método de HPLC de fase reversa donde se utiliza una columna C-8 a un pH básico y la fase móvil es un buffer de amonio/amoniaco y para la detección directa se usa el método de espectrometría de masas. Ésta combinación de separación-detección proporciona una determinación simple y específica de la Tobramicina^[20].

También se emplea el método usando HPLC en tándem con MS/MS para muestras de plasma donde primero se precipitan las proteínas como proceso de limpieza y permite la cuantificación de concentraciones debajo de 10.5 ppm^[21].

La técnica de cromatografía de interacción hidrofílica combinada en tándem con espectrometría de masas (HILIC-MS/MS) es una técnica poderosa y robusta por su cuantificación simultánea altamente específica de algunos aminoglucósidos tales como amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina y tobramicina en matrices biológicas, debido a que es adecuado para el análisis de compuestos polares, es utilizada para monitorización terapéutica, para cuestiones clínicas y farmacocinéticas^[22].

La cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPAE), es una técnica usada para separar las impurezas de la tobramicina, usando un eluyente de hidróxido de sodio para poder eliminar la contaminación por carbonatos. Sin embargo, el uso de estas técnicas resulta muy costoso^[23].

Actualmente se ha adoptado en conjunto con la técnica de detección amperométrica de pulsos (PAD) utilizando un electrodo de trabajo de oro, la cual es una potente técnica con un amplio intervalo lineal y con límites de detección muy bajos para antibióticos aminoglucósidos siendo de concentraciones del orden de 500 ppm^[24].

2.4 Fundamentos de electroquímica

2.4.1 Voltamperometría

Es el conjunto de métodos electroanalíticos que tiene por objeto la obtención e interpretación de las curvas de intensidad de corriente medida en una celda electroquímica, en función del potencial aplicado a un electrodo pequeño. La celda electroquímica en donde se obtiene toda la información del sistema consta de 3 electrodos: electrodo de trabajo, electrodo de referencia y un electrodo auxiliar. El potencial es medido con respecto al electrodo de referencia y la corriente se mide entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar.

2.4.2 Polarografía

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, el término de voltamperometría se usa para caracterizar los métodos en los cuales el trazo de las curvas intensidad de corriente – potencial se realice con cualquier electrodo sólido y el término de polarografía se reserva sólo al utilizar el electrodo de gota de mercurio (EGM).

Generalmente se utiliza un montaje de tres electrodos, en donde se mide la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia con un voltímetro de alta resistencia interna, de modo que apenas circula corriente por este circuito. Así se tiene que el potencial medido corresponde al electrodo indicador. La microelectrolisis es llevada a cabo en el electrodo indicador y en el electrodo auxiliar pudiendo ser éste de cualquier forma o material.

El electrodo de gota de mercurio consiste en un tubo capilar de vidrio (de 0.06 mm – 0.08 mm de diámetro interno y entre 10 cm – 15 cm de longitud), conectado a un depósito de mercurio. En cuanto a la caída de la gota de mercurio, se cuenta con dispositivos automatizados que controlan la caída con un martillo impulsado de forma mecánica o con impulsos electromagnéticos, obteniéndose una frecuencia de caída de gota de aproximadamente una gota cada 1 – 6 segundos, midiéndose la corriente y el voltaje.

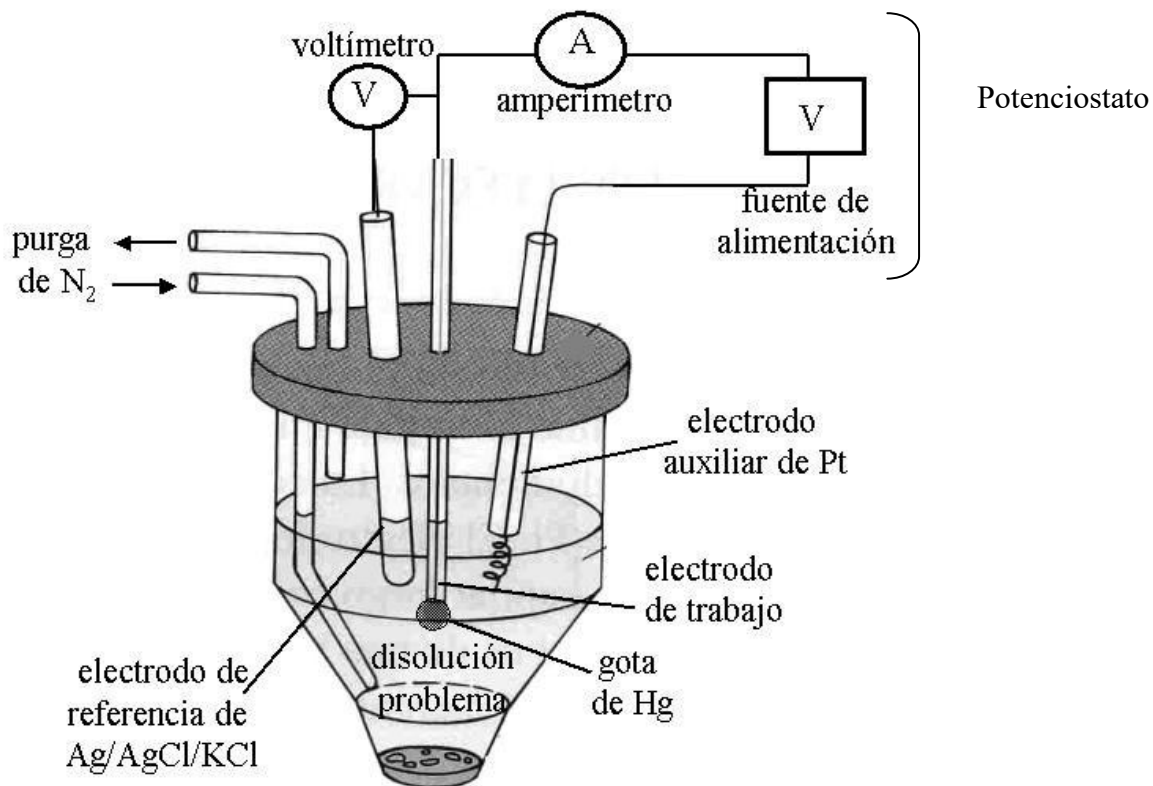


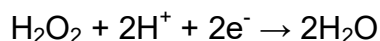
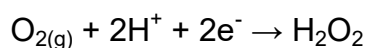
Figura 6. Electrodo de gota de mercurio y celda polarográfica. Se puede observar la purga de N_2 para eliminar las trazas de O_2 disueltas en la muestra que podrían interferir en la medida^[24]

Al utilizar el método polarográfico de gota de mercurio, se pueden obtener las siguientes ventajas:

- Debido a la elevada tensión que presenta para la reducción de iones H^+ , se amplía considerablemente el campo de estudio (para efectuar reducciones) en medio ácido ya que sobre el mercurio se pueden llegar hasta potenciales inferiores a ≈ -1.7 V en cambio sobre platino los iones H^+ se reducen sólo hasta un potencial de ≈ 0 V.
- Las curvas intensidad-potencial son muy reproducibles al renovarse continuamente el área del electrodo evitando el riesgo por contaminación, además de controlarlo al regular la altura del depósito de mercurio.
- La cantidad de sustancia electrolizada es muy pequeña debido a que la corriente de electrólisis y el área de la gota también lo son.

Sin embargo, se deben considerar ciertos inconvenientes que pudieran presentarse tales como son:

- Su uso como ánodo es limitado debido a que el mercurio se oxida a potenciales ligeramente superiores a 0.8 V (0.55 V respecto al electrodo de calomel).
- Para los métodos polarográficos clásicos se tiene una limitante en la sensibilidad debido a que se presenta una corriente residual capacitiva que puede ser mayor que la propia corriente de electrólisis para concentraciones del analito aproximadas a 10^{-5} mol L⁻¹.
- Se debe eliminar previamente el oxígeno disuelto, debido a que se producen dos ondas de reducción correspondientes a los siguientes procesos^[25]:



2.4.3 Polarograma

Se puede identificar en un polarograma las barreras de reducción y oxidación que corresponderían a reacciones electroquímicas en donde la especie que se electroliza se encuentra en una concentración relativamente alta; es por eso que la intensidad de corriente suele ser grande. La diferencia de potenciales de barrera puede representarse de la siguiente forma:

$$\Delta E = E_{\text{oxidación}} - E_{\text{reducción}}$$

Esto constituye lo que se conoce como dominio de electroactividad.

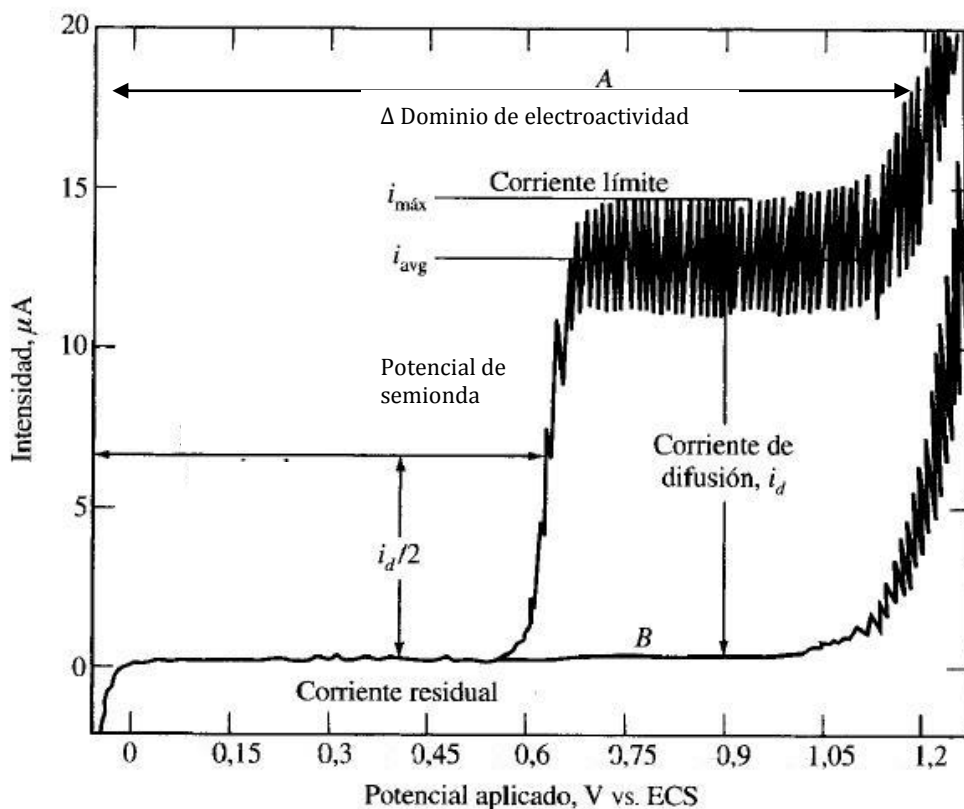


Figura 7. Representación de un polarograma

El valor del potencial de semionda, corresponde a la mitad de la onda global ($E_{1/2}$) y coincide con el potencial normal condicional del par redox (E°).

La corriente límite o corriente límite de difusión convectiva (i_D) es proporcional al número de electrones intercambiados del analito en el proceso electroquímico y a la concentración de sustancia electroactiva (analito) en la disolución y es obtenida cuando todo el analito se oxida o se reduce (este proceso es debido a que fue transportado por difusión a la superficie del electrodo de trabajo). La ecuación que describe la relación que existe entre la concentración del analito y la corriente límite, es la siguiente:

$$i_D = nK_D C^*$$

i_D : Corriente límite de difusión

n: Número de electrones intercambiados en la reacción

K_D : Constante de proporcionalidad que depende de las condiciones experimentales (superficie del electrodo, régimen de difusión)

C: Concentración en disolución de la especie que da lugar al proceso.

La relación entre el potencial impuesto al electrodo de trabajo y la intensidad de corriente de electrólisis media, se expresa con una variante de la expresión de Nernst donde los valores de las actividades de oxidante y reductor son substituidos por sus expresiones de corriente:

$$E = E^{o'} + \left[\frac{2.3 RT}{nF} \right] \log \left[\frac{K_D^{Red}}{K_D^{Ox}} \right] + \left[\frac{2.3 RT}{nF} \right] \log \left[\frac{i - i_{ox}}{i_{Red} - i} \right]$$

Que equivale aproximadamente (30°C):

$$E = E_{1/2} + \left[\frac{0.06}{n} \right] \log \left[\frac{i - i_{ox}}{i_{Red} - i} \right]$$

2.4.4 Polarografía clásica

La oxidación o reducción de una sustancia se realiza en un electrodo denominado indicador, mientras en el segundo electrodo, en general, el potencial permanece fijo. El valor de la corriente límite de difusión, i_{ox} o i_{Red} , es proporcional a la concentración de la sustancia oxidada o reducida en el electrodo indicador.

Por consiguiente en una determinación polarográfica se lleva a cabo una microelectrólisis con un electrodo indicador; variando la tensión de la electrólisis se obtiene la curva $i = f(E)$ en el electrodo.

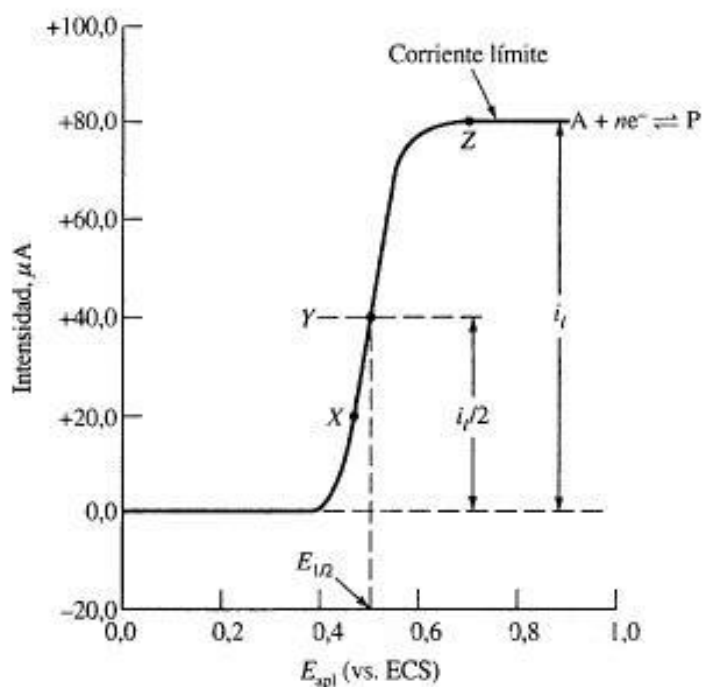


Figura 8. Curva de intensidad-potencial para la reacción electroquímica:
 $\text{Ox} + e^{-} \rightarrow \text{Red}$

A continuación se mide la altura de la onda de difusión, la cual en unas condiciones experimentales convenientes, es proporcional a la concentración de la sustancia reducida u oxidada en el electrodo indicador:

$$i_D = m * K_D * C$$

2.4.5 Polarografía diferencial de impulsos

La técnica de impulsos más común y eficiente es la polarografía diferencial de impulsos (PDI). En los instrumentos digitales la señal de excitación consiste en un incremento del potencial en forma de rampa escalonada (ΔE_p), al cual se le aplican en sucesión periódica, impulsos de potencial constante (amplitud del impulso ΔE_A). La superposición está sincronizada con el tiempo de goteo (t_g) y con la superficie del electrodo.

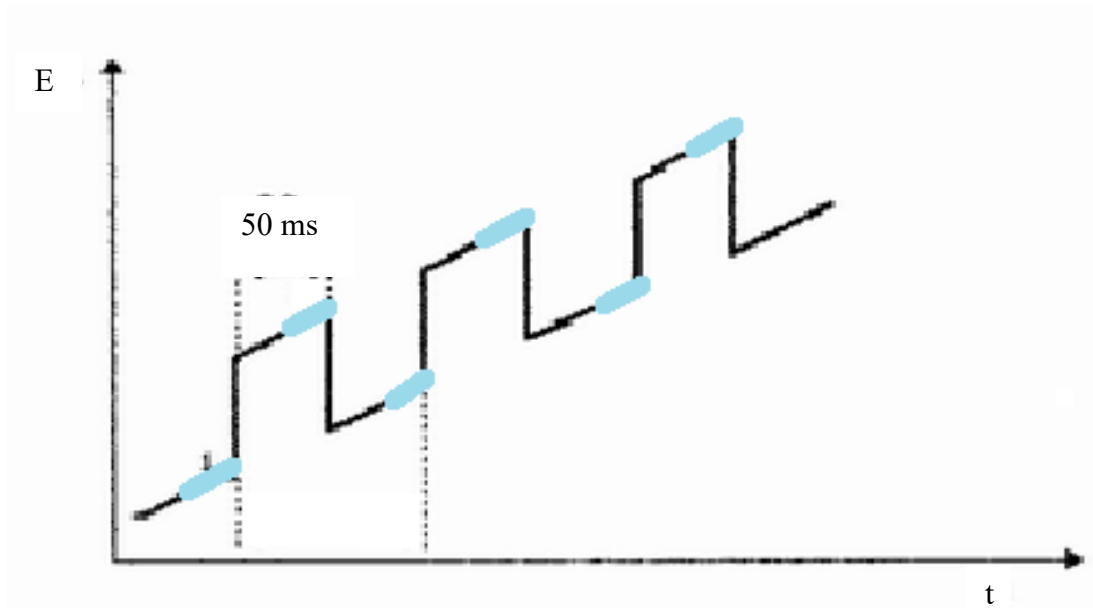


Figura 9. Señal de excitación y curva de intensidad de corriente-potencial para polarografía diferencial de impulsos (PDI). La corriente se mide sólo en los intervalos indicados en rayas gruesas

La intensidad de corriente se mide dos veces para cada gota de mercurio, 1) antes de cada impulso y 2) al final del tiempo de impulso, t_p , justo antes de la caída de la gota. Las diferencias entre las medidas de corriente (Δi) se representan en función del potencial y al ser mayor en la región del potencial de semionda, se obtienen gráficas en forma de picos.

Se reduce la corriente capacitiva debido a las diferencias de las intensidades de corriente y por lo tanto aumenta la sensibilidad de la técnica.

Para los procesos electroquímicos reversibles, la altura del pico i_p es proporcional a la concentración del analito y depende de la amplitud ΔE_A de los impulsos y del tiempo del impulso t_p y tiempo de goteo t_g , entre otros factores.

2.4.6 Potenciometría

Esta técnica está basada en la determinación de potenciales de celdas electroquímicas en ausencia de corriente apreciables.

La determinación de los potenciales permite conocer la especie que se tiene y la magnitud de la corriente permite conocer la concentración de una sustancia o seguir las variaciones de esta concentración en el curso de una reacción química. También se puede controlar la síntesis de un producto durante su fabricación o determinar el punto de equivalencia de una reacción de valoración, siendo éste último aspecto la aplicación más importante de la potenciometría^[26].

El tipo de electrodo de referencia usado en este trabajo, fue un electrodo de segundo tipo, el cual es de tipo metálico y responde a la actividad de un anión con el que forma el precipitado o un ion complejo estable. Por ejemplo, la plata puede servir como un electrodo de segundo tipo para haluros.



Al aplicar la ecuación de Nernst se obtiene:

$$E = 0.222 \text{ V} - 0.0592 \text{ V} * \log \alpha_{Cl^{-}}$$

Donde los electrodos de referencia de plata-cloruro de plata y calomelanos, pertenecen a este tipo de electrodos.

2.4.7 Conductimetría

Las conductividades de los electrolitos varían considerablemente dependiendo de su concentración y la naturaleza de los iones. Es más fácil comparar la

conductividad de electrolitos diferentes tomando en cuenta su concentración, de esta forma surge el término conductividad molar, Λ .

$$\Lambda = \frac{\kappa}{C}$$

Donde normalmente la concentración, C , se expresa en moles por cm^3 ; por tanto las unidades de la conductividad molar son $\text{S mol}^{-1} \text{cm}^2$.

De esta forma, el valor de Λ representaría la conductividad hipotética que tendría una mol de un electrolito en disolución, medido dentro de una celda de 1 cm de lado.

La ecuación de Kohlrausch, describe la relación que hay entre el valor de la conductividad con el de la conductividad límite, siendo obtenida ésta última al disminuir la concentración del electrolito o aumentar su dilución, ya que la conductividad molar aumenta y tiende a un valor límite constante, denotando esta conductividad límite con el símbolo Λ° .

$$\Lambda = \Lambda^\circ - k\sqrt{C}$$

Esta ecuación proporciona un buen método para la determinación de los valores de Λ° de electrolitos fuertes. También se llegó a la conclusión que la contribución de cada ión a la conductividad límite de un electrolito es una cantidad definida e independiente de la naturaleza de otro ion, lo cual se expresa en la siguiente ecuación:

$$\Lambda^\circ = \lambda^\circ_+ + \lambda^\circ_-$$

En donde λ°_+ y λ°_- corresponden a las conductividades límite del catión y anión respectivamente.



Robert Koch (1843-1910)

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo general*

Realizar el estudio químico analítico de la Tobramicina para determinar si es posible el uso de métodos electroquímicos para poder cuantificarlo y determinar su pureza en un preparado farmacéutico.

3.2 *Objetivos particulares*

- Realizar el estudio de las propiedades ácido base de la Tobramicina en disolución acuosa utilizando potenciometría.
- Realizar un estudio electroquímico fundamental de la Tobramicina en disolución acuosa por polarografía.
- Estudiar la formación de complejos de Tobramicina con Ag(I). Determinar la estequiometría y la constante de disociación condicional de los complejos que se formen.
- Estudiar la formación de complejos de Tobramicina con Hg(II). Determinar la estequiometría y la constante de disociación condicional de los complejos que se formen.
- Estudiar la formación de complejos de Tobramicina con Cu(II). Determinar la estequiometría y la constante de disociación condicional de los complejos que se formen.
- Proponer una metodología en donde se pueda implementar la polarografía para determinar el contenido de Tobramicina en una muestra de materia prima en polvo de Tobramicina.



Alexander Fleming (1881-1955) descubridor del primer antibiótico, la penicilina.

4. METODOLOGÍA

4.1 Reactivos y soluciones

Tabla 1. Reactivos utilizados.

Reactivo	Pureza	Marca comercial
Nitrato de plata	99.5%	Merck
Cloruro de hierro (III) hexahidratado	R.A.	J.T. Baker
Sulfato de Zinc hexahidratado	R.A.	Aldrich
Sulfato de cobre pentahidratado	R.A.	J.T. Baker
Cloruro de calcio dihidratado	99.5%	Mallinckrodt
Cloruro de aluminio hexahidratado	R.A.	Mallinckrodt
Ácido clorhídrico	36.5%	J.T: Baker
Carbonato de sodio anhidro	99.6%	Mallinckrodt
Cloruro de potasio anhidro	99.97%	J.T. Baker
Buffer boratos pH 10	R.A.	R.A.
Nitrato de mercurio (II)	R.A.	R.A.
Nitrato de potasio	99%	Meyer
Nitrato de níquel	R.A.	Barsa
Tobramicina	R.A.	USP
Agua desionizada	-	-

4.2 Equipo

- 713 pHmetro marca Metrohm modelo CH-9101 Herisau fabricado en Suiza, medidor de pH, voltaje y temperatura con el cual se realizan valoraciones ácido-base.
- Conductímetro marca Metrohm modelo 644, utilizado para medir la conductividad del compuesto.
- pH-metre, titrimetre modelo 2G 8N, Tacussel electronique, medidor de potencial y pH, utilizado para hacer las valoraciones potenciométricas usando electrodos de trabajo de vidrio, plata y cobre y un electrodo de referencia de Ag|AgCl de compartimento separado y con electrolito soporte de KNO_3 0.5 mol L^{-1} .
- Polarógrafo modelo 797 VA Computrace marca Metrohm que funciona con el software 797 VA Computrace Software 1.2 y adaptado a un electrodo de gota de mercurio (EGM), este aparato será utilizado para realizar barridos de potencial utilizando la técnica DME (Dropping Mercury electrode).

4.3 Valoración ácido-base de la Tobramicina

Se realizó la valoración con un pHmetro 713 de la marca Metrohm, preparándose una solución de Tobramicina de aproximadamente 0.01 mol L^{-1} . Se tomó una alícuota de 3 mL de Tobramicina, que se colocó en un vaso de precipitados con una barra magnética de agitación; mediante una micropipeta de $10 \mu\text{L}$ - $100 \mu\text{L}$, se agregó una solución de HCl de concentración conocida, hasta el punto final de la valoración.

4.4 Pruebas cualitativas de Tobramicina con algunos cationes metálicos

Se realizaron pruebas a la gota en una placa de Toque entre Tobramicina en disolución acuosa y las siguientes sales: AgNO_3 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , CuSO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Esta prueba fue realizada con el fin de observar si se

daba una reacción y así pudiese formarse algún complejo de interés en la industria farmacéutica.

4.5 Valoración potenciométrica de la Tobramicina con nitrato de plata, sulfato de cobre y nitrato de mercurio.

El método de potencimetría se utilizó para conocer la estequiometría de la Tobramicina al formar complejos con los cationes Ag(I), Cu(II) y Hg(II); se midió el cambio de potencial de la solución, ya que la medida de potencial depende de la concentración de cada catión.

A una alícuota de 2.0 mL de Tobramicina 4.206 mg/mL, que se colocó en un vaso de precipitados con una barra de agitación magnética, se fueron agregando alícuotas de 25 μL y 20 μL de las disoluciones AgNO_3 0.0055 mol L^{-1} , CuSO_4 0.0073 mol L^{-1} y $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 0.0145 respectivamente. La medición del cambio de potencial en la disolución, se efectuó con el milivoltímetro, titrimetre modelo 2G 8N, Tacussel electronique. El electrodo de trabajo empleado fue un alambre de plata, cobre y otro de mercurio depositado sobre cobre según el caso.

4.6 Estudio electroquímico fundamental de la Tobramicina

El estudio electroquímico de la Tobramicina se realizó por medio de la polarografía, en donde se utiliza un electrodo de gota de mercurio (EGM) como electrodo de trabajo, siendo un caso especial de voltamperometría. Para detectar las posibles señales del compuesto, se trazaron curvas i vs. E utilizando las técnicas de polarografía clásica (PC) y polarografía diferencial de impulsos (PDI). Para llevar a cabo estas mediciones de las curvas obtenidas i/E se utilizó un potenciostato 797 VA computrace de la marca Metrohm con un montaje de 3 electrodos, siendo el electrodo de referencia de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{ac}}$ 3 mol L^{-1} , un electrodo de trabajo de gota de mercurio (EGM) y un electrodo auxiliar compuesto de platino. Se utilizó una solución de KNO_3 0.5 mol L^{-1} pH = 5 y para la valoración con mercurio se usó una solución de boratos pH = 10 como medio de trabajo y

electrolito soporte. Primeramente se trazó la corriente residual, la cual es la curva i/E del electrolito soporte. Después se agregaron alícuotas de la solución de Tobramicina 4.202 mg/mL.

La metodología del trabajo consistió en colocar 20.0 mL de electrolito soporte en la celda electroquímica y burbujear nitrógeno durante 7 minutos, después se mide la corriente residual para posteriormente hacer adiciones de la disolución de Tobramicina con ayuda de una micropipeta de capacidad de 10 μL -100 μL . Al finalizar cada adición se burbujea nitrógeno durante 30 segundos y enseguida se registra la correspondiente curva de i/E bajo las siguientes condiciones: velocidad de barrido de $5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, barrido de potencial de -1.5 V hasta 0.4 mV, en el caso de PDI la amplitud de pulso de 50 mV con una duración de pulso de 0.04 segundos.

4.7 Valoración complejométrica

La valoración complejométrica se llevó a cabo colocando en la celda electroquímica 20.0 mL de KNO_3 0.1 mol L^{-1} , pH = 5 o boratos pH = 10, como electrolito soporte y registrando su corriente residual después de haber burbujeadado nitrógeno durante 3 minutos; posteriormente se agregaron 600 μL de disolución de Tobramicina, después se hicieron adiciones de 60 μL de la disolución del catión, con la finalidad de obtener distintas proporciones para realizar el método de relaciones molares entre el catión y la Tobramicina durante la valoración y determinar la estequiometría del complejo formado.

Posteriormente se realizó una segunda valoración en la cual se colocaron en la celda electroquímica 20.0 mL de KNO_3 0.1 mol L^{-1} , pH = 5, como electrolito soporte y registrando su corriente residual después de haber burbujeadado nitrógeno durante 3 minutos, posteriormente se agregó un volumen conocido del catión (por ejemplo 150 μL de Ag(I) 0.0055 mol L^{-1}) con consecuentes adiciones de 50 μL de Tobramicina para obtener distintas proporciones y realizar el método de relaciones molares, con la finalidad de comprobar la estequiometría de los complejos a formarse.

También se realizó la valoración de Tobramicina con Hg(II), colocando en la celda electroquímica 20.0 mL de boratos pH = 10, como electrolito soporte y registrando su corriente residual después de haber burbujeado nitrógeno durante 7 minutos, posteriormente se agregaron 500 μL de una disolución de Hg(II) 0.011 mol L^{-1} con posteriores adiciones de 30 μL de Tobramicina, para obtener distintas proporciones de ambas especies y así por medio del método de relaciones molares obtener una posible estequiometría de los complejos a formarse.

Se realizó una valoración complejométrica con Cu(II) para lograr cuantificar la cantidad de Tobramicina en una muestra de materia prima en polvo.

4.8 Cuantificación de Tobramicina en una muestra de materia prima en polvo mediante una valoración complejométrica

La valoración complejométrica se realizó agregando primero 10 mL de electrolito soporte de buffer de acetatos pH = 5.75 en la celda del polarógrafo, solución que se burbujeó con nitrógeno durante 6 minutos y se trazó posteriormente la curva de intensidad potencial. Posteriormente se agregaron 1 150 μL de la disolución de cobre $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$ y se burbujeó durante 40 segundos, trazando consecuentemente su curva intensidad-potencial. Enseguida se hicieron adiciones de 100 μL de la solución de Tobramicina hasta llegar a un volumen final agregado de 2450 μL de tal solución, burbujeando en cada adición nitrógeno durante 40 segundos y realizando la respectiva curva de intensidad potencial por cada adición.

Para determinar el contenido de Tobramicina en la muestra de materia prima en polvo, con lote M100602335, la cual según la preparación de la disolución contenía 4.22 mg/mL de Tobramicina, se utilizó la propiedad de la molécula de Tobramicina para poder formar complejos estables con los iones Cu(II). Se calculó el volumen necesario de la alícuota a tomar de la suspensión para obtener una concentración de aproximadamente $8.4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Tobramicina y se utilizó una solución patrón de Cu(II) de $0.0073 \text{ mol L}^{-1}$.



Hongo *Streptomyces griseus*

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 Conductimetría

Reactivo	Conductancia (μS)
Disolvente (agua desionizada)	10
Disoluc. Tobramicina 210.1mg/50ml (alícuota: 6 ml)	72
Tobramicina	72 – 10 = 62

Tabla 2. Resultados de la prueba de conductimetría

El bajo valor de conductancia ($6.2 \times 10^{-5} \Omega^{-1}$) indica que la Tobramicina se encuentra prácticamente no ionizada, ya que la conductividad en solución acuosa que presentó fue muy baja en comparación a la que se tendría si se encontrara en forma ionizada que estaría alrededor de 400 μS para una concentración de 4.202 mg/mL. La conductividad encontrada podría deberse a impurezas iónicas.

$$C_{TB} = \frac{0.2101 \text{ g TB}}{0.050 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ mol TB}}{467.52 \text{ g TB}} = 8.98 \times 10^{-6} \text{ mol/cm}^3$$

$$\text{Si } \Lambda^\circ = 100 \text{ S cm}^3 \text{ mol}^{-1}$$

$$C_{dis} = \frac{62 \times 10^{-6} \text{ S}}{100 \text{ S cm}^3 \text{ mol}^{-1}} = 3.9 \times 10^{-8} \text{ mol/cm}^3$$

$$\text{Impurezas} = \frac{3.9 \times 10^{-8}}{8.98 \times 10^{-6}} \times 100 \% = 0.6 \%$$

5.2 Valoración ácido-base de la Tobramicina

Conforme a la estructura de la Tobramicina mostrada en la Figura 10 se puede pensar que un método eficiente para determinar la pureza de la sustancia en cuestión, sería por medio de una valoración ácido-base, ya que se presentan

grupos hidroxilo y amino confiriéndole una naturaleza básica, lo cual nos puede proporcionar al menos un salto al valorarlos con un ácido. En la literatura se indica que la molécula presenta cinco pKa de 9.29, 8.39, 7.71, 7.06 y 5.6^[21], lo que haría muy difícil de observar algún salto en estos puntos al agregar el ácido, y no se podría titular cuantitativamente debido a que los dos primeros son un tanto altos y los consecuentes se encuentran muy cercanos entre sí; sin embargo, se espera obtener un salto al momento de que la disolución pase de un comportamiento de ácido débil (sólo en el punto de equivalencia) al de ácido fuerte por el exceso de una solución patrón valorada de HCl 0.0092 mol L⁻¹ agregado.

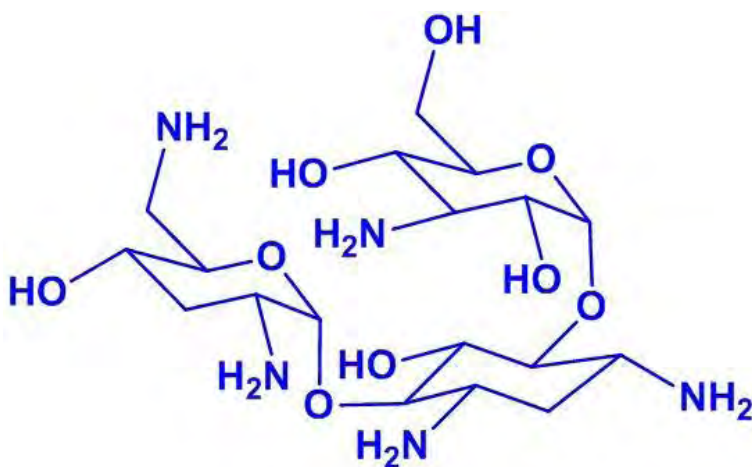


Figura 10. Tobramicina

Se hicieron adiciones de HCl 0.0092 mol L⁻¹ a un alícuota de 3.0 mL de Tobramicina 0.009 mol L⁻¹ si la Tobramicina estuviera pura; posteriormente se graficó el valor de pH que se obtenía en cada adición de ácido clorhídrico y así el resultado se observa en la curva mostrada en la Figura 11.

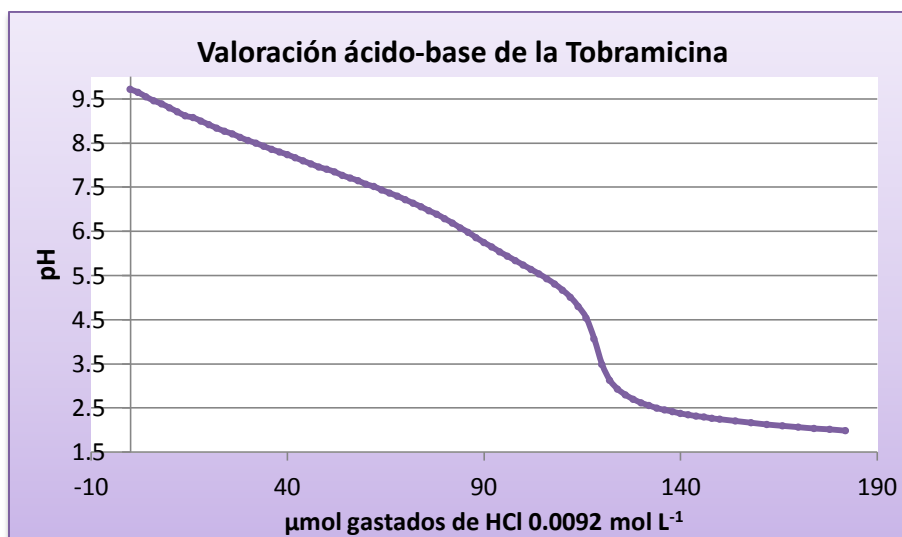


Figura 11. Valoración de 3.0 mL de Tobramicina 0.009 mol L⁻¹ con HCl 0.0092 mol L⁻¹

A pesar de que es difícil apreciar todos los saltos en la curva de valoración, se puede visualizar un salto muy evidente al momento en que se protonó por completo la Tobramicina y se tuvo un exceso de ácido fuerte. Para 30 μmol teóricas de Tobramicina se perciben cambios pequeños no aptos para la cuantificación y un salto de cerca de tres unidades cuando se han gastado 1 288 μL de HCl 0.0092 mol L⁻¹ (118.5 μmol) lo que corresponde a haber valorado 4 grupos básicos de la Tobramicina e indica que el antibiótico (USP) tiene una pureza del 98.75 %. Si se considera el gasto para la última protonación, se puede estimar un valor de $pK_{a1} = 5.3$; este valor es muy cercano al mencionado en la literatura para la acidez más fuerte de la Tobramicina (sección 9.2 de ANEXOS, pág. 67).

5.3 Pruebas cualitativas de Tobramicina con algunos cationes metálicos

Las pruebas cualitativas nos sirven para conocer si se lleva a cabo una reacción entre los compuestos en estudio utilizando pequeñas cantidades de los mismos. Se realizó el ensayo con la Tobramicina para saber el comportamiento que tiene ante las siguientes sales: nitrato de plata (AgNO₃), cloruro férrico hexahidratado (FeCl₃•6H₂O), cloruro de zinc (ZnCl₂), sulfato de cobre (CuSO₄), nitrato mercúrico

($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$), cloruro de aluminio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y nitrato de níquel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) y así poder determinar si se producía una reacción de formación de complejos entre los cationes con la Tobramicina.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las pruebas cualitativas efectuadas entre la Tobramicina y las respectivas sales.

Se realizó un estudio polarográfico con la plata ya que con este catión fue más notoria la reacción con la Tobramicina.

Tabla 3. Resultados obtenidos en las pruebas cualitativas de la formación de complejos entre la Tobramicina y diferentes cationes metálicos.

No.	Compuesto	Color
1	Tobramicina	Incoloro
2	TB + Ag(I)	Marrón
3	TB + Fe(II)	Incoloro
4	TB + Zn(II)	Incoloro
5	TB + Cu(II)	Precipitado azul
6	TB + Ni(II)	Precipitado verde
7	TB + Hg(II)	Incoloro
8	TB + Al(III)	Incoloro

En la Figura 12, se muestran los colores que se obtuvieron de la prueba cualitativa entre la Tobramicina y los cationes metálicos. Se pueden observar tres cambios de color evidentes con los cationes Ag(I), Cu(II) y Ni(II), en donde además se logra ver precipitado en el caso de la reacción con Ni(II) y con Cu(II). En el caso de la reacción con plata, el color se fue oscureciendo más (quizás debido a la misma oxidación de la plata al entrar en contacto con la luz solar).

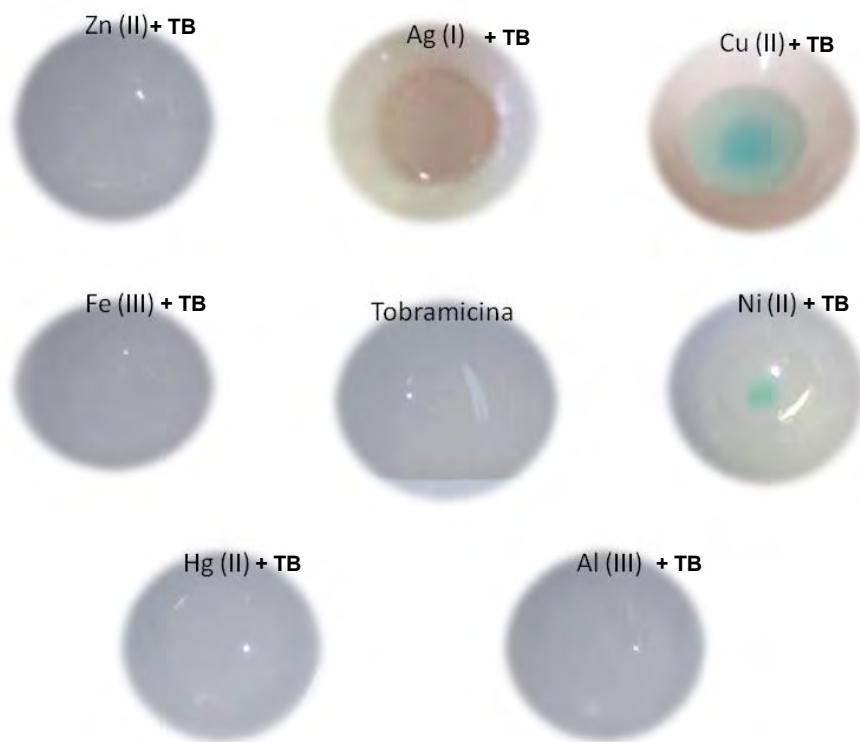


Figura 12. Pruebas cualitativas de Tobramicina con cationes metálicos.

5.4 Valoración potenciométrica de la Tobramicina con nitrato de plata

Esta prueba se hizo con la finalidad de comprobar que se forman complejos entre la plata y la Tobramicina, además de que por medio del método de relaciones molares se puede estimar cuál sería la estequiometría de dicha reacción.

Se partió de una alícuota de 2.0 mL de una disolución de Tobramicina 4.206 mg/mL, a la cual se le fue agregando una solución de concentración definida de AgNO_3 $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$, las adiciones fueron de $25 \mu\text{L}$ con ayuda de una micropipeta de capacidad máxima de $100 \mu\text{L}$; el cambio de potencial se midió con el pH-metro, titrimetro modelo 2G 8N, Tacussel electronique, el cual está compuesto por un electrodo de referencia en compartimento separado de Ag/AgCl ; se colocó el electrolito de referencia en el compartimento debido a que la presencia de cloruros podría afectar la lectura al reaccionar con la Tobramicina y

así interferir con la formación de complejos de la plata con la Tobramicina. En la Figura 13, se muestra la curva de valoración obtenida con su respectivo punto de equivalencia de la reacción, calculado también por el método de la primera derivada.

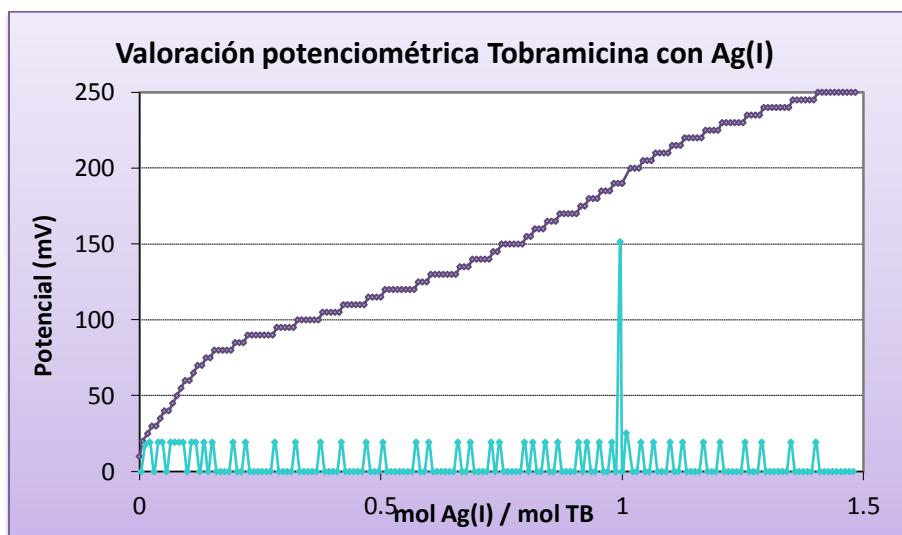


Figura 13. Curva de titulación potenciométrica de la Tobramicina 4.206 mg/mL cuando se agrega una disolución de AgNO_3 $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$

A partir del método de relaciones molares, en el cual se hace la relación entre los moles de iones plata que se agregan y los moles de Tobramicina (TB) que se tenían inicialmente, podemos estimar la estequiometría del complejo entre estas dos sustancias, así tenemos que el punto de equivalencia de la reacción es $x = 0.987$, observándose cercano a la relación molar 1:1, indicando por este método que el complejo formado sería $\text{TB}(\text{Ag})$. Esta valoración confirma además la pureza de la Tobramicina (98.75 % en la valoración ácido-base y 98.3 % por la medida conductimétrica).

5.5 Valoración potenciométrica de la Tobramicina con sulfato de cobre

A partir de la observación en la prueba cualitativa que se realizó con anterioridad en donde se distinguió un cambio de coloración y por ende una reacción al agregar iones cobre a la Tobramicina, se decidió hacer el ensayo de

potenciometría entre estas dos sustancias para verificar que hay formación de complejos y saber la posible estequiometría.

Se partió de una alícuota de 2.0 mL de Tobramicina 4.206 mg/mL a la cual se le fue agregando alícuotas de 20 μL de una disolución de CuSO_4 0.0073 mol L^{-1} , llevado a cabo con una micropipeta de capacidad de 10 μL -100 μL .

En la Figura 14, se muestra la curva de titulación potenciométrica obtenida con su respectivo punto de equivalencia de la reacción, obtenido al graficar el cambio de potencial en función de la relación molar $\text{mol}_{\text{Cu(II)}}/\text{mol}_{\text{TB}}$ y con el método gráfico de líneas paralelas.

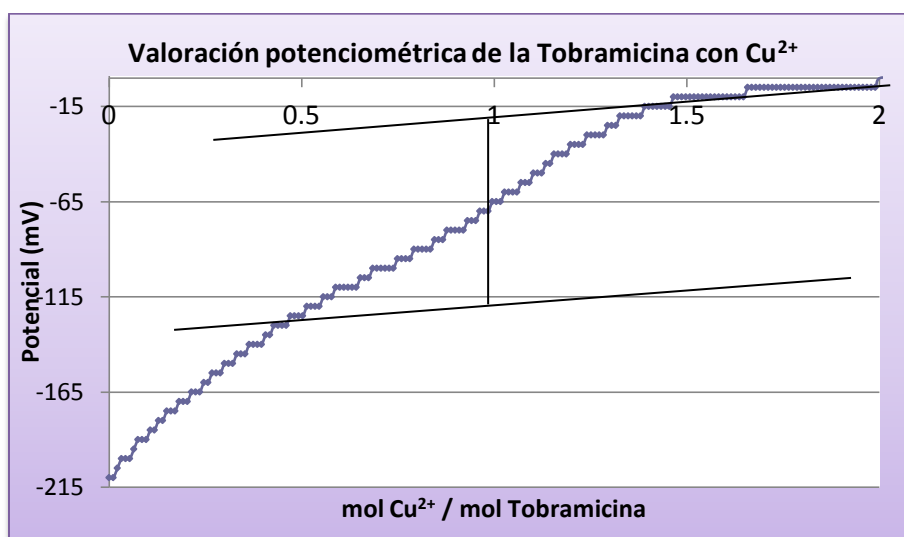


Figura 14. Curva de valoración potenciométrica de Tobramicina 4.206 mg/mL cuando se va agregando CuSO_4 0.0073 mol L^{-1}

Por medio del método de relaciones molares, en donde se hace la relación de moles de iones Cu(II) que se van agregando entre los moles teóricos de Tobramicina que se tienen inicialmente, para así obtener la posible estequiometría del complejo formado.

En la Figura 14 se puede observar que se presenta un salto cercano a la relación molar 1:1 además de que al calcular la intersección de la línea perpendicular y la misma curva de valoración se obtuvo un valor de 0.96, con lo cual se puede

deducir que el complejo formado tiene una estequiometría de 1:1, siendo el complejo TB(Cu).

5.6 Valoración potenciométrica de la Tobramicina con nitrato de mercurio

Esta prueba se realizó con el fin de determinar si era posible una complejación entre la Tobramicina y los iones mercurio.

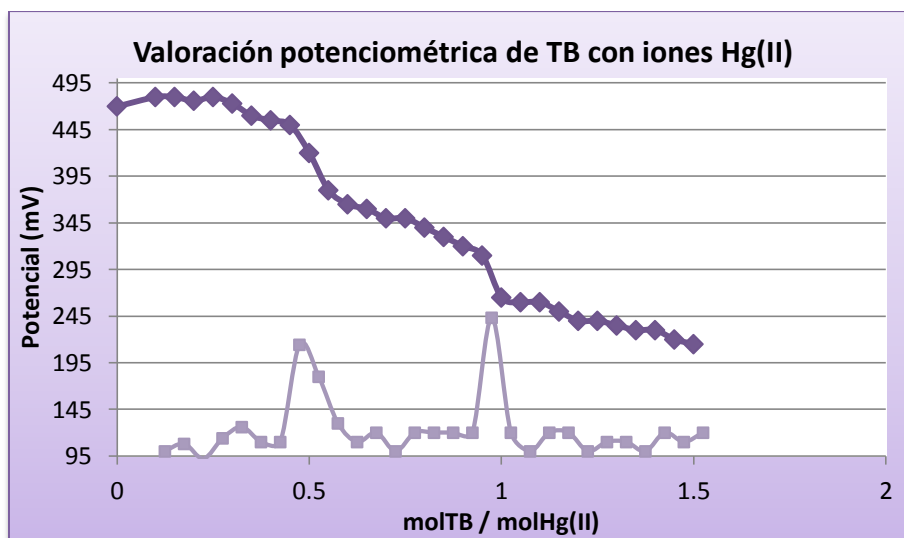


Figura 15. Curva de valoración potenciométrica de Tobramicina 4.206 mg/mL cuando se hacen adiciones de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 0.011 mol L^{-1}

Al aplicar el método de relaciones molares, teniendo en cuenta la cantidad de iones Hg(II) que se van agregando y hacer la relación entre los moles teóricos de Tobramicina adicionados inicialmente, fue posible obtener la estequiometría de los posibles complejos formados.

En la Figura 15 se puede observar que al aplicar el método de la primera derivada en los datos obtenidos, se presenta el primer punto de equivalencia cuando $x = 0.49$ lo cual nos indica que se forma un complejo con una estequiometría de 1:2 y se observa de igual manera que se presenta otro punto de equivalencia en la curva en 0.95, lo que nos indica que el siguiente complejo tiene una estequiometría 1:1.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que es posible la formación de dos complejos entre la Tobramicina con mercurio, teniendo una estequiometría de 1:2 para el complejo TB(Hg)₂ y 1:1 para el complejo TB(Hg).

De esta manera podemos discernir si la señal polarográfica obtenida entre la Tobramicina y los iones plata era debida a la oxidación de la Tobramicina o a una señal de complejación entre el antibiótico y el electrodo de mercurio.

5.7 Dominio de electroactividad

Este parámetro electroquímico se obtuvo mediante un barrido de potencial desde -1.7 V hasta 0.4 V para el medio KNO₃ 0.5 mol L⁻¹, pH = 5.

El dominio de electroactividad se estableció al hacer el barrido de potencial a una velocidad de 5 mV/s y en una celda electroquímica conteniendo un volumen de 10.0 ml del electrolito soporte. Como podemos observar en la Figura 16, el dominio de electroactividad para el medio de KNO₃ 0.5 mol L⁻¹, es de 2.1 V, con una barrera anódica en 0.4 mV y la catódica en -1.7 V.

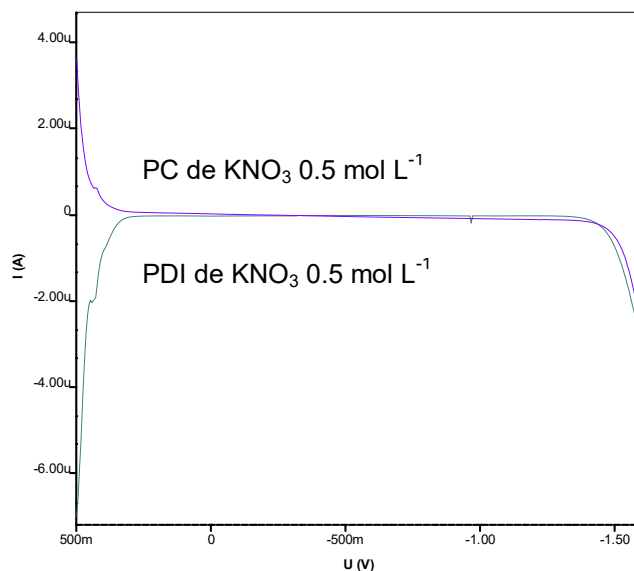


Figura 16. Curvas i/E del medio KNO₃ 0.5 mol L⁻¹ en PDI (Polarografía diferencial de impulsos) y PC (Polarografía clásica)

5.8 Electroquímica de la Tobramicina

5.8.1 Polarografía clásica (PC)

Para llevar a cabo el estudio polarográfico de la Tobramicina por el método de polarografía clásica, se utilizaron 20.0 mL de KNO_3 0.5 mol L^{-1} como electrolito soporte, al cual se le agregó una alícuota inicial de 250 μL de una disolución de Tobramicina $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ y posteriormente se agregaron 2 alícuotas de 50 μL y 3 alícuotas de 100 μL , llegando a un volumen final de 550 μL , teniendo en celda una concentración de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Tobramicina.

Con cada adición se realizaba un barrido de potencial de 5 mV/s con el electrodo SMDE, desde -1.2 V hasta 0.5 V.

En la Figura 17, se muestra el polarograma obtenido de las siguientes adiciones de Tobramicina: 0, 250, 300, 350, 450 y 550 μL de Tobramicina $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$.

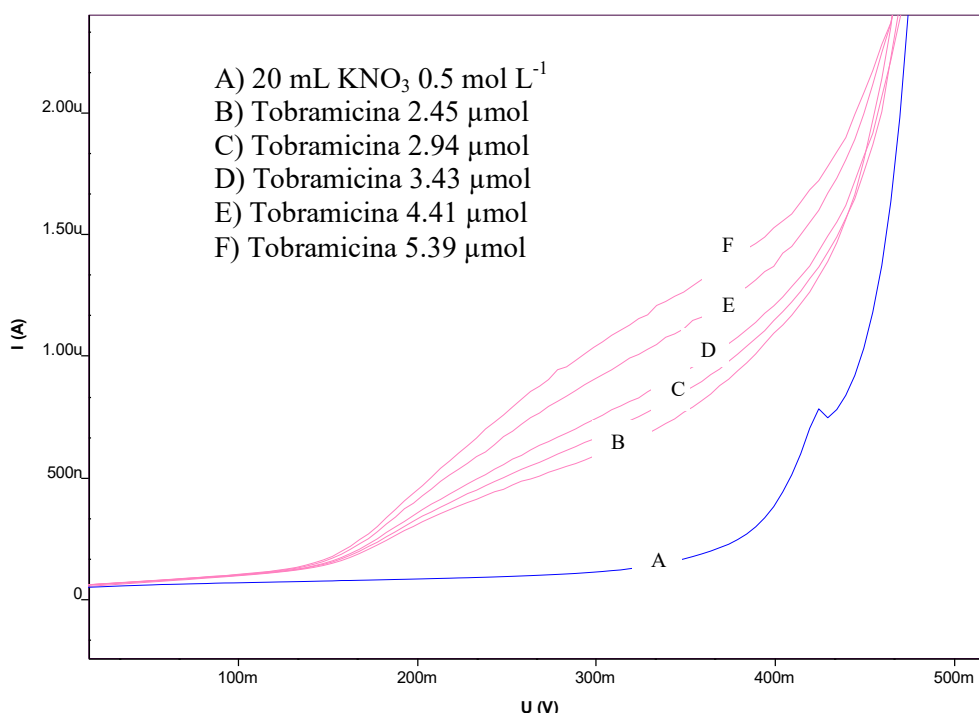


Figura 17. Curvas de i/E en PC para diferentes concentraciones de Tobramicina en medio de KNO_3 0.5 mol L^{-1} $\text{pH} = 5$

En la Figura 17, se observa una señal de oxidación cerca de un potencial alrededor de 208 mV, existiendo un aumento de la intensidad de corriente conforme se aumenta la concentración de la Tobramicina en celda.

La intensidad de corriente total del sistema aumenta proporcionalmente conforme se adiciona Tobramicina. El análisis logarítmico de esta señal indica que el sistema tiene un $E'_{1/2} = 0.1657$ V (Figura 18).

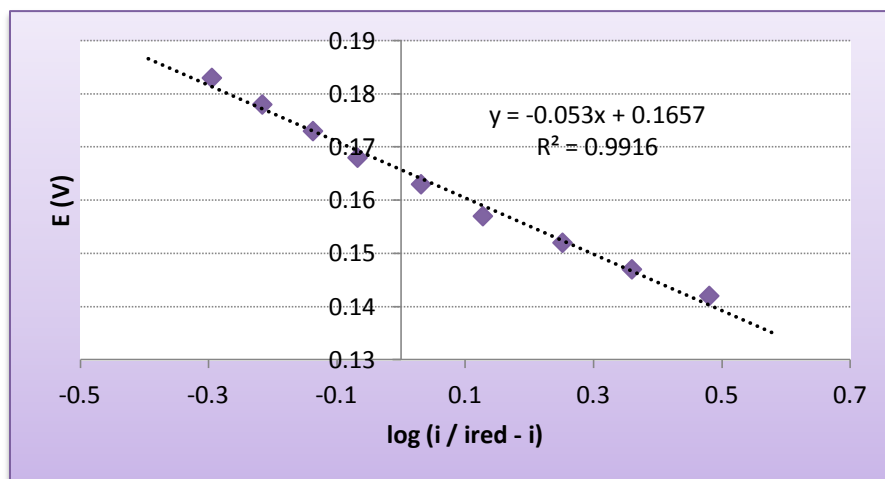


Figura 18. Representación gráfica del análisis logarítmico de la señal de oxidación de Tobramicina en medio KNO_3 0.5 mol L^{-1} $pH=5$

La pendiente que se obtiene es menor a 0.059 V, indicando que en el sistema electroquímico se involucra más de un electrón además de que hace referencia a que el proceso es no nernstiano (el tratamiento matemático se describe en la sección 9.7 de los ANEXOS, pág. 71).

La señal de oxidación de la Tobramicina se estudió también con la ecuación de Tafel; los resultados se presentan en la Figura 19 y el tratamiento matemático se describe en la sección 9.8 de ANEXOS (pág. 73).

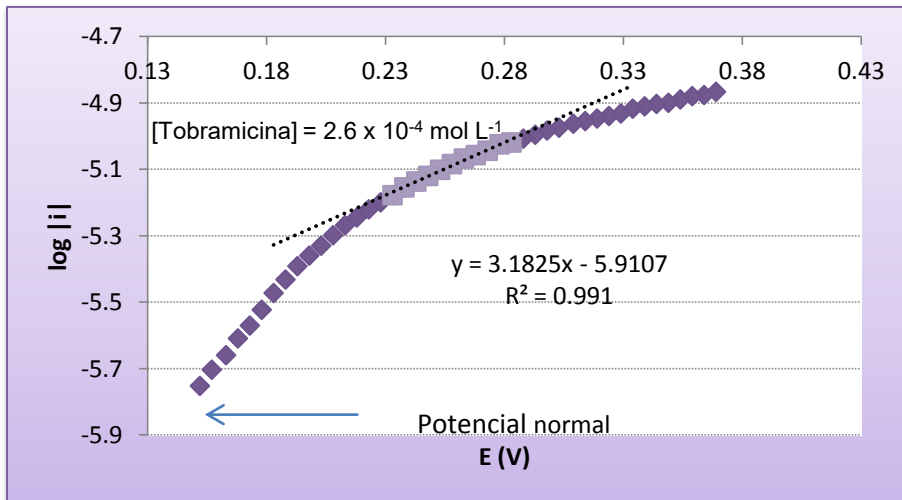


Figura 19. Gráfico de Tafel de la señal de oxidación de la Tobramicina en KNO_3 0.5 mol L^{-1} $\text{pH}=5$

Al aplicar el tratamiento matemático de Tafel a la señal de oxidación de acuerdo a la Figura 19, se obtienen los parámetros que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la ecuación de Tafel para la oxidación de la Tobramicina a 0.1657 V

Parámetro	Valor
Log i_0	-5.427
i_0 (A)	3.741×10^{-7}
m (V^{-1})	3.1825
αn	0.188

Para la señal de oxidación de la Tobramicina se obtiene un valor de corriente de intercambio de $i_0 = 3.741 \times 10^{-7} \text{ A}$; al ser un valor pequeño, nos indica que el sistema es lento, ya que la velocidad de transferencia de electrones puede estar influida por algún fenómeno como la adsorción a la gota de mercurio, alguna reacción química que pueda existir entre la Tobramicina y Hg(II) o las condiciones que presente el electrolito soporte en estudio. Con el valor obtenido del coeficiente

de transferencia de carga $\alpha = 0.188$, si $n = 1$, se indica que el sistema es no reversible, pues los sistemas reversibles tienen valores de α cercanos a 0.5.

5.8.2 Polarografía diferencial de impulsos

En el método de PDI, se trazaron las curvas de i/E con 20.0 mL de KNO_3 0.5 mol L^{-1} como electrolito soporte, al que se hizo una adición inicial de Tobramicina $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ de $50 \mu\text{L}$ y con posteriores adiciones de $50 \mu\text{L}$ hasta obtener una concentración final de $2.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, a una velocidad de barrido de 5 mV/s y con el electrodo SMDE, desde -1.2 V hasta 0.5 V . Se utilizó este método por tener más sensibilidad que el método PC para así determinar cuáles de las curvas obtenidas presenta una señal de corriente que aumente proporcionalmente con la concentración de la Tobramicina.

En la Figura 20, se muestra la señal de oxidación a 208 mV .

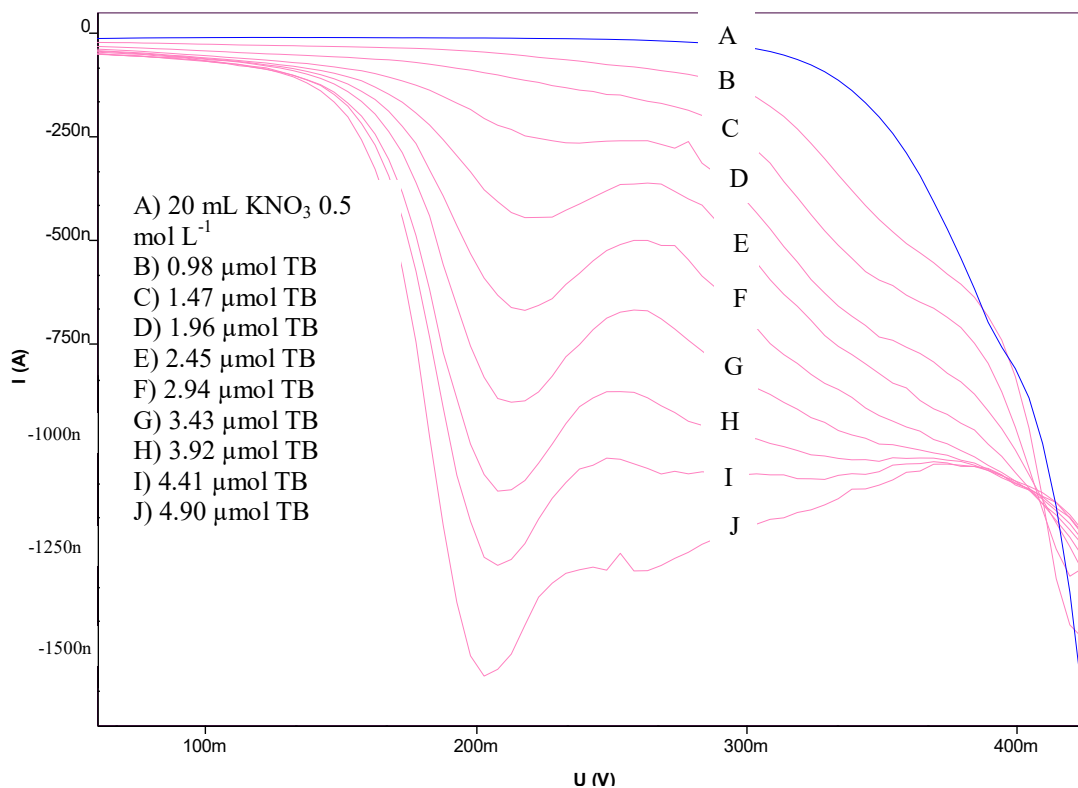


Figura 20. Curvas de i/E en PDI para diferentes concentraciones de Tobramicina en KNO_3 0.5 mol L^{-1} $\text{pH}=5$

Para lograr determinar la dependencia de corriente con respecto a la concentración de Tobramicina, se trazó una gráfica de i_p vs. C_{TB} , en la cual por medio del método de mínimos cuadrados se realizó una regresión lineal. En la señal a 208 mV se encontró que la corriente de pico (i_p) es directamente proporcional a la concentración. Conforme a la regresión lineal, se determinó que el límite de detección (LDD) para 208 mV corresponde a $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

La Figura 21, muestra el gráfico de i_p vs. C_{TB} o curva de calibración para la señal en 208 mV, en la cual se observa que hay una relación directamente proporcional de la corriente con la concentración de Tobramicina; lo que indica que la oxidación está gobernada por la difusión, esta señal es adecuada para la cuantificación de la Tobramicina.

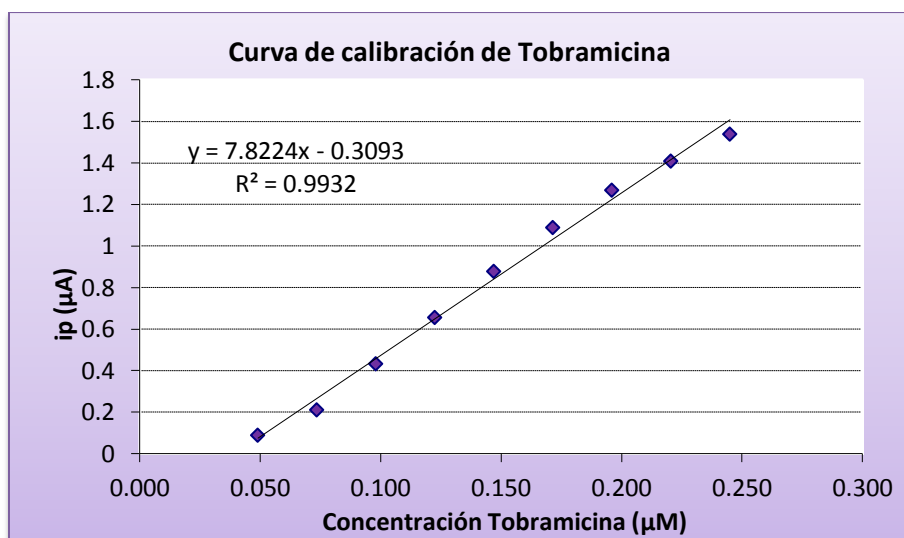


Figura 21. Curva de calibración para la señal en 208 mV en PDI de Tobramicina en KNO_3 0.5 mol L^{-1} pH = 5

5.9 Equilibrios de complejación

El equilibrio de complejación de la Tobramicina con Ag(I) , se estudió con los cambios en las curvas de i/E de la Tobramicina durante su valoración con la plata. Al reducirse este catión cerca de la barrera catódica a 450 mV, puede presentarse un potencial mixto entre el Ag(I) y Hg^0 debido a que la reducción y oxidación, respectivamente, de estas especies metálicas se presenta en potenciales

similares, lo cual puede observarse en las curvas así como los cambios debidos a la formación de complejos entre el catión Ag(I) y la Tobramicina.

Se realizó también la valoración con el catión Hg(II) para conocer si se formaba algún complejo con éste catión y así elucidar si la señal de oxidación obtenida anteriormente, se debe a la Tobramicina sola o es una señal de complejación al oxidarse la gota de mercurio del electrodo.

Al medir la variación de la corriente de pico (i_p) de la Tobramicina de la señal en 208 mV en función de la relación de (moles TB agregados) / (moles de catión totales) se obtienen curvas para las cuales la abscisa en cada cambio de pendiente puede indicarnos la estequiometría del complejo formado.

5.9.1 Complejos de Ag(I) con Tobramicina

Al valorar una alícuota de 1 150 μL de una solución de Ag(I) $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$ con Tobramicina, se obtiene una señal cerca de 208 mV, en donde por medio del método de PC (Figura 22) se puede observar la señal de reducción de la plata sola y que al hacer adiciones de Tobramicina (TB), ésta señal va disminuyendo, lo que indica que hay una reacción entre la TB y la Ag(I) , produciendo un complejo estable.

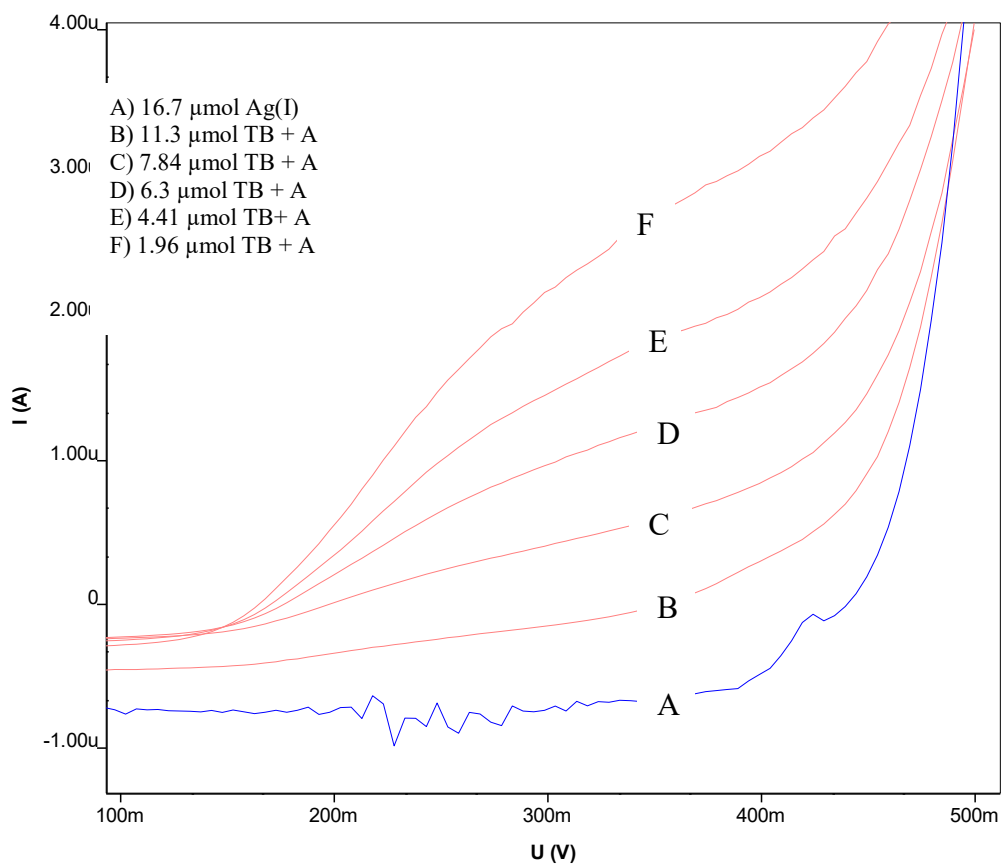


Figura 22. Curva de i/E en PC de la valoración de Ag(I) $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$ con TB $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ en medio de KNO_3 0.5 mol L^{-1} $\text{pH} = 5$

Por el método de PDI se obtuvo la intensidad de corriente de pico (i_p) en 208 mV, la cual va en aumento conforme se agregan alícuotas de Tobramicina y podría tratarse de la formación del complejo con la plata (Figura 23).

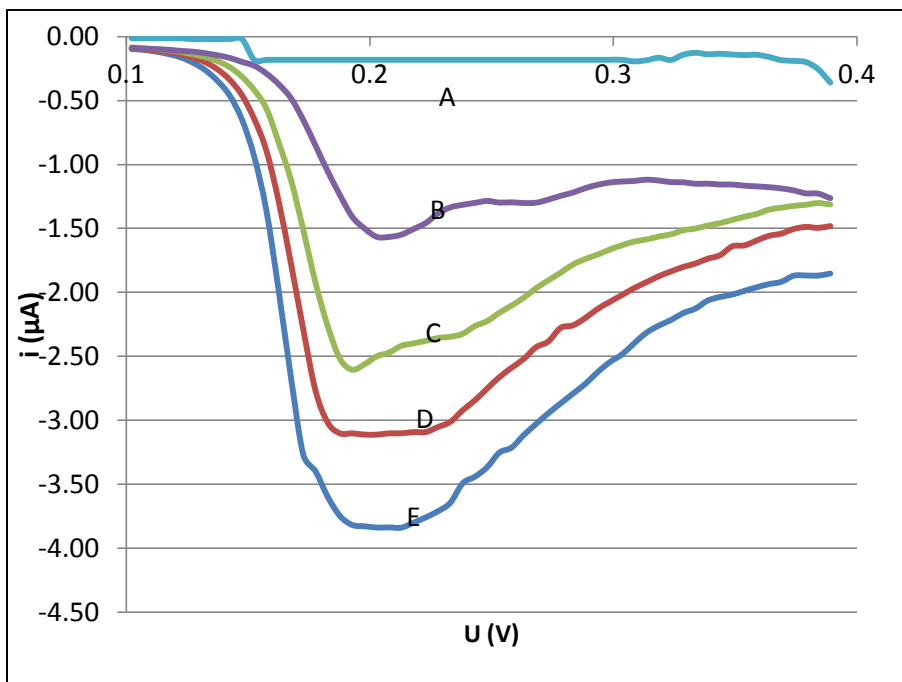
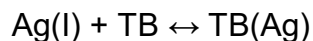


Figura 23. Curva de i/E en PDI de la valoración Ag(I) $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$ con TB $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ en medio de KNO_3 0.5 mol L^{-1} $\text{pH} = 5$. A) $6.3 \text{ } \mu\text{mol Ag(I)}$; B) A + $4.41 \text{ } \mu\text{mol TB}$; C) A + $7.84 \text{ } \mu\text{mol TB}$; D) A + $11.3 \text{ } \mu\text{mol TB}$; E) A + $16.7 \text{ } \mu\text{mol TB}$

Se representó gráficamente la intensidad de corriente contra la relación molar entre los moles agregados de TB y los moles iniciales de Ag(I) $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$ para determinar si existen cambios de pendiente que nos permitan conocer la relación estequiométrica del complejo (Figura 24). Se observa que el valor de i_p varía de tal forma que disminuye en el intervalo de 0 a 1.0 de la relación molar $\text{TB} / \text{Ag(I)}$ y después hay un cambio de pendiente en el intervalo de 1.0 a 2.5 en donde también se observa disminución de i_p . Al calcular la intersección entre estas dos zonas rectas, se obtiene el valor de $x \approx 1$, lo que indica la formación del complejo TB(Ag) . Por lo tanto podemos decir que se lleva a cabo el siguiente equilibrio:



Este equilibrio explica la estequiometría del complejo y la disminución de la i_p durante la valoración, debido al consumo de Ag(I) y disminución de su concentración.

A partir de este gráfico también podemos calcular la constante de formación del complejo, ya que la corriente i_p en 208 mV es proporcional a la cantidad de TB y además se conoce la estequiometría de la reacción, por lo que los valores obtenidos se pueden sustituir en la expresión de la constante de equilibrio y obtener dicha constante. Al obtener por medio de cálculos la concentración de la Tobramicina y las demás especies involucradas en el equilibrio de complejación (descritas en la sección de ANEXOS 9.9.2, pág. 79), se obtuvo un valor de $\log\beta$ de 7.06, es decir, un $\text{p}K'_{\text{dis}} = 7.06$ para el complejo TB(Ag); este valor indica que el complejo es estable.

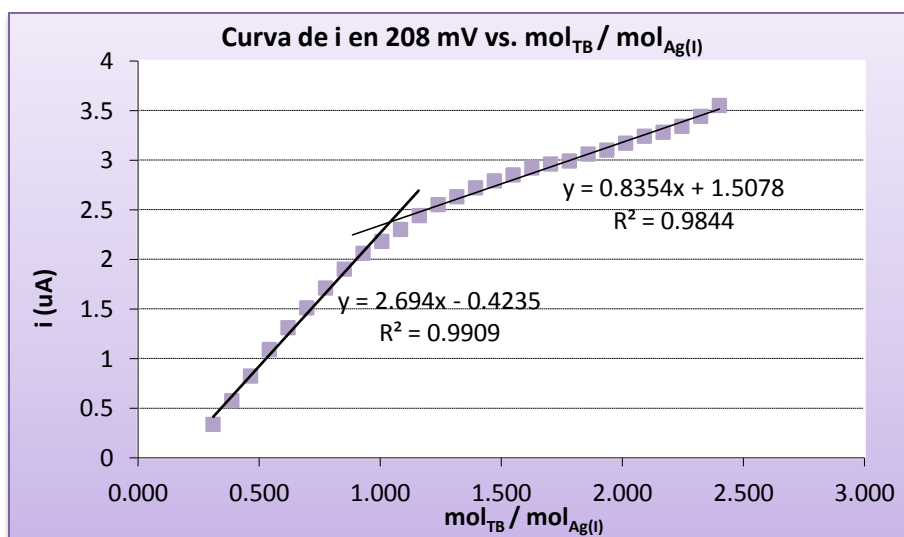


Figura 24. Curva de i_p en 208 mV vs. $\text{mol}_{\text{TB}} / \text{mol}_{\text{Ag(I)}}$ en medio de KNO_3 0.5 mol L^{-1} $\text{pH} = 5$

Al realizar una segunda valoración, en la cual se comenzó adicionando a una alícuota de $100 \mu\text{L}$ de TB $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ con posteriores adiciones de Ag(I) $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$, se observa que la corriente límite de difusión (i_d) de la Tobramicina aumenta, indicando una señal de oxidación de la Tobramicina en presencia de plata cercano a 139 mV, atribuible a un complejo de Ag(I) (Figura 25).

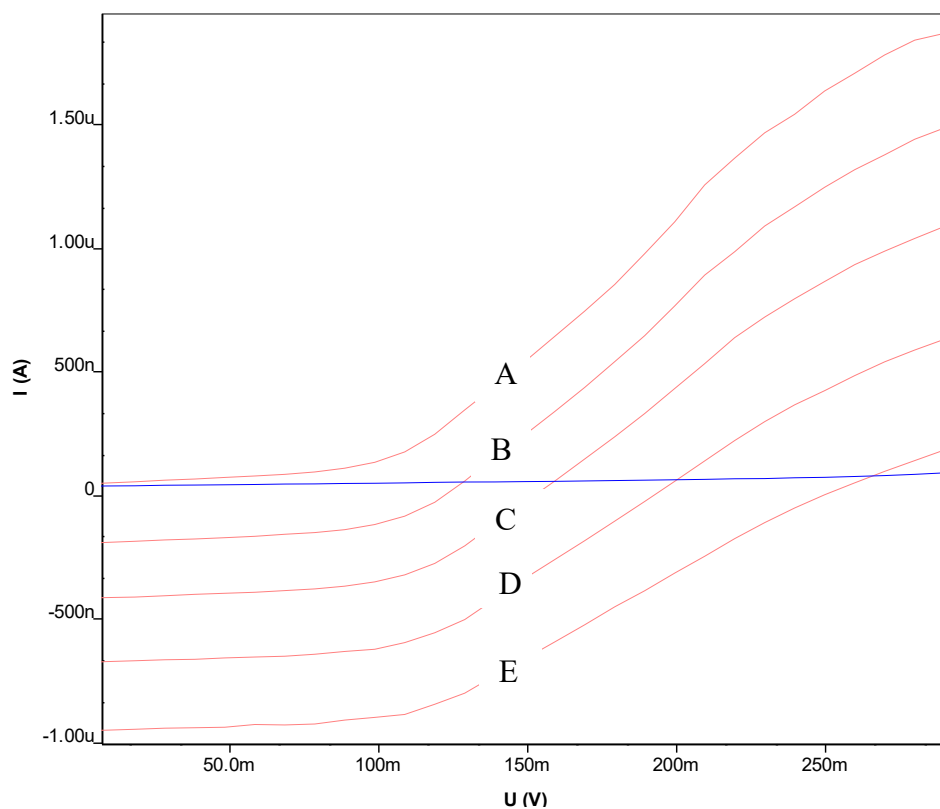


Figura 25. Curvas i/E en PC representativas de la valoración de TB $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ con Ag(I) $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$. A) $10.8 \mu\text{mol}$; B) A + $3.025 \mu\text{mol Ag(I)}$; C) B + $7.15 \mu\text{mol Ag(I)}$; D) C + $16.2 \mu\text{mol Ag(I)}$; E) D + $22.8 \mu\text{mol Ag(I)}$

Al realizar la misma valoración ahora por el método de PDI, en la cual se comenzó adicionando la solución de Tobramicina y posteriormente se adicionaron alícuotas de solución de Ag(I) , es posible observar dos señales en -486 mV y en 169 mV (Figura 26).

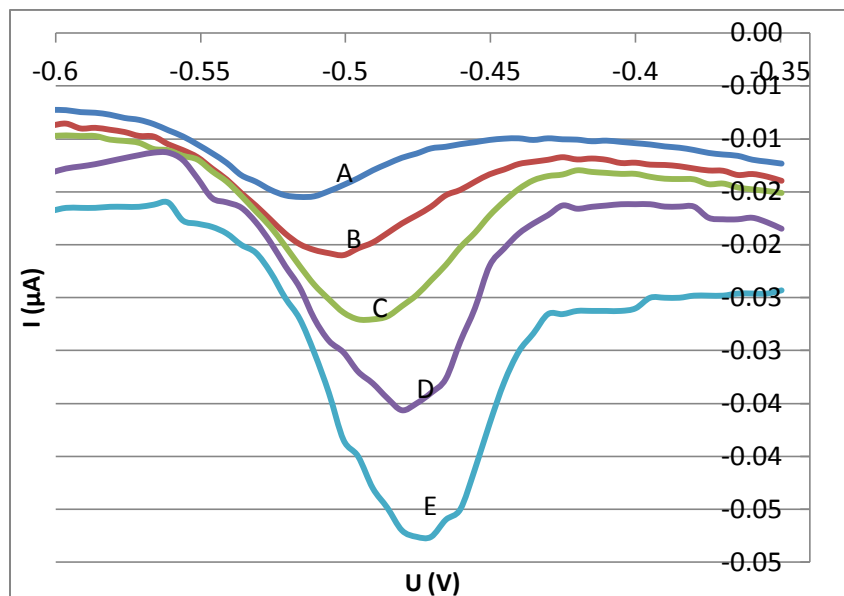


Figura 26. Polarograma (PDI) de la valoración de TB $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ con $\text{Ag(I)} 0.0055 \text{ mol L}^{-1}$ en -486 mV ; medio $\text{KNO}_3 0.5 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 5$. A) $5.88 \text{ } \mu\text{mol TB}$; B) A + $2.64 \text{ } \mu\text{mol Ag(I)}$; C) A + $3.63 \text{ } \mu\text{mol Ag(I)}$; D) A + $5.94 \text{ } \mu\text{mol Ag(I)}$; E) A + $9.02 \text{ } \mu\text{mol Ag(I)}$

Cuando se grafica la variación de la corriente límite de difusión en -486 mV en función de la relación $\text{mol}_{\text{Ag(I)}} / \text{mol}_{\text{TB}}$, puede observarse que existen dos zonas con diferente pendiente, cuya intersección se encuentran en $x \approx 1$, indicando la formación del complejo TB(Ag) (Figura 26).

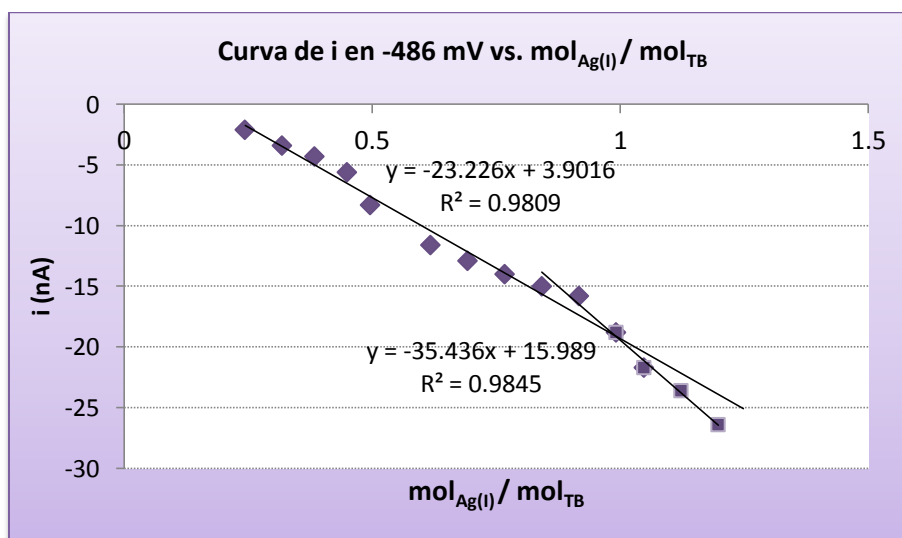


Figura 26. Curva de la i_d en -486 mV en función de la relación molar $\text{mol}_{\text{Ag(I)}} / \text{mol}_{\text{TB}}$; medio $\text{KNO}_3 0.5 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 5$

Al graficar la variación de corriente de la señal a 169 mV en función de la relación molar $\text{mol}_{\text{Ag(I)}} / \text{mol}_{\text{TB}}$, podemos observar que hay dos rectas cuya intersección se localiza en $x \approx 1$, confirmando la formación del complejo $\text{TB}(\text{Ag})$ (Figura 27 y 28).

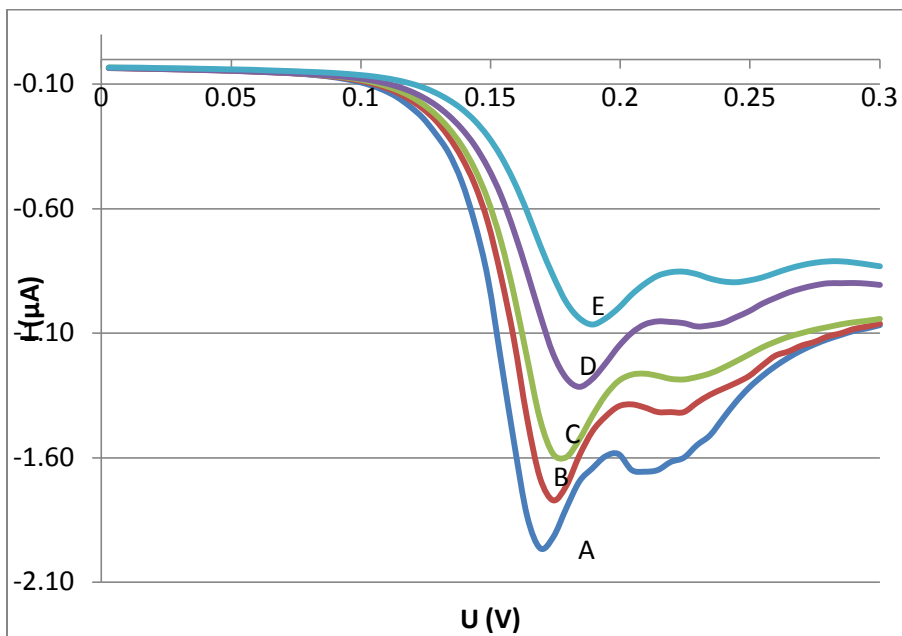


Figura 27. Polarograma (PDI) de la valoración de TB $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ con $\text{Ag(I)} 0.0055 \text{ mol L}^{-1}$ en 169 mV; medio $\text{KNO}_3 0.5 \text{ mol L}^{-1}$. A) $5.88 \text{ } \mu\text{mol TB}$; B) A + $2.64 \text{ } \mu\text{mol Ag(I)}$; C) A + $3.63 \text{ } \mu\text{mol Ag(I)}$; D) A + $5.94 \text{ } \mu\text{mol Ag(I)}$; E) A + $9.02 \text{ } \mu\text{mol Ag(I)}$

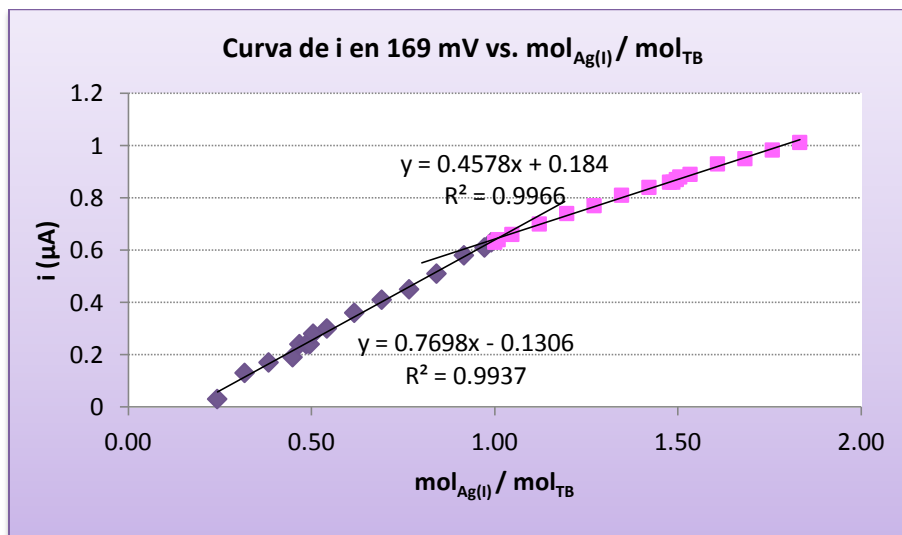


Figura 28. Curva de la i_d en 169 mV en función de la relación molar $\text{mol}_{\text{Ag(I)}} / \text{mol}_{\text{TB}}$; medio $\text{KNO}_3 0.5 \text{ mol L}^{-1}$

Además de obtener la estequiometría del complejo en las Figuras 27 y 28, también se puede obtener el valor de la constante condicional de disociación del mismo, si se considera que la relación entre la corriente experimental (tomada de la curva) y la corriente teórica (tomada de la intersección de las rectas) se puede calcular el grado de disociación del complejo y así al sustituir este valor en la constante de disociación expresada en función del grado de disociación, se puede obtener el valor de la constante de disociación condicional. Al utilizar esta metodología descrita en la sección 9.9.1 de los ANEXOS (pág. 76), se obtuvo un valor de $K'_{\text{dis}} = 9.63 \times 10^{-8}$ o expresado de otra forma $\text{p}K'_{\text{dis}} = 7.02$ para el complejo TB(Ag); este valor coincide con el calculado previamente al invertir el orden de los reactivos (pág. 46).

5.9.2 Complejos de Hg(II) con Tobramicina

Cuando se agrega una solución de Tobramicina a una disolución de Hg(II), se observa que la corriente límite de difusión (i_D) de este catión disminuye, esto indica la disminución de Hg(II) libre y al mismo tiempo nos indica la posible formación de un complejo entre este catión y la Tobramicina (Figura 29).

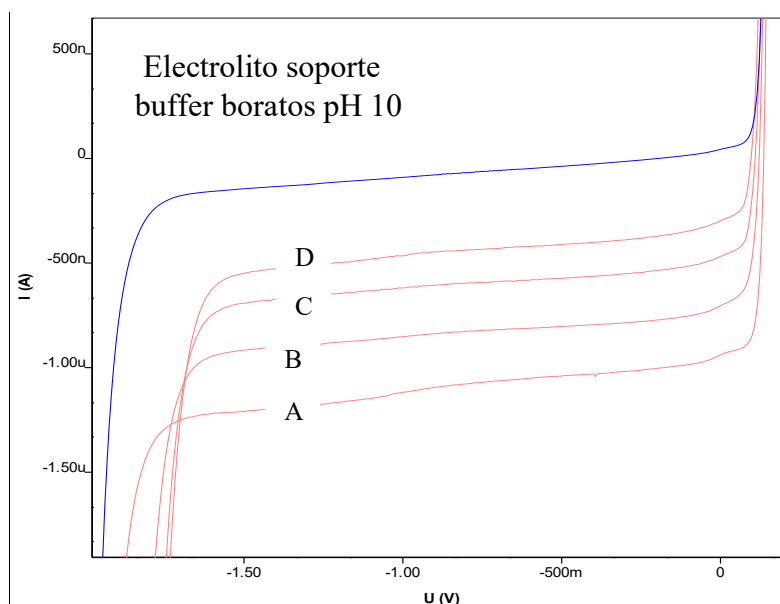


Figura 29. Polarograma (PC) representativo de la valoración de Hg(II) 0.011 mol L^{-1} con Tobramicina $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$. A) $5.5 \text{ } \mu\text{mol Hg(II)}$; B) A + $1.6 \text{ } \mu\text{mol TB}$; C) A + $4.2 \text{ } \mu\text{mol TB}$; D) A + $12.5 \text{ } \mu\text{mol TB}$; medio buffer boratos pH = 10

Al graficar la variación de la corriente límite de difusión en -631 mV dado que en esta zona es donde se observa que la intensidad de corriente es más estable, se grafica entonces en función de la relación molar $\text{mol}_{\text{TB}} / \text{mol}_{\text{Hg(II)}}$, observando que se presentan tres cambios de pendiente, cuyas intersecciones se encuentran en $x \approx 0.5$ y en $x \approx 1$, confirmando la formación de los complejos TB(Hg)_2 y TB(Hg) (Figura 30).

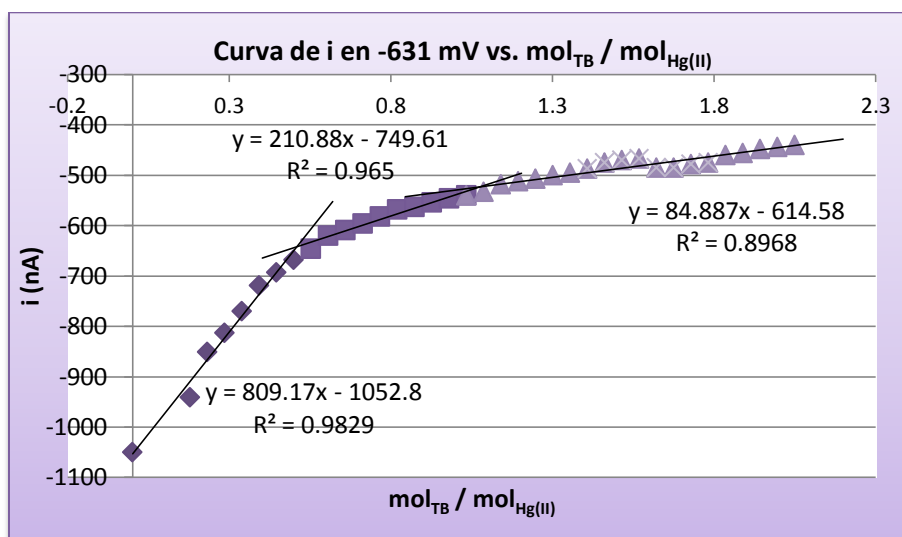


Figura 30. Curva de la i_p (PC) en -631 mV vs. relación molar $\text{mol}_{\text{TB}} / \text{mol}_{\text{Hg(II)}}$; medio buffer boratos pH = 10

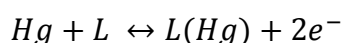
Podemos deducir que el primer complejo formado es el TB(Hg)_2 y en segundo lugar el TB(Hg) , puesto que el exceso de Hg(II) al inicio de la valoración favorece la formación del complejo TB(Hg)_2 . De lo anterior se pueden establecer las reacciones químicas que ocurren durante la valoración; son las siguientes:



Mediante la diferencia de potencial de las señales de Hg(II) libre y de Hg(II) complejoado, se determinaron los valores de $\log\beta$ de 7.6 y 13.7 para los complejos

TB(Hg) y TB(Hg)₂ respectivamente (el procedimiento de la obtención de logβ se encuentra descrito a detalle en la sección 9.9.3 de los ANEXOS, pág. 82).

Adicionalmente, al conocer que el Hg(II) forma complejos con la Tobramicina, se confirma que la señal de oxidación que se observa en el polarograma de Tobramicina en PC, se debe a la oxidación del electrodo de mercurio en presencia de este ligante, tal y como lo indicaría la siguiente ecuación electroquímica general planteada a continuación:



5.9.3 Complejos de Cu(II) con Tobramicina

De manera similar a los ensayos anteriores, se determinó que la Tobramicina forma complejos con el cobre; al valorar una alícuota (1 200 μL) de cobre 0.0073 mol L⁻¹, con adiciones de Tobramicina se pudo determinar a partir del análisis de las señales polarográficas, la obtención de dos complejos con estequiometría 1:1 y el segundo 2:1, presentando un valor de pK'_{dis} de 5.75 para el complejo TB(Cu) y un pK'_{dis} de 4.3 para el complejo TB₂(Cu).

5.10 Complejos metálicos de Tobramicina

A continuación se muestra en la Tabla 5 un resumen de los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados con cada catión.

Tabla 5. Resultados de las valoraciones complejométricas de la Tobramicina con cationes metálicos

Catión	Complejo formado	pK'_{dis}	$\log\beta$
Cu(II)	TB(Cu)	5.75	5.75
	TB ₂ (Cu)	4.3	10.05
Ag(I)	TB(Ag)	7.02	7.02
Hg(II)	TB(Hg)	7.6	7.6
	TB(Hg) ₂	6.1	13.7

5.11 Cuantificación preliminar de Tobramicina en una muestra de materia prima mediante una valoración complejométrica

En este estudio se determinó que la Tobramicina también forma complejos con cobre siendo posibles dos complejos con estequiometría 1:1, TB(Cu) y 2:1 TB₂Cu, lo cual se aprovechó para realizar la cuantificación de Tobramicina en una muestra de materia prima de Tobramicina con lote M100602335 mediante la valoración complejométrica seguida por polarografía diferencial de impulsos.

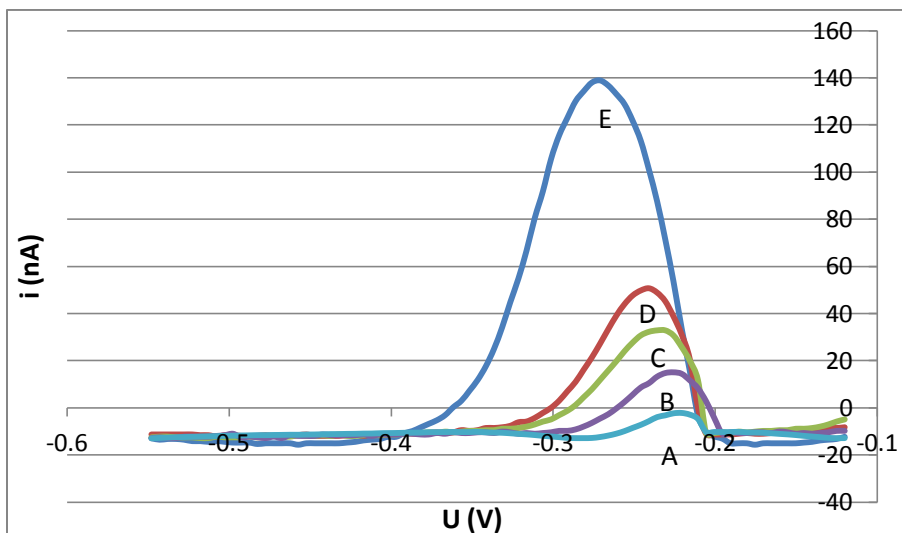


Figura 31. Polarograma (PDI) de la valoración de 1150 μL de Cu(II) $0.0073 \text{ mol L}^{-1}$ con TB $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ en -270 mV ; 10 mL de medio acetatos pH 5.72, 0.1 mol L^{-1} .
 A) $8.4 \mu\text{mol Cu(II)}$; B) A + $1.5 \mu\text{mol TB}$; C) A + $3.4 \mu\text{mol TB}$; D) A + $6.4 \mu\text{mol TB}$;
 E) A + $12.3 \mu\text{mol TB}$

Se realizó una curva de valoración graficando el valor de la corriente de pico medido a un potencial de -270 mV en función de los microlitros de TB agregados (Figura 32) en la cual se pueden observar dos puntos de inflexión o cambio de pendiente que corresponde a la formación de los complejos de Tobramicina con iones Cu(II) .

Al inicio de la valoración existe un gran exceso de iones Cu(II) , al ir agregando más alícuotas de Tobramicina a la celda electroquímica se favorece la formación del complejo TB(Cu) , es decir, el primer cambio de pendiente se debe a la formación de este complejo. Sin embargo conforme se va agregando alícuotas de Tobramicina a la celda electroquímica, se favorece la formación del segundo complejo TB_2Cu , por lo que el segundo cambio de pendiente se debe a la formación de dicho complejo.

El primer punto de equivalencia se encontró en $950 \mu\text{L}$ de TB agregados; con la estequiometría 1:1 del complejo formado, el volumen de la alícuota que se utilizó de $1150 \mu\text{L}$ de la disolución de Cu(II) $0.0073 \text{ mol L}^{-1}$ y con la masa molar de la Tobramicina, se calculó que hay $8.4 \mu\text{mol}$ de Tobramicina en $950 \mu\text{L}$ de la disolución preparada a partir de la muestra en polvo de la Tobramicina, de la cual

sabemos que su concentración teórica era $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ y por ende presentaba $9.31 \text{ } \mu\text{mol}$ teóricos.

Con el segundo punto de equivalencia que se alcanza con $1\ 950 \text{ } \mu\text{L}$ de TB agregados, se realizó el mismo procedimiento y el resultado es exactamente el mismo, ya que se comprueba que si la estequiometría es 2:1, significa que se valora el doble de moles que se tienen en el primer punto de equivalencia (con $x = 0.986$); se espera que el siguiente cambio de pendiente se presente en la intersección $x = 1.97$, comprobando la formación de ambos complejos.

El procedimiento del cálculo está descrito en la sección 9.10 de los ANEXOS, pág. 84.

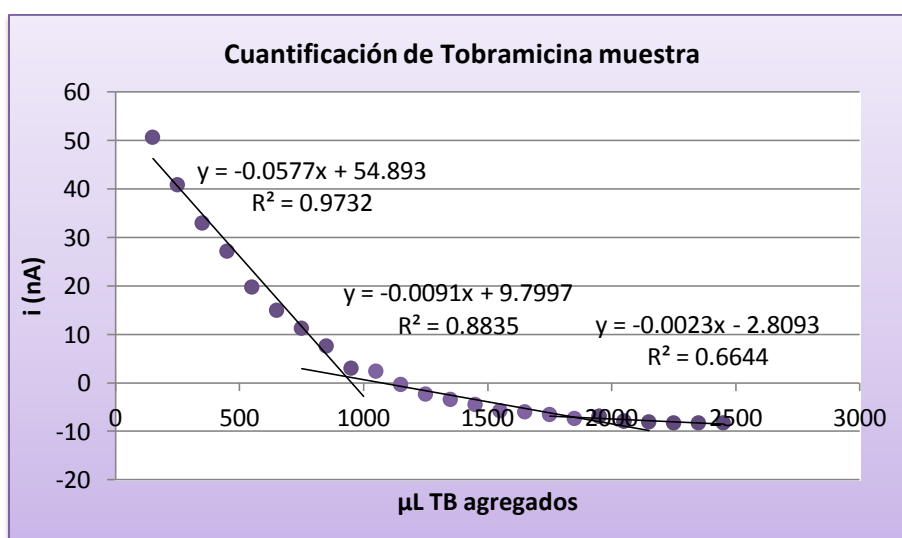
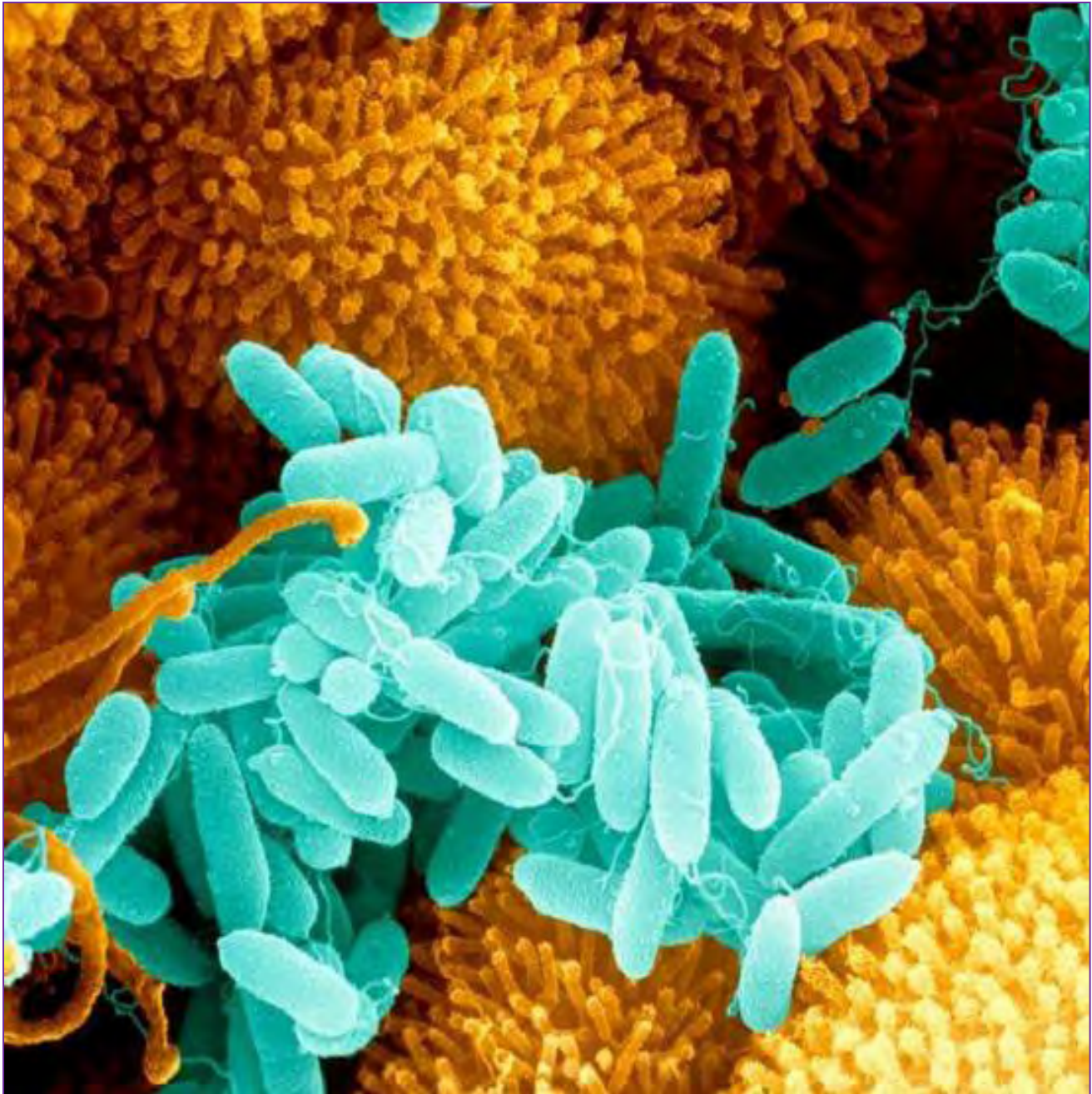


Figura 32. Curva de valoración complejométrica de Tobramicina con Cu(II) a -270mV . Medio acetatos $\text{pH} = 5.72$ 0.1 mol L^{-1} .

En la disolución preparada, teóricamente hay $9.31 \text{ } \mu\text{mol}$ de Tobramicina. Mediante la valoración se obtuvo la cantidad de $8.4 \text{ } \mu\text{mol}$ de Tobramicina en la muestra, es decir, contiene una pureza de 90.2% . Lo anterior permite demostrar que este método es adecuado para cuantificar Tobramicina.

También es posible calcular la constante de disociación K_{dis} del complejo a partir de la diferencia obtenida entre la corriente experimental y la corriente teórica obtenida en la primera intersección de la recta la cual nos arroja un valor de $i_{\text{teo}} = 2.546 \text{ nA}$, teniendo en cuenta que nuestra concentración inicial en celda es

$C_o = 8.4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ y que la corriente correspondiente según nuestra regresión lineal es de 54.893 nA fue posible calcular un coeficiente de disociación $\alpha = 0.046$ y posteriormente con la concentración inicial se obtuvo una $K'_{\text{dis}} = 1.86 \times 10^{-6}$ o expresado de otra forma $\text{p}K'_{\text{dis}} = 5.73$, indicando un complejo estable.



Micrografía electrónica de barrido de color (SEM) de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (azul) sobre el epitelio nasal humano ciliado

6. CONCLUSIONES

En el ensayo de conductimetría, se encontró que la Tobramicina usada como referencia, se encontraba en una forma no ionizada, quiere decir que no estaba como comúnmente podría encontrarse, que es formando una sal con iones sulfato. Este resultado, es conveniente para futuras determinaciones ya que se descarta la interferencia que podrían causar los sulfatos y cloruros, principalmente.

Los experimentos realizados en este trabajo, donde se utilizaron técnicas potenciométricas, permitieron determinar parámetros y características referentes a los equilibrios ácido-base de la Tobramicina como lo es un valor encontrado de pKa de 5.3, observándose claramente en la curva de valoración al utilizar ácido clorhídrico. Se dedujo también que corresponde a la valoración de 4 protones. Además por medio de esta técnica fue posible determinar la pureza del reactivo que fue de 98.75 % para la Tobramicina.

La utilización de técnicas polarográficas, permitió determinar que la Tobramicina posee una señal en 208 mV, debida a la oxidación de Hg^0 a Hg(II) en presencia del antibiótico, la cual puede ser utilizada para fines cuantitativos. La Tobramicina presenta un límite de detección en PDI de $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

El análisis logarítmico y el gráfico de Tafel de la señal de oxidación de la Tobramicina, arrojaron valores de $\alpha n = 0.188$ (considerando $n = 1$ electrones intercambiados y $C_{\text{TB}} = 2.6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), e $i_0 = 3.74 \times 10^{-7}$, los cuales son valores característicos de un sistema del tipo irreversible.

A través de las valoraciones complejométricas realizadas con Ag(I) y a $\text{pH} = 5$, se determinó una estequiometría de 1:1, formándose el complejo TB(Ag) y el valor del logaritmo de su constante de disociación la cual es $\text{pK}_{\text{dis}} = 7.02$. A su vez en la segunda valoración realizada intercambiando el reactivo en celda y el reactivo valorante, se obtuvo un $\text{pK}'_{\text{dis}} = 7.05$ y una $\log\beta = 7.05$, por lo que podemos confirmar que se forma el complejo independientemente del orden en que se agreguen los reactivos.

En cuanto a la valoración complejométrica con Hg(II) y a pH = 10, se determinó una estequiometría de 1:2 y 1:1, siendo los complejos TB(Hg)₂ y TB(Hg) y los valores de las constantes de formación globales $\log\beta = 7.6$ y 13.7 son respectivamente.

El análisis preliminar del contenido de Tobramicina en una suspensión oftálmica utilizada para el tratamiento de la conjuntivitis, se efectuó con el mínimo tratamiento de la muestra y sin derivatizaciones de la Tobramicina presente en la misma, mediante una valoración complejométrica con Ag(I); sin embargo, se encontró que debido a que esta forma farmacéutica presenta cloruros en su composición, hubo interferencias en la determinación de esta valoración ocultando la señal de la misma Tobramicina y dificultando su determinación.

Se optó por hacer una valoración complejométrica usando una disolución patrón de Cu(II) con una muestra en polvo del antibiótico. Se determinó gráficamente, a partir de los cambios de pendiente observados, la cantidad gastada de Tobramicina para valorar una alícuota de la disolución de Cu(II), obteniendo los dos puntos de equivalencia observados a una concentración de $8.4 \mu\text{mol}$ y una pureza de 90.2 %.

Esta metodología propuesta, puede considerarse como una buena alternativa para la cuantificación de la Tobramicina, porque al usar las técnicas polarográficas el costo y el tiempo de análisis es menor, comparado con otras técnicas cromatográficas, además de considerar que el gasto de reactivos y de muestra son mínimos, porque no se lleva a cabo la derivatización de la Tobramicina, donde se tendría que hacer volátil la sustancia o en caso de usar la espectrofotometría, que se tendría que formar una sustancia que absorba en la zona de UV o de la zona visible del espectro electromagnético.

7. PERSPECTIVAS

- ❖ Al no existir tanta información sobre los procesos electroquímicos que posee la Tobramicina, sería muy importante realizar un estudio electroquímico más amplio de este antibiótico, pero utilizando algún electrodo sólido ya sea de platino, oro o carbón vítreo como electrodo de trabajo, lo cual podría ayudarnos a visualizar posibles reacciones de oxidación de los grupos amino e hidroxilo presentes en la molécula o algún otro posible proceso redox.
- ❖ Sería de relevancia igualmente, que se lleve a cabo una validación de los métodos propuestos para la cuantificación de la Tobramicina y así poder establecer procedimientos normalizados de operación donde se puedan utilizar procesos electroquímicos para determinar la cantidad de antibiótico en cualquier presentación farmacéutica usada, ya sea para la conjuntivitis o la fibrosis quística.
- ❖ Así mismo poder aprovechar el conocimiento que se tiene sobre el complejo que forma la Tobramicina con la Cu(II) y desarrollar una metodología que nos permita cuantificar la cantidad de antibiótico en cualquier muestra problema mediante una valoración potenciométrica con un electrodo de cobre. Esta metodología podría ser útil para un análisis rutinario una vez validado.
- ❖ En el mismo orden de ideas, para tener un conocimiento más amplio sobre los aspectos estructurales de la Tobramicina, se podría realizar un estudio de RMN-H para determinar si los grupos amino e hidroxilo de la molécula interaccionan para la transferencia de protones. De esta manera se podría conocer específicamente qué protones se valoran en los equilibrios que se llevan a cabo en la valoración ácido-base.
- ❖ Finalmente, lograr sintetizar los complejos estudiados en este ensayo, y así poder caracterizarlos por métodos espectroscópicos y de esta manera conocer más sobre su estructura.

8. BIBLIOGRAFÍA

[1] Powers John H., MD y Phoenix Janet A. **Antibiotic Uses and Challenges**. Medscape, No. 49, (Jun 16, 2010): 491-504.

[2] Mingeot-Leclercq Marie-Paule y Glupczynski Youri. **Aminoglycosides: Activity and Resistance**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43(4), (1999): 727-728.

[3] Shou Dan y Dong Yu. **Rapid Quantification of Tobramycin and Vancomycin by UPLC –TQD and Application to Osteomyelitis Patient Samples**. Journal of Chromatographic Science, No. 52, (2014):501–502.

[4] Bjorklund Ruth. **Cystic fibrosis**. Edit. Marshall Cavendish, (2009): 30-33.

[5] Heidelberger Michael. **Karl Landsteiner 1868-1943**. National Academy of Sciences, (1969): 179-184.

[6] Stevens Richard F. y Meyer Stefan. **Fanconi and Glanzmann: the men and their works**. British Journal of Haematology, 119 (4): 901-904.

[7] Di Sant’Agnese P.A., Darling R.S., Perera G.A. **Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease**. Pediatrics, volumen 12, (1953): 549-563.

[8] Escobar Héctor. **Fibrosis quística**. Asociación Española de Pediatría. Consultada el 3 de octubre de 2016: www.aeped.es/sites/default/files/documentos/10-FQ.pdf.

[9] Buchanan Paul J. **Infeción microbiana e implicación en fibrosis quística**. British Society for Immunology. Consultada el 3 de octubre del 2016: <http://inmunologia.eu/microbios-patogenos-y-enfermedad/infecion-microbiana-e-implicacion-en-fibrosis-quistica>.

[10] Gibson Le. **Test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis.** Pediatrics, No. 23, (1959): 545-549.

[11] Boucher Richard C. **Principios de Medicina Interna.** 13a edición. Edit. Interamericana Mc Graw-Hill, (1994): 1373.

[12] Azari Amir A. y Barney Neal P. **Conjunctivitis: A systematic review of diagnosis and treatment.** JAMA, Author manuscript; available in PMC, 310(16), (Oct 23, 2013): 1721–1729.

[13] Umezawa H. y Hooper I. R. **Aminoglycoside antibiotics.** Ed. Springer-Verlag, (1982): 111.

[14] **Hubei MaxSource Chem Co., Ltd.** Consultada el 29 de agosto del 2016: http://spanish.everychina.com/f-z52dd590/p-97185042-tobramycin_32986_56_4.html.

[15] Chemical book. **Tobramycin (32986-56-4).** Consultada el 30 de agosto de 2016: http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB7154445_EN.htm..

[16] **Farmacopea de los Estados Unidos de America. USP 36- NF 34.** Volumen 3, (2016): 5852-5861.

[17] Das Gupta V. **Colorimetric determination of Tobramycin in parenteral solutions.** Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. No. 13, (1988): 195-198.

[18] **Farmacopea de los Estados Unidos de America. USP 36- NF 34.** Volumen 1, (2016): 290-292.

[19] Ruckmani K. y Co. **A simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for determining tobramycin in pharmaceutical formulations by direct UV detection.** Pharmaceutical methods. No. 2, volumen 2, (2011): 117-123.

[20] Xuemei Michele G. y Wrisley Loren. **Measurement of tobramycin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection**. No. 6, volumen 2, (2003): 87-95.

[21] Attema-de Jonge Milly E. y Bekkers Judith M. **Simple and sensitive method for quantification of low tobramycin concentrations in human plasma using HPLC-MS/MS**. ELSEVIER, No. 862, (junio 4, 2008): 257-262.

[22] Oertel R. y Neumeister V. **Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass espectrometry to determine six aminoglycosides in serum**. ELSEVIER, volumen 1058, Issues 1-2, (26 november, 2004): 197-201.

[23] Dionex Corporation. **Determinaton of Tobramycin and Impurities Using HPAE-PAD**. Application Note 61. Thermo Scientific (LPN #1626). Sunnyvale, C.A. (Abril, 2004).

[24] Dionex Corporation. **Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates using the Dionex ED40 Electrochemical Detector**. Technical Note 21; Sunnyvale, CA.

[25] **Hubei MaxSource Chem Co., Ltd**. Consultada el 18 de enero del 2016: http://spanish.everychina.com/f-z52dd590/p-97185042-tobramycin_32986_56_4.html.

[26] **Determinación de potenciales de celdas electroquímicas**. Consultada el 10 de agosto de 2016: https://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/TAQ/TAQP5_0506.pdf.

[27] Skoog D., West D. y Holler J. **Fundamentos de química analítica**. Ed. Thompson. 8° edición, (2005): 675-678.



Alessandro Volta demostrando su batería (pila voltaica) a Napoleón

9. ANEXOS

9.1 Determinación de la concentración del ácido clorhídrico

Debido a que para realizar la titulación ácido-base de la Tobramicina, se necesita ácido clorhídrico como titulante a una concentración conocida, se realizó un ensayo para conocer la concentración utilizando como patrón primario carbonato de sodio secado en estufa a 80°C durante 3 horas.

Reacción:

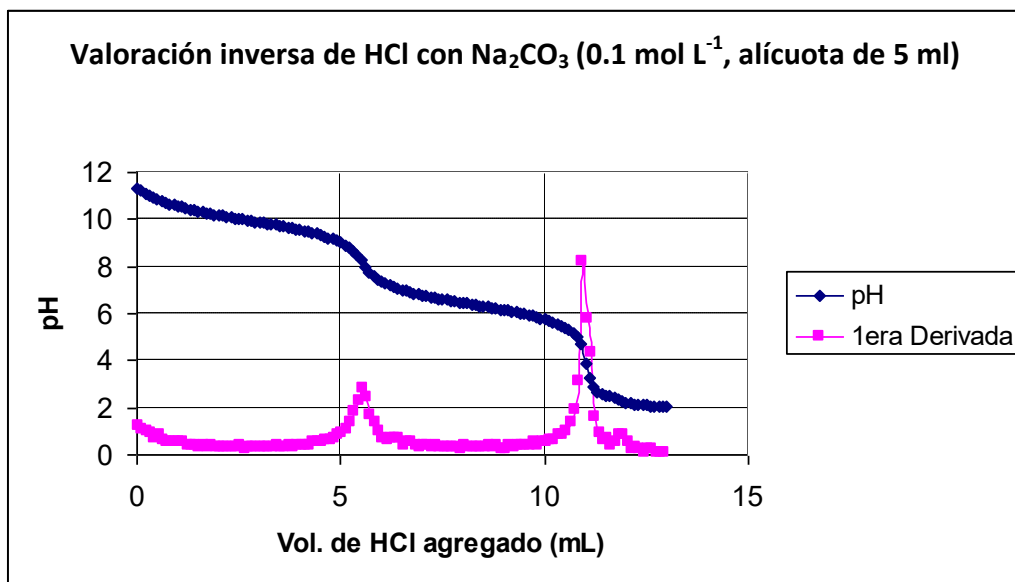
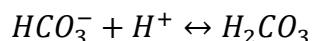
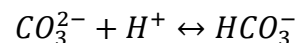


Figura 33. Gráfica de valoración del HCl con carbonato de sodio, determinando el punto de equivalencia con el método de la primera derivada

Con el método de la primera derivada se logró obtener el punto de equivalencia en el cual se gastaron 5.45 mL de HCl para titular 0.5336 g de Na_2CO_3 , volumen que se obtuvo por medio de un cálculo, en el cual se tomó la distancia entre los dos puntos de inflexión que se observan en la Figura 33 y que corresponde a la

valoración de HCO_3^- ; esta cantidad es prácticamente idéntica a la gastada para valorar el CO_3^{2-} (primer punto de equivalencia):

$$10.95 \text{ mL HCl} - 5.5 \text{ mL HCl} = 5.45 \text{ mL HCl}$$

Esto es con la finalidad de comprobar el primer punto de equivalencia, ya que al ser un ácido diprótico, la distancia que hay entre el primer punto de equivalencia y el segundo deben ser iguales; sin embargo se pueden hacer los cálculos con el primer volumen.

$$\left(\frac{0.5336 \text{ g imp NaCO}_3}{0.050 \text{ L}}\right) \left(\frac{1 \text{ mol NaCO}_3}{105.99 \text{ g puros}}\right) \left(\frac{99.6 \text{ g puros}}{100 \text{ g imp}}\right) \left(\frac{1 \text{ mol HCl}}{1 \text{ mol CO}_3^{2-}}\right) \left(\frac{0.005 \text{ L CO}_3^{2-}}{0.00545 \text{ L HCl}}\right)$$
$$= 0.0920 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$$

9.2 Titulación ácido-base de la Tobramicina con ácido clorhídrico

Para poder determinar la pureza de la Tobramicina, se realizó el ensayo de titulación ácido-base, ya que al conocer que la molécula de Tobramicina presenta grupos amino e hidroxilo que le confiere de un carácter básico, se vuelve un método adecuado y sencillo.

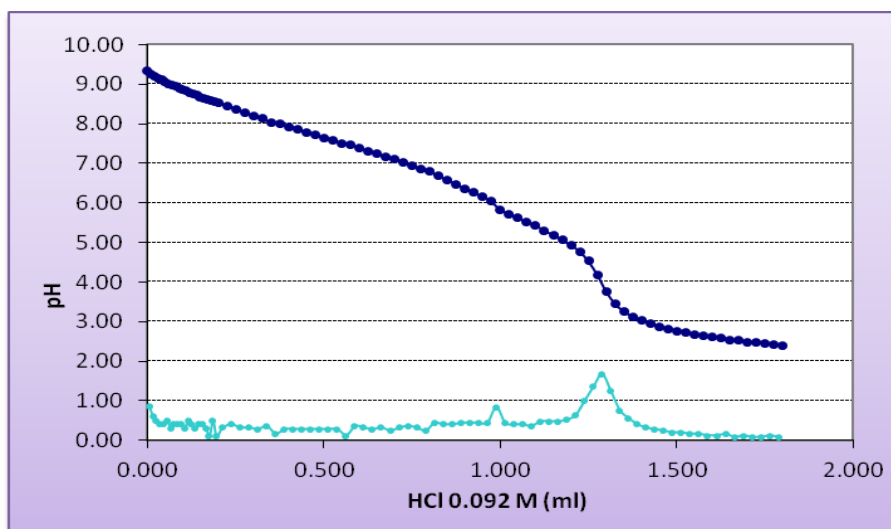


Figura 34. Valoración de 2 mL de Tobramicina 4.202 mg/mL con HCl 0.0920 mol L⁻¹

Con fundamento en la reacción ácido-base, el volumen de la alícuota usada de Tobramicina, la cantidad que se pesó y el volumen en el que se preparó la disolución madre, es posible determinar la pureza de la siguiente manera:

$$\% \text{pureza} = \left(\frac{467.52 \text{ g Tb}}{1 \text{ mol Tb}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol Tb}}{4 \text{ mol HCl}} \right) \left(\frac{0.0920 \text{ mol HCl}}{1000 \text{ ml}} \right) \left(\frac{1.287 \text{ ml HCl}}{3 \text{ ml Tb}} \right) \left(\frac{50 \text{ ml}}{0.2101 \text{ g Tb}} \right) \times 100\%$$

$$\% \text{ pureza} = 98.7\%$$

$$\text{pKa} = \frac{4.9 + 5.8}{2} = 5.3$$

9.3 Determinación de la concentración del nitrato de plata

Para poder realizar la determinación de la estequiometría que puede tener un complejo formado entre la Tobramicina y la Ag(I), se necesita tener una concentración conocida de una solución de nitrato de plata, para lo cual en el ensayo para conocer dicha concentración se utilizó como patrón primario KCl anhidro secado en estufa a 80°C durante 3 horas.

Reacción:

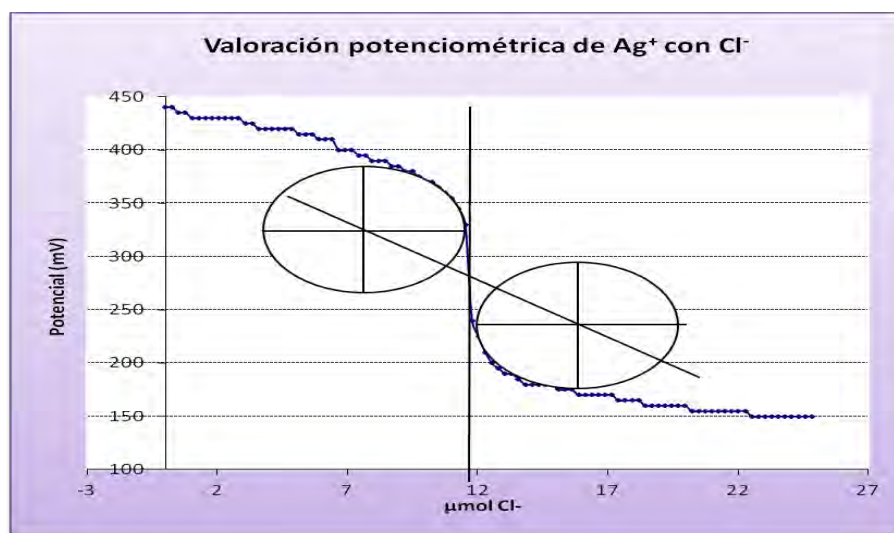
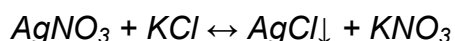


Figura 35. Curva de la valoración potenciométrica del AgNO_3 de 2 mL con concentración 2.4 mg/mL al ir agregando KCl 0.0128 mol L^{-1}

El punto de equivalencia de la reacción en la curva de valoración anterior, se determinó por el método gráfico de los círculos, el cual se alcanza cuando se han agregado 11.2 μmol de KCl a una alícuota de 2 mL de una disolución de AgNO_3 con una concentración teórica de 0.006 mol L^{-1} . De esta manera por medio de cálculos estequiométricos podemos determinar la concentración real de la disolución de AgNO_3 :

$$\frac{11.2 \mu\text{mol Cl}^-}{2 \text{ml Ag}^+} \times \frac{1 \mu\text{mol Ag}^+}{1 \mu\text{mol Cl}^-} \times \frac{1 \text{mmol Ag}^+}{1000 \mu\text{mol Ag}^+} = 0.0055 \text{ mol L}^{-1} \text{ AgNO}_3$$

9.4 Determinación de la concentración del sulfato de cobre

La titulación potenciométrica realizada entre el sulfato de cobre y la Tobramicina, se hizo con la finalidad de poder determinar la formación de algún complejo entre estas sustancias y así determinar la posible estequiometría. La disolución de CuSO_4 empleada con una concentración teórica de 0.01 mol L^{-1} , fue valorada para este fin a partir de una curva de calibración con una solución de cobre con concentración conocida, $0.0257 \text{ mol L}^{-1}$. Se realizó por el método polarográfico en donde se fueron añadiendo alícuotas de $50 \mu\text{L}$ de la solución de CuSO_4 $0.0257 \text{ mol L}^{-1}$ en un medio de $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$ 0.1 mol L^{-1} en solución acuosa; el volumen de la celda fue de 15 mL . Se graficó la corriente de pico de las señales de reducción en un potencial de pico (E_p) de 92.5 mV , obtenidas por PDI, contra la concentración que se tenía en la celda electroquímica de la solución de cobre conocida.

Tabla 6. Valores de la intensidad de corriente de pico (i_p) del sulfato de CuSO_4 $0.0257 \text{ mol L}^{-1}$ a 92.5 mV .

Volumen CuSO_4 $0.0257 \text{ mol L}^{-1}$ (μL)	$[\text{CuSO}_4]_{\text{celda}}$ (mol)	i_p (nA)
0	0	0
50	1.29×10^{-6}	845
100	2.57×10^{-6}	1090
150	3.86×10^{-6}	1270
200	5.14×10^{-6}	1530
250	6.43×10^{-6}	1740

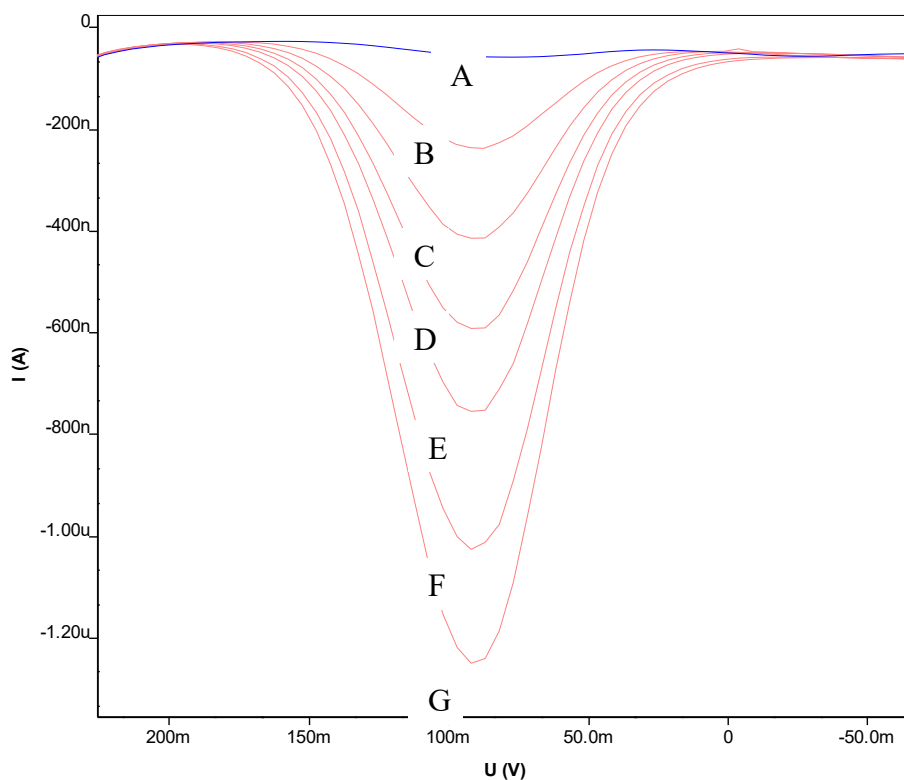


Figura 36. Curvas de i/E en PDI para diferentes concentraciones de Cu(II). A) 15 mL de $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$ 0.1 mol L^{-1} pH = 5; B) 400 μL solución Cu(II) desconocida; C) B + 50 μL Cu(II) patrón; D) B + 100 μL Cu(II) patrón; E) B + 150 μL Cu(II) patrón; F) B + 200 μL Cu(II) patrón; G) B + 250 μL Cu(II) patrón

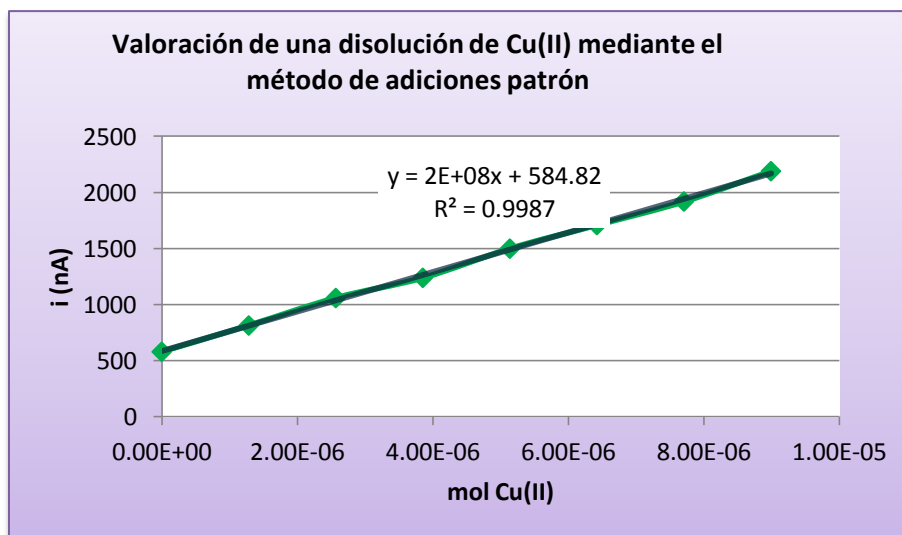


Figura 37. Curva de calibración por PDI de la señal de CuSO_4 en 92.5 mV en $\text{HNO}_3/\text{KNO}_3$ 0.1 mol L^{-1}

Al realizar una regresión con el método de mínimos cuadrados, dicho análisis arrojó la siguiente ecuación de la recta: $i_p = (2 \times 10^8)C + 584.82$. Para calcular la concentración, se sustituyó el valor del volumen utilizado de la disolución desconocida de cobre siendo de 400 μL en la ecuación obtenida en la curva de calibración y obtener la concentración de la disolución:

$$C_{\text{celda}} = \frac{(580.4 \text{ nA})(10^6 \text{ mol})}{\left(2 \times 10^8 \frac{\text{nA}}{\text{mol}}\right)(400 \mu\text{L})} = 0.0073 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

9.5 Determinación del límite de detección y linealidad del método

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la curva de calibración de la Tobramicina de la señal de oxidación a un potencial de pico (E_p) de 208 mV, la cual se obtuvo al graficar la corriente de pico de dicha señal por el método de polarografía diferencial de impulsos contra la concentración respectiva de Tobramicina en celda, al hacer adiciones que comprenden concentraciones de 4.4×10^{-5} a 2.22×10^{-4} en un medio de 20 mL de KNO_3 0.5 mol L^{-1} .

Tabla 7. Valores de i_p de la señal de oxidación de Tobramicina en 208 mV

Vol. Tb (μL)	Conc. Tb (μM)	i_{TB} (μA)
0	0	0
100	0.044	-0.0882
150	0.067	-0.2102
200	0.089	-0.4322
250	0.111	-0.6552
300	0.133	-0.8772
350	0.155	-1.0882
400	0.178	-1.2682
450	0.200	-1.4082
500	0.222	-1.5382

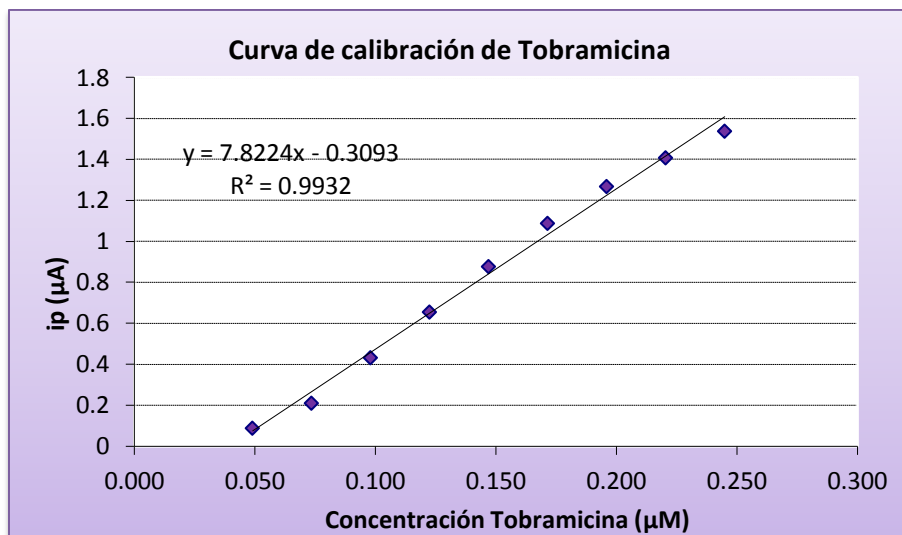


Figura 38. Curva de calibración por PDI para la señal en 208 mV de Tobramicina en KNO_3 0.5 mol L^{-1} pH = 5

Se obtiene la ecuación de la recta a partir de esta curva de calibración por medio de una regresión lineal de los puntos graficados. La linealidad del método está definida por el coeficiente de correlación, de esta manera tenemos:

$$y = 7.8224 x - 0.3093$$

$$r^2 = 0.9932$$

y: intensidad de corriente experimental (i_{exp})

Donde: x: concentración de TB añadida a la celda (C_{exp})

$$n = 9$$

R^2 : coeficiente de correlación de la recta

n: número de datos experimentales

Al presentar esta curva una linealidad muy cercana a la unidad ($r^2 = 0.9932$), nos indica que la corriente es directamente proporcional a la concentración, por lo tanto esta señal de oxidación se encuentra regulada por la difusión conectiva, lo que permite su aplicación para fines cuantitativos.

Para calcular el límite de detección (LDD) que es la mínima concentración de Tobramicina que el equipo puede detectar, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$S_{i/c}$: desviación estándar de la recta

$$i_{calc} = (C_{exp} \times m) + b$$

i_{exp} : intensidad de corriente experimental

$$S_{i/c} = \left\{ \frac{[\sum(i_{exp} - i_{calc})^2]}{(n - 2)} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Donde:

C_{exp} : concentración en celda de Tobramicina

$$LDD = 3 \times \frac{S_{i/c}}{m}$$

m : pendiente de la ecuación de linealidad

b : ordenada de la ec. de linealidad

LDD: límite de detección

Los resultados obtenidos al aplicar las ecuaciones anteriores son los siguientes:

Tabla 8. Valores para el cálculo del LDD de TB

Vol. Tb (μl)	Conc.Tb(μM)	i exp (μA)	i calc (μA)	(i exp-i calc) ²	$S_{i/c}$	LDD (μM)
100	0.044	-0.0882	-0.074	0.0002	0.0046	0.020±.003
150	0.067	-0.2102	-0.266	0.0031		
200	0.089	-0.4322	-0.457	0.0006		
250	0.111	-0.6552	-0.649	0.0000		
300	0.133	-0.8772	-0.841	0.0013		
350	0.155	-1.0882	-1.032	0.0031		
400	0.178	-1.2682	-1.224	0.0020		
450	0.200	-1.4082	-1.416	0.0001		
500	0.222	-1.5382	-1.607	0.0048		
n = 9			Σ=	0.0152		
b = -0.3093						
m = 7.8224						

9.6 Curva de calibración y límite de detección de la plata

Los resultados obtenidos para la curva de calibración de la señal de reducción de la plata a un E_p de 369 mV, la cual se obtuvo al graficar la corriente de pico por el método de polarografía clásica (PC) contra la concentración respectiva de Ag(I) en celda, al hacer adiciones que comprenden concentraciones de $3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $8.9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en un medio de KNO_3 0.5 mol L^{-1} , se presentan a continuación

Tabla 9. Valores de i_p de la señal de reducción de Ag(I) en 369 mV

Vol. Ag(I) (μL)	$\mu\text{mol Ag(I)}$	Conc. Ag(I) (mol L^{-1})	$i \text{ Ag(I)}$ (nA)
0	0	0	0
100	0.55	3×10^{-5}	158
150	0.825	4.4×10^{-5}	300
200	1.1	5.9×10^{-5}	419
250	1.375	7.4×10^{-5}	549
300	1.65	8.9×10^{-5}	623

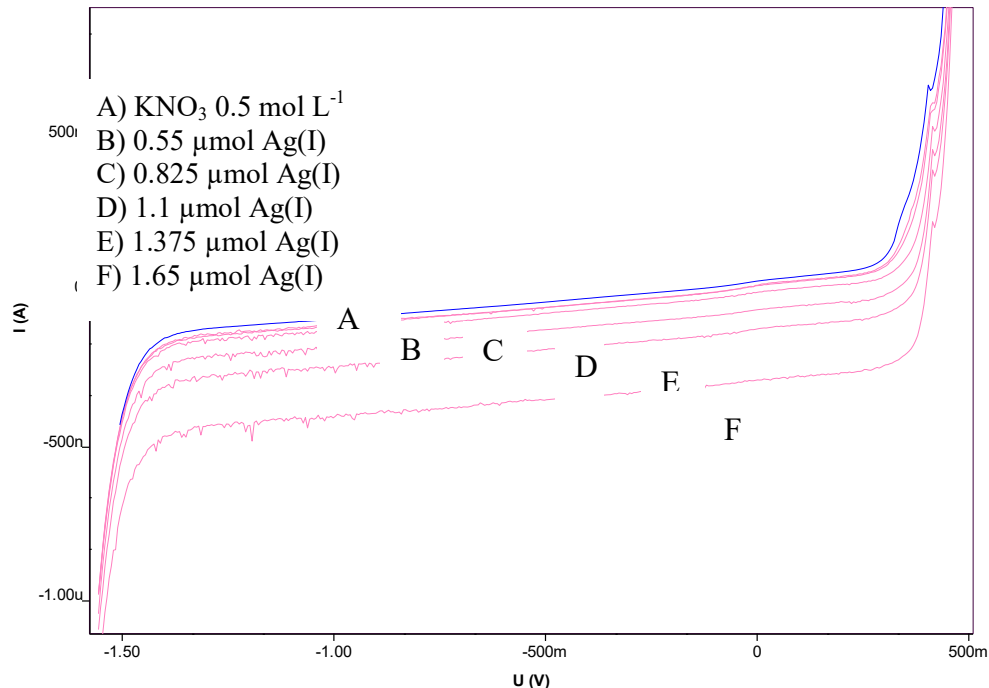


Figura 39. Curva de i/E en PC para diferentes concentraciones de Ag(I) $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$ en 10 mL de medio de KNO_3 0.5 mol L^{-1}

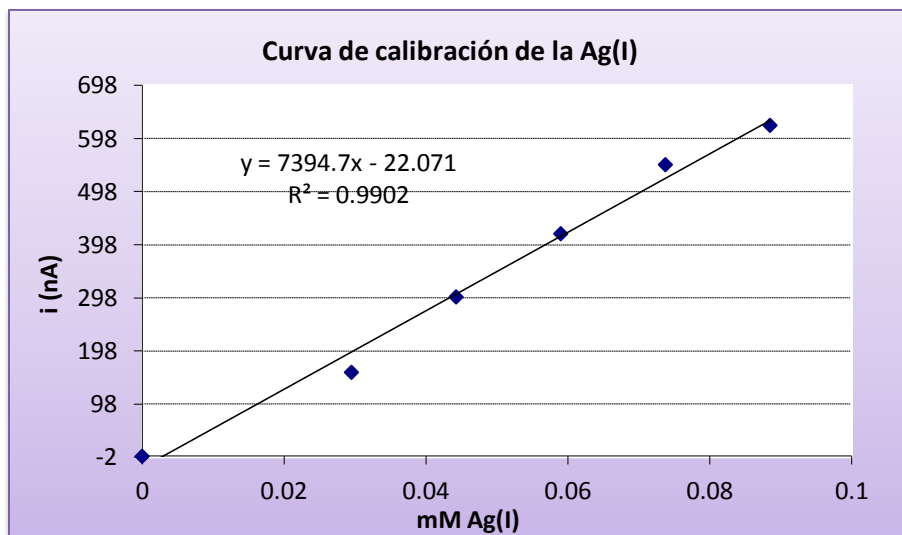


Figura 40. Curva de calibración por PC para la señal en 369 mV de Ag(I) en KNO_3 0.5 mol L^{-1}

Tabla 10. Valores para el cálculo del LDD de Ag(I)

Vol. Ag(I) (μL)	Concentración Ag (mM)	i Ag (nA) exp	i calc	(i exp-i calc) ²	$S_{i/c}$	LDD (mM)
0	0	0	0	0	27.3714	0.011
100	0.030	158	196.07	1449.5267		
150	0.044	300	305.14	26.4656		
200	0.059	419	414.22	22.8838		
250	0.074	549	523.29	661.1005		
300	0.089	623	632.36	87.6087		
n = 5			$\Sigma =$	2247.5853		
b = -22.071						
m = 7394.7						

9.7 Estudio logarítmico de las curvas i/E para la obtención del potencial de media onda ($E_{1/2}$) de la Tobramicina

Al tenerse una onda o señal polarográfica de oxidación, el comportamiento que se obtiene a 25 °C es el siguiente:

$$E = E_{1/2} + \frac{0.059}{n} \times \log\left(\frac{i}{i_{Red} - i}\right)$$

Esta ecuación describe la forma de la curva de intensidad potencial de un sistema electroquímico nernstiano que contiene solo la especie reducida.

Por lo tanto una gráfica de $\log\left(\frac{i}{i_{Red} - i}\right)$ en función de E, dará una línea recta cuya ordenada al origen corresponde al potencial de media onda ($E_{1/2}$) y la pendiente igual a $\left(\frac{0.059}{n}\right)$ que involucra así el número de electrones intercambiados (n).

El potencial de media onda es característico para cada sistema redox en un medio determinado, es independiente de la concentración de la especie electroactiva y además corresponde al potencial en que la corriente es igual a la mitad de la corriente límite ($i = \frac{i_d}{2}$).

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron los datos de las curvas i/E obtenidas por polarografía clásica (PC) en el medio de KNO_3 0.5 mol L^{-1} en solución acuosa a una concentración de 2.6×10^{-4} mol L^{-1} de Tobramicina en la celda. Los valores para calcular el $\log\left(\frac{i}{i_{Red} - i}\right)$ se tomaron de la zona logarítmica de la curva. Siguiendo este procedimiento se obtuvieron los siguientes datos mostrados en la Tabla 11, representados en la Figura 41:

$\log\left(\frac{i}{i_{Red} - i}\right)$	E (V)
-0.29428167	0.183
-0.21568297	0.178
-0.13673453	0.173
-0.06722002	0.168
0.0317434	0.163
0.12813915	0.157
0.25222214	0.152
0.36039066	0.147
0.48096459	0.142

Tabla 11. Valores experimentales para el análisis logarítmico de la Tobramicina

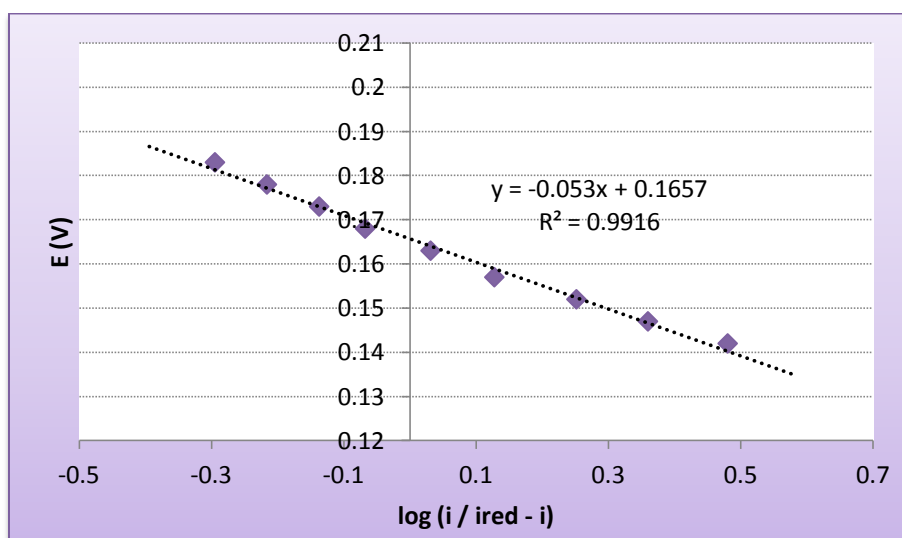


Figura 41. Análisis logarítmico de la señal de oxidación de Tobramicina en 0.1657 V

Realizando este tipo de análisis, se obtuvo un valor de $E_{1/2} = 0.1657 \text{ V}$ para la señal de oxidación del mercurio en presencia de la Tobramicina.

9.8 Gráficos de Tafel

Para representar la ecuación de Tafel, se hace a partir de un gráfico de $\log i$ en función de η :

$$\log i = \log i_0 - \frac{\alpha nF}{2.3RT} \times \eta$$

Donde i es la corriente, i_0 es la corriente de intercambio que representa la corriente que se transfiere al potencial de equilibrio (E_{eq}) y η es el sobrepotencial ($\eta = E - E_{\text{eq}}$). Sin embargo, comúnmente se desconoce el potencial normal condicional (E°) del sistema en estudio y los datos del sobrepotencial se sustituyen por los valores de potencial (E) de la curva i/E , pues se considera que i tiende a cero y $\log i$ a menos infinito cuando E se acerca a E° .

En la Tabla 12 se muestra como ejemplo de aplicación el tratamiento realizado para la señal de oxidación de la Tobramicina a una concentración de $2.6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en la celda.

Tabla 12. Valores experimentales para el gráfico de Tafel

E (V)	i (A)	Log (i)
0.369	1.36E-05	-4.86646109
0.364	1.33E-05	-4.87614836
0.359	1.32E-05	-4.87942607
0.354	1.29E-05	-4.88941029
0.349	1.26E-05	-4.89962945
0.344	1.25E-05	-4.90308999
0.339	1.23E-05	-4.91009489
0.334	1.21E-05	-4.91721463
0.329	1.17E-05	-4.93181414
0.324	1.15E-05	-4.93930216
0.319	1.13E-05	-4.94692156
0.314	1.11E-05	-4.95467702
0.309	1.09E-05	-4.9625735
0.303	1.06E-05	-4.97469413
0.298	1.04E-05	-4.98296666
0.293	1.01E-05	-4.99567863
0.288	9.83E-06	-5.00744648
0.283	9.57E-06	-5.01908806
0.278	9.45E-06	-5.02456819
0.273	9.04E-06	-5.04383157
0.268	8.77E-06	-5.05700041
0.263	8.56E-06	-5.06752624
0.258	8.24E-06	-5.08407279
0.253	7.92E-06	-5.10127482
0.248	7.59E-06	-5.11975822
0.243	7.30E-06	-5.13667714
0.238	7.01E-06	-5.15428198
0.233	6.64E-06	-5.17783192
0.228	6.32E-06	-5.19928292
0.223	6.02E-06	-5.22040351
0.218	5.69E-06	-5.24488773
0.213	5.39E-06	-5.26841123
0.208	5.03E-06	-5.29843201
0.203	4.68E-06	-5.32975415
0.198	4.37E-06	-5.35951856
0.193	4.06E-06	-5.39147397
0.188	3.70E-06	-5.43179828
0.183	3.37E-06	-5.4723701
0.178	3.00E-06	-5.52287875
0.173	2.69E-06	-5.57024772
0.168	2.46E-06	-5.60906489
0.163	2.19E-06	-5.65955589
0.157	1.98E-06	-5.70333481
0.152	1.77E-06	-5.75202673

Con los datos de la tabla anterior se trazó la gráfica de $\log i$ en función de E, que se representa en la Figura 42.

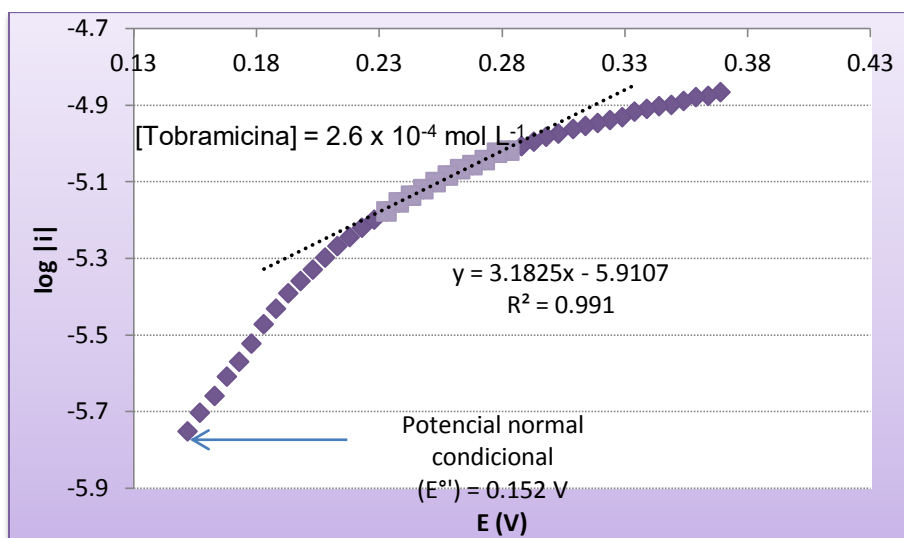


Figura 42. Gráfico de Tafel de Tobramicina en KNO_3 0.5 mol L^{-1}

En la gráfica anterior el valor de la pendiente de la recta (m) corresponde a $-\frac{\alpha n F}{2.3RT}$, de tal forma que despejando se obtiene un valor de αn :

$$\alpha n = -\frac{2.3RT \times m}{F} = (-2.3)(0.02569 \text{ V})(3.1825 \text{ V}^{-1})$$

$$\alpha n = -0.188$$

También en la gráfica se observa que para un potencial de 0.13 V el valor de $\log i$ tiende a menos infinito, es decir que 0.13 V corresponde al valor de potencial normal condicional del sistema y por lo tanto el valor de $\log i$ dado por la ecuación anterior a dicho potencial puede considerarse como la corriente de intercambio o $\log i_0$.

$$\log i_0 = [(3.1825 \text{ V}^{-1})(0.13 \text{ V})] - 5.9107$$

Es decir que se obtiene: $\log i_0 = -5.49$

9.9 Determinación de la estabilidad de los complejos formados

9.9.1 Determinación de la constante de disociación condicional utilizando el método de relación de corrientes

Mediante el análisis cualitativo y cuantitativo de las curvas i_p vs relación molar $\text{mol}_{\text{TB}} / \text{mol}$ catión agregado o viceversa, mol catión agregado / mol_{TB} , se obtuvieron las estequiometrías y constantes condicionales de formación. A continuación se muestra como ejemplo la obtención de dichos valores para el complejo TB(Ag).

Primero se obtiene el gráfico de i_p leída en 169 mV como función de la relación molar $\text{mol}_{\text{Ag(I)}} / \text{mol}_{\text{TB}}$, el cual es la representación de la corriente en 169 mV, que corresponde al complejo formado, contra la relación molar $\text{mol}_{\text{Ag(I)}} / \text{mol}_{\text{TB}}$, que es una manera de expresar la cantidad que se agrega de iones Ag(I) en la celda, pero que permite leer directamente la estequiometría de los complejos formados en el eje de las abscisas conforme cambia la pendiente de la curva. Para la valoración complejométrica de Tobramicina $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ con Ag(I) $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$, se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 13. Conjunto de datos experimentales obtenidos para la curva de valoración complejométrica de Tobramicina con Ag(I)

Volumen de Ag(I) μL	$\text{mol}_{\text{Ag(I)}} / \text{mol}_{\text{TB}}$	i (μA) $E_p = 0.169 \text{ V}$
0	0	0
260	0.24	0.03
340	0.32	0.13
410	0.38	0.17
480	0.45	0.19
500	0.47	0.24
520	0.49	0.24
530	0.50	0.24
540	0.51	0.28
580	0.54	0.3
660	0.62	0.36
740	0.69	0.41

820	0.77	0.45
900	0.84	0.51
980	0.92	0.58
1040	0.97	0.61
1060	0.99	0.63
1070	1.00	0.63
1080	1.01	0.64
1120	1.05	0.66
1200	1.12	0.7
1280	1.20	0.74
1360	1.27	0.77
1440	1.35	0.81
1520	1.42	0.84
1580	1.48	0.86
1590	1.49	0.86
1600	1.50	0.87
1610	1.51	0.88
1640	1.53	0.89
1720	1.61	0.93
1800	1.68	0.95
1880	1.76	0.983

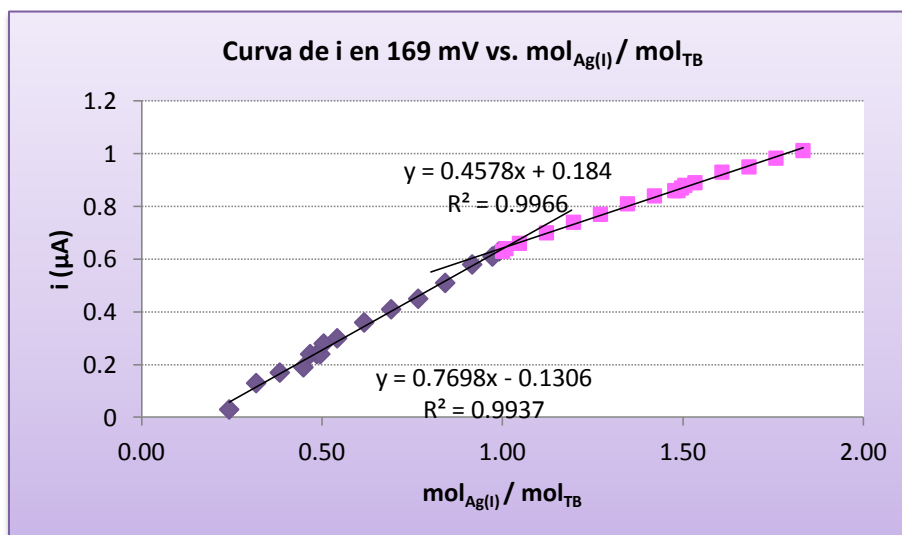


Figura 43. Curva de la i_p en 169 mV vs. $\text{mol}_{\text{Ag(I)}} / \text{mol}_{\text{TB}}$

En la curva de la Figura 43 se observa un cambio de pendiente en $x = 1$, lo que indica la formación del complejo TB(Ag) .

Hay que recordar que al llegar al punto de equivalencia no se tiene exceso de catión ni de ligante y por lo tanto se tiene el mayor grado de disociación del

complejo formado, por esta razón el valor de corriente obtenido experimentalmente es menor que el valor que se lee en la intersección de las rectas, pues debemos recordar que la corriente es proporcional a la concentración. A partir del siguiente cuadro de variación de concentraciones se muestra la reacción de disociación de este complejo:

	$TB(Ag) \longleftrightarrow Ag(I) + TB$		
Inicio	C^*	-----	-----
Disocia	$-αC^*$	-----	-----
Forma	-----	$αC^*$	$αC^*$
Equilibrio	$C^*(1 - α)$	$αC^*$	$αC^*$

La expresión de la constante de disociación para esta reacción es la siguiente:

$$K'_{dis} = \frac{|Ag||TB|}{|AgTB|}$$

Al sustituir las concentraciones al equilibrio obtenidas del cuadro de variación de concentraciones en la expresión de la constante de disociación, se obtiene esta última expresada en función del grado de disociación ($α$):

$$K'_{dis} = \frac{α^2 C^*}{1 - α}$$

Recordemos que la corriente es igual al número de electrones que intercambia el par redox, la constante de difusión y la concentración de la especie que reacciona ($i = nK_D C^*$), de esta manera, la corriente obtenida experimentalmente es igual al número de electrones que se intercambian en la reducción del complejo, la constante de difusión del mismo y su concentración al equilibrio, es decir, $i_{exp} = nK_D C^*(1 - α)$, por lo tanto el grado de disociación ($α$) se obtiene relacionando la corriente experimental con la corriente teórica, cuyos valores son $0.63 \mu A$ y $0.6418 \mu A$, respectivamente.

$$\frac{i_{exp}}{i_{teo}} = \frac{0.63 \mu A}{0.6418 \mu A} = \frac{nK_D C^* (1 - \alpha)}{nK_D C^*}$$

$$0.9816 = 1 - \alpha$$

$$\alpha = 0.0184$$

La concentración se calculó tomando en cuenta que los moles de complejo que se forman son los moles de Ag(I) agregados en el punto de equivalencia considerado, dividido entre el volumen total en celda en el punto de equivalencia considerado:

$$C^* = \frac{5.885 \times 10^{-6} \text{ mol}}{20 \text{ ml}_{cel} + 1.070 \text{ ml}_{Ag(I)}} \times 1000 = 2.793 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

Al sustituir el valor de α encontrado en la expresión de la constante de disociación queda la ecuación de la siguiente forma:

$$K'_{dis} = \frac{(0.0184)^2 (2.793 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1})}{1 - 0.0184} = 9.63 \times 10^{-8}$$

Se obtiene un valor de 9.63×10^{-8} para la K'_{dis} del complejo, la cual también puede escribirse como $pK'_{dis} = 7.02$.

9.9.2 Determinación de la constante condicional de formación

Mediante el análisis cualitativo y cuantitativo de las curvas i_p vs relación molar $\text{mol}_{TB} / \text{mol}$ catión agregado o viceversa, mol catión agregado / mol_{TB} , se obtuvieron las estequiometrías y constante condicional de formación. A continuación se muestra la obtención de dichos valores para el complejo Ag(TB).

Primero se obtiene el gráfico de i_p leída en 208 mV como función de la relación molar $\text{mol}_{TB} / \text{mol}_{Ag(I)}$, el cual es la representación de la corriente en 208 mV, que

corresponde al complejo formado, contra la relación molar $\text{mol}_{\text{TB}} / \text{mol}_{\text{Ag(I)}}$, que es una manera de expresar la cantidad que se agrega de iones Ag(I) en la celda, pero que permite leer directamente la estequiometría de los complejos formados en el eje de las abscisas conforme cambia la pendiente de la curva. Para la valoración complejométrica de Tobramicina $0.0098 \text{ mol L}^{-1}$ con Ag(I) $0.0055 \text{ mol L}^{-1}$, se obtuvieron los siguientes datos:

Vol. de Tobramicina μL	$\text{mol}_{\text{TB}} / \text{mol}_{\text{Ag(I)}}$	$i \text{ (nA)}$ $E_p = 0.208 \text{ V}$
0	0.000	0.0354
200	0.310	0.337
250	0.387	0.5761
300	0.465	0.8241
350	0.542	1.0911
400	0.620	1.3111
450	0.697	1.5111
500	0.775	1.7111
550	0.852	1.9011
600	0.930	2.0611
650	1.007	2.1811
700	1.085	2.3011
750	1.162	2.4411
800	1.240	2.5511
850	1.317	2.6311
900	1.394	2.7211
950	1.472	2.7911
1000	1.549	2.8511
1050	1.627	2.9211
1100	1.704	2.9611
1150	1.782	2.9911
1200	1.859	3.0611
1250	1.937	3.1011
1300	2.014	3.1711
1350	2.092	3.2411
1400	2.169	3.2811
1450	2.247	3.3411
1500	2.324	3.4411
1550	2.402	3.5511
1600	2.479	3.6211
1650	2.557	3.6611
1700	2.634	3.7211

Tabla 14. Conjunto de datos experimentales obtenidos para la curva de valoración complejométrica de Ag(I) con Tobramicina

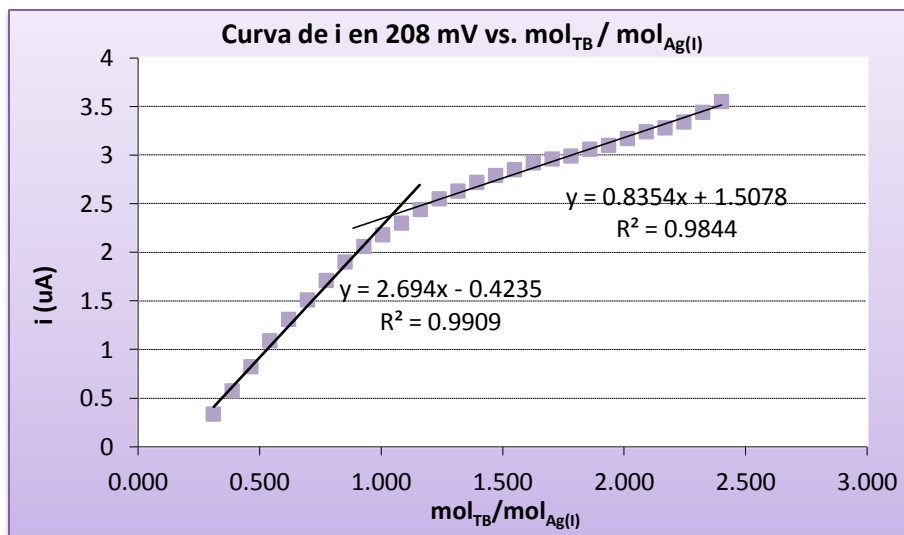
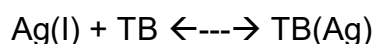


Figura 44. Curva de la i_p en 208 mV vs. relación molar $\text{mol}_{\text{TB}} / \text{mol}_{\text{Ag(I)}}$

En la curva de la Figura 42, se observa un cambio de pendiente en $x = 0.99 (\approx 1)$, indicando la formación del complejo $\text{TB}(\text{Ag})$, llevándose a cabo durante la valoración el siguiente equilibrio:



Dado que la señal en 0.208 V es de difusión, se puede relacionar directamente su valor respectivo de corriente de pico (i_p) con la concentración de Ag(I) ($C_{\text{Ag(I)}}$) presente en su forma libre, esto es, no complejada.

Recordemos que la corriente es igual al número de electrones que intercambia el par redox, la constante de difusión y la concentración de la especie que reacciona ($i = nK_D C^*$), de esta manera, la corriente obtenida experimentalmente es igual al número de electrones que se intercambian en la reducción del complejo, la constante de difusión del mismo y su concentración al equilibrio, es decir, $i_{\text{exp}} = nK_D C^*(1 - \alpha)$, por lo tanto el grado de disociación (α) se obtiene relacionando la corriente experimental con la corriente teórica, cuyos valores son 2.18 nA y 2.2168 nA, respectivamente.

$$\frac{y_{\text{exp}}}{y_{\text{teo}}} = 1 - \alpha$$

$$1 - \alpha = \frac{2.18}{2.2168} = 0.9834$$

$$\alpha = 1 - 0.9834 = 0.0166$$

Tomando en cuenta que se partió de una concentración en celda de Ag(I) de $3.16 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ y que la estequiometría de la reacción es 1 mol de TB por 1 mol de Ag(I), se calcula la K'_{dis} de la siguiente forma:

$$K_{dis} = \frac{|Ag(I)||TB|}{|AgTB|} = \frac{(\alpha C_0)^2}{C_0(1 - \alpha)} = \frac{\alpha^2 C_0}{1 - \alpha}$$

$$K_{dis} = \frac{(0.0166)^2 (3.16 \times 10^{-4})}{1 - 0.0166} = 8.8 \times 10^{-8} = 10^{-7.06}$$

Dado que sólo se lleva a cabo un equilibrio de complejación, la β de formación global es el inverso de K_{dis} , por lo tanto el cálculo de la constante de formación es la siguiente:

$$\beta = \frac{1}{10^{-7.06}} = 10^{7.06} \quad \text{ó} \quad \log \beta = 7.06$$

9.9.3 Determinación de las constantes de formación globales y la obtención de las constantes de disociación con Hg(II)

Esta metodología fue realizada con el propósito de determinar la estabilidad de los complejos de mercurio; como ejemplo se muestra el procedimiento realizado para el complejo $TB(Hg)_2$.

De la gráfica realizada al graficar la corriente contra la relación molar entre la Tobramicina y los cationes de Hg(II), se pueden obtener tres ecuaciones a la recta, de las cuales es posible obtener el punto de intersección $x_1 = 0.507$ y $x_2 = 1.07$.

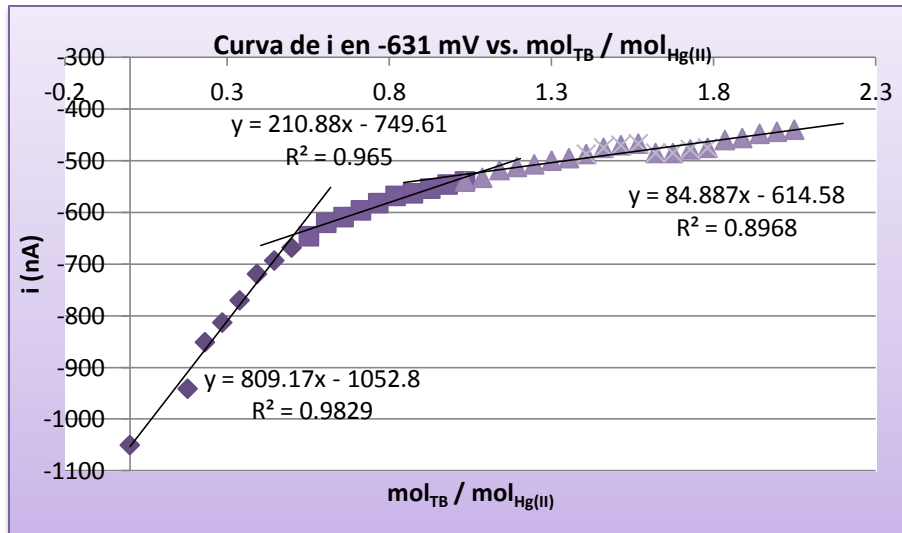


Figura 45. Curva de la i_p en -631 mV vs. relación molar $\text{mol}_{\text{TB}} / \text{mol}_{\text{Hg(II)}}$; medio buffer boratos pH = 10

Se calcula la corriente teórica sustituyendo x_1 en la ecuación de la recta:

$$y_{\text{teo}} = (210.88)(1.0) - 749.61 = -538.22 \text{ nA}$$

Conociendo que la corriente teórica sólo depende de la concentración inicial y viene dada por la ecuación:

$$y_{\text{teo}} = nK_p C_0 \quad \text{Ec. 1}$$

Y que la corriente experimental depende también del grado de disociación del complejo, quedando la ecuación de la siguiente forma:

$$y_{\text{exp}} = nK_p C_0 (1 - \alpha) \quad \text{Ec. 2}$$

Para poder obtener α se divide la ecuación 2 entre la ecuación 1 y posteriormente sustituir los valores y despejar α :

$$\frac{y_{\text{exp}}}{y_{\text{teo}}} = 1 - \alpha$$

$$1 - \alpha = \frac{-533}{-538.22} = 0.9903$$

$$\alpha = 1 - 0.9903 = 0.0097$$

Tomando en cuenta que se partió de una concentración en celda de Hg(II) de $2.75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ y que la estequiometría de la reacción es 1 mol de TB por 1 mol de Hg(II), se calcula la K'_{dis} de la siguiente forma:

$$K_{dis} = \frac{|TB(Hg)_2|^2 |TB|}{|TB(Hg)|} = \frac{\alpha^2 C_0^2}{C_0(1-\alpha)} = \frac{\alpha^2 C_0}{1-\alpha}$$

$$K_{dis} = \frac{(0.0097)^2 (2.75 \times 10^{-4})}{1 - 0.0097} = 2.6 \times 10^{-8} = 10^{-7.6}$$

$$pK_{dis} = 7.6$$

De la misma manera se calculó el pK'_{dis} del segundo complejo con un valor de $pK'_{dis2} = 6.1$ tomando en cuenta su estequiometría 1:2. Dado que β_1 es el inverso de K_{dis} , y que β de formación global es el producto del inverso de las dos constantes de disociación, podemos calcular las β 's de la siguiente manera:

$$\beta_1 = \frac{1}{10^{-7.6}} = 10^{7.6} \quad \beta_2 = \frac{1}{10^{-7.6}} \times \frac{1}{10^{-6.1}} = 10^{13.7}$$

9.10 Cuantificación de Tobramicina en una muestra mediante una valoración complejométrica con Cu(II)

La cantidad y pureza de Tobramicina en la disolución de un lote de muestra en polvo, se obtuvo con la ayuda de una curva de valoración, misma que se construyó graficando la corriente de la señal a -270 mV, correspondientes al complejo formado, en función de los μL de TB agregados a una alícuota de 150 μL de Cu(II) $7.3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ que se agregaron a 10 mL de electrolito soporte de acetatos pH 5.75 (Tabla 15).

Tabla 15. Datos experimentales utilizados para construir la curva de valoración

$\mu\text{L TB}$	i (nA)
0	139
150	50.7
250	40.9
350	33
450	27.2
550	19.8
650	15
750	11.3
850	7.63
950	3.05
1050	2.44
1150	-0.305
1250	-2.29
1350	-3.39
1450	-4.43
1550	-5.71
1650	-5.95
1750	-6.5
1850	-7.32
1950	-6.87
2050	-7.87
2150	-8.03
2250	-8.24

En la curva de valoración mostrada en la Figura 46, se observa que existe dos cambios de pendiente, en el cual se encuentran los puntos de equivalencia de 950 μL de TB y 1950 μL de TB, indicando la formación del complejo $\text{TB}(\text{Cu})$ y TB_2Cu .

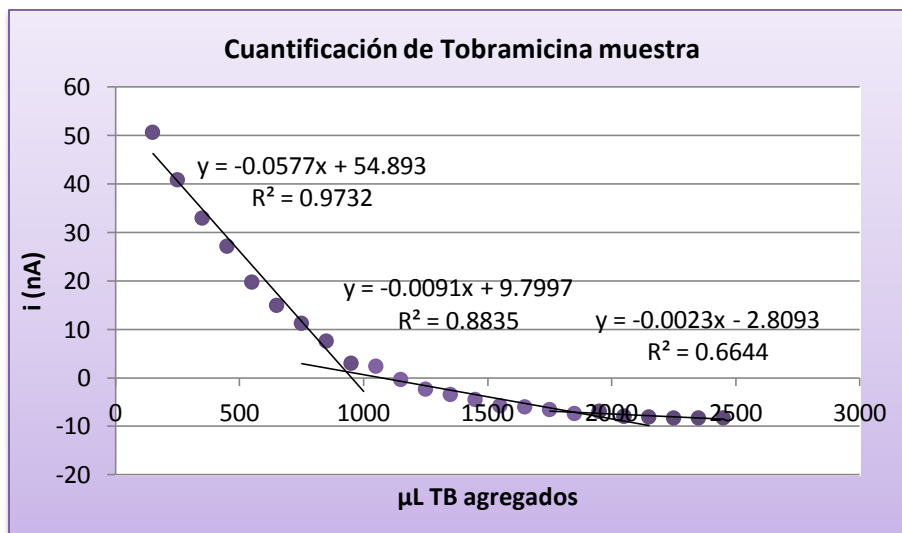


Figura 46. Curva de valoración complejométrica de Tobramicina con Cu(II).

Con la información anterior y como se sabe que se tomó una alícuota de la solución de Cu(II) de $0.0073 \text{ mol L}^{-1}$ de $1\ 150 \mu\text{L}$ y que la Tobramicina tiene una masa molar de 467.52 g/mol , la pureza de la Tobramicina considerado en el punto de equivalencia, es decir, la formación del complejo TB(Cu), se calcula de la siguiente forma:

$$1 \mu\text{L} \rightarrow 9.8 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$$

$$950 \mu\text{L} \rightarrow 9.31 \mu\text{mol TB}$$

$$9.31 \mu\text{mol TB} \rightarrow 100\%$$

$$8.4 \mu\text{mol TB}_{exp} \rightarrow 90.2\%$$