

31
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**"DESARROLLO Y VALIDACION
DE UN METODO ANALITICO POR
POLAROGRAFIA DIFERENCIAL DE
PULSOS PARA LA CUANTIFICACION
DE ACIDO NALIDIXICO EN MATERIA
PRIMA Y PRODUCTO TERMINADO".**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
JOSE GERARDO MEDINA ALONSO**



MEXICO, D. F.



MARZO DE 1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

INDICE.

INTRODUCCION	1
FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA Y OBJETIVOS	2
GENERALIDADES	5
PRINCIPIOS DE ELECTROQUIMICA ANALITICA	9
INSTRUMENTACION	16
POLAROGRAFIA DC	26
POLAROGRAFIA DP	34
FUNDAMENTOS DE VALIDACION	36
PARTE EXPERIMENTAL	40
RESULTADOS	56
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	66
CONCLUSIONES	71
PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	73
ANEXO I	74
ANEXO II	76
BIBLIOGRAFIA	82

INTRODUCCION.

En la actualidad debido al avance científico y tecnológico la introducción de nuevos medicamentos al mercado y al empleo de técnicas analíticas poco prácticas, con elevado costo y mantenimiento de sus equipos, la industria farmacéutica requiere del desarrollo de métodos analíticos que sean confiables, eficientes y rápidos para el control de calidad de sus productos.

Dichos métodos analíticos deben además asegurar un adecuado control de la calidad en las diferentes etapas de fabricación y como producto terminado, lo que permite verificar que el medicamento al ser administrado cumpla debidamente con las funciones terapéuticas deseadas lo cual se logra mediante la validación .

En nuestro país existe un elevado índice de infecciones tracto urinarias, de origen bacteriano, lo que explica el gran consumo de medicamentos bactericidas específicos de amplio espectro. De estos medicamentos uno de los más importantes es el ácido nalidixico debido a que es precursor de otros fármacos de similares características, está incluido dentro del cuadro básico de medicamentos y es ampliamente usado contra las infecciones bacterianas del tracto urinario.⁽¹⁾

El propósito del presente trabajo es desarrollar y validar un método analítico por polarografía diferencial de pulsos para la cuantificación de ácido nalidixico en materia prima y producto terminado, debido a que algunos de los métodos de análisis para cuantificar ácido nalidixico son poco exactos , reproducibles y precisos y/o requieren de cierto tiempo de análisis para poder dar un resultado final. La polarografía diferencial de pulsos además de ser más exacta , precisa y reproducible que estos métodos, es también versátil debido a la rapidez de análisis y al empleo de reactivos comunes de laboratorio para realizarlos.

FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA Y OBJETIVOS.

La industria farmacéutica nacional depende de la importación de materias primas y tecnología para su desarrollo económico, ante ello, la prioridad fundamental es orientar la investigación al desarrollo de tecnología propia y adecuarla a sus necesidades, a fin de procurar su independencia del exterior .

Dentro de las buenas prácticas de manufactura de la industria farmacéutica, el aspecto más importante es el control de calidad de las materias primas y producto terminado para el cual generalmente se requiere de métodos analíticos con características de exactitud, precisión y reproducibilidad aceptables para que permitan la adecuada cuantificación del principio activo de una forma farmacéutica, de ahí la necesidad de desarrollar y optimizar métodos analíticos eficientes y confiables que satisfagan estas cualidades .

Una buena opción son los métodos polarográficos, y en particular la polarografía diferencial de pulsos debido a la exactitud, precisión y reproducibilidad que presenta en el análisis cuantitativo de una especie electroactiva; por otro lado se puede trabajar con cantidades mínimas de muestra y disolvente, pudiéndose efectuar además análisis rápidos y confiables de la cantidad de principio activo presente en una forma farmacéutica .

Debido a la necesidad de un control de medicamentos más riguroso en nuestro país , la validación es ahora un requisito sanitario (Diario Oficial de la Federación 18-enero-1988) cuya finalidad es tener un medicamento seguro en todo aquello que pueda afectarlo en su fabricación además de ser eficaz en cuanto a su acción terapéutica (2)

Así la calidad de los medicamentos fabricados será la adecuada porque a partir de sus propiedades físicas, químicas y biológicas se establecen sus especificaciones y tolerancia para asegurar de que el producto final está de acuerdo al diseño establecido.

La cuantificación de ácido nalidixico puede realizarse conforme al método de Farmacopea (780-B1,1338-1139) directamente por valoración con metóxido de litio ó por espectrofotometría UV ó por otros ensayos tales como colorimetría, cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de gases, etc.⁽⁸⁾ También en Farmacopea se encuentra su determinación en en tabletas y suspensión oral (4,5)

Actualmente en los laboratorios fabricantes, para la cuantificación de ácido nalidixico, como análisis de rutina, se emplean los métodos espectrofotométricos en UV y la valoración con metóxido de litio; el primer método requiere de previa extracción clorofórmica del principio activo, lo cual disminuye su eficiencia y confiabilidad; para el segundo método el problema es el empleo de reactivos tales como el metóxido de litio, dimetilformamida, etc, que a parte del riesgo que representa su manejo, son costosos y requieren de ciertas precauciones tales como proteger las muestras de absorción de dióxido de carbono de la atmósfera; por otro lado en una titulación generalmente hay menor exactitud, precisión y confiabilidad que en un análisis instrumental. De lo anterior se desprende que el problema propuesto es establecer un método analítico alternativo rápido, eficiente y confiable que cumpla con los parámetros de validación: linealidad, exactitud, precisión, especificidad y sensibilidad. El método analítico alternativo propuesto es la polarografía diferencial de pulsos por sus características electroanalíticas.

Se sugiere la siguiente hipótesis de trabajo para la resolución del problema establecido :

" Si se desarrolla y valida el método por polarografía diferencial de pulsos para la cuantificación de ácido nalidixico , se establecerá un método analítico práctico, eficiente y confiable, el cual será lineal, exacto, preciso, sensible y específico para el control analítico de ácido nalidixico en materia prima y como producto terminado ".

Con base a la hipótesis anterior se pretenden alcanzar los siguientes objetivos :

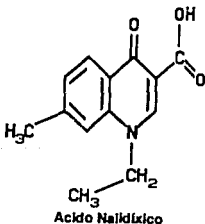
- Desarrollar un método analítico por polarografía diferencial de pulsos para la cuantificación de ácido nalidixico en materia prima y producto terminado.
- Realizar el estudio de validación del método polarográfico propuesto.

GENERALIDADES.

El ácido nalidíxico es el primer compuesto de una serie de antibióticos que se ha desarrollado en los últimos 20 años, que se han denominado quinolonas. Ejemplos típicos de estos antibióticos, además del ácido nalidíxico son el ácido oxalínico, la cinoxacina y de los más recientes la norfloxacin y ciprofloxacina. Esta familia de compuestos ha sido ampliamente usada en el tratamiento de infecciones del tracto urinario causados por microorganismos Gram negativos.⁽⁶⁾ El ácido nalidíxico es un bactericida de amplio espectro, muy utilizado para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, está incluido dentro del cuadro básico de medicamentos.

El ácido nalidíxico es ácido 1-etil-1,4-dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxílico ó 3-carboxi-1-etil-7-metil-1,8-naftiridina-4-ona-3-ácido carboxílico.⁽⁸⁾

Su fórmula es :



Fórmula Molecular : $C_{21}H_{22}N_2O_3$

Nombres Comerciales :

Amsalidixin; Elprin; Hubadix; Nalidex; Nalidin; Nalidixico
Bitter; Nalix; Seltomyton; Wintoger; Wintomyton; Wintoger;
Dalic; Azo-Wintomyton; Anadix; Acinal; Urlix; Novaaldrin.⁽⁴⁾

Propiedades Físicas (3,4)

- El ácido nalidixico es un polvo cristalino blanco o ligeramente amarillo e inodoro.
- Peso Molecular : 232.24 u.m.a.
- Contiene no menos del 98.0 % y no más del 102.0 % de $C_{12}H_{12}N_2O_6$ calculado sobre base seca.
- Es estable al aire.
- Pérdida al secado a 105 °C por dos horas es : no más de 0.5 % de su peso.
- Residuo de ignición : no más del 0.2 % .
- Metales Pesados : no más de 20 ppm.
- Punto de Fusión : 225°- 231° C .
- El espectro de absorción en la región ultravioleta de una muestra en solución 0.01 N de hidróxido de sodio exhibe máxima y mínima a las mismas longitudes de onda que una solución similar de estándar de ácido nalidixico concomitantemente medidas y las absorptividades respectivas calculadas en la sustancia seca a la longitud de onda máxima absorbancia de 258 nm aproximadamente, no difieren en más de 30 por ciento.
- Es Fotodegradable.
- Solubilidad

Los valores de la solubilidad del ácido nalidixico en varios disolventes a 23° C son listados como sigue :

Disolvente	Solubilidad (mg/ml) (M)	
Cloroformo	35.0	1.50×10^{-1}
Alcalis	35.0	1.50×10^{-1}
Tolueno	1.6	6.89×10^{-2}
Metanol	1.3	5.60×10^{-2}
Etanol	0.9	3.87×10^{-2}
Etil Acetato	0.8	3.44×10^{-2}
Isopropanol	0.4	1.72×10^{-2}
Agua destilada	0.1	4.31×10^{-3}
Éter Etilico	0.1	4.31×10^{-3}

Propiedades Químicas.^(3,6)

- Análisis Elemental :

La Fórmula Molecular es $C_{12}H_{12}N_2O_8$.

Elemento	Teórico	Experimental	Estándar
C	62.07%	62.11	61.98
H	5.21%	5.21	5.20
N	12.07%	12.00	12.32

- El ácido nalidixico es un ácido monoprótico con valores de pKa publicados que oscilan entre 5.9 y 6.2 . El pKa de la protonación del nitrógeno en posición ocho ha sido reportado como 6.02 y el pKa para el anión carboxilato en la fórmula ha sido reportado como - 0.94.
- $E_{1/2} = - 1.68$ Voltios (disolución de hidróxido de sodio con 1 % de DMF a pH = 13.50).

INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES.⁽⁴⁾

El ácido nalidixico es un compuesto antibacterial sintético de amplio espectro que es usado en el tratamiento de infecciones del tracto urinario. Es un quimioterápico de acción bacteriostática, contra a) organismos patógenos, Gram negativos y algunos Gram positivos, b) en infecciones tracto urinarias agudas y crónicas, tales como cistitis, pielonefritis, prostatitis, uretritis, uretriquinitis, c) infecciones causadas por cateterismo, como son : uretratriginitis y cirugía urológica, d) es efectivo además en algunas infecciones gastrointestinales : diarrea y disentería, producidas por Aerobacter , E. coli , Klebsiella pneumoniae , Proteus , Salmonella y Shigella .

No se recomienda su administración en niños menores de un mes, en prematuros, ni durante el primer trimestre del embarazo.

MECANISMO DE ACCION. (5,6,7)

Se ha demostrado que el ácido nalidixico actúa por inhibición selectiva de la replica del DNA bacteriano, y se han propuesto dos posibles mecanismos de acción a nivel molecular : a) por la inhibición de la DNA-girasa , la cual es una topoisomerasa del DNA , y b) por la interacción directa del fármaco con el DNA , proponiéndose que para que se lleve a cabo la interacción se requiere de un acarreador, el cual se ha supuesto sea un complejo de hierro o cobre. En trabajos previos , se ha demostrado que el ácido nalidixico se une a iones Cu (II) de dos posibles formas, dependiendo del ambiente químico que rodee el centro metálico.

ACCION FARMACOCINETICA. (5,7)

Después de la administración oral el ácido nalidixico es absorbido rápidamente por el tracto gastrointestinal, uniéndose en gran parte a las proteínas plásmaticas, se metaboliza parcialmente en el hígado y se excreta pasando primero a través de los túbulos renales , luego al riñón , en el cual es eliminado rápidamente en la orina. Parte del ácido nalidixico aparece sin alteración en la orina junto con el ácido hidroxinalidixico, que es su metabolito activo, con poder antibacteriano similar. Entre otros metabolitos aparecen los conjugados glucuronidos ácidos de los ácidos nalidixico e hidroxinalidixico y el derivado del ácido dicarboxílico. La concentración que se alcanza en sangre es baja , y por lo tanto es poco efectivo en las infecciones parenquimatosas del riñón.

El ácido nalidixico sólo es tóxico en concentraciones altas y en tratamientos prolongados. Los efectos secundarios son escasos, pero los más comunes suelen ser náuseas, vómitos, irritación, urticaria, alteración de la percepción visual, fotosensibilidad cutánea.

ELECTROQUÍMICA ANALÍTICA E INTRODUCCION A LAS CURVAS I/E.

La electroquímica analítica estudia los fenómenos de transferencia de electrones entre una superficie conductora y una fase iónica conductora generalmente líquida. Esta transferencia de partícula se lleva a cabo cuando la energía que se impone a tal electrodo externamente es la adecuada para que se lleve a cabo la transferencia de electrones. Si la especie que entra en contacto con el electrodo acepta un electrón, está se reduce y la superficie del electrodo actúa como cátodo, si ocurre lo contrario el electrodo se comporta como ánodo. Estas reacciones electroquímicas ocurren de manera espontánea o no dependiendo de las características de las interfaces electrodo-disolución.^(10,11)

En condiciones apropiadas, los electrones pueden ser cedidos por un conductor sumergido en la disolución de un oxidante, o tomados de la disolución de un reductor. Los electrones son intercambiados entre un electrodo y las sustancias en disolución. Este fenómeno es una reacción electroquímica, la cual se lleva a cabo en la interfase disolución-electrodo y por consiguiente es una reacción de intercambio de electrones; oxidación o reducción en un electrodo.^(10,11)

La reacción electroquímica es en si una reacción de oxidación o de reducción efectuada por medio de un conductor eléctrico llamado electrodo.

El paso de una corriente directa constante entre un conductor metálico y una disolución electrolítica, se registra mediante el intercambio de electrones. Para lograr un circuito eléctrico completo a través de una disolución se requieren dos conductores o electrodos para que los electrones se reúnan en uno y sean liberados en el otro. Este arreglo recibe el nombre de *celda galvánica*, si las reacciones son espontáneas o *celda de electrolisis* si se inducen externamente.⁽⁴²⁾

La electrolisis puede definirse como la producción de una reacción química en electrodos, mediante una diferencia de potencial aplicada (E_{el} vs E_{eq}). Los diversos pasos del proceso pueden identificarse como :

1) la transferencia de la masa a la superficie del electrodo, bajo uno o más de los diversos gradientes (potencial, concentración, temperatura y densidad) que puedan existir en la superficie,

2) la transferencia de uno o más electrones a las especies activas y

3) la liberación de producto del electrodo.

Para producir una electrolisis se necesita un montaje con los siguientes elementos :

a) La celda de electrolisis con la disolución a electrolizar.

b) Los electrodos , los conductores y eventualmente diferentes aparatos de medición : voltímetros, amperímetros, etc.

c) Un generador eléctrico, que constituye la fuente de intensidad o de tensión necesaria para la realización de la electrolisis.

Cerrando el circuito (fig. 1), circula una corriente de intensidad i en todo punto del mismo. Llamando V a la tensión impuesta por el generador, ΔE a la diferencia de potencial entre los dos electrodos, i a la intensidad de corriente en un momento dado y R la resistencia de la celda, debe cumplirse la relación:

$$V = \Delta E + Ri,$$

es decir, que la tensión impuesta V debe ser superior a la diferencia de potencial existente entre los electrodos siempre que la celda posea una cierta resistencia R , representando el producto Ri la caída óhmica en la misma.

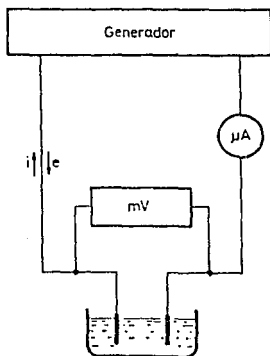


Figura 1. Circuito de electrólisis.

En el generador, conductores y electrodos, la corriente eléctrica es debida realmente al paso de electrones, aunque por conveniencia, el sentido de la corriente viene determinado por el sentido de circulación de las cargas eléctricas positivas, contrario, pues, al sentido de circulación de los electrones. En la disolución no existen electrones libres, siendo por consiguiente los iones los encargados de asegurar el paso de corriente eléctrica gracias al transporte eléctrico por migración, producido por la influencia del campo eléctrico establecido entre los electrodos, haciendo que, en principio, los iones negativos se dirijan hacia el electrodo positivo, y los positivos, al negativo.

Los electrodos de un sistema electrolítico están caracterizados por ser la sede de reacciones electroquímicas de efectos contrarios; el que actúa como cátodo lleva a cabo la reducción, circulando los electrones en el sentido electrodo-disolución y el que actúa como ánodo, lleva a cabo la oxidación, circulando los electrones en el sentido disolución-electrodo.

Lo anterior se efectúa en base a lo siguiente :

i) los electrodos, al estar en contacto con la disolución electrolítica, tienden a adquirir el potencial de dicha disolución, que puede ser el potencial de equilibrio (E_{eq});

ii) al imponer un potencial eléctrico (E_{el}) diferente de E_{eq} , se produce un desequilibrio entre la disolución y los electrodos, llegando nuevamente al equilibrio gracias a las reacciones electroquímicas producidas en la superficie del electrodo, las cuales modifican la composición de la disolución.

Si el potencial impuesto al electrodo $E_{el} < E_{eq}$, éste debe disminuir de valor, y como, según la ecuación de Nerst, es:

$$E_{eq} = E_0^0 + \frac{0.06}{n} \log \frac{[Ox]_s}{[Red]_s}$$

La relación $[Ox]_s/[Red]_s$ deberá disminuir, puesto que E_0^0 es constante. En este caso, la relación electroquímica producida será una reducción; siendo el caso contrario, cuando $E_{el} > E_{eq}$, una oxidación. (12-14)

Se debe considerar que cuánto mayor sea la diferencia de potencial entre la disolución y el electrodo, más elevada será la corriente que circula por él. Por ello, las reacciones electroquímicas se caracterizan por una relación entre la intensidad de corriente eléctrica o la densidad de corriente, si se considera el área del electrodo, y el potencial del mismo sobre el cuál se da la reacción electroquímica. Esta relación se traduce gráficamente en una curva llamada curva intensidad-potencial, representando en un sistema de ejes $i-E$, en la parte positiva de i , las corrientes de oxidación, y la negativa, las de reducción. (10-12)

La reacción electroquímica entre el electrodo y la disolución electrolítica por la imposición de un potencial sobre el primero, depende de cuatro variables responsables de dicho fenómeno electroquímico, éstas son: el potencial, la intensidad de corriente eléctrica, la concentración de la especie electroactiva y el tiempo; dichas variables están relacionadas entre sí, expresándose como:

$$f(i, E, C, t) = 0$$

Si los fenómenos electroquímicos tienen lugar de forma independiente del tiempo y si la concentración de la especie electroactiva no cambia sensiblemente a lo largo de la electrólisis, la ecuación anterior se convierte en una relación entre dos variables: la intensidad de corriente eléctrica que circula por el electrodo y el potencial aplicado al mismo, es decir :

$$f(I, E) = 0 \quad \text{o} \quad I = f(E)$$

A las sustancias que son capaces de oxidarse o reducirse en la superficie del electrodo, se denominan especies electroactivas, éstas son electrólitos así como cualquier oxidante o reductor presente en el electrodo que intercambie electrones con él, dentro de la zona de electroactividad.

Varios grupos funcionales son electroactivos tales como : los grupos carbonílicos en aldehídos, cetonas y quinonas; el grupo ácido carboxilato cuando se conjuga con un grupo cetona, aldehído u otro carboxato; la mayoría de los peróxidos y epóxidos; los grupos nitro, nitroso, óxido aminico, y azo; la mayoría de los grupos halógenos orgánicos; dobles enlaces carbono-carbono, siempre que estén conjugados con otro grupo insaturado, incluyendo anillos aromáticos; hidroquinonas y grupos mercaptano que producen ondas anódicas. (40-44)

Cuando el potencial que se aplica a un electrodo alcanza un valor suficientemente elevado (positivo o negativo) para que se produzca una reacción electroquímica, dicha reacción electroquímica que consume la sustancia electroactiva próxima al electrodo, sigue su curso gracias a la intervención de los mecanismos de transporte, encargados de reponer la materia electroactiva en la superficie del electrodo.

Los mecanismos de transporte de materia son de tres tipos : a) migración, b) convección y d) difusión.

a) El mecanismo de transporte de materia por migración se produce siempre que una especie ionizada se encuentra en un campo eléctrico formado por dos electrodos (ánodo y cátodo), por lo que éste modo de transporte debe llamarse en realidad electromigración, afectando únicamente a las sustancias si : 1) éstas sustancias están en forma de iones en la disolución; 2) su número de transporte no es pequeño.

b) El fenómeno de transporte de materia por convección consiste en una homogenización de la concentración de la disolución. Esta homogenización se lleva a cabo térmicamente o mecánicamente, agitando la disolución o de otra forma que provoque movimientos de materia dentro de la misma hasta lograr una homogenización adecuada. La agitación de la disolución la homogeniza en lo que respecta a su concentración hasta las proximidades del electrodo, excepto en una capa que lo rodea que recibe el nombre de capa de difusión.

c) Por último se considera el fenómeno por difusión, mediante el cual el soluto, y especialmente la sustancia electroactiva consumida o producida en el electrodo, difunde desde zonas de más alta concentración a las de menor concentración. Es un fenómeno natural que se presenta en todo proceso electroquímico, incluso en los casos en que no existe transporte de materia por convección, por ejemplo en los casos en que las disoluciones permanezcan rigurosamente inmóviles. (13-14)

En una celda electroquímica completa en la cuál exista una corriente despreciable, la f.e.m. está dada por :

$$E_{\text{celda}} = E_{\text{ind}} + E_{\text{ref}} + E_{\text{I}}$$

donde E_{ind} , E_{ref} y E_{I} son los potenciales del electrodo indicador, del electrodo de referencia y la unión líquida, respectivamente.

El electrodo indicador es el electrodo sensor, el electrodo de referencia es independiente de la composición de la disolución problema, y la unión líquida es una interfase entre soluciones diferentes. En un sistema de diseño apropiado, E_{ref} es una constante y E_{I} es constante o bien despreciable. Cuando se logran estas condiciones el electrodo indicador puede suministrar información relativa a las actividades iónicas. ^(10,12)

INSTRUMENTACION.

La celda electrolítica consta básicamente de los electrodos, una fuente de corriente directa, una resistencia ajustable, y una celda de electrólisis. Para poder medir la corriente y el voltaje aplicado, se utiliza un amperímetro y un voltímetro apropiados.

La celda electrolítica es aquella en la cuál se hace fluir la corriente eléctrica a través de la misma desde una fuente externa. En las interfases electrodo disolución se producen cambios electroquímicos y en la totalidad del sistema se verifican cambios de concentración. En realidad, una celda galvánica está constituida por los productos de la celda electrolítica, que se acumulan en los electrodos. Si el circuito externo se interrumpe, los productos tienden a producir una corriente en dirección opuesta.

En el punto exacto en el que la f.e.m. galvánica se opone a una f.e.m. aplicada de igual magnitud, no fluye corriente por la celda en ninguna dirección.

En esta condición de balance a cero, el potencial generado en la interfase de un electrodo indicador reflejará la composición de la fase en disolución, siempre y cuando dicho electrodo se seleccione de tal forma que su potencial sea sensible al componente de la disolución deseado. Para poder medir el potencial de un sólo electrodo, es necesario medirlo con respecto a otro (electrodo de referencia). (16-18,20,25,26)

ELECTRODOS. (9-12,17-21)

Existen electrodos atacables, que son aquellos que sufren una transformación química durante el intercambio de electrones (metales oxidables, óxidos, sales conductoras), y electrodos inatacables o inertes que sólo son soporte de electrones (carbon grafito, o un metal noble).

Los electrodos son de tres tipos : A) electrodo de trabajo o indicador; B) electrodo de referencia; y C) electrodo auxiliar.

A) EL ELECTRODO DE TRABAJO O INDICADORES.

En estos electrodos se registra la transferencia de los electrones de interés; las características de un electrodo de éste tipo determinan las clases de electrólisis para las que son apropiados. Como propiedades específicas de los electrodos indicadores se tienen : el grado de inercia, el área y la forma.

Los materiales más empleados para electrodos indicadores son el mercurio y el platino, el primero es eficiente especialmente como cátodo y el segundo indistintamente como cátodo y como ánodo.

ELECTRODO DE GOTEO DE MERCURIO (EGM).

El electrodo de goteo de mercurio (EGM) consiste en un tubo capilar de 5 a 10 cm de longitud que tiene un diámetro interno de 0.04 a 0.08 mm. La combinación de la longitud del capilar y la presión del mercurio está ajustada de tal forma que las pequeñas gotas de mercurio salgan a intervalos de 2 a 5 segundos. Al desprenderse una gota, la intensidad de corriente disminuye hasta cero, luego se incrementa rápidamente al aumentar el área del electrodo, debido a la gran superficie en la que puede producirse la difusión.

La corriente media es la corriente constante hipotética, que en el tiempo de goteo t , produciría el mismo número de culombios que la corriente fluctuante en el mismo período de tiempo. Para poder determinar la corriente media, se deben reducir las fluctuaciones de corriente; lo cual se obtiene mediante la amortiguación con un filtro electrónico.

El electrodo de gotas de mercurio (EGM) posee varias ventajas sobre los microelectrodos sólidos como el de platino. La principal de ellas, es el elevado sobrevoltaje para la formación de hidrógeno, lo que permite la reducción de muchas especies en medio ácido sin interferencia. De igual manera, es que el comportamiento de electrodo de gotas de mercurio (EGM) no depende de su uso anterior, ya que continuamente se está generando una nueva especie metálica. En consecuencia se obtienen curvas reproducibles de intensidad-potencial, sin importar cómo se ha utilizado el electrodo previamente. El EGM además desarrolla intensidades de corriente reproducibles prácticamente instantáneas.

Otras ventajas del EBM son : el mercurio es un buen conductor de la electricidad, es fácil de limpiar ; durante la electrólisis en el electrodo sólo se descompone una cantidad despreciable de la sustancia electroactiva, por lo que se reduce en forma insignificante la concentración del despolarizador, pudiéndose repetir los análisis con resultados idénticos ; con un capilar muy fino se puede trabajar en microanálisis, etc.

La principal desventaja del electrodo de mercurio es la facilidad con que el mercurio se oxida , lo que limita el uso del mercurio como ánodo.

B) ELECTRODOS DE REFERENCIA.

El electrodo de referencia ideal tendrá un potencial conocido, constante y completamente insensible a la composición de la solución del analito. Además un electrodo de referencia debe ser resistente, fácil de acoplar y mantener un potencial constante aún después del paso de pequeñas cantidades de corriente a través de la pila.

En la actualidad se emplea el electrodo de plata/cloruro de plata ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$) debido a su baja sensibilidad a cargas de corriente, su potencial es de + 0.199 voltios a 25°C ; otro electrodo de referencia es el de calomel saturado ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$) que tiene un potencial de + 0.244 voltios a 25°C ; ambos con respecto a el electrodo normal de hidrógeno en agua .

C) ELECTRODOS AUXILIARES.

Un electrodo inatacable o auxiliar, es aquel, que no participa en ninguna reacción química o electroquímica en las condiciones de medida.

Su principal función es ceder o aceptar electrones, teniendo en cuenta que son buenos conductores de corriente eléctrica. Para que se lleve a cabo una electrólisis se impone una diferencia de potencial, entre el electrodo de trabajo y el de referencia; en el electrodo auxiliar únicamente circula la corriente eléctrica que suministra la fuente del potencióstato y el término Ri (caída óhmica), para el circuito constituido entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, es despreciable; por lo tanto, se puede decir que la tensión aplicada entre ellos es igual a su diferencia de potencial, razón por la cuál es posible conocer el potencial del electrodo de trabajo en forma independiente del valor de la corriente de electrólisis.

Como electrodo auxiliar puede emplearse un electrodo de metal noble o de carbon grafito, si ocurrieran reacciones perturbadoras en el electrodo, entonces deber ser colocado dentro de un recipiente poroso.

SISTEMA DE ELECTROLISIS. (8-12,17,18,20-22)

El sistema polarográfico está constituido básicamente por la celda polarográfica de potencial controlado que es donde se realiza el análisis; tres electrodos: electrodo de trabajo que es el electrodo de goteo de mercurio, un electrodo de referencia con un sistema $Aq/AqCl/KCl$ y un electrodo auxiliar de carbono grafito; la fuente de potencial eléctrico y el panel electrónico que controla las variables de operación y registra la señal (fig. 2). Teniendo lugar el proceso de electrólisis entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar y la corriente que circula entre ambos constituye la corriente de electrólisis.

La celda polarográfica está constituida de dos partes, la mitad superior es fija, y el recipiente de vidrio inferior está unido a ella por medio de un anillo de ajuste. La parte fija tiene dispuestos el capilar, los electrodos de referencia y auxiliar, el tubo para el gas y una entrada para la introducción de la muestra.

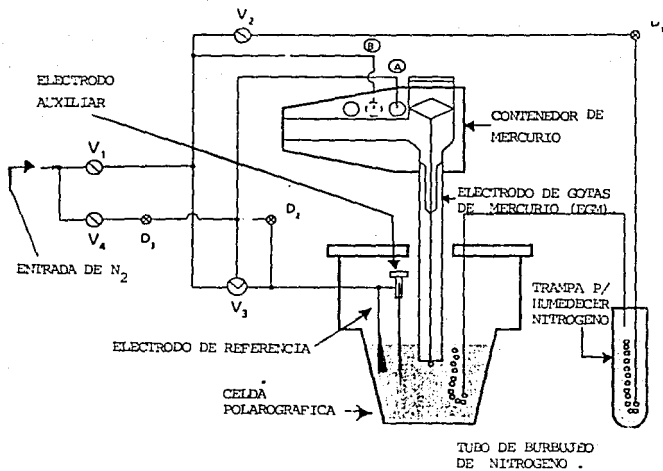


Figura 2 . Sistema polarografico.

ELECTROLITO SOPORTE! 15-18,23-26

El proceso de electrólisis requiere de la conductividad de la disolución en la celda polarográfica. El principal objetivo del electrolito soporte consiste en soportar la corriente de migración iónica por el efecto del campo eléctrico entre los electrodos, permitiendo así que los iones difundan del seno de la disolución al electrodo; movidos únicamente por la difusión sin intervención de la migración eléctrica. La concentración de este electrolito debe ser de por lo menos 50 veces mayor que la de los iones a electrolizar.

La conductividad de la disolución está ligada al poder ionizante del disolvente, es decir, a su constante dieléctrica y a su polaridad.

Las propiedades que debe reunir un electrolito soporte son: a) no deben producir una onda polarográfica debida a la oxidación o reducción de sus propios iones del intervalo de potenciales de interés; b) debe permitir la existencia en disolución de las especies electroactivas en estudio, ya sea en forma solvatada o en iones complejos; c) su naturaleza puede ser ácida, básica, neutra o formadora de complejos; d) debe ser suficientemente puro para no causar interferencias en la determinación; etc.

Ejemplos de electrolitos soporte son:

Los percloratos, nitratos y cloruros alcalinos son poco más solubles en mezclas de agua-disolvente orgánico, debido a la presencia de componente agua en la mezcla. Entre los disolventes orgánicos, las sales de litio y sales de tetraalquilamonio están entre las sales más solubles y más ionizables.

Los hidruros, borhidruros y compuestos organometálicos de aluminio, circonio y titanio son utilizados para hacer conductoras las disoluciones de los éteres.

Por otra parte, algunas sales fundidas tales como los cloruros y nitratos alcalinos, tienen la característica de conservar en el estado líquido una disociación iónica propia muy notable, de modo que dicho medio es ya conductor y no hay necesidad de introducir un electrólito soporte o indiferente.

Las técnicas de evaluación en polarografía son:

Comparación con Estándar se basa en el registro de curvas corriente-voltaje de una disolución patrón y una disolución problema de la misma especie electroactiva, bajo iguales condiciones. Empleando la ecuación de Ilkovic en su forma simplificada ($i_d = I_c$), se calcula el cociente de la corriente de difusión, i_d/c . Las mediciones relativas de este tipo no exigen un conocimiento de las características exactas del capilar, sólo que estas permanezcan constantes durante la comparación. (12-14)

Adición Estándar en este método se registra el polarograma de la disolución problema, luego se agrega un volumen conocido de una disolución patrón de la especie electroactiva analizada y se repite el polarograma. A partir del aumento de la corriente de difusión puede calcularse la concentración original por interpolación. Para una precisión máxima, la cantidad agregada de solución patrón debe ser suficiente para casi duplicar la altura de la onda original. (12-15)

ELECTROLISIS Y METODOS ELECTROANALITICOS. (10-18,20,25)

La electrólisis es la base de varios métodos instrumentales que generalmente se clasifican bajo la designación de voltamperometría; estos métodos se caracterizan por requerir de una corriente finita y en algunos casos apreciable. La potenciometría es esencialmente, la voltamperometría llevada al límite en que se mantiene un equilibrio exacto entre la f.e.m. aplicada y la f.e.m. de la celda, de tal manera que no existe corriente alguna. Las técnicas voltamperométricas en general están basadas en el uso de corriente directa, aunque existen también técnicas con procedimientos de corriente alterna.

La Voltamperometría se refiere al conjunto de métodos electroanalíticos en los cuales la información analítica se obtiene de medidas de intensidad de corriente en función de un potencial aplicado, en condiciones que favorezcan la polarización del electrodo indicador o electrodo de trabajo. Generalmente, en voltamperometría, el área de la superficie de los electrodos indicadores (microelectrodos) es pequeña con el fin de favorecer la polarización.

En la voltamperometría existen dos tipos de electrólisis: a) electrólisis completa de una especie (como en la coulombimetría y electrogravimetría) y b) electrólisis de una fracción pequeña de una disolución en un microelectrodo (como en la polarografía y la amperometría).

Algunos de estos métodos electroanalíticos son: amperometría, coulombimetría, polarografía, cronopotenciometría, algunas variantes de estas mismas, etc.

Las diferentes técnicas compiten entre si en ciertos campos, pero son diferentes en sensibilidad, variedad de sustancias que pueden examinar, aplicaciones, seguridad y facilidad de manejo. La polarografía y la coulombimetría de corriente constante, son sensibles hasta los niveles de trazas (10^{-6} M y menos) ; siendo la polarografía más selectiva y generalmente más útil para analizar mezclas que como lo es la coulombimetría de corriente constante.

De las técnicas mencionadas, la polarografía es una de las más versátiles para análisis cuantitativos y también tiene gran utilidad como método cualitativo, por las características de sus registros polarográficos.

POLAROGRAFIA DE CORRIENTE DIRECTA (PDC). (4,5,8-15,20-24)

El método polarográfico fué desarrollado por el profesor Jaroslav Heyrovsky (1920-1930) quien midió la corriente eléctrica que circulaba a través de la interfase en función del potencial aplicado obteniendo una gráfica en forma de S, denominada onda polarográfica . La corriente característica de la meseta resultó ser directamente proporcional a la concentración del catión electrodepositado. J. Heyrovsky fue quien dió el nombre de "Polarografía" a esta técnica y junto con Shikata construyó el primer polarógrafo en 1925. (47,18)

La polarografía es un método electroanalítico que se basa en la medida del flujo de corriente que se produce por la electrólisis de una especie electroquímica en disolución sobre un microelectrodo altamente polarizable en función del voltaje aplicado (voltamperometría). El registro $I = f(E)$ obtenido, conocido como polarograma, proporciona información cualitativa y cuantitativa de sustancias electro-reducibles y electro-oxidables.⁽¹⁴⁾

El método polarográfico se distingue especialmente por su sensibilidad, exactitud, precisión y reproducibilidad. Con la implementación de nueva tecnología automatizada, se han diseñado equipos que analizan muestras con una exactitud de $\pm 0.5\%$ en el intervalo de 10^{-2} a 10^{-7} M, en condiciones constantes. Algunas de sus ventajas son: a) se puede repetir varias veces la determinación sobre una misma muestra, ya que ésta no se consume prácticamente; b) se requiere de una cantidad pequeña de muestra para ser analizada; c) pueden hacerse análisis de varias sustancias electroactivas en una mezcla; d) el método es sencillo y versátil; e) el análisis es relativamente rápido; etc.^(17,18)

Se ha mencionado que los iones transportan electricidad a través de la disolución, y que la difusión, la atracción electrostática entre los iones de la especie electroactiva y el electrodo, así como la convección, contribuyen al proceso de migración. En el método polarográfico todo esfuerzo está dirigido a asegurar que las corrientes observadas sean debidas solamente a la difusión. Se mantiene una elevada concentración del electrolito soporte para eliminar los efectos de la atracción electrostática entre los iones de la especie electroactiva y el electrodo. Las fuerzas de convección se minimizan evitando la vibración del equipo y las diferencias de temperatura.⁽¹²⁻¹⁵⁾

En la polarografía, la pequeña corriente que se origina en la carga de las gotas dilatantes de mercurio, por efecto de la electrólisis de trazas de impurezas y que no es producida por la electrólisis de especies analíticas, es la llamada corriente residual; ésta corriente residual tiene dos orígenes el primero es por la reducción de trazas de impurezas existentes en el medio reaccionario; el segundo es la llamada intensidad de carga o de condensador, resultante del flujo de electrones que carga las gotas de mercurio con respecto a la solución. La intensidad residual aumenta aproximadamente en forma lineal con el potencial del electrodo goteante de mercurio y es casi siempre pequeña ($< 1 \mu A$). Dicha corriente residual es negativa cuando se aplican potenciales bajos (de 0 a $-0.4 V$), y se hace positiva a potenciales mayores.

Una característica de la onda polarográfica es la región en donde la corriente, después de elevarse bruscamente, se hace prácticamente independiente del potencial aplicado. Esta intensidad límite resulta como consecuencia de la velocidad con la que la sustancia que participa en el proceso electroquímico es transportada hasta la superficie del microelectrodo. En circunstancias en las que sólo la difusión controla la velocidad de transferencia de masa, la diferencia entre la intensidad límite y la corriente residual se denomina intensidad de difusión (i_d). Teóricamente la intensidad de difusión es directamente proporcional a la concentración de la especie electroactiva que reacciona.

La corriente de difusión promedio obtenida en el electrodo goteante de mercurio (EGM) bajo condiciones controladas, depende de factores de difusión y de electrólisis.

Algunos de estos parámetros son temperatura, viscosidad de la solución, movilidades iónicas, la superficie de las gotas de mercurio y el ritmo que siguen. Bajo los factores de electrólisis pueden anotarse el número de electrones requeridos para reducir cada ión o molécula de la especie electroactiva y cualquier otro factor asociado con una reacción electroquímica lenta.

Considerando todas estas variables, Ilkovic desarrolló la siguiente expresión para definir la corriente de difusión polarográfica, bajo condiciones constantes :

$$i_d = 607nD^{1/2}cm^{2/3}t^{1/6}$$

En la ecuación i_d es la corriente promedio en microamperes producido durante la duración de una gota, n es el número de farads requeridos por mol de la especie electroactiva, D , es el coeficiente de difusión de la especie en $cm^2\text{seg}^{-1}$, c , la concentración de la sustancia en milimoles por litro, m , la velocidad de flujo del mercurio en miligramos por segundo y t es la duración de la gota en segundos. La relación directa entre la concentración y la corriente de difusión bajo condiciones constantes, queda expresada como :

$$i_d = Ic$$

en donde $I = 607nD^{1/2}cm^{2/3}t^{1/6}$, la cuál es una constante de corriente de difusión, dicha cantidad es independiente del polarógrafo y electrodos. (8-15)

El potencial de media onda, otro parámetro importante, es el potencial en el cual la corriente es igual a la mitad de la intensidad de difusión. El potencial de media onda ($E_{1/2}$) permite la identificación cualitativa de la especie electroactiva que reacciona.

Puesto que tanto la forma oxidada como la reducida de una especie electroactiva están presentes en la superficie del electrodo cuando menos brevemente, si la reducción es reversible, la situación electroquímica se aproxima al equilibrio termodinámico. Como consecuencia, el voltaje del electrodo en el que la corriente de difusión alcanza la mitad de su valor máximo, es característica de la reducción en particular y se denomina potencial de media onda ($E_{1/2}$), (fig. 3).

Existen diversas variables que pueden afectar las reacciones electroquímicas, tales como la temperatura, la presión, el tiempo, la concentración de las especies electroactivas, el pH del medio reaccionario, las características físicas del electrodo, el potencial, la corriente eléctrica, el mecanismo de transporte de masa, la presencia de oxígeno en el medio reaccionario, etc. (17-20)

Por otro lado existen los máximos polarográficos que son distorsiones que se presentan en las ondas polarográficas como consecuencia de corriente anómalas. Estos máximos interfieren en la evaluación exacta de las corrientes de difusión y en los potenciales de media onda ($E_{1/2}$). La supresión de estos máximos se logra con el uso de pequeñas cantidades de sustancias de alto peso molecular como la gelatina, tritón X-100 (tensoactivo), rojo de metilo, otros colorantes, etc. (10-14)

La polarografía de corriente directa (PDC) se basa en la aplicación de un voltaje de corriente directa, que aumenta linealmente con el tiempo, la corriente que resulta del electrodo de trabajo se registra obteniéndose una gráfica corriente/voltaje o polarograma, en donde se puede determinar el potencial de media onda $E_{1/2}$ y la corriente límite de difusión i_d para efectuar los análisis cualitativo y cuantitativo respectivamente. (19)

El electrodo de referencia que más se utiliza es el de calomel saturado (ECS) con un área superficial grande, a medida que el voltaje aplicado a la celda se incrementa, fluye sólo una cantidad muy pequeña de corriente residual, hasta que se llega a un valor de potencial tal que la sustancia bajo ensayo puede oxidarse o reducirse. Entonces la corriente se incrementa inicialmente de manera gradual hasta alcanzar un valor límite como se muestra en la figura 3. En la parte inicial de la onda polarográfica, el aumento en el flujo de corriente produce una disminución de las especies electroactivas en la superficie del electrodo.

Como el voltaje y la corriente se incrementan, la concentración de las sustancias reactivas disminuye en forma adicional hasta un valor mínimo en la superficie del electrodo. La corriente está limitada entonces, por la velocidad a la que las sustancias reactivas son capaces de difundirse del seno de la disolución a la superficie del microelectrodo.

La elevación final de la corriente es debida a la reacción del electrólito soporte que se encuentra en grandes cantidades y que es inerte en el rango de potencial utilizado en el análisis; la función de este electrólito es impedir que las sustancias reactivas lleguen al electrodo por migración eléctrica, asegurando que la corriente limitante esté controlada por difusión. Puesto que en el caso del EGM, la superficie del electrodo está siendo constantemente renovada en una forma cíclica, la corriente se incrementa desde un valor pequeño conforme la gota empieza a formarse, hasta alcanzar un valor máximo cuando la gota cae. Empleando un registrador adecuado para medir la corriente, se obtiene un registro característico.

La corriente límite es la suma de las corrientes residual y de difusión. La corriente residual se sustrae de la corriente límite para dar la altura de la onda (fig. 3). ^(4,8-20)

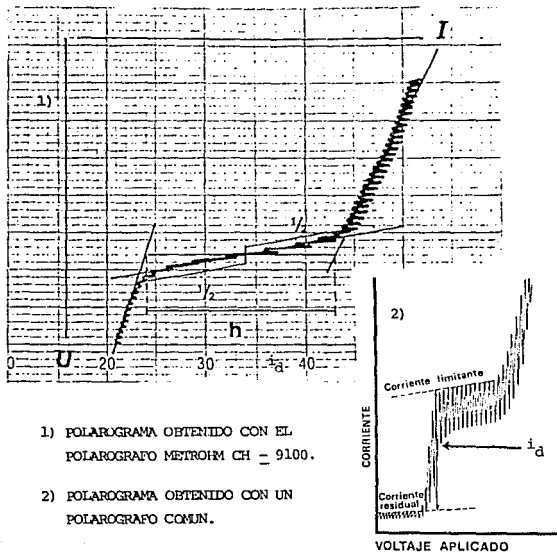
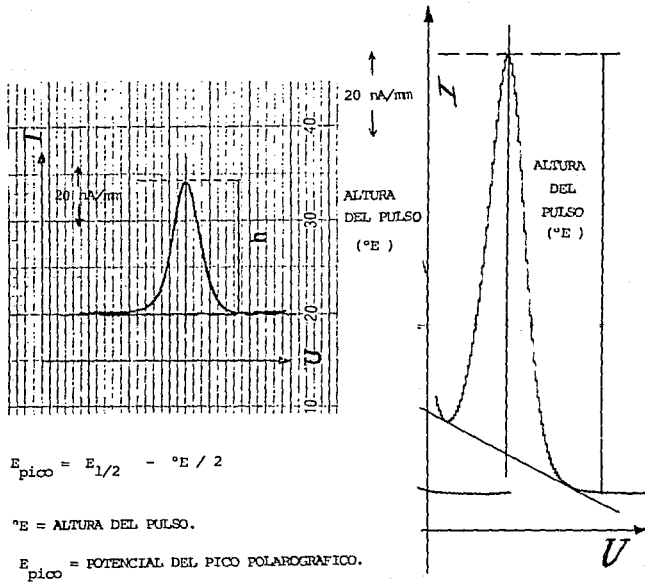


Figura 3. Polarograma típico (DCSE), muestra los cambios en el flujo de corriente con el incremento del potencial aplicado al EGM. Medición de la corriente de difusión.



$$E_{\text{pico}} = E_{1/2} - \frac{\text{°E}}{2}$$

°E = ALTURA DEL PULSO.

E_{pico} = POTENCIAL DEL PICO POLAROGRAFICO.

Figura 4. Polarograma obtenido por DPso. La altura del pico es directamente proporcional a la concentración de la muestra. Determinación de la Corriente de pico máximo.

POLAROGRAFIA DIFERENCIAL DE PULSOS (PDP). (4,5,8-12,20-24)

La polarografía diferencial de pulsos (PDP) esta basada en la relación de que para cada cambio de voltaje, se impone un pulso de onda cuadrada sobre el barrido de voltaje de corriente directa, la amplitud de este pulso es ajustable. Está amplitud se selecciona y se mantiene constante durante el curso del análisis. Debido a la forma escalonada del barrido de voltaje de corriente directa, el voltaje bajo el pulso permanece constante durante la vida de una gota. El flujo de corriente se mide antes de la aplicación del pulso y al final del pulso. La diferencia entre estas dos corrientes se mide y se presenta en el registrador. Tal señal diferencial presenta un aspecto parecido a la derivada de la onda polarográfica, que es en forma de pico (fig. 4). El potencial del pico es equivalente a $E_{1/2} - \frac{\circ}{2}E$, donde $\circ E$ es la altura del pulso. La altura del pico es directamente proporcional a la concentración a velocidades de barrido y alturas de pulso constantes.

Este método es muy sensible, se puede determinar niveles de $10^{-7}M$, y proporciona una mejor resolución entre ondas poco espaciadas (con $E_{1/2}$ parecidos).

La polarografía es un método instrumental de análisis de amplias posibilidades, con características propias, que en algunos casos particulares, pueden hacerla superior a los restantes métodos instrumentales, con los que entra en competencia. Su principal campo de acción quizás sea, el del microanálisis de compuestos con diversos constituyentes; esto hace que resulte particularmente útil en la detección y determinación de impurezas, y en la clasificación y control de microconstituyentes de muchos materiales naturales y tecnológicos.

Tiene gran aplicabilidad en el análisis metalúrgico; igualmente en el análisis de medicamentos tales como vitaminas, antibióticos, diversos compuestos orgánicos, compuestos bioquímicos, y generalmente en cualquier tipo de sustancia orgánica con características electroactivas; en el análisis de alimentos , etc. (42-45,47-2 o)

VALIDACION. (27-30)

La validación se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición. (28)

Los parámetros a evaluar en general en un proceso de validación son los que a continuación se definen :

LINEALIDAD.

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

Este parámetro se divide en linealidad del sistema y linealidad del método.

Linealidad del Sistema. Se determina, construyendo una curva de calibración empleando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma disolución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

Linealidad del Método. Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés, cada una de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado.

EXACTITUD.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis por sextuplicado de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

PRECISION.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto.

Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación.

a) REPETIBILIDAD. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio, etc.).

b) REPRODUCIBILIDAD. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorio, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

LIMITE DE DETECCION.

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

LIMITE DE CUANTIFICACION.

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

ESPECIFICIDAD.

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

TOLERANCIA.

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

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

PARTE EXPERIMENTAL.

MATERIAL.

- Matraces aforados de 25, 50, 100 y 1000 ml.
- Tubos de ensayo con tapón.
- Micropipetas automáticas de 50 a 200 μ l.
- Pipetas volumétricas de 2 y 20 ml.
- Celdas polarográficas de 50 ml.
- Vasos de precipitados de 50 y 100 ml.
- Mortero con pistilo.

REACTIVOS Y DISOLUCIONES.

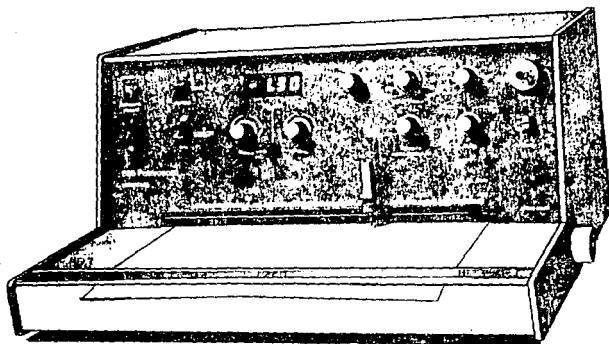
1. Disolución de fosfatos 0.1 M a pH = 12.0 (J.T.Baker, R.A.)
2. Acido Clorhídrico 2N (J.T.Baker, O.P.)
3. Hidróxido de sodio 2N (J.T.Baker, O.P.)
4. Peróxido de hidrógeno al 30 % (BDH, O.P.)
5. Acido nalidixico materia prima .
6. Agua destilada o desionizada.
7. Nitrógeno (INFRA).
8. Tritón X (Lab.Sigma, O.P.)
9. Placebos .

EQUIPO.

Polarógrafo Metrohm 626 AB CH - 9100 Herisau Series 01.

Electrodos Metrohm 663 VA Stand Series 05. (fig. No. 5)

- Electrodos :
- Electrodo de trabajo
 - Electrodo goteante de Mercurio
 - Electrodo de gota de Mercurio suspendida
 - Electrodo de Referencia
 - Sistema de referencia : Ag/AgCl/KCl
 - Electrodo Auxiliar
 - Carbono Grafito



POLAROGRAFO METROHM
AG CH - 9100 HERISAU.

STAND DE ELECTRODOS Y
CELDA ELECTROQUIMICA MOD.
STAND VA 663 series 05
METROHM HERISAU.

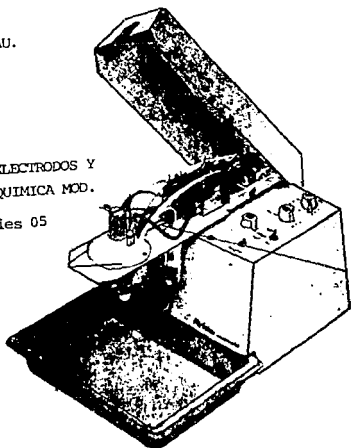


Figura No. 5. Polarografo Metrohm 626 AG
CH - 9100 Herisau Series 01.
Stand Metrohm 663 VA Series 05.
(Sistema de Electrodos).

Preparación de la muestra.

Determinar el peso promedio de 20 tabletas, triturarlas finamente y homogenizar el polvo. Pesar el equivalente a 50 mg de ácido nalidixico, transferir la muestra a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y llevar al aforo con medio reaccional (disolución de fosfatos 0.1 M, pH = 12.0).

Nota : Todas las disoluciones de trabajo (estándar, materia prima y producto terminado) se disuelven, se llevan al aforo y se analizan en el medio reaccional (disolución de fosfatos 0.1 M a pH = 12.0), junto con 100 μ l de titrón.

Por disolución analizada se registran de 7 a 10 polarogramas.

La concentración adecuada para cuantificar el ácido nalidixico por PDP, bajo las condiciones de trabajo establecidas, es de 1 mg/ml (4.3061 mM). Concentración previamente determinada con el Sistema (tabla A).

Condiciones de trabajo :

Polarografía DP₅₀
Sensibilidad ($\Delta I/\Delta L$) = 20 nA/mm
Ei = - 1.55 voltios
Velocidad de barrido = - 5 mV/s
Velocidad del papel = 100 mV/cm
DAMP = 2
Tiempo de goteo = 1 gota/s.
Medio Reaccional : Disolución de fosfatos
0.1 M a pH = 12.0.

Procedimiento.

Para efectuar la cuantificación del ácido nalidixico por el método propuesto se procede primero a determinar el dominio de electroactividad de la disolución de fosfatos 0.1 M a pH = 12.0 (fig. 6). Después se prueban los métodos de adición de estándares y comparación directa por PDC y PDP, se comparan los resultados obtenidos (tabla B , fig. 7 y 8).

Se selecciona el método a validar y se analiza bajo las condiciones de operación ya establecidas. Antes de iniciar la validación del método, se lleva a cabo diferentes pruebas con disoluciones estándar y materia prima, con objeto de comprobar si el sistema se comporta adecuadamente.

Validación del Sistema.

Linealidad del Sistema.

Preparar una disolución de ácido nalidixico al 100 % y hacer las siguientes diluciones 50, 80, 100, 120 y 150 % (2.15, 3.45, 4.306, 5.17, 6.46 mM) de la concentración del principio activo; analizar por duplicado cada dilución (fig. 9). Los resultados obtenidos se presentan en las tablas No.1 y No. 2, la gráfica de linealidad se muestra en la gráfica No. 1.

Precisión del Sistema.

Se prepara una disolución de ácido nalidixico al 100 % (1 mg/ml, 4.306 mM) y se analiza por sextuplicado (fig. 9). Los resultados se presentan en las tablas No. 1 y No. 2 .

Exactitud del Sistema.

Se analizan por sextuplicado placebos adicionados de ácido nalidíxico a niveles de 50, 80, 100, 110 y 120 % (2.15, 3.45, 4.306, 4.74, 5.17 mM) de la concentración del principio activo (fig 10). Los resultados se encuentran en las tablas No. 3 y No. 4 .

Validación del Método.

Linealidad del Método.

Prepar las siguientes disoluciones : 50, 80, 100, 120 y 150 % (2.15, 3.45, 4.306, 5.17, 6.46 mM) de la concentración del principio activo; y analizar cada una por triplicado (fig. 11). Los resultados se presentan en las tablas No. 5 y No. 6, la gráfica de linealidad está representada por la gráfica No. 2 .

Exactitud del Método.

Para la evaluación de la exactitud del método, se analizan por sextuplicado disoluciones al 50, 80, 100, 110 y 120 % (2.15, 3.45, 4.306, 4.74, 5.17 mM) de producto terminado de ácido nalidíxico (fig. 11). Los resultados obtenidos se presentan en las tablas No. 7 y No. 8.

Precisión

Repetibilidad.

Se preparan seis disoluciones de la formulación de ácido nalidixico al 100 % (1 mg/ml, 4.3061 mM) y se analizan por separado (fig 12). Los resultados se encuentran en las tablas No. 9 y No. 10 .

Reproducibilidad.

Para poder conocer la variabilidad del método analítico, se analizan muestras de producto terminado al 100 % (1 mg/ml, 4.3061 mM) por dos analistas en dos días y por triplicado (fig 12). Los datos obtenidos se someten a un análisis de varianza anidado . Los resultados del análisis se presentan en la tabla No. 11 y el análisis de varianza en la tabla No. 12.

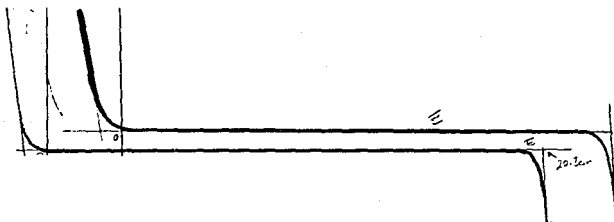
Límite de Detección.

Preparar disoluciones de ácido nalidixico al 50 % (0.5 mg/ml, 2.15 mM) de la concentración del principio activo y hacer diluciones reduciendo la concentración inicial de 10 en 10 % . Analizar cada dilución por separado con el método propuesto; las respuestas se presentan en la figura 13.

Especificidad.

Preparar una disolución de ácido nalidixico al 100 % (1 mg/ml, 4.3 mM), se analiza con el método propuesto. Se compara la respuesta de la materia prima y producto terminado con respecto a la del estándar (figura 14).

La evaluación de la especificidad del método se lleva a cabo sometiendo muestras del estándar, materia prima, producto terminado y un placebo a diferentes condiciones de degradación, como se presenta en la tabla No. 13. Las muestras se analizan empleando el método propuesto (fig. 14) y los resultados se presentan en la misma tabla.



a)

Condiciones :

$C_0 = 0.1 \text{ M}$

$\text{pH} = 12.0$

Polarografía DCso

Vel. Barrido = 5 mV/s

Vel. papel = 100 mV/cm

t. goteo = 1 gota/s

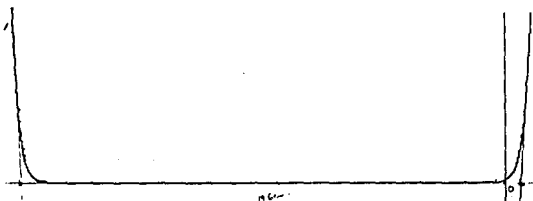
Sensibilidad ($\Delta I/\Delta L$) = $0.5 \mu\text{A/mm}$

$E_i = + 0.09 \text{ V/Ecs}$

Dominio de potencial = 2010 mV

$1 \text{ cm} = 100 \text{ mV}$

$1 \text{ cm} = 50 \mu\text{A}$



b)

Condiciones :

$C_0 = 0.1 \text{ M}$

$\text{pH} = 12.0$

Polarografía DPso

Vel. Barrido = 5 mV/s

t. goteo = 1 gota/s

Sensibilidad ($\Delta I/\Delta L$) = $0.5 \mu\text{A/mm}$

$E_i = + 0.06 \text{ V/Ecs}$

Dominio de potencial = 1760 mV

$1 \text{ cm} = 100 \text{ mV}$

$1 \text{ cm} = 50 \mu\text{A}$

FIGURA 6. Dominios de electroactividad de la disolución de Fosfatos 0.1 M $\text{pH} = 12.0$, trazados por a) PDC
 ✓ b) PDP.

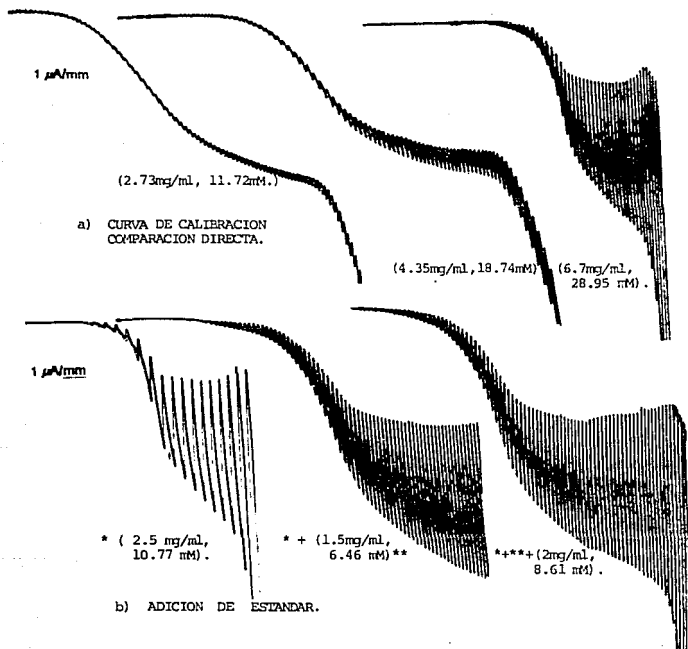


FIGURA 7. Interpretación de Polarogramas DC₆₀ de ácido nalidixico, empleando los métodos de evaluación: a) curva de calibración y b) adición de estándares.

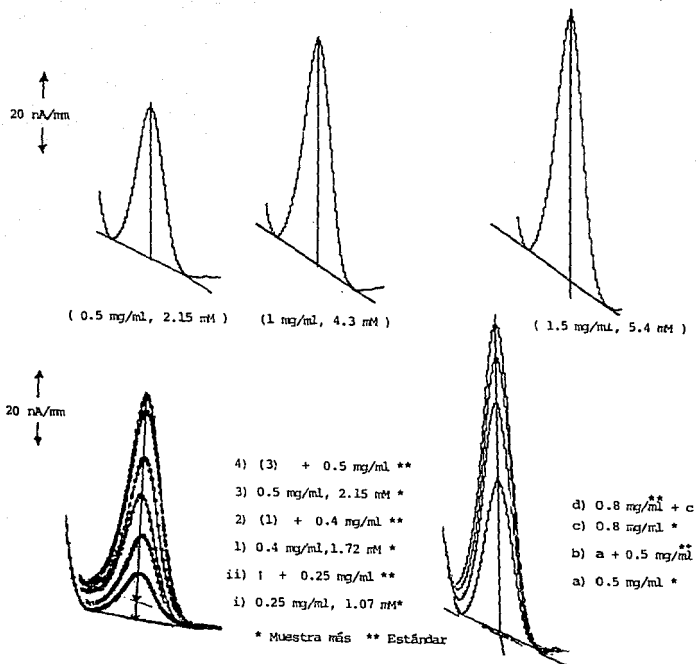


FIGURA 8. Interpretación de Polarogramas Dfao de ácido validixico, empleando los métodos de evaluación: a) curva de calibración y b) adición de estándares.

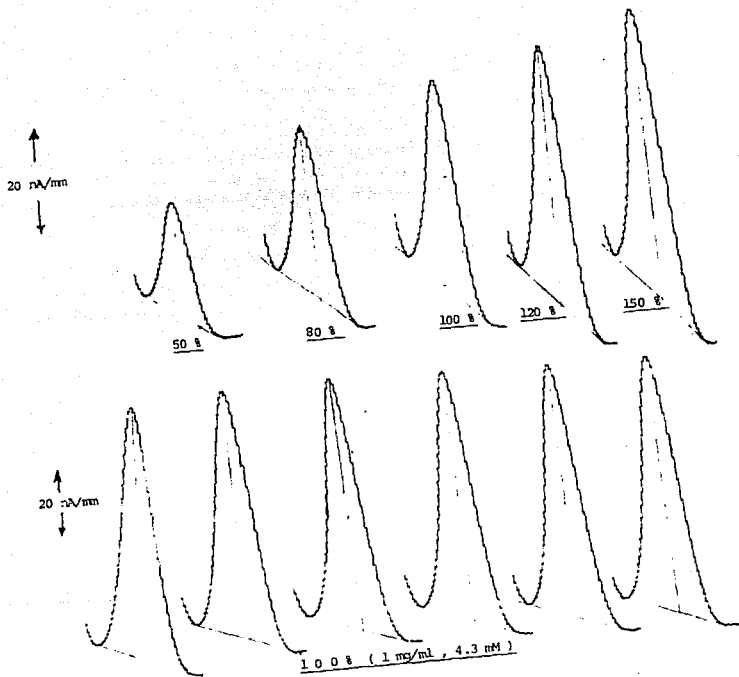


FIGURA 9. Polarogramas obtenidos de ácido
 ascorbico, en la evaluación de:
 a) linealidad y b) precisión,
 del sistema.

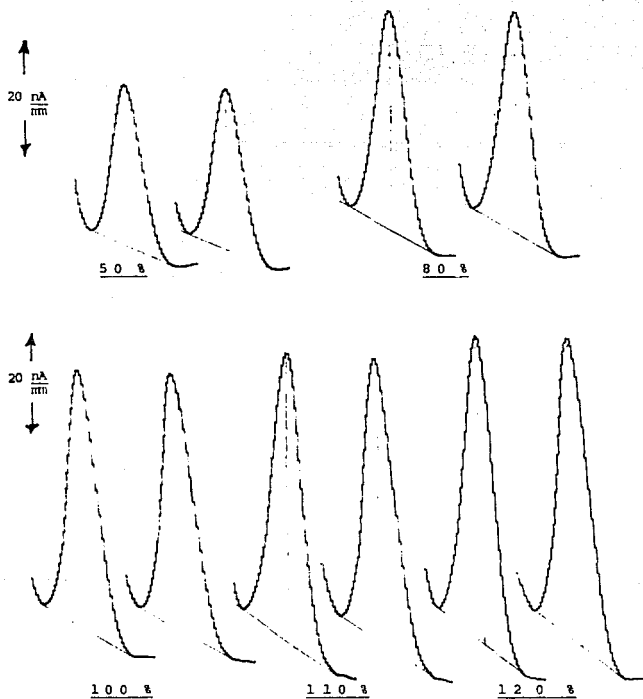


FIGURA 10. Polarogramas obtenidos de Ácido nalidíxico, en la evaluación de la exactitud del sistema.

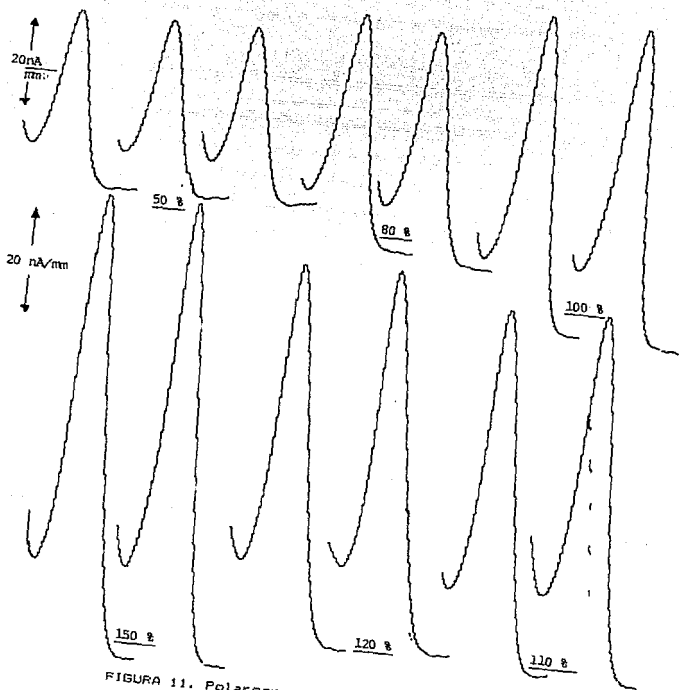


FIGURA 11. Polarogramas obtenidos de Ácido salicílico, en la evaluación de : a) linealidad y b) exactitud, del método.

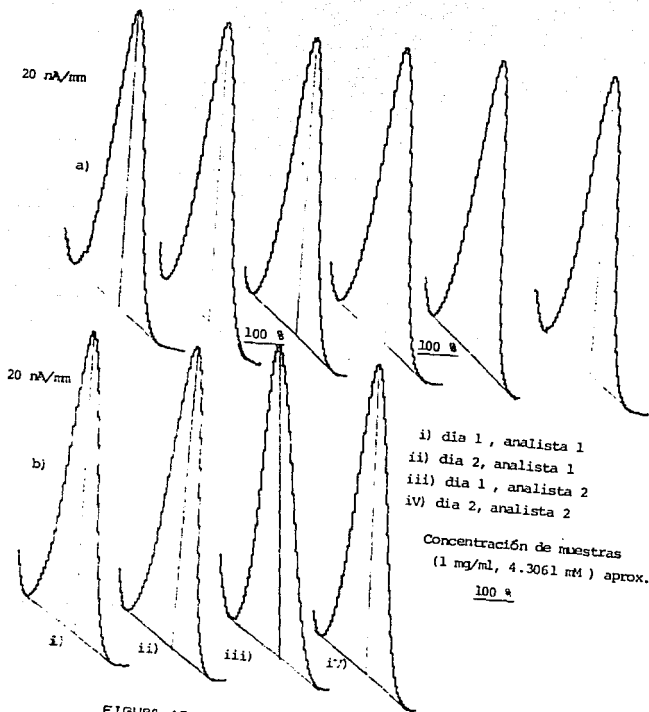


FIGURA 12. Polarogramas obtenidos de ácido nalidixico, en la evaluación de la precisión del método a) repetibilidad y b) reproducibilidad.

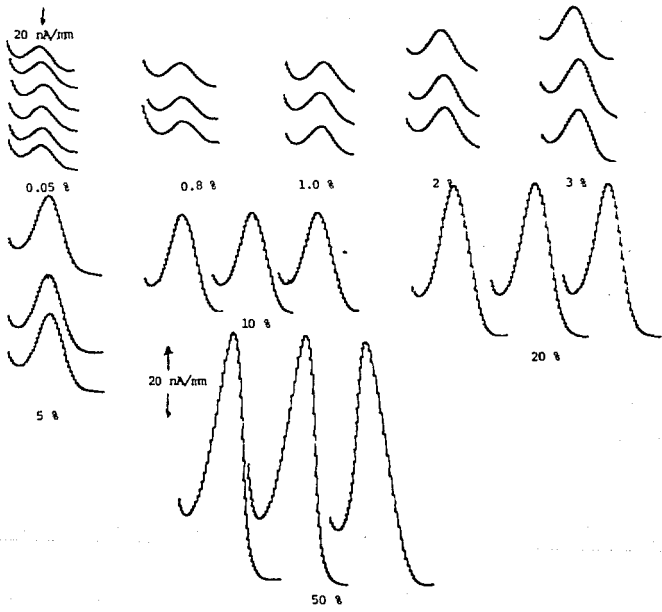


FIGURA 13. Polarogramas obtenidos de Ácido nalidixico, en la evaluación del límite de detección (sensibilidad del método), se muestra la señal mínima detectable por el equipo .

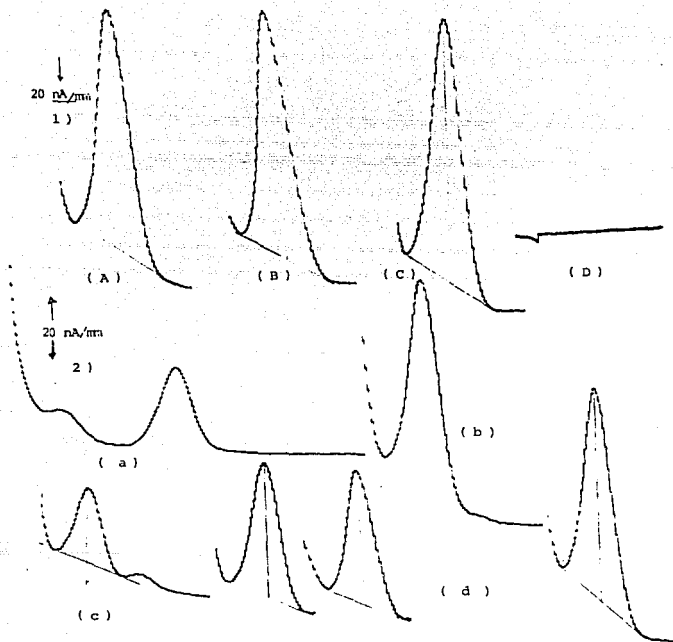


FIGURA 14. 1) Polarogramas obtenidos para (A) estándar, (B) materia prima, (C) formulación, en especificidad respuesta al 100%. 2) Polarogramas obtenidos de las muestras degradadas de la formulación, a) Medio ácido, b) Medio básico, c) Reducción y d) Efecto luz

RESULTADOS.

TABLA A.
Concentraciones de ácido nalidíxico trabajadas en mg/ml y mM .

Concentración de la disolución del analito en :			Conc. dil. 2ml/20ml*	
mg/ml	mM	%	µg/ml	mM
1.00	4.3061	100	100	0.43061
0.60	2.15305	60	60	0.215305
0.80	3.44488	80	80	0.344488
1.10	4.73671	110	110	0.473671
1.20	5.16732	120	120	0.516732
1.60	6.45915	160	160	0.645915

Estas concentraciones se determinaron mediante el Sistema y bajo condiciones de trabajo previamente establecidas .

En la evaluación del Sistema se emplean diluciones de una solución patrón de ácido nalidíxico al 100 % .

* Concentración del analito en la celda polarográfica (2ml de solución analito / 20ml de medio reaccionario) .

Se trabaja materia prima (2 lotes) y producto terminado (formulación de 500mg , 2 lotes) .

TABLA B
Comparación entre los métodos PDC y PDP en la cuantificación de ácido nalidíxico empleando las técnicas de evaluación : comparación directa y adición de estándar, en ambos.

METODO DE EVALUACION	PARAMETRO	POLAROGRAFIA	
		PDC	PDP
COMPARACION DIRECTA (CURVA LINEAL)	CONCENTRACION (mg/ml) DE LA MUESTRA (mM)	6.71	1.0
	TIEMPO APROX. DE ANALISIS (MINUTOS)~	28.95	4.3061
	INTERPRETACION DEL POLAROGRAMA	7.31	1.5
	DESV. ESTANDAR	Se determina en PDC I_r , $E_{1/2}$ y I_d ; en PDP corriente de pico máximo.	
	SENSIBILIDAD	1.8745 %	0.056789 %
		1 µA/mm	20 nA/mm
ADICION DE ESTANDAR	CONCENTRACION (mg/ml) DE LA MUESTRA (mM)	5.24/1.21	* 1.5/1.0
	TIEMPO APROX. DE ANALISIS (MINUTOS)~	22.56/5.21	** 6.48/4.3061
	INTERPRETACION DEL POLAROGRAMA	12.31	1.7
	DESV. ESTANDAR	Se determina en PDC I_r , $E_{1/2}$ y I_d ; en PDP corriente de pico máximo.	
	SENSIBILIDAD	1.0897 %	0.009345 %
		1 µA/mm	20 nA/mm

* Concentración en mg/ml de disolución problema/disolución estándar.

** Concentración en mM de disolución problema / disolución estándar.

~ Tiempo en que se determina una muestra (registro de polarograma).

TABLA No. 1.
Datos de mg/ml y μA para obtener la linealidad y precisión del Sistema.

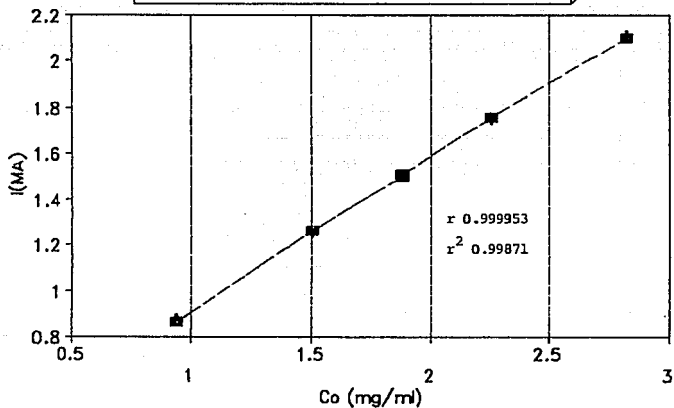
LINEALIDAD		PRECISION	
Conc. de dil. (mg/ml)	Corriente (μA)	Análisis (#)	Corriente (μA)
0.980	0.724	1	1.627
0.980	0.720	2	1.624
1.568	1.070	3	1.584
1.568	1.066	4	1.580
1.960	1.325	5	1.584
1.960	1.312	6	1.524
2.352	1.533		
2.352	1.540		
2.940	1.878		
2.940	1.890		

TABLA No. 2.
Resultados de la evaluación estadística para precisión y linealidad del Sistema por PDP para la cuantificación de ácido nalidixico .

LINEALIDAD		PRECISION
r =	0.9993	CV = 0.041134 %
r ² =	0.9986	
CV =	0.096883 %	

DADO QUE $r > 0.99$, $r^2 > 0.98$ Y $CV < 1.5\%$, SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA LINEALIDAD Y PRECISION DEL SISTEMA .

LINEALIDAD DEL SISTEMA DE ACIDO NALIDIXICO



GRAFICA No 1. LINEALIDAD DEL SISTEMA
DE ACIDO NALIDIXICO.

TABLA No. 3.		
Datos de mg recuperados y % de recobro para obtener la exactitud del Sistema.		
mg Adicionados	mg Recuperados	% de Recobro
1.02	1.0354	101.509
1.02	1.0040	98.411
1.02	1.0210	100.079
1.02	1.0233	100.304
1.02	1.0068	98.684
1.02	1.0310	101.080
1.62	1.6200	100.000
1.62	1.6125	99.538
1.62	1.6275	100.462
1.62	1.6198	99.987
1.62	1.6231	100.193
1.62	1.6199	99.968
2.00	2.0017	100.088
2.00	2.0071	100.354
2.00	1.9911	99.557
2.00	1.9999	99.993
2.00	1.9990	99.935
2.00	2.0321	101.606
2.18	2.1403	98.177
2.18	2.1944	100.663
2.18	2.2053	100.160
2.18	2.1799	99.996
2.18	2.1700	99.541
2.18	2.1902	100.499
2.38	2.3818	100.077
2.38	2.3543	98.919
2.38	2.4039	101.004
2.38	2.3710	99.622
2.38	2.3990	100.794
2.38	2.3897	100.406

TABLA No. 4.		
Resultados de la evaluación estadística para la exactitud del Sistema para el ácido naldídico.		
Promedio de Recobro :	\bar{R} =	100.087
Desviación Estándar :	DE =	0.000575
Coefficiente de Variación :	CV =	0.000674 %

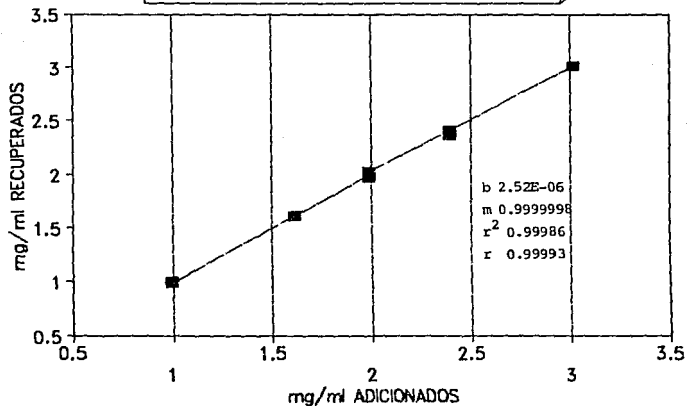
YA QUE R SE ENCUENTRA DENTRO DEL 98 AL 102 % Y
CV < 2 %, SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA LA
EXACTITUD DEL SISTEMA.

TABLA No. 5.		
Datos de mg recuperados y % de recobro para obtener la linealidad del Método.		
mg Adicionados	mg Recuperados	% de Recobro
0.9912	0.9912	99.3893
0.9912	1.0024	100.3050
0.9912	0.9800	100.3050
1.6085	1.6121	100.2150
1.6085	1.6068	99.8928
1.6085	1.6068	99.8928
1.9920	1.9901	100.5460
1.9920	1.9620	100.0780
1.9920	2.0238	99.3765
2.3970	2.4140	100.0160
2.3970	2.3628	99.8213
2.3970	2.4140	100.1820
3.0180	3.0103	100.6040
3.0180	3.0218	100.1260
3.0180	3.0160	99.3703

TABLA No. 6.	
Resultados de la evaluación estadística para la linealidad del método por PDP para el ácido nalidíxico.	
r =	0.9994
r ² =	0.9989
Pendiente :	m \cong 1
Ordenada al origen :	b = 3.43E-07
Promedio de recobro :	R = 100
Desviación estándar :	DE = 0.377881
Coefficiente de variación :	CV = 0.377881 %

YA QUE $b \cong 0$, $m \cong 1$, $r^2 > 0.98$ Y $CV < 2\%$.
SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA LINEALIDAD DEL METODO.

LINEALIDAD DEL METODO
DE ACIDO NALIDIXICO



ECUACION DE LA RECTA : $Y = 1 + 2.5E-06 * X$

GRAFICA No 2. LINEALIDAD DEL METODO
DE ACIDO NALIDIXICO.

TABLA No 7.

Datos de mg recuperados y % de recobro para obtener la exactitud del método.

mg Adicionados	mg Recuperados	% de Recobro
1.0000	1.00746	100.746
1.0000	1.00746	100.746
1.0000	0.98507	98.5075
1.0000	0.99988	99.9877
1.0000	0.98712	98.712
1.0000	1.00245	100.245
1.6266	1.60966	98.934
1.6266	1.66049	102.058
1.6266	1.60966	98.934
1.6266	1.62345	99.7818
1.6266	1.62669	99.5632
1.6266	1.62667	100.103
2.0120	2.01948	100.372
2.0120	2.03631	101.208
2.0120	1.98021	98.4201
2.0120	2.01234	100.017
2.0120	2.02120	100.457
2.0120	2.01142	99.9712
2.2056	2.22292	100.767
2.2056	2.23736	101.421
2.2056	2.19405	99.4584
2.2056	2.20135	99.789
2.2056	2.21346	100.338
2.2056	2.21099	100.226
2.3956	2.38978	99.7396
2.3956	2.39876	100.115
2.3956	2.39699	100.041
2.3956	2.41234	100.682
2.3956	2.40130	100.221
2.3956	2.39676	100.115

TABLA No. 8 .

Resultados de la evaluación estadística para la exactitud del método por FDP para el Ácido nalidíxico .

Promedio de recobro :	—
	R = 100.0703
Desviación estándar :	DE = 0.000575
Coefficiente de variación :	CV = 0.000575 %

YA QUE R SE ENCUENTRA DENTRO DEL 98 AL 102 % Y CV < 2 % , SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA LA EXACTITUD DEL METODO .

TABLA No. 9 .	
Datos obtenidos para la determinación de la repetibilidad del método analítico .	
Corriente I (μ A)	% Recuperado
1.440	98.5812
1.460	99.95438
1.464	100.2282
1.472	100.7759
1.464	100.2282
1.464	100.2282

TABLA No. 10 .	
Resultados de la evaluación estadística para la repetibilidad del método por PDP para el ácido nalidixico .	
Promedio de recobro :	$\bar{R} = 100$
Desviación estándar :	DE = 0.276222
Coefficiente de variación :	CV = 0.276222 %

DADO QUE \bar{R} ESTA DENTRO DEL INTERVALO DEL 98 AL 102 % Y EL CV < 2 %, SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA REPETIBILIDAD AL 100 % DEL METODO ANALITICO .

TABLA No. 11 .
Datos obtenidos para la determinación de la reproducibilidad del método analítico .

		ANALISTA (i)	
		1	2
DIA (j)	1	99.6958	100.7009
		100.6080	98.2492
		99.6958	101.0299
	2	99.4860	98.8159
		98.9149	101.0764
		101.5990	100.1078

-
 $\bar{Y} = 100$
 $DE = 0.535077$
 $CV = 0.535077 \%$

TABLA No. 12 .
Tabla de análisis de varianza para determinar reproducibilidad del método por PDP .

F. V.	g-l	S. C.	M. C.	Fcal	Ftab
ANALISTA (α)	1	4.30E-10	4.30E-10	1.71E+00	38.51
DIA (δ)	2	5.00E-10	2.50E-10	1.70E-10	6.08
ERROR (ϵ)	8	1.18E+01	1.47E+00		

YA QUE $F_{\alpha} < F_{g,l,d}; 0.05$ EL METODO ANALITICO ES REPRODUCIBLE POR LOS ANALISTAS .

YA QUE $F_{\delta} < F_{g,l,d}; 0.05$ EL METODO ANALITICO ES REPRODUCIBLE EN DISTINTOS DIAS POR UN MISMO ANALISTA .

REPETIBILIDAD DEL METODO ANALITICO POR PDP .

REPETIBILIDAD = ± 0.735731

COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL .

CV = 0.535077 %

TABLA No. 13				
Condiciones de degradación a las que fueron sometidas las muestras y resultados obtenidos utilizando el método por PDP.				
MUESTRA	EFECTO	TIEMPO	OBSERVACIONES	RESULTADOS
Estándar	LUZ SOLAR	30 DIAS	Sol. transparente	98.99
Materia prima			Sol. transparente	97.66
Formulación			Sol. amarilla	94.65
Placebo			Sol. amarilla	—
Estándar	ACIDAS TEMP. AMBIENTE	14 DIAS	Sol. c/precipitado	88.89
Materia prima			Sol. c/precipitado	79.22
Formulación			Sol. c/precipitado	69.81
Placebo			Sol. c/precipitado	—
Estándar	BASICAS TEMP. AMBIENTE	14 DIAS	Sol. transparente	99.02
Materia prima			Sol. transparente	98.42
Formulación			Sol. amarilla	95.66
Placebo			Sol. amarilla	—
Estándar	REDUCC. TEMP. AMBIENTE	UN DIA	Sol. transparente	—
Materia prima			Sol. transparente	—
Formulación			Sol. amarilla	—
Placebo			Sol. amarilla	—

EN LA FIGURA 14 SE PRESENTAN ALGUNOS POLAROGRAMAS QUE SE REGISTRARON DE LAS DISOLUCIONES DE ACIDO NALIDIXICO DEGRADADAS.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

De los resultados obtenidos al analizar el ácido nalidixico, se observó que al trabajar con polarografía de corriente directa (DCso) se requería de mayor cantidad de muestra y tiempo de análisis (tabla B), además al hacer la interpretación del correspondiente polarograma se tiene la desventaja de hacer tres mediciones (medir : corriente límite, corriente residual y corriente de difusión; fig. 3 y 7) lo cual disminuye la eficiencia del método; en comparación la polarografía diferencial de pulsos requiere de menor cantidad de muestra, es más rápida y la interpretación del polarograma es sencilla de realizarse debido a que la señal de la respuesta es en forma de pico, siendo está la corriente de pico máximo la cual es directamente proporcional a la concentración de la muestra (fig. 4 y 8). En base a esto se establece que la polarografía diferencial de pulsos es más sensible, rápida y eficiente en comparación con la polarografía de corriente directa.

Por otro lado se trabajó con los métodos de comparación con un estándar y adición de estándares (fig. 7 y 8), se eligió el método de comparación con un estándar por ser el más adecuado debido a que la corriente de difusión no es sensible a otros componentes de la muestra, y dado que se puede determinar directamente la concentración de la muestra problema a partir de un intervalo de concentración conocido de estándar, siendo además este método más práctico y rápido para los fines de la cuantificación de ácido nalidixico y para el estudio de validación (figs. 7 y 8).

El potencial de media onda que se obtuvo bajo las condiciones de trabajo operadas fue de $- 1.70 \pm 0.04$ voltios , resultados obtenidos a partir de las disoluciones del estándar de ácido nalidixico que permitieron comprobar y estandarizar el sistema . Este valor de potencial es cercano al encontrado en la literatura que es de $- 1.68$ voltios.

Por otro lado el potencial encontrado experimentalmente se tomó como base para conocer la identidad del ácido nalidixico en la disoluciones que se sometieron a degradación.

El método analítico por PDP para la cuantificación de Ácido nalidixico se sometió a validación debido a que dicho estudio es un requisito sanitario así establecido por las autoridades de regulación sanitaria ; los parámetros de validación evaluados fueron los siguientes : linealidad y precisión del sistema, exactitud, linealidad del método, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), especificidad, sensibilidad y estabilidad de la muestra; estos son los mínimos necesarios que debe cumplir un método analítico para control de calidad. ^(2,27-30)

De los resultados obtenidos del estudio de validación , al evaluar el sistema (tabla No. 1 y No. 2, fig. 9 y 10) se observa que el sistema es preciso debido a que el coeficiente de variación es menor a 1.5 % cumpliendo así con el criterio para precisión del sistema ; en cuanto a linealidad se refiere existe una relación lineal entre la cantidad adicionada del estándar y la respuesta del equipo (corriente máxima de pico, fig. 4) presentando un coeficiente de correlación de 0.9993 (Tabla No. 2 y gráfica No. 1) con lo cual se afirma que cumple con los criterios para linealidad del sistema.

La exactitud del sistema a los niveles de concentración trabajados (tabla No. 3 y fig. 10) cumple con los criterios establecidos, debido a que el promedio de recobro está entre el 98 y 102 % y dado que el coeficiente de variación es menor al 2 % (tabla No. 4) , por lo se cumple con los criterios para la exactitud del sistema.

La linealidad obtenida por el método, muestra una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada en el análisis, lo cual indica la proporcionalidad existente en el intervalo de concentración analizado (tabla No. 5 y fig. 12), en este parámetro, se obtiene una pendiente cercana a la unidad, la ordenada al origen se aproxima a cero y el coeficiente de determinación es mayor a 0.98 (tabla No. 6 y gráfica No. 2), con lo cual se establece que se cumple con los criterios de linealidad del método.

La exactitud presentada por el método analítico a los niveles de concentración de 50, 80, 100, 110 y 120 % (tabla No. 7 y fig. 13) cumple con los criterios establecidos, debido a que el promedio de recobro está entre el 98 y 102 % y dado que el coeficiente de variación es menor al 2 % (tabla No. 8), por lo que el método analítico es exacto a los niveles de concentración trabajados.

En el parámetro de precisión se evaluó repetibilidad y reproducibilidad. Para repetibilidad se observó que si había concordancia entre los valores que se obtenían (tabla No. 9 y fig. 14), el promedio de recobro está entre el 98 y 102 % , el coeficiente de variación es menor al 2 % (tabla No. 10), con lo cual el método es repetible al 100 % del contenido nominal del principio activo. El método es además reproducible ya que no presenta efecto en los resultados debido al analista o al día en el que se realiza el análisis, ni por interacción día-analista (tablas No. 11 y No. 12, fig. 14), por lo que el método puede ser empleado en cualquier día y por cualquier analista sin encontrar variación apreciable en los resultados .

Por último el método es sensible y específico: el primer parámetro se cumple debido a que la sensibilidad de trabajo detectó hasta una concentración de $10^{-7}M$ (fig. 15); para el segundo parámetro se obtuvo el 100 % de respuesta del estándar y en base a este criterio se sometieron las muestras, las cuales dieron una respuesta equivalente (los polarogramas son de iguales características, fig. 16); en cuanto al estudio de estabilidad realizado se observa en la tabla No. 13 que bajo las condiciones de estudio la muestra presentó productos de degradación los cuales al analizarlos junto con la muestra, no interferían en la determinación de la misma (fig. 16), por lo que el método es específico dado que no hay interferencias presentes en las muestras analizadas (fig. 16). En base a este estudio se puede establecer que el método analítico desarrollado es estable bajo las condiciones de trabajo propuestas , por lo que puede ser utilizado como método de análisis de rutina en el control de calidad del ácido nalidixico en materia prima y producto terminado.

El propósito del presente trabajo fué desarrollar y validar un método analítico por polarografía diferencial de pulsos, lo cual se cumplió y a continuación se describe la metodología establecida, la cual puede ser empleada como método de análisis de rutina:

Se pesa con exactitud aproximadamente 50 mg de ácido nalidixico y/o su equivalente (materia prima y/o producto terminado), se transfieren a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y llevar al aforo con disolución electrolito. Se prepara y trata de igual forma una disolución de estándar.

Se vierte 20 ml de la disolución electrolito en la celda polarográfica, adicionar 2 ml de disolución de la muestra, 100 μ l de tritón X, introducir los electrodos (de trabajo, auxiliar y referencia) y burbujear nitrógeno humedecido durante 5 minutos, manteniendo la atmósfera de nitrógeno durante el proceso de electrólisis. Se procede a realizar la electrólisis y a registrar el polarograma desde - 1.55 voltios a - 1.88 voltios. Determinar la corriente de pico máximo a - 1.72 \pm 0.02 voltios y calcular la cantidad, en porcentaje, de $C_{12}H_{12}N_2O_6$, en el ácido nalidixico tomado, en la fórmula $[IU/IS][CS/CU]*PS$, donde IU y IS son las corrientes de pico máximo del estándar y muestra. CS y CU son las concentraciones en μ g/ml del estándar y la muestra, y PS es la potencia en porcentaje del estándar.

CONCLUSIONES.

La polarografía diferencial de pulsos es un método de análisis confiable, práctico y versátil debido a su sensibilidad, rapidez de análisis y al empleo de materiales accesibles de laboratorio.

El método polarográfico desarrollado es eficiente y fácil de trabajar debido a que la determinación del principio activo es directa por lo cual es más simple, rápido y confiable.

La confiabilidad del método quedó demostrada con el estudio de validación dado que el método resultó ser lineal, exacto, preciso, sensible y específico por lo que puede ser utilizado en el análisis rutinario de control de calidad de ácido nalidixico en materia prima y producto terminado.

Mediante el análisis del ácido nalidixico por polarografía diferencial de pulsos, se determinó que el potencial de media onda fué de -1.70 ± 0.04 voltios bajo las condiciones de trabajo establecidas.

Ventajas del método analítico por polarografía diferencial de pulsos :

- Es un método de análisis sencillo y fácil de operar.
- Una misma muestra puede ser analizada varias veces proporcionando respuestas iguales.
- Puede emplearse en microanálisis (puede detectar hasta $10^{-7}M$).

- En análisis de medicamentos con polifármacos o con varios metales es posible determinarlos simultáneamente.
- El equipo instrumental es sencillo y económico comparado con otros equipos.
- Varios grupos funcionales orgánicos son reducibles en el electrodo de gotas de mercurio, lo cual permite la aplicación de la PDP a una gran variedad de especies orgánicas y bioquímicas.

PROPUESTAS.

- Proponer el método analítico diseñado a las autoridades sanitarias para que sea estudiado y se establezca como método oficial .
- Rediseñar y validar el método polarográfico propuesto utilizando el análisis de adición de estándares y comparar el estudio con el realizado en el presente trabajo.
- Realizar el estudio de validación del método analítico variando las siguientes condiciones : el equipo; el laboratorio; la marca comercial de los reactivos; etc. y determinar si es reproducible bajo estas condiciones.
- Establecer un estudio de variación de temperatura del análisis y determinar si hay variaciones, en caso de haberlas optimizar el método y validarlo.
- Se debe hacer un estudio comparativo económico entre el método polarográfico propuesto y los métodos de análisis oficiales, para determinar si existe igualdad entre estos y/o para conocer cual es el más eficiente , confiable y económico.
- El método analítico por polarografía de corriente directa se debe diseñar y validar.
- Investigar que otros medicamentos son susceptibles de ser cuantificados por polarografía diferencial de pulsos y desarrollar su método analítico tomando como base el presente trabajo.

ANEXO I.

SIMBOLOGIA

- b = Ordenada al origen o intercepto
- r = Coeficiente de Correlación
- r^2 = Coeficiente de determinación
- CV = Coeficiente de Variación
- IC = Intervalo de Confianza
- Σ = Sumatoria
- m = Pendiente
- n = Número de replicaciones
- t = Número de diluciones o número de cantidades adicionadas
- \bar{Y} = Media Aritmética
- N = Número total de determinaciones
- S^2 = Varianza
- DE = Desviación Estándar
- x = Dilución o cantidad adicionada
- Y = Propiedad medida o cantidad recuperada
- R = Por ciento recuperado
- \bar{R} = Promedio aritmético del por ciento recuperado

- t = Valor de la distribución t de Student
con una probabilidad acumulada de 0.975 .
- t^* = Valor de la distribución t de Dunnet con
una probabilidad acumulada de 0.975 .
- Sp^2 = Varianza ponderada .
- F^* = Valor de la distribución F de Fisher con
una probabilidad acumulada 0.975 .
- $Y_{...}$ = Y total .
- F = Factor para cálculos en linealidad de Sistema.
- PDC = Polarografía de Corriente Directa.
- PDP = Polarografía Diferencial de Pulsos.
- E_{GM} = Electrodo Goteante de Mercurio.
- f.e.m. = Fuerza Electromotriz.
- $E_{1/2}$ = Potencial de media onda.
- E_{eq} = Potencial de equilibrio.
- E_{el} = Potencial eléctrico .
- I = Constante de corriente difusión. ($I=607nD^{1/2}$).
- i_d = Corriente de difusión.
- i_c = Corriente capacitiva.
- i_r = Corriente residual.
- i_l = Corriente límite.
- i_R = Caída óhmica.

ANEXO II.

Fórmulas y criterios para evaluar los parámetros de validación. ⁽²⁷⁻³⁰⁾

LINEALIDAD.

Linealidad del Sistema.

Coefficiente de Correlación :

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

Coefficiente de determinación :

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

Factor F :

$$F = \frac{[\text{propiedad medida (y)}]}{[\text{conc. de dilución (x)}]}$$

Media del Factor :

$$\bar{F} = \frac{F}{N}$$

donde : N = número de puntos de la linealidad del sistema.

Desviación Estándar :

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

Coefficiente de Variación :

$$CV = (DE / \bar{F}) \cdot 100$$

CRITERIO :

$$CV \leq 1.5 \%$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

PRECISION DEL SISTEMA.

Desviación Estándar :

$$DE = ([N(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2] / [N(N - 1)])^{1/2}$$

Coefficiente de Variación :

$$CV = (DE / \bar{Y}) 100$$

donde \bar{Y} es la media de los valores de la propiedad medida.

CRITERIO.

$$CV \leq 1.5 \%$$

LINEALIDAD DEL METODO.

Pendiente (m) :

$$m = [nt (\Sigma xy) - (\Sigma x) (\Sigma y)] / [nt (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2]$$

Ordenada al origen (b) :

$$b = [\Sigma y - m (\Sigma x)] / (nt)$$

Coefficiente de Determinación :

$$r^2 = [nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2 / [nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2] [nt(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]$$

CRITERIO.

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada : $m \approx 1$, $b \approx 0$,

$$r^2 \geq 0.98$$

LINEALIDAD DEL METODO , EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.

Por ciento Recuperado :

$$R = (y / x) 100$$

Desviación Estándar :

$$DE = ([N (R^2) - (R)^2] / [N (N-1)])^{1/2}$$

Promedio del por ciento recuperado :

$$\bar{R} = \Sigma R$$

Coficiente de Variación :

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

donde \bar{R} es la media del por ciento recuperado .

CRITERIO.

Por ciento Recuperado : 98 % al 102 %

Coficiente de Variación : $CV \leq 2 \%$

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

PRECISION.

REPRODUCIBILIDAD.

Modelo Matemático :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$$

Donde :

Y_{ijk} = el ensayo de la sustancia de interés de la késima muestra analizada por iésimo analista en el jésimo día.

μ = media poblacional del ensayo de la sustancia de interés en la muestra.

α_i = efecto del analista en el ensayo (donde $i = 1 \dots a$).

$\delta_{j(i)}$ = efecto del día anidado en el analista (donde $j = 1 \dots d$).

$\epsilon_{k(ij)}$ = error del método analítico (donde $k = 1 \dots r$).

a = número de analistas. (donde $a = 2$)

d = número de días. (donde $b = 2$)

r = número de replicaciones. (donde $r = 3$)

Calcular :

$$Y_{11.} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113}$$

$$Y_{21.} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213}$$

$$Y_{12.} = Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{22.} = Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

$$Y_{1..} = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123}$$

$$Y_{2..} = Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

$$Y_{...} = Y_{1..} + Y_{2..}$$

$$\Sigma Y_{ij} = (Y_{11.})^2 + (Y_{12.})^2 + (Y_{21.})^2 + (Y_{22.})^2$$

$$\Sigma Y_{i.}^2 = (Y_{1..})^2 + (Y_{2..})^2$$

$$\Sigma \Sigma Y_{ijk}^2 = (Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + \dots + (Y_{221})^2 + (Y_{222})^2 + (Y_{223})^2$$

$$SCa = (\Sigma Y_{i.}^2 / dr) - (Y_{..}^2 / adr)$$

$$SCd = (\Sigma \Sigma Y_{ij}^2 / r) - (\Sigma Y_{i.}^2 / dr)$$

$$SCe = \Sigma \Sigma \Sigma Y_{ijk}^2 - \Sigma \Sigma Y_{ij}^2 / r$$

$F_{0.05}^*$ = los valores de $F_{0.05}$ se obtienen de la tabla de F, localizando el cruce del valor de los grados de libertad (gl) del numerador horizontalmente y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para una $\alpha = 0.05$.

Interpretación de resultados.

Si $F_a < F_{gla, gld; 0.05}$ El método analítico es reproducible por los analistas.

Si $F_a \geq F_{gla, gld; 0.05}$ El método analítico no es reproducible por los analistas.

Si $F_d < F_{gld, gle; 0.05}$ El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si $F_d \geq F_{gld, gle; 0.05}$ El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

REPETIBILIDAD DEL METODO ANALITICO.

$$\text{REPETIBILIDAD} = \pm (MCE)^{1/2}$$

COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL .

$$CV = (s / \bar{Y}) 100$$

De donde :

$$\bar{Y} = Y_{...} / n \quad (n = \text{adr})$$

Desviación estándar total:

$$s = \{ [n \sum Y_{ik}^2 - (Y_{...})^2] / n(n-1) \}^{1/2}$$

BIBLIOGRAFIA.

1. Diccionario de Especialidades Farmaceuticas (PLM).
37a edición Edit. Ediciones PLM S.A.
México 1991.
2. Diario Oficial de la Federación.
Tomo CD XII , No. 11.
México D.F. Lunes 18 de enero de 1988
3. Florey Klaus
Analytical Profiles of Drug Substances.
Vol. 8 Edit. Academic Press Inc.
U.S.A. 1979.
4. F.N.F.U.M.
5a edición
Secretaría de Salud
México 1988.
5. U.S.P. XII.
The United States Pharmacopeia
U.S.A. 1991.
6. Méndez D. "Determinación espectrofotométrica de la solubilidad intrínseca y la constante de disociación para los antibióticos: ácido nalidixico oxolínico y cinoxacina". Rev.Asoc.Farm.Mex. 22 (1) abril-mayo (1991).

7. Bevan J.A., et. al.
Farmacología Médica.
2a edición Edit. Harla
México 1982

8. Charlot, G., et. al. B. Tremillon
Las Reacciones Electroquímicas.
Edit. Toray - Masson S.A.
España 1979.

9. Charlot, G., et. al. B. tremillon
Métodos Electroquímicos.
Edit. Toray-Masson S.A.
España 1977.

10. Skoog A. Douglas
Química Analítica.
4a edición Edit. McGraw-Hill.
México 1989.

11. Ayres H. G.
Análisis Químico Cuantitativo.
2a edición Edit. Harla
México 1980.

12. Strobel H. A.
Instrumentación Química.
Edit. Limusa
México 1979.

13. Batanero Sanchez P.
Química Electroanalítica.
Edit. Alhambra Universidad
España 1981.
14. Damaskin B.B.
Fundamentos de la Electroquímica Teórica.
Edit. MIR Moscú
U.R.S.S. 1981.
15. Day R. A.
Química Analítica Cuantitativa.
Edit. Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A.
Sa. ed.
México 1989.
16. Willard H. Hobart
Métodos Instrumentales de Análisis.
Edit. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V.
2da. ed.
México 1988.
17. Nuño M.
Polarografía.
Edit. Internacional Científica, S.A.
México 1979.
18. Almagro Huertas V.
Polarografía.
Edit. Alhambra, S.A.
España 1971.

19. Vassos H. Basil
Electroquímica Analítica.
Edit. Limusa
México 1987.
20. Connors K. A
A Textbook of Pharmaceutical Analysis.
3a. ed., Edit. John Wiley & Sons
U.S.A. 1982.
21. Bard A.J.
Equilibrio Químico.
Edit. Harper & Row Publishers Inc.
México 1970.
22. Watty B. M.
Química Analítica.
2a. ed., Edit. Alhambra Mexicana S.A. de C.V.
México 1989.
23. W.J. Van Cort, et al, J. Den H.
"Polarographic Reduction and Determination
of Nalidixic Acid. Anal.Chim.Acta, 149 ,
175-191 , (1983).
24. Garcia V., M. Y.
Equilibrio Químico Aplicado a la Química Analítica.
Edit. Diana
México 1988.

25. Kreshkov A.P.
Curso de Química Analítica Análisis Cuantitativo.
Edit. MIR Moscú
U.R.S.S. 1985.
26. Faulkner L.R., Bard J. A.
Electrochemical Methods.
Edit. John Wiley & Sons
U.S.A. 1980.
27. Validación de Métodos Analíticos.
Comite de Elaboración de Guías Oficiales
de Validación de la Dirección General de
Control de Insumos para la Salud, SSA (1991).
28. Miller Irwin
Probabilidad y Estadística para Ingenieros.
Edit. Reverté Mexicana, S.A.
México 1980.
29. Spiegel R. M.
Estadística.
Edit. Mc Graw-Hill
México 1979.
30. Compendial Assay Validation Committee
Pharm. Forum. Stimuli to the Revision Process
"Current Concepts for the Validation of
Compendial Assays".
March-April , 1241-45 (1986).

31. Taylor J.R. , "Anal. Chem. Validation of Analytical Methods".
55, 6 , 600-608 A (1983).

32. Inman E.L. , "General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples."
J. Chromatogr. Sci. 25 , 252-56 (1987).

33. Horwitz W.
Standart of Analytical Method Analysis Proc.
J. Chromatogr. Sci. 24 , 49-55 (1989).

34. Cavenaghi L. , Gallo G.
"Statiscal Evaluaction of the result obtensid with the Analytical Method used for the Quality Control of Medicines", Drug Dev. Ind. Pharm. 13 (4) , part I, 2571-95, part II 2596-615 , (1987).

35. Adrianus J. , Vanderwielen & A.H. Edward.
"Guidelines for Assay Validation".
Pharm. Techn. March, (1982).

36. "Validation of Analytical Method".
Syntex Laboratories Inc.
Quality Assurance Division, 1989.