

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DETERMINACIÓN DEL METRONIDAZOL EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS, MEDIANTE VOLTAMETRÍA DE PULSO DIFERENCIAL Y ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER

María Escalante¹, Reynaldo Ortiz¹, Elkis Weinhold¹, Gladys Velazco².

1. Departamento de Química, Laboratorio de Electroquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

2. Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

Correspondencia: Avenida Las Américas, Núcleo la Hechicera Departamento de Química, Laboratorio de Electroquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Email: reynaldo@ula.ve

RESUMEN

En este trabajo se realizó un estudio comparativo para la determinación del antibiótico metronidazol en dos formulaciones farmacéuticas diferentes por voltametría de pulso diferencial y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier. La voltametría de pulso diferencial muestra una respuesta para la reducción del antibiótico sobre un electrodo de carbón vítreo de 0,55 V vs Ag/AgNO₃ a 5 mVs⁻¹ en un Buffer Britton-Robinson a pH 4,5, encontrándose un límite de detección de 7,17x10⁻⁷ M con un porcentaje de recuperación promedio para el comprimido de 101,4 % y en la solución intravenosa de 97,4 %. Para la técnica de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier se empleó como solvente acetonitrilo y se utilizó la banda del grupo C-O a 1188 cm⁻¹ para la cuantificación, encontrándose un límite de detección de 8,9x10⁻⁶ M con una recuperación promedio del 117,7 % en el comprimido y 101,0 % en la solución intravenosa.

PALABRAS CLAVE: Metronidazol, Voltametría de Pulso, Formulaciones farmacéuticas, FTIR

COMPARATIVE STUDY FOR THE DETERMINATION OF METRONIDAZOLE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS, BY DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRY AND FOURIER TRANSFORMED INFRARED SPECTROSCOPY

ABSTRACT

In this work, a comparative study for the determination of the antibiotic metronidazole was performed in two different pharmaceutical formulations by Fourier transformed infrared spectroscopy and differential pulse voltammetry. The differential pulse voltammetry shows a reduction response of the antibiotic on glassy carbon electrode at 0.55 V vs. Ag/AgNO₃ at scan rate of 5 mVs⁻¹ in a Britton-Robinson Buffer at pH 4.5. Detection limit of 7.17×10^{-7} M was achieved, and a recovery average 101.4% and 97.4% for the tablet and intravenous solution respectively. For the Fourier transformed infrared spectroscopy technique, pure acetonitrile was used as solvent, and the band of the C-O Group at 1188 cm⁻¹ was employed for the quantification. Detection limit of 8.9×10^{-6} M with an average recovery of 117,7% for the Tablets and 101.0% for the intravenous solution.

KEYWORDS: Metronidazole, Pulse Voltammetry, pharmaceutical formulations, FTIR

INTRODUCCIÓN

El Metronidazol (2-metil-5nitroimidazol-1-etanol) (figura 1), es un medicamento antiinfeccioso, antiparasitario perteneciente al grupo de los nitroimidazoles. Es uno de los medicamentos esenciales en la clasificación que le otorga la Organización Mundial de la Salud (1) (Figura 1).

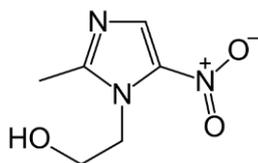


Figura 1.- Estructura del metronidazol

Es un compuesto bactericida para los microorganismos anaeróbicos y microaerófilos,

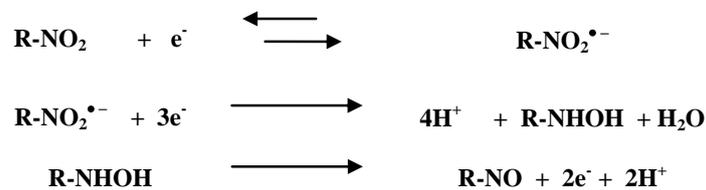
como Bacteroides, especies de Clostridium, Endolimax nana, Entamoeba histolytica, Fusobacterium vicentii, Gardnerella vaginalis, Giardia lamblia, Peptococcus, Peptostreptococcus, Helicobacter pylori y Trichomonas vaginalis. Estos microorganismos reducen el grupo nitro y generan metabolitos que inhiben la síntesis del ADN. Las características farmacocinéticas y de solubilidad del metronidazol, permiten elaborar diferentes formas farmacéuticas, incluyendo preparaciones tópicas en forma de gel o cremas en concentraciones de 0,7%, tabletas o cápsulas en presentaciones de 200, 400 o 500 mg, así como en suspensiones con 50 o 100 mg/mL. También

hay formas disponibles para administración intravenosa (2). Los productos farmacéuticos, antes de ser comercializados, deben ser sometidos a un estricto control de calidad que garantice la eficacia y eficiencia del mismo, por estas razón se han desarrollado y se siguen investigando, diversas técnicas para la determinación de un gran número de principios activos disponibles hoy día. Para la determinación del metronidazol en diversos preparados farmacéuticos y matrices biológicas como sangre, suero sanguíneo y saliva entre otros, se han desarrollado métodos que incluyen técnicas espectrofotométricas (3-8), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (6, 7, 8, 9, 10, 11) y resonancia magnética nuclear (RMN-¹H) (12) entre otras. Desde el punto de vista electroquímico, se han publicado varios trabajos en los cuales se estudia el comportamiento Red- del metronidazol y algunas aplicaciones que se derivan de este comportamiento (13-15), así como también se

ha realizado una serie de investigaciones tendientes a aprovechar el comportamiento electroquímico del metronidazol, para su determinación empleando técnicas electroanalíticas. A continuación se describen algunos trabajos que se consideraron relevantes en este sentido.

Estudios electroanalíticos.

X. Jiang y X. Lin (16), reportaron un mecanismo de reducción del metronidazol basados en la respuesta voltamétrica sobre un electrodo de carbón vítreo modificado con ADN de becerro (GCE/ADN), en solución de metronidazol 5 mM. El primer paso (I), involucra la transferencia electrónica reversible de un electrón para convertir el grupo nitro en un anión radical nitro, luego un proceso irreversible (II), que involucra la transferencia de tres electrones para convertir el anión radical nitro en un derivado de hidroxilamina y como último paso (III), se produce la reoxidación de la hidroxilamina generada según la ecuación 1



Ecuación 1.

Las evidencias voltamétricas también señalan que el mecanismo de reducción para un

electrodo de carbón vítreo no modificado, revela un solo proceso irreversible, que se le atribuye a

la transferencia de cuatro electrones y cuatro protones debido a la reducción del grupo nitro

ecuación 2 (14, 17).



Ecuación 2.

AM Oliveira y colaboradores (18), investigaron la reducción electroquímica del metronidazol, usando un electrodo de carbón vítreo modificado con ADN y compararon los resultados obtenidos con electrodos de carbón vítreo sin modificar. Observaron que los potenciales de reducción para el electrodo modificado eran menos negativos, y encontraron que con el electrodo de carbón vítreo modificado con ADN se puede realizar voltametría de redisolución adsorptiva, siendo esto conveniente para aplicaciones analíticas; encontrando un límite de detección de 1,67 μM usando un buffer a pH 4,5 como medio electrolítico con dos minutos de preconcentración. Sin preconcentración obtienen límites de detección de 3,25 μM . En un electrodo de carbón vítreo sin modificar, no es posible realizar una preconcentración y el límite de detección encontrado para el mismo pH fue de 3,44 μM .

M.B Gholivand y M. Torkashvand (19), diseñaron un sensor voltamétrico altamente selectivo y sensible para la determinación del metronidazol, basado en un electrodo de pasta

de carbono modificado con un polímero impreso molecularmente. El estudio se realizó mediante la comparación de la respuesta voltamétrica en los electrodos de polímero impreso molecularmente (MIP), polímero no impreso (NIP) y sobre el electrodo de pasta de carbono sin modificación (CP). Con la aplicación del sensor para la determinación del metronidazol, usando el método de Voltametría por redisolución catódica, el electrodo modificado (MIP-CP) mostró una alta habilidad de reconocimiento en comparación al NIP-CP; esto permitió lograr optimizar los parámetros que afectan la respuesta del señal y así obtener la curva de calibración, la cual proporcionó dos rangos lineales dinámicos de $5,64 \times 10^{-5}$ a $2,63 \times 10^{-3}$ mg/L y $2,65 \times 10^{-3}$ a $7,69 \times 10^{-2}$ mg/L, con un límite de detección del sensor calculado de $3,59 \times 10^{-5}$ mg/L siendo bastante exitoso para la determinación del metronidazol en fluidos biológicos.

S. LÜ, y colaboradores (20), plantearon un método electroquímico simple y sensible para la determinación de metronidazol, basado en la utilización de un electrodo de carbón vítreo

modificado con películas de carbón nanoestructurado de pared múltiple (MWNT), como electrodo de trabajo. Este estudio fue realizado mediante la técnica de voltametría de pulso diferencial, donde encontraron un pico bien definido, cuyo pico de reducción es de -0,64V en una ventana de potencial entre (-0,4 a -1,0 V). También este comportamiento del metronidazol fue estudiado por la técnica de voltametría cíclica, donde se encontró una corriente pico de reducción de -0,71V en una ventana de potencial entre (0,6 a -1,2 V). Todo esto fue realizado a un pH 9,0 con un tampón Britton-Robinson 0,1 M. Realizando un estudio comparativo con el VCE (electrodo de carbón vítreo) libre, es notable la mejora significativa del pico de corriente de reducción cuando el electrodo es modificado con una película de MWNT, mostrando así un límite de detección de 6×10^{-9} mol/L con un tiempo de acumulación de 2 min.

Y. Gui y colaboradores (21), desarrollaron un método para la determinación simultánea de tres 5-nitroimidazoles en productos alimenticios por voltametría de pulso diferencial y quimiometría. Estos compuestos en estudio son: metronidazol, tinidazol y ornidazol, los cuales generaron una respuesta de reducción sobre un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE) usando voltametría de pulso diferencial, en una solución buffer a pH 8,95. Las respuestas voltamétricas para estos compuestos produjeron señales con potenciales de pico a 692, 640 y 652 mV respectivamente. Realizando una comprobación

del sistema mediante voltametría cíclica se muestra sólo un pico de reducción y ausencia de picos de oxidación, lo que implica un proceso de reducción irreversible para cada compuesto. La determinación individual de cada compuesto se realizó mediante la utilización de la quimiometría, permitiendo resolver los voltagramas superpuestos y cuantificar las mezclas por medio de los modelos de calibración PLS (método de mínimos cuadrados parciales), PCR (regresión de componentes principales) y RBF-ANN (función de base radial de redes neuronales artificiales). También fue utilizado HPLC como método de referencia, para comparar el rendimiento con los métodos propuestos, proporcionando buenos resultados con respecto a las medidas de HPLC. El método propuesto fue aplicado con éxito en la determinación de 5- nitroimidazoles en muestras de leche y miel.

Xiaohua Jiang y Xiangqin Lin (22), utilizaron métodos de voltametría, para determinar metronidazol sobre un electrodo de carbón vítreo modificado con ADN de becerro. La interacción del metronidazol con la superficie DNA/GCE, mostró corrientes de pico ocho veces superior a la obtenida con el VCE sin modificar. Reportaron un límite de detección de $2,0 \times 10^{-8}$ M, haciendo del DNA/VCE un biosensor prometedor para la determinación de MTZ (figura 1.6). Este método fue aplicado con éxito, ya que mostró alta precisión y exactitud (error relativo <6%) para la estimación del

contenido total de MTZ en drogas en distintos preparados farmacéuticas.

P.N. Bartlett, y colaboradores (23), investigaron la reducción electroquímica del metronidazol sobre un electrodo de fibra de carbono en un buffer Britton-Robinson a pH 9,0. Bajo estas condiciones la reducción del metronidazol está controlada por adsorción. La adsorción y la acumulación del metronidazol en la superficie de la fibra de carbono permite su determinación a bajas concentraciones utilizando voltametría adsorptiva de redisolución de onda cuadrada, con el cual obtuvieron un límite de detección de 5×10^{-7} mol/dm³, con un sistema de dos electrodos sin agitación durante la fase de acumulación. Este método les ofreció un procedimiento sencillo para determinar metronidazol en la orina sin un tratamiento previo de la muestra antes del análisis.

AM Oliveira y colaboradores (24), realizaron un estudio comparativo del comportamiento voltamétrico de la reducción electroquímica del metronidazol, sobre un electrodo de carbón vítreo modificado con ADN, un electrodo de película delgada de mercurio y un electrodo de carbón vítreo. En este estudio todos los electrodos mostraron una tendencia similar en cuanto al mecanismo de reducción del metronidazol, cuya respuesta de reducción, mostró una dependencia del pH en medio ácido y neutro e independiente en medios alcalinos; aunque observaron cambios en los potenciales de pico a valores más negativos cuando es

utilizado un electrodo de carbón vítreo desnudo en comparación con los otros dos. También fue observado que al utilizar el electrodo modificado con ADN para la reducción del metronidazol, se obtiene un límite de detección inferior a 1 μ M debido a la posibilidad de realizar preconcentración de éste medicamento en la superficie del electrodo, el cual no fue el caso del electrodo de película delgada de mercurio o electrodos de carbón vítreos desnudos.

Z. Wang y colaboradores (25), plantearon un método para la determinación de metronidazol en trazas, por voltametría de redisolución adsorptiva. El analito fue preconcentrado por adsorción sobre la superficie de un electrodo HMDE, con el cual pudieron observar un pico de redisolución a -0,62V, con una respuesta lineal desde 1×10^{-8} a 1×10^{-6} M con 1,5 min de acumulación. El método también mostró, la determinación submicromolar de metronidazol en suero humano la cual fue pretratado para poder ser medido, con tiempos cortos de preconcentración. El límite de detección se estimó en 1,7 ng/ml en suero humano y 0,63 ng/ml en formulaciones con 120 segundos de preconcentración.

Parte Experimental

Los reportes bibliográficos muestran que el electrolito preferido para la determinación de metronidazol mediante voltametría sobre electrodos de carbón vítreo (CV) es el buffer Britton-Robinson a pH básico(19-23) ; sin

embargo en todos los casos se emplean electrodos modificados y la modalidad de redisolución adsortiva; para los estudios por métodos voltamétricos directos, se emplean electrolitos a pH neutro o ligeramente ácidos(18, 19, 26), bien empleando soluciones reguladoras de fosfato o buffer Britton-Robinson; por esta razón y en vista de que la técnica a emplear en esta investigación es la VPD directa, se estudiaron como electrolitos de soporte, una solución reguladora a pH 7 (preparada ajustando el pH de una solución de KH_2PO_4 0,1 M con solución de NaOH 0,2 M) y una solución reguladora Britton-Robinson pH 4,5 (preparada ajustando el pH de una mezcla de ácidos fosfórico, acético y bórico en una concentración de 0,04 M con NaOH 0,2 M), siendo los experimentos a pH 4,5 los que arrojaron resultados favorables para la determinación ya que solo a este valor de pH se lograron obtener curvas de calibración reproducibles y con coeficientes de correlación adecuados. Los estudios electroquímicos se realizaron en un potenciostato/galvanostato **Radiometer** modelo *Voltalab PSTO50* y utilizando una celda de un solo compartimiento y tres electrodos, usando carbón vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y un espiral de Pt como electrodo secundario; los parámetros instrumentales para los experimentos de VPD fueron altura de pulso= 100 mV; ancho de pulso = 100 ms y velocidad de barrido = 5 mV/s. Los estudios espectroscópicos fueron realizados en un

espectrómetro de infrarrojo *Perkin Elmer* modelo System 2000 FT-IR y una celda de transmisión para líquidos con ventanas transparentes de CaF_2 . Todos los espectros fueron adquiridos promediando 20 interferogramas (n) y con resolución nominal de 8 cm^{-1} .

Reducción electroquímica y determinación voltamétrica de metronidazol sobre carbón vítreo.

Voltametría cíclica.

El estudio de reducción del MTZ se llevó a cabo mediante voltametría cíclica, sumergiendo el electrodo de CV en una solución $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ de MTZ patrón en la solución reguladora a pH 4,5 como electrolito soporte, en una ventana de potencial de 0,0 a -1,2 V a $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (figura 1).

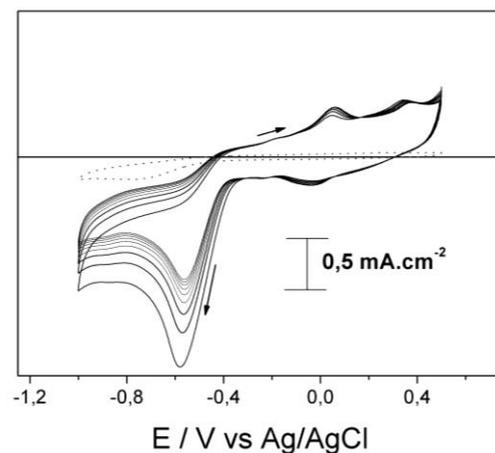


Figura 2. Respuesta voltamétrica de MTZ en 0,01 M a 50 mV/s y buffer Britton-Robinson a pH 4,5 como electrolito soporte.

En la figura 2, se puede observar la respuesta voltamétrica de reducción del MTZ sobre el electrodo de CV, la cual presenta una densidad

de corriente pico de reducción a $-0,57$ V; así como también la presencia de dos picos de oxidación en el barrido inverso a potenciales de $0,057$ y $0,34$ V respectivamente, lo cual muestra la naturaleza irreversible de la reducción del MTZ también a este valor de pH (18). En los barridos sucesivos la intensidad de la densidad de corriente disminuye hasta permanecer constante en aproximadamente el decimo barrido, alcanzando una disminución de aproximadamente el 42 % del valor inicial. Este voltagrama permite determinar el intervalo de potencial que se debe emplear para realizar las experiencias de Voltametría de Pulso diferencial, en este caso la señal de reducción del grupo Nitro del MTZ es ubica entre $-0,3$ y $-0,7$ V vs Ag/AgCl, por lo cual, este fue el intervalo escogido. Por otro lado, el hecho de que exista disminución en los barridos consecutivos, es indicativo de la existencia de un leve bloqueo de la superficie del electrodo de trabajo, por cual la misma se debe regenerar mediante pulido entre cada medida.

Voltametría de pulso diferencial (VPD)

Mediante esta técnica podemos observar que a medida que aumenta la concentración de metronidazol, aumenta la corriente de pico catódico (figura 3), siendo ésta la respuesta esperada ya que la corriente es proporcional a los cambios en la concentración del analito(18, 22, 23). También podemos observar un ligero desplazamiento de los potenciales de pico de

reducción del metronidazol hacia potenciales más negativos a medida que aumenta la concentración del analito, sin embargo la variación es muy pequeña y el intervalo donde ocurre la reducción del metronidazol coincide con los reportados (18, 19, 20,25, 26, 27). Por otro lado se realizó una curva de calibración por adición de estándar con el fin de investigar si existe influencia de la matriz.

Análisis de significancia entre las pendientes de la curva de calibración sencilla y adición estándar.

Se realizó un análisis estadístico (t-Student) (27) de las pendientes de la curva de calibración sencilla y la curva del método de adición estándar, para un nivel de confianza del 99 % ; y no se encontraron diferencias significativas al aplicar ambos métodos de calibración, por lo tanto, con solo la curva de calibración sencilla es aceptable la determinación ya que no hay interferencias de matriz. Con muestras acuosas como la solución inyectable intravenosa, es de esperar que de igual manera no exista interferencia debido a lo simple de la matriz.

Parámetros de calidad

Los criterios cuantitativos que da la ecuación de la recta de una curva de calibración, como son la pendiente (m), la desviación estándar (σ) y el corte (B) en el eje de las ordenadas, permiten obtener los parámetros de calidad como son; la sensibilidad y la precisión de la

técnica (28), necesarias para determinar el límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ). En la tabla I., se pueden apreciar los parámetros de calidad obtenidos a partir de la curva de calibración sencilla y la desviación estándar de la respuesta del blanco (figura 3).

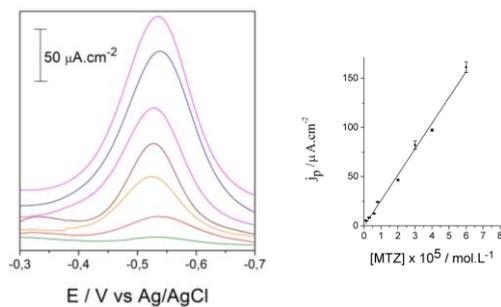


Figura 3 Respuesta voltamétrica de MTZ sobre CV en buffer Britton-Robinson a pH 4,5. Intervalo de concentraciones 0,01 – 0,06 mM.L⁻¹ y curva de calibración sencilla i_p vs concentración patrón, para la determinación electroquímica de MTZ a pH 4,5.

Se puede observar en la tabla I, que la concentración mínima que puede detectarse por este método analítico o límite de detección (LD), se obtiene de la curva de calibración sencilla con un valor de $7,17 \times 10^{-7}$ M y la concentración más pequeña con la que se pueden realizar medidas cuantitativas o límite de cuantificación es de $2,40 \times 10^{-6}$ M. Los valores obtenidos en la tabla I, nos permite señalar que esta metodología es aplicable para la determinación de metronidazol a nivel de fármacos ya que se pueden determinar una mínima concentración del analito en un orden de 10^{-6} M con un nivel de confianza de 99 %.

De acuerdo a los criterios cuantitativos obtenidos mostrados en la tabla I, se realiza el cálculo del porcentaje de recuperación (% *Recup*) de MTZ en comprimidos y solución intravenosa de MTZ. Esto realiza mediante la ecuación 3.

$$\%Recup = \frac{[MTZ]_{exp}}{[MTZ]_{nominal}} \times 100$$

Ecuacion 3.

Donde (MTZ)_{exp} = concentración de MTZ obtenida mediante la curva de calibración

(MTZ)_{nominal} = concentración de MTZ de acuerdo a las indicaciones del farmaco

La magnitud de los valores obtenidos para los % de recuperación, coinciden con los reportados en la bibliografía (20, 22), para estas formas farmacéuticas.

Tabla I. Características analíticas de las curvas de calibrado.

Curva de calibración	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación (R)	Pendiente (m)	Intercepto (b)	Desviación estándar (S)
Sencilla	$i_p = b + m$ (MTZ)	0,992	0,18	-0,002	blanco= 0,001 muestra= 0,06
Adición de estándar		0,980	0,21	3,2	blanco= 0,9 muestra= 0,0149

Estudio por espectroscopia IRTF.

Criterio de selección y medida de la señal analítica.

En la figura 4, se muestra el espectro infrarrojo de distintas soluciones de MTZ, en el intervalo comprendido entre 1280 y 1120 cm^{-1} ; allí se puede observar una banda centrada en 1188 cm^{-1} , la cual corresponde a la vibración de tensión perteneciente al grupo C-O proveniente del alcohol primario presente en la estructura de la molécula en estudio; esta banda es de mediana intensidad, libre de interferencias y con la simetría adecuada para generar una buena línea de base, por estas razones se seleccionó esta banda como la señal analítica.

Curva de calibración

Las curvas de calibrado (figura 4) se construyeron calculando el área bajo la banda seleccionada o Absorbancia integral (A_i) para concentraciones de entre 0,6 mM y 1×10^{-2} M.

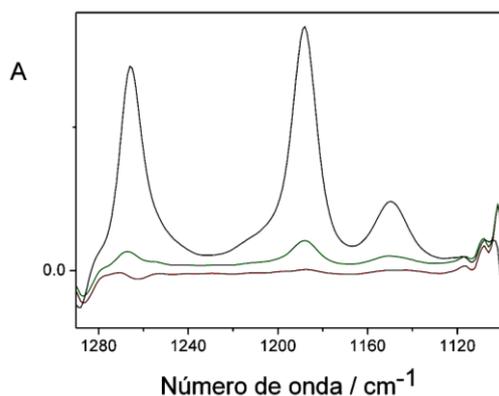


Figura 4. Comportamiento espectral del MTZ a diferentes concentraciones. (Condiciones experimentales: Espectro de

fondo: CH_3CN puro; $n=20$; paso óptico (b)= 1 mm).

Para determinar si la diferencia entre las pendientes de las CCS y CAE son estadísticamente significativas, se realizó la prueba de hipótesis (t-Student) (27) encontrándose que bajo las condiciones aplicadas, no existen interferencias de matriz.

En la tabla II se puede apreciar los parámetros de calidad obtenidos a partir de la curva de calibración sencilla y la desviación estándar del blanco obtenida experimentalmente.

La concentración mínima que puede detectarse por este método analítico (LD), es de $8,91 \times 10^{-6}$ M y la concentración más pequeña con la que se pueden realizar medidas cuantitativas o límite de cuantificación es de $2,96 \times 10^{-5}$ M. Permitiendo señalar que esta metodología es aplicable para la determinación de metronidazol a nivel de fármacos ya que se pueden determinar una mínima concentración del analito en un orden de 10^{-5} M.

Tabla II. Parámetros de calidad obtenidos a partir de la curva de calibración sencilla y la desviación estándar.

Fármaco	(MTZ) Nominal Mm	(MTZ) Promedio obtenida (3 determinaciones) mM	σ	% Recuperación
Comprimidos	0,0350	0,0355	0,0064	101,4 ± 7,6
Solución intravenosa		0,0340	0,0001	97,4 ± 0,9

Porcentaje de recuperación obtenido de los fármacos.

Para la determinación de MTZ en los fármacos, se estudiaron soluciones preparadas a partir de los comprimidos y solución intravenosa de concentración nominal de 0,35 y 0,20 mM; respectivamente notándose que para ambos casos se obtiene una respuesta centrada en el máximo de absorbancia a 1188 cm^{-1}

De acuerdo a los criterios cuantitativos obtenidos mostrados en la tabla 4.4, se realiza el cálculo del porcentaje de recuperación (% *Recup*) de MTZ en comprimidos y solución intravenosa. Esto realiza mediante la ecuación 2 y los resultados se resumen en la tabla VI

Se realizó la estimación de la exactitud del método, analizando las soluciones usadas en las CAE bajo la óptica de estudios de recuperación. Los resultados obtenidos evidencian, en ambos casos una recuperación mayor al 100 %.

Por otra parte, en los fármacos analizados por CAE, se encuentra que la concentración de MTZ obtenida por ambos métodos de calibración (CCS y CAE) tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas.

Análisis de significancia entre los resultados obtenidos por VDP y espectroscopía IRTF.

Para decidir si la diferencia entre dos medidas muestrales, \bar{X}_1 y \bar{X}_2 es significativa, es decir para contrastar la hipótesis nula, $H_0 = \mu_1 = \mu_2$, se calcula el t estadístico (27).

De acuerdo a los criterios cuantitativos obtenidos mostrados en la tabla 4.3 y 4.6, se determinan los t_{exp} para los fármacos de MTZ en estudio encontrándose valores de 3,28 y 7,56 para los análisis de comprimido y solución i.v. respectivamente, teniendo el $t_{critico}$ un valor de 4,6 para un límite de confianza del 99 % . Los valores indican que ambas técnicas dan resultados que no difieren significativamente para el análisis del comprimido; por el contrario, para los resultados obtenidos para la solución i.v , si existe diferencias significativa ya que el $t_{exp} > t_{critico}$.

Análisis crítico comparativo entre las técnicas de voltametría de pulso diferencial y

la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

El tema central de esta investigación plantea un estudio comparativo, crítico y objetivo acerca de la potencialidad real que tienen las técnicas de voltametría de pulso diferencial y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, como detector selectivo y sensible, para llevar a cabo la determinación del antibiótico

metronidazol en soluciones patrones y muestras reales como comprimidos y solución inyectable intravenosa; a continuación se presenta un cuadro comparativo de ambas técnicas, de acuerdo con los resultados obtenidos y las experiencias acumuladas durante la realización de los experimentos:

Tabla III. Descripción de los experimentos.

Voltametría de pulso diferencial (VPD)	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IRTF)
El rango de concentraciones utilizado para el análisis de estándares y muestras es bastante bajo (10^{-6} M), debido a que esto minimiza el fenómeno de adsorción que ocurre sobre la superficie del electrodo.	El rango de concentraciones utilizado, está en el orden 10^{-3} M debido a que para esta técnica, con concentraciones menores se pierde la resolución de la señal analítica así como deformación o desplazamientos de los máximos de absorción.
El límite de detección encontrado mediante esta técnica permite encontrar concentraciones en un rango de 10^{-7} M siendo este lo suficientemente adecuado para ser detectado por VPD.	El límite de detección obtenido para esta técnica esta en el rango de 10^{-6} M, siendo este valor muy bajo con respecto a las concentraciones que realmente se pueden utilizar y que proporcionan una respuesta instrumental adecuada, lo que implica que trabajar a ese nivel de concentraciones puede proporcionar errores significativos en las medidas.
La sensibilidad fue determinada por la pendiente de la curva de calibración sencilla siendo ésta de $0,18 \text{ A.cm}^{-2} \cdot \text{L.mol}^{-1}$ generando este valor de acuerdo al rango de concentraciones trabajo establecido.	La sensibilidad fue determinada por la pendiente de la curva de calibración sencilla $468 \text{ u.a.L.mol}^{-1}$ generando este valor de acuerdo al rango de concentraciones de trabajo establecido, siendo mucho mayor que el obtenido para VPD, lo que implica que los mismos cambios en concentración generan una mayor respuesta instrumental en IRFT
El tiempo de análisis requerido para esta técnica es largo, debido a que requiere un tiempo previo para la limpieza del electrodo con diferentes tipos de alúmina y ultrasonido, además del tratamiento electroquímico que se debe realizar periódicamente.	El tiempo de análisis que requiere esta técnica es mucho menor con respecto a la VPD ya que sólo se realiza la inyección de la muestra en la celda y la espera de un tiempo corto que requiere el equipo para proporcionar los espectros con la acumulación de 20 interferogramas
La cantidad de reactivos requerido para realizar los experimentos es mucho mayor ya que se preparan blancos, estándares y muestras que requieren un electrolito soporte el cual consta de la combinación de varios reactivos.	A diferencia de la técnica de VPD sólo se requiere de un solo reactivo como solvente para los estándares y muestras.
En cuanto a la toxicidad de los reactivos utilizados para esta técnica, todos los experimentos fueron realizados en medio acuoso; por lo que estos no producen ningún tipo de riesgo o daño al operador o al ambiente.	La toxicidad del solvente que se utiliza en esta técnica es alta, por lo que representa mayores riesgos, por lo que el acetonitrilo debe ser empleado con la seguridad requerida.
Los equipos, celdas y electrodos que se emplean para esta técnica son de bajos costos con respecto a la técnica de IRTF y las celdas y electrodos utilizados se pueden construir de manera manual en el laboratorio.	Los costos para esta técnica son mayores debido a que la instrumentación tienen un valor bastante elevado y no existen posibilidades de construir los las celdas y ventanas transparentes al IR en el laboratorio

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se desarrolló una nueva propuesta metodológica para la determinación de metronidazol en formulaciones farmacéuticas (comprimidos y solución inyectable intravenosa). La estrategia de trabajo utilizada para la preparación de estándares y muestras para el caso de los estudios electroquímicos realizados en medio acuoso, así como también las experiencias realizadas por espectroscopia IRTF utilizando acetonitrilo como solvente; propiciaron el desarrollo de un métodos de análisis simple, rápido y de bajos costos. Sin embargo la espectroscopia IRTF como técnica de detección proporciona, rapidez y simplicidad al método, lo cual no es observado en la voltametría de pulso diferencial ya que esta requiere un tiempo de análisis mucho mayor.

2. La voltametría de pulso diferencial proporciona límites de detección menores que los proporcionados por la espectroscopia IRTF para la determinación de metronidazol en fármacos.

3. Bajo las condiciones de trabajo seleccionadas para cada técnica se construyeron curvas de calibración sencilla y adición estándar para evaluar el comportamiento lineal del metronidazol en el rango de concentraciones seleccionado, para los cuales se observó que las pendientes de las CAE no mostraron diferencias

significativas con las correspondientes a las CCS en ninguna de las técnicas empleadas. Estos resultados indican que el método propuesto está libre de interferencias de tipo físico y químico por parte de la matriz de la muestra.

4. Los porcentajes de recuperación obtenidos tanto como para la técnica de VPD como para la de espectroscopia IRTF revelan que la concentración de metronidazol encontrada en las dos técnicas muestran una buena concordancia con los valores declarados en la etiqueta del producto. Aunque la prueba de *t-studen*, indica que estadísticamente las dos técnicas proporcionan resultados que difieren significativamente para las soluciones i.v. de metronidazol

5. Las figuras de mérito relacionadas con sensibilidad, precisión y exactitud; confieren a ambas técnicas un perfil adecuado para ser utilizado en el control de calidad de este tipo de productos.

REFERENCIAS

1. Rediguieri F C, Porta V, Nunes D, Nunes T, Junginger Hans E, Kopp S, Midha K, Shah V, Stavchansky S, Dressman J B. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Metronidazole. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011, 100(5): 1618-1627.

2. Herrera R. Determinación de la bioequivalencia de dos formulaciones orales de Metronidazol en voluntarios sanos". Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, Escuela superior de Medicina. México 2005.
3. Siddappa K, Mallikarjun M, Reddy PT, Tambe M. Spectrophotometric determination of Metronidazole through Schiff's base system using vanillin and PDAB reagents in pharmaceutical preparations". *Eclética Química* 2008, 33(4): 41-46.
4. Alphonse M M y Farouk E E. Validated Spectrophotometric Methods for the Simultaneous Determination of Ciprofloxacin Hydrochloride and Metronidazole in Tablets. *Pharmaceutical Society of Japan* 2011, 59(12): 1485-1493.
5. Tolgyesi A, Sharma V K, Fekete S, Fekete J, Simon A, Farkas S. Development of a rapid method for the determination and confirmation of nitroimidazoles in six matrices by fast liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2012, 40(8): 64-65.
6. Tavakoli N, Varshosaz J, Dorkoosh F Y, Zargarzadeh M R. Development and validation of a simple HPLC method for simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, 43(1): 325-329.
7. Saffaj T, Charrouf M, Abourriche A, Abboud Y, Bennamara A, Berrada M. Spectrophotometric determination of metronidazole and secnidazole in pharmaceutical preparations. *IL FARMACO* 2004, 59 (10) 843-846.
8. Dubreuil D, Poule P, Duffaut D, Ivan B. Simultaneous determination of metronidazole and spiramycin I in human plasma, saliva and gingival crevicular fluid by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005 38 (2) 298-306.
9. Erk N, Altun M L. Spectrophotometric resolution of metronidazole and miconazole nitrate in ovules using ratio spectra derivative spectrophotometry and RP-LC". *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011, 25(1): 115-122.
10. Akay C, Ozkan S, Senturk Z, Cevheroglu S. Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC". *IL Farmaco* 2002, 57 (11): 953-957.
11. Gomes T, Eduardo O, Macêdo R. Simultaneous determination of ranitidine and metronidazole in human plasma using high performance liquid chromatography with diode array detection". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, 37 (4): 777-783.
12. Salem A A, Mossa H A. Method validation and determinations of levofloxacin, metronidazole and sulfamethoxazole in an

aqueous pharmaceutical, urine and blood plasma samples using quantitative nuclear magnetic resonance spectrometry". *Talanta* 2012, 88: 104-114.

13. Cavalcanti M J, Oliveira N V, de Moura M A B.F, Fruttero R, Bertinaria M, M Goulart O F. Evidence of self-protonation on the electrodic reduction mechanism of an anti- *Helicobacter pylori* metronidazole isotere. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2004, 571(2): 177-182.

14. La-Scalea M A, de souza C M M, M S da silva J, M C Chung, S H Pires S y E I Ferreira. Voltametric Behavior of Nitrofurazone and its Hydroxymethyl Prodrug with Potencial Anti-Chagas Activity". *J. Braz. Chem. Soc.* 2005, 16 (4) 774-782.

15. La-Scalea M A., S H.P. Serrano y I G.R. Gutz. "Voltametric Behaviour of Metronidazole at Mercury Electrodes". *J. Braz. Chem. Soc.* 1999 10 (2): 127-135.

16. Jiang X, Lin X. Voltammetry of the interaction of metronidazole with DNA and its analytical applications. *Bioelectrochemistry* 2006, 68 (2): 206 – 212.

17. Mandal P. Reactions of the nitro radical anion of metronidazole in aqueous and mixed solvent: a cyclic voltammetric study. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2004, 570 (1) 55–61.

18. Oliveira A M, Serrano S H P, Gutz I, La-Scalea M A. Electrochemical reduction of

metronidazole at a DNA- modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1997, 42: 175-178.

19. Gholivand M B, Torkashvand M. A novel high selective and sensitive metronidazole voltammetric sensor based on a molecularly imprinted polymer-carbon paste electrode. *Talanta* 2011, 84: 905-912.

20. Lú S, Wu K, Dang X, Hu S. Electrochemical reduction and voltammetric determination of metronidazole at a nanomaterial thin film coated glassy carbon electrode. *Talanta* 2004, 63: 653–657.

21. Gui Y, Y N. Ni, Kokot S. "Simultaneous determination of three 5-nitroimidazoles in foodstuffs by differential pulse voltammetry and chemometrics" *Chinese Chemical Letters* 2011, 22 (5) 591-594.

22. Jiang X, Lin X. Voltammetry of the interaction of metronidazole with DNA and its analytical applications". *Bioelectrochemistry* 2006, 68 (2): 206 – 212.

23. Bartlett P N, Ghoneim E, El-Hefnawy G, El-Hallag I. Voltammetry and determination of metronidazole at a carbon fiber microdisk electrode". *Talanta* 2005, 66: 869–874.

24. Oliveira A M, S.H.P Serrano, I. Gutz, M.A La-Scalea. Comparison of the voltammetric Behavior of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode, a mercury thin film



electrode and a glassy carbon electrode.

Electroanalysis 1997 9 (2): 110-114

25. Wang Z, Zhou H, Zhou S. Study o the determination of Metronidazole in human serum by adsorptive stripping voltammetry. Talanta 1993, 40: 1073-1075.

26. Arias B, Ortiz R, Velazco G. Determinación de la velocidad de liberación de metronidazol incorporado en membranas de quitosano. Acta Bioclínica 2012, 2 (3): 69-93.

27. Miller J N, Miller J C. Estadística y quimiometría para Química Analítica. 4ta Ed. Madrid: PEARSON; 2004.

28. Miller J, Miller J. Estadística para química analítica. 2da Ed. Madrid: Addison-Wesley Iberoamericana; 1993.