



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME DE SERVICIO SOCIAL

Detección y cuantificación mediante
cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de
metabolitos de Metronidazol, obtenidos por técnicas
electroquímicas.

DOCENTES:

Dra. GEORGINA ALARCÓN ÁNGELES

M. en C. MARCELA HURTADO Y DE LA PEÑA

Georgina Alarcón Angeles
Marcela Hurtado y de la Peña

ALUMNO: URIEL HERNÁNDEZ LICEA

MATRICULA: 2163065587

INDICE

RESUMEN	3
JUSTIFICACIÓN	4
OBJETIVOS	5
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	7
Técnicas de separación.....	7
Técnicas de identificación.....	8
Metronidazol.....	10
Susceptibilidad de Metronidazol a reacciones redox.	11
Métodos de electroquímicos para determinar la susceptibilidad de la molécula a reacciones redox.	13
Métodos utilizados para la identificación de los productos de la oxidación de Metronidazol	17
Métodos cromatográficos para el análisis de Metronidazol y sus derivados.	19
CONCLUSIÓN	23
REFERENCIAS	24

RESUMEN

El estudio del metabolismo de fármacos representa un pilar fundamental en la investigación farmacéutica, ya que permite comprender su comportamiento biológico, perfil de seguridad y posibles interacciones. Sin embargo, los métodos tradicionales basados en ensayos *in vivo* o sistemas biológicos *in vitro* presentan limitaciones significativas en términos de complejidad operativa, costos económicos y dificultad para aislar metabolitos específicos. En este contexto, el presente trabajo de titulación aborda una revisión bibliográfica exhaustiva sobre el uso de técnicas electroquímicas y cromatográficas como alternativa metodológica para el estudio de metabolitos, utilizando al **Metronidazol** como molécula modelo debido a su metabolismo ampliamente caracterizado en la literatura científica.

Un aspecto crucial identificado en la revisión es que la generación electroquímica de metabolitos requiere un control preciso de diversos parámetros experimentales que influyen directamente en el rendimiento y la reproducibilidad de las reacciones. Entre estos parámetros se encuentran el potencial aplicado, el material del electrodo (carbono vítreo, BDD o platino), la composición de la solución electrolítica, el tiempo de electrólisis, el pH del medio y la temperatura de reacción. La optimización de estas variables permite simular de manera controlada las condiciones del metabolismo hepático, donde el electrodo funciona como un análogo del sitio activo de enzimas como el citocromo P450.

Para aplicaciones que requieren máxima sensibilidad y selectividad, especialmente cuando se trabaja con matrices biológicas complejas como plasma, orina o tejidos, la revisión destaca la importancia del acoplamiento de la cromatografía líquida con **espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)**. Esta configuración analítica permite no solo cuantificar el fármaco y sus metabolitos a concentraciones traza (del orden de nanogramos por mililitro), sino también confirmar su identidad estructural mediante el monitoreo de transiciones iónicas específicas, como se reporta en estudios farmacocinéticos que emplean estándares internos isotópicos para garantizar la precisión de los resultados.

La revisión también aborda las estrategias de preparación de muestras, particularmente la **extracción en fase sólida (SPE)**, que resulta indispensable para eliminar interferencias de la matriz y concentrar los analitos antes del análisis cromatográfico. En este sentido, los estudios revisados reportan recuperaciones

superiores al 80% para el Metronidazol y sus metabolitos principales, con efectos de matriz mínimos cuando se utilizan procedimientos optimizados.

En cuanto a los métodos cromatográficos, la revisión evidencia que la elección del sistema de detección depende fundamentalmente de los objetivos del análisis y la complejidad de la muestra. Mientras que el HPLC-UV sigue siendo una opción robusta, accesible y suficientemente sensible para muchos laboratorios, el UPLC-MS/MS se posiciona como la técnica de referencia para estudios regulatorios, análisis de residuos en alimentos o investigaciones farmacocinéticas que demandan los más altos estándares de sensibilidad y especificidad.

JUSTIFICACIÓN

La investigación de la biotransformación de los fármacos implica la participación de organismos completos vivos, células aisladas, preparados enzimáticos con ciertas condiciones de uso y múltiples requisitos experimentales. Todos estos estudios representan un alto grado de complejidad. La investigación de la estabilidad metabólica de nuevos fármacos busca nuevas técnicas de investigación que permita avanzar con mayor agilidad en el conocimiento del comportamiento de los fármacos con miras a reducir el número de experimentos de mayor complejidad a un nivel de confirmación de la información.

La posibilidad de una batería de pruebas in vitro que permitan tener un panorama predictivo acertado del comportamiento in vivo de los fármacos, si bien, no sustituye los estudios in vivo permite una mejor selección de moléculas con propiedades y posibilidades de éxito y permite también hacer un selectivo diseño de experimentos in vivo que aporten los datos desconocidos del fármaco sin necesidad de hacer una exhaustiva cantidad de pruebas in vivo dado que se tiene ya un mapa de datos confiables.

La determinación de la susceptibilidad a la oxidación de las moléculas mediante electroquímica es una forma relativamente sencilla de aportar esa información tanto de la estabilidad fisicoquímica, como de la tendencia biológica de las moléculas. Por tratarse de una técnica instrumental altamente sensible no solamente aporta el dato de susceptibilidad, sino también información de los potenciales necesarios para que

la reacción ocurra, lo cual plantea procesos predictivos muy interesantes acerca de la estabilidad química y biológica.

La separación e identificación de los productos de la oxidación de las moléculas mediante celdas electroquímicas, forma la segunda parte de la investigación. Esta segunda parte resulta tan fundamental para el estudio del destino fisicoquímico y biológico de los fármacos como la primera, no es posible concluir la investigación sin plantear, cuáles son los productos de la reacción. Las técnicas de separación acopladas a detectores de identificación resultan ser las herramientas analíticas que ayudan a resolver esta segunda parte de la investigación.

En este trabajo se plantea realizar una revisión de la información reportada hasta el momento acerca de este método para obtener información sobre la susceptibilidad a la oxidación de una molécula seleccionada mediante celdas electroquímicas y el acoplamiento y los métodos utilizados para la separación e identificación de los productos de la oxidación.

El Metronidazol, es una molécula modelo, ejemplo seleccionado, dado que su metabolismo es plenamente conocido y sus metabolitos identificados. Lo que se busca es demostrar en la revisión la utilidad y la confiabilidad de la alternativa como medio para establecer las posibles vías oxidativas químicas y/o biológicas de los fármacos.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Realizar una búsqueda de información sobre el desarrollo de métodos utilizados para la separación e identificación de metabolitos de Metronidazol.

Objetivos particulares

- Revisar métodos electroquímicos para determinar la susceptibilidad de la molécula a reacciones redox.
- Revisar métodos utilizados para la separación e identificación de los productos de la redox de Metronidazol.
- Revisar métodos cromatográficos para el análisis de Metronidazol y sus derivados

INTRODUCCIÓN

El Metronidazol, un agente antimicrobiano nitroimidazólico de uso clínico generalizado, constituye un tratamiento de primera línea para infecciones protozoarias y anaeróbicas. Su mecanismo de acción, dependiente de la reducción bioquímica del grupo nitro ($-\text{NO}_2$) en su estructura molecular, es fundamental para su actividad citotóxica selectiva contra microorganismos anaerobios. Esta misma característica redox, sin embargo, también influye en su perfil de estabilidad, su metabolismo y la formación de metabolitos y productos de degradación, cuya identificación es crucial para evaluar la seguridad y eficacia del fármaco.

El estudio de la biotransformación de fármacos es un pilar fundamental en la investigación farmacológica, ya que impacta directamente en su eficacia, toxicidad y farmacocinética. En el caso del Metronidazol, la comprensión de sus vías metabólicas, particularmente las reacciones redox iniciales, es esencial para explicar el destino del fármaco *in vivo* y predecir potenciales interacciones o efectos adversos. Tradicionalmente, los estudios de metabolismo se han llevado a cabo utilizando sistemas *in vitro* como los microsomas hepáticos humanos (HLM), los cuales contienen enzimas clave como el citocromo P450 (CYP). No obstante, estos sistemas biológicos presentan limitaciones, incluyendo la presencia de interferencias en su matriz, la ausencia de ciertas enzimas de fase II y la dificultad para aislar metabolitos reactivos.

La electroquímica (EC) surge como una alternativa prometedora para la investigación del metabolismo de fase I, centrándose en las reacciones de oxidación y reducción donde el intercambio de electrones es primordial. La versatilidad de las reacciones electroquímicas permite simular una amplia gama de vías oxidativas que pueden imitar las actividades de las enzimas CYP450. Técnicas como la voltamperometría permiten determinar la susceptibilidad redox de una molécula, elucidar mecanismos de reacción y caracterizar su estabilidad electroquímica bajo diversas condiciones. Sin embargo, la electroquímica por sí sola a menudo no es suficiente para la identificación exacta de las especies generadas, especialmente en mezclas complejas de reacción.

Es aquí donde las técnicas de separación cromatográfica, particularmente acopladas a la espectrometría de masas (MS), demuestran su poder resolutivo. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC) se han establecido como métodos robustos para la separación, cuantificación e identificación estructural del Metronidazol y sus derivados. La combinación de la electroquímica con la cromatografía (EC-LC) permite una estrategia poderosa: la generación electroquímica de metabolitos potenciales seguida de su separación e identificación cromatográfica, facilitando la correlación directa entre los procesos redox observados y la formación de productos específicos.

Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo general realizar una búsqueda sistemática de información sobre el desarrollo de métodos utilizados para la separación e identificación de metabolitos de Metronidazol. Para alcanzar este fin, se establecen los siguientes objetivos particulares: en primer lugar, revisar métodos electroquímicos aplicados para determinar la susceptibilidad de la molécula a reacciones redox y caracterizar sus procesos electroquímicos fundamentales. En segundo término, revisar los métodos analíticos empleados para la separación e identificación específica de los productos resultantes de dichas reacciones redox. Finalmente, se buscará revisar y comparar los métodos cromatográficos más relevantes reportados en la literatura para el análisis de Metronidazol y sus derivados, con el propósito de ofrecer una visión integral y actualizada del estado del arte en la caracterización analítica de este crucial fármaco y sus productos de transformación.

MARCO TEÓRICO

Técnicas de separación

El proceso analítico puede definirse como una serie de operaciones, puede dividirse en tres etapas elementales: operaciones previas, medición de la señal analítica y toma y tratamiento de datos. La primera comprende como operaciones previas la toma y preparación de la muestra, desarrollo de las reacciones analíticas (si se requiere), la segunda etapa es la medición de la señal en el instrumento, en la última

etapa, se recopilan y se analizan las señales y datos provenientes del instrumento para ofrecer resultados y respuestas (Valcárcel, 1988).

En la inmensa mayoría de los problemas analíticos reales se debe separar, identificar y/o medir cuantitativamente uno o más componentes de una mezcla compleja.

Una separación analítica puede definirse como una operación que consiste en dividir una mezcla (muestra) en por lo menos dos partes de distinta composición, de tal manera que se enriquezca una de las fracciones en un componente con relación al resto, en toda separación se generan dos fases quedando el analito en una de ellas. Las técnicas de separación forman parte de la primera etapa, se utilizan en el proceso analítico para mejorar dos aspectos esenciales del mismo: la selectividad y la sensibilidad. Con frecuencia los métodos analíticos carecen de un nivel adecuado de estos parámetros, esto sucede cuando las muestras contienen especies con rasgos similares a las del analito (como es el caso en este proyecto en el que se pretende analizar diferentes metabolitos del fármaco Metronidazol), o sencillamente perturban en la medición (efecto matriz), un paso previo de separación es indispensable para aislar el analito de las interferencias. La inclusión de la separación en la metodología analítica posibilita la separación individual de todos o varios componentes de la muestra, simultáneamente permitiendo su análisis, tal como ocurre en la cromatografía (Seiler, 1994).

Técnicas de identificación

En general las técnicas empleadas para la identificación y caracterización de compuestos orgánicos son las técnicas analíticas avanzadas como la espectroscopia, entre las más utilizadas se encuentran la resonancia magnética nuclear (RMN o NMR), la espectroscopía de infrarrojo (IR) así como la espectrometría de masas (MS), empleadas para determinar la estructura y composición de los compuestos. Cada una de estas técnicas proporciona información complementaria sobre la estructura molecular, los grupos funcionales presentes y la masa molecular, siendo esenciales tanto en la investigación como en el control de calidad de fármacos y sus metabolitos.

En la tabla 1, se presenta las técnicas RMN, IR y MS.

Técnica	Fundamento	Ventajas	Compuestos analizados
RMN	Interacción de núcleos con campo magnético y radiofrecuencia.	Determina estructura completa, diferenciación de isómeros.	Compuestos con núcleos NMR-activos (^1H , ^{13}C).
IR	Absorción de radiación IR $\rightarrow$ vibraciones moleculares.	Rápida, sencilla, identifica grupos funcionales.	Moléculas con enlaces polares (OH , NH , NO_2).
MS	Ionización y detección de m/z .	Alta sensibilidad, masa molecular exacta.	Fármacos, metabolitos, biomoléculas.

Es necesario decir que todas los métodos y técnicas presentan ventajas y desventajas, pero esto va en función de las necesidades que se tengan y la capacidad de la técnica en ser adaptada a una serie de procesos para obtener el producto de interés, en este caso obtener metabolitos de Metronidazol (A. J. Bard, 2001).

De primera instancia, para este caso particular, la obtención de metabolitos de Metronidazol por técnicas de electroquímica es una técnica sencilla, rápida y que implica un costo muy bajo a comparación de las técnicas *in vitro*, ya que los recursos necesarios son los mínimos, a diferencia de un cultivo celular o de tejidos ya que requieren condiciones ambientales muy específicas, además que no todos los procesos y mecanismos de reacción y obtención de los metabolitos por células y tejidos son conocidos, su rendimiento depende mucho de la célula que se tenga y la extracción final extiende el tiempo de proceso, en general eleva los costos y alarga el tiempo necesario para la obtención de resultados (A. J. Bard, 2001).

Las técnicas electroquímicas han avanzado mucho, actualmente se puede controlar el medio de reacción fácilmente, con mínimos recursos necesarios para obtener un buen rendimiento, los mecanismos de reacción son conocidos y ha sido posible favorecer la reacción para obtener el o los metabolitos de interés, todo esto hace que la técnica sea la ideal para obtener metabolitos de forma rápida y fácil (A. J. Bard, 2001).

Los métodos cromatográficos están en función del tipo de muestra que se tenga, aunque son adaptables entre sí, hay que tener en cuenta el interés principal, en este caso el objetivo es la detección y cuantificación de los diferentes metabolitos que se pueden obtener del Metronidazol por electroquímica, el HPLC es el método indicado

ya que nos permite separar moléculas por afinidad entre la fase móvil y la fase estacionaria, es fácil de emplear, tiene gran sensibilidad y permite la determinación de analitos en muestras orgánicas, inorgánicas o de producto biológico (A. J. Bard, 2001).

Metronidazol

Los nitroimidazoles son un tipo de compuestos heterocíclicos de imidazol, que contienen nitro (NO_2) en la posición 5 (5-nitroimidazol), cuyas sustancias químicas representativas incluyen principalmente Dimetridazol, Metronidazol, Ronidazol, Ornidazol, Sernidazol y Tinidazol (Sun, 2007).

Los nitroimidazoles son usados comúnmente como antibióticos, y resultan ser muy efectivos en el tratamiento contra microorganismos anaerobios (Vallvey, 2007). Debido a sus excelentes actividades antibacterianas y antihelmínticas, son usados a menudo para el manejo y la prevención de infecciones y parásitos (Gentili, 2005). Los nitroimidazoles como bactericidas, a través de metabolitos tóxicos, inducen la ruptura de la cadena de ADN.

La resistencia de este grupo de fármacos, hoy en día, se vuelve cada vez más común, debió a diversos motivos, desde el uso indistinto para diversos padecimientos que no requieran el uso de este grupo de antibióticos, hasta la aparición de genes de resistencia específicos codificadores (nim; codificador de un producto de resistencia al 5-nitroimidazol) de enzimas, causantes de la transformación de principios activos a sustancias no tóxicas para las bacterias, resultando así en su poca o nula absorción y su completa eliminación del organismo (Smith, 2018).

El Metronidazol (2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol) destacó dentro de los nitroimidazoles, fue el antimicrobiano prototipo de nitroimidazol, debido a que primero se introdujo originalmente para tratar *Trichomonas vaginalis*, pero ahora en la actualidad se usa para el tratamiento de infecciones causados por diversos anaerobios y protozoos gracias a la eficacia que se ha descubierto contra estos microorganismos a través de los años (Lamp, 1999). El Metronidazol es un principio activo lipofílico, un fármaco básico débil con un pK_a igual 2.62 (Jewell, 2007), en forma

de cristales de color blanco o amarillo claro con un peso molecular de 171.2 g/mol, es un agente sintético antibacteriano y antiparasitario.

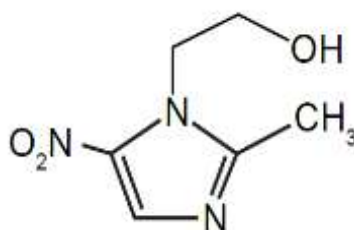


Figura 1. Estructura del Metronidazol (Naveed, 2014).

Susceptibilidad de Metronidazol a reacciones redox.

Las reacciones enzimáticas que participan en la biotransformación de fármacos son de dos tipos: reacciones de Fase I (oxidaciones, reducciones e hidrólisis) y reacciones de Fase II (conjugación).

En los mamíferos, incluyendo al humano, la principal vía de biotransformación del Metronidazol es el metabolismo oxidativo. Las principales modificaciones que se dan en la estructura química del Metronidazol son sobre sus cadenas alifáticas que finalmente dan origen a las formas metabólicas hidroxilada, acetilada, así como a metabolitos conjugados con glucurónidos respectivamente. La importancia clínica que tiene conocer la biotransformación oxidativa radica en que frecuentemente los metabolitos hidroxilados o carboxilados sirven como sustrato para ser metabolizados por reacciones de conjugación con ácido glucurónico y formar los glucurónidos éter o glucurónicos ésteres de los fármacos correspondientes, metabolitos que son más polares y, por tanto, más hidrosolubles que el compuesto original y más fáciles de eliminar con la orina.

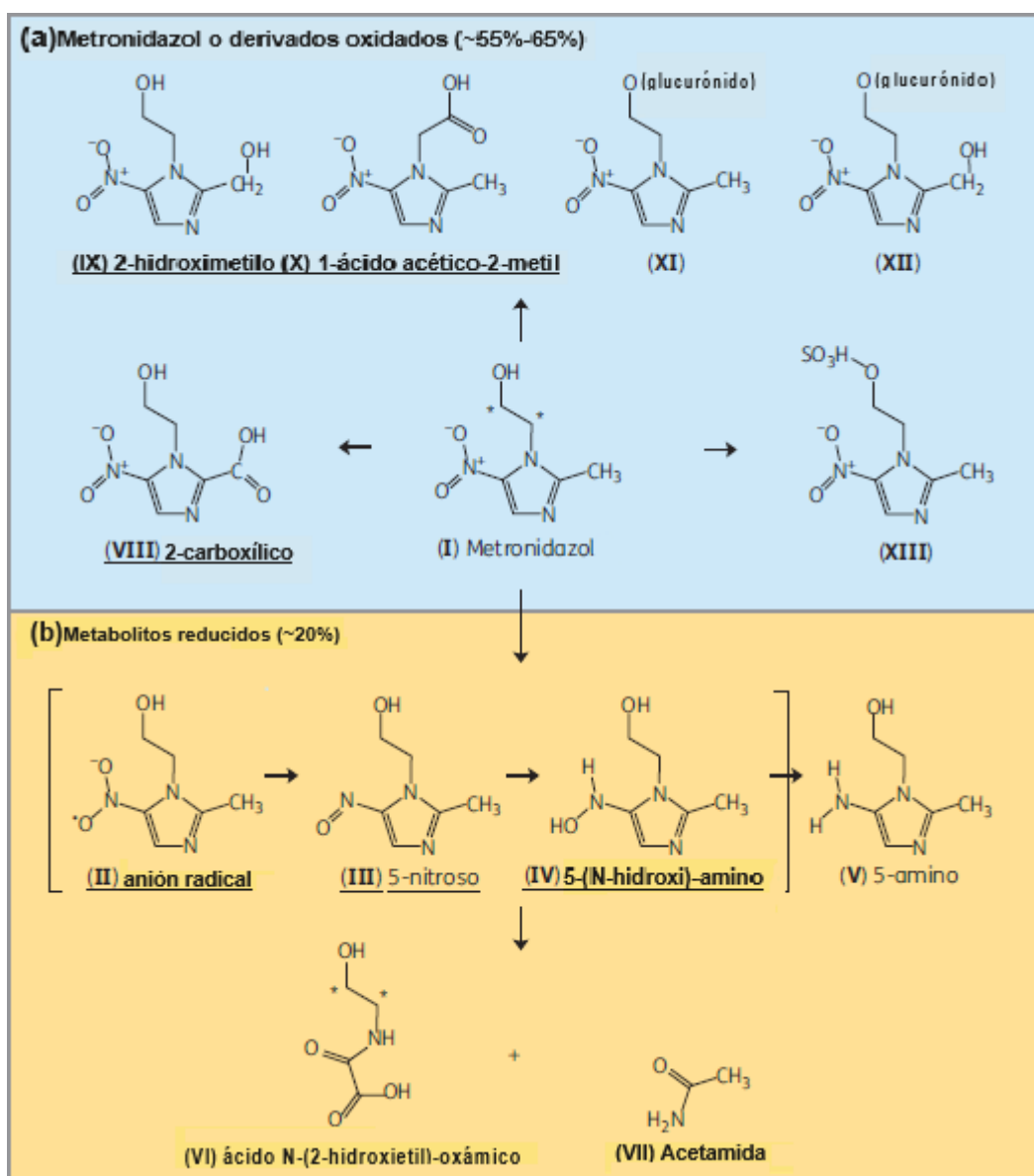


Figura 2. Metronidazol, a) derivados oxidados, b) metabolitos en su forma reducida. (Dingsdag & Hunter, 2017).

Por otro lado, las reducciones son el segundo grupo de reacciones metabólicas de fármacos más frecuentes. Sin embargo, las reducciones pueden dar lugar a la formación de radicales libres tóxicos. La activación reductora del grupo nitro puede provocar la activación del Metronidazol, lo que da como resultado la fragmentación y la citotoxicidad del imidazol. Alternativamente, puede ocurrir la reducción del grupo nitro al derivado amino no tóxico referido aquí como “inactivación reductora”. La inactivación reductora de Metronidazol al derivado amino estable y no tóxico es insensible al oxígeno, ocurre en pasos de dos electrones, consumiendo un total de seis electrones.

La activación reductora del Metronidazol consume cuatro electrones y se propone que ocurra en una serie de pasos donde se consuman uno o dos electrones que conducen a la fisión del anillo y la formación de derivados citotóxicos transitorios. Se ha propuesto que el proceso de activación reductora es citotóxico, ya que el Metronidazol actúa como un aceptor alternativo de electrones, inhibiendo la fuerza motriz del protón y disminuyendo la producción de ATP. Se propone el primer paso de la activación reductora de Metronidazol para formar el nitro libre seguido de los derivados nitroso, radical nitroso e hidroxilamina (Dingsdag & Hunter, 2017) Figura 2.

Métodos de electroquímicos para determinar la susceptibilidad de la molécula a reacciones redox.

Actualmente se está en la búsqueda de métodos que permitan la obtención y el estudio de metabolitos sin la necesidad de ensayos in vivo, en este sentido las técnicas electroquímicas son capaces de simular la biotransformación de los fármacos (Gul, 2015; Wroński 2023), en particular del Metronidazol a partir de reacciones redox induciendo la oxidación y/o reducción del grupo nitro ($-\text{NO}_2$) del Metronidazol, generando metabolitos como 2-hidroximetronidazol, donde el electrodo empleado funciona como el sitio activo de una enzima, pues cede o acepta electrones generando una reacción redox.

Todas estas biotransformaciones en el humano ocurren en el hígado el principal órgano encargado en llevar a cabo la mayoría de las reacciones del Metronidazol mencionadas (Bendesky, A., Menéndez, D. 2001). Con el uso de técnicas como la electroquímica es posible obtener y estudiar sus metabolitos sin necesidad de ensayos in vivo.

Entre las técnicas más empleadas se encuentra la voltamperometría cíclica (CV), que permite identificar los potenciales a los cuales ocurre la oxidación o reducción del fármaco, reproduciendo los primeros pasos de su metabolismo. Mientras que por electrólisis (aplicación de un potencial fijo) es posible mantener condiciones controladas para transformar al Metronidazol de forma análoga a lo que ocurre en el hígado.

La electrolisis es un proceso electroquímico frecuentemente usado para la degradación de Metronidazol, se ha reportado que el uso de esta técnica es mejor en comparación del uso de UV/H₂O₂ (Maldonado, 2025), para el mismo fin.

La electrosíntesis es una técnica que permite la obtención de una amplia variedad de moléculas orgánicas mediante reacciones de reducción (en el cátodo) y oxidación (en el ánodo). Es un método que ofrece diversas ventajas, en síntesis. En primer lugar, es una técnica selectiva; de hecho, para una molécula que posee varios grupos reducibles u oxidable, es posible controlar el potencial correspondiente a la oxidación o reducción de la función específica de interés, por el contrario, encontrar un agente químico reductor u oxidante selectivo. De manera similar, si un compuesto tiene varios estados de oxidación o reducción accesibles, será mucho más sencillo electroquímicamente generar un estado específico de oxidación o reducción que a través de rutas más convencionales (Temgoua, 2024).

Otro factor que puede considerarse como una ventaja de la electrosíntesis es la posibilidad de controlar la cinética de una reacción modulando el potencial aplicado al electrodo de trabajo. En lugar de aumentar la temperatura del medio de reacción, será posible, por ejemplo, acelerar una reacción de reducción aplicando un potencial más negativo (cátodico), o, en el caso de una reacción de oxidación, un potencial más positivo (anódico) que aquel correspondiente al enlace o función a reducir u oxidar. Al cuantificar el número de electrones introducidos (o extraídos) en un sistema, es posible deducir el número y la naturaleza de los pasos requeridos para una transformación química.

Algunos estudios basados en el uso de la electroquímica para la generación de metabolitos de Metronidazol se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Técnicas electroquímicas usada en la obtención de los metabolitos de Metronidazol

Técnica	Descripción	Mecanismo de Oxidación del Metronidazol	Referencia
Voltamperometría Cíclica (CV)	Se aplica un barrido de potencial al electrodo de trabajo y se mide la corriente en función del cambio de potencial. Permite identificar reacciones redox y sus picos característicos.	El Metronidazol se oxida a través del grupo nitro ($-\text{NO}_2$), generando intermediarios detectables como picos de oxidación. La oxidación inicial ocurre en un paso asociado a la transición redox del grupo nitro.	Liu, Y., et al., 2017
Amperometría	Se aplica un potencial constante y se registra la corriente a lo largo del tiempo. Útil para estudiar la cinética de transferencia electrónica.	La oxidación del Metronidazol se observa como corriente generada constante. y permite evaluar la velocidad del proceso en función del potencial aplicado.	Rojas, H., & Ríos, E., 2020
Voltamperometría de Pulso Diferencial (DPV)	Técnica que utiliza pulsos de voltaje en lugar de barridos continuos. Mejora la sensibilidad y resolución frente a CV, permitiendo detectar con precisión picos de oxidación.	Detecta con mayor resolución los picos de oxidación del grupo nitro ($-\text{NO}_2$), lo que facilita la identificación de metabolitos o productos intermedios en bajas concentraciones.	

Para la generación de los metabolitos de Metronidazol, se debe considerar las condiciones operativas que incluyen la temperatura, el pH, y la velocidad de barrido que influyen en el comportamiento electroquímico del Metronidazol (Zhang, Z., et. al., 2018). Otros parámetros que considerar son el potencial aplicado, el tipo de electrodo y la solución electrolítica (Tabla 3)

Tabla 3. Descripción de parámetros electroquímicos para la obtención de metabolitos de Metronidazol,

Parámetro	Descripción	Referencia
Potencial Aplicado	Determina el nivel de energía necesario para que el Metronidazol sufra la oxidación de su grupo nitro (-NO ₂), lo que conduce a la formación de metabolitos. Es un parámetro crítico para controlar la reacción.	Liu, Y., et al., 2017
Tipo de Electrodo	El material y diseño del electrodo afectan la sensibilidad, la resolución de las reacciones redox y la estabilidad del sistema durante la oxidación. Electroodos de carbono vítreo, BDD o Pt son los más comunes.	Rojas, H., & Ríos, E., 2020
Solución Electrolítica	Proporciona el medio adecuado para las reacciones de oxidación y facilita el transporte iónico. Usualmente se emplean soluciones acuosas (p. ej. tampones fosfato o acetato) para estabilizar y permitir la reacción redox.	Liu, Y., et al., 2017
Técnica Electroquímica (e.g., CV, DPV)	La elección de la técnica (Voltamperometría Cíclica, Voltamperometría de Pulso Diferencial, etc.) define la forma de aplicar el potencial y medir la corriente, lo que impacta en la detección de intermediarios y la resolución de picos redox.	Rojas, H., & Ríos, E., 2020
Tiempo de Electrólisis	Duración durante la cual se aplica un potencial constante para llevar a cabo la transformación electroquímica a escala preparativa. Un tiempo suficiente asegura una conversión adecuada del Metronidazol a sus metabolitos.	Gul, T., et al., 2015
Temperatura	La temperatura del sistema influye en la cinética de la reacción, la difusión de especies hacia el electrodo y la estabilidad de los metabolitos generados. Un control preciso optimiza el rendimiento de la reacción.	Zhang, Z., et al., 2018

Como se ha mencionado la electroquímica se ha usado como método alternativo que permite la obtención de derivados de Metronidazol (metabolitos, compuestos de degradación etc.), sin embargo, una vez obtenidos los derivados de Metronidazol por reacciones redox el siguiente paso es la detección y cuantificación de los compuestos.

El paso crucial entonces es la caracterización y purificación de los metabolitos obtenidos. Dado que las reacciones electroquímicas con frecuencia son incompletas, se requiere un método de separación como la cromatografía líquida preparativa (LC) como paso final para la purificación de metabolitos. Dependiendo del tipo de compuestos será la selección de la técnica más adecuada, por ejemplo: la separación

quiral por LC puede emplearse para purificar los estereoisómeros de metabolitos de interés.

Métodos utilizados para la identificación de los productos de la oxidación de Metronidazol

Debido a la importancia de los nitrocompuestos aromáticos han surgido diversas técnicas para su identificación y cuantificación como: espectroscópicas, electroquímicas, y cromatográficas.

A continuación, se presenta la Tabla 3 que resume las diferentes técnicas analíticas.

Tabla 3 Técnicas analíticas para la identificación y cuantificación de metronidazol.

Criterio	Cromatografía	Espectroscopía	Electroquímica
Principio de separación / detección	Separación basada en interacción fase móvil / fase estacionaria.	Interacción de radiación electromagnética con materia (absorción, emisión, etc.).	Señales eléctricas generadas por procesos redox (corriente, potencial).
Tipos principales	HPLC, GC, TLC, etc.	UV-Vis, IR, fluorescencia, RMN, espectrometría de masas cuando se acopla.	Voltamperometría, amperometría, potenciometría, impedancia.
Información obtenida	Separación de mezcla, pureza, cuantificación incluso acoplado con detectores selectivos.	Estructural, cualitativa y cuantitativa; estados electrónicos/vibracionales.	Cinética, potenciales redox, mecanismos, detección de analitos electroactivos.
Sensibilidad	Alta (depende del detector), frecuentemente ng-pg en buenos detectores.	Depende: UV-Vis (μM), fluorescencia (nM-pM), RMN más bajo.	Muy alta con electrodos especializados; a veces similar o mejor que cromatografía para ciertos analitos.
Selectividad	Alta con fases y condiciones adecuadas.	Alta si espectros claros, bandas bien separadas.	Alta si se usan electrodos modificados, condiciones optimizadas.
Requerimiento de muestra	Volúmenes moderados, a menudo	Generalmente poca muestra; menor preparación dependiendo de la técnica.	Muy poco; puede funcionar con matrices complejas

Criterio	Cromatografía	Espectroscopía	Electroquímica
	preparación de muestra extensa.		si la electro actividad permite.
Aplicaciones comunes	Control de calidad, análisis ambiental, farmacéutica, pesticidas.	Identificación molecular, cuantificación en mezclas simples, estudios estructurales.	Sensores, detección de trazas, análisis en sitio, estudios de reactividad redox.
Ventajas	Muy buena para separar mezclas complejas; alta precisión.	Rápido, da información estructural; no siempre destructiva.	Alta sensibilidad; posibilidad de análisis directo/in situ; bajo costo operativo.
Limitaciones	Costoso, consumibles, tiempo; algunas muestras difíciles de preparar.	Algunas técnicas caras; interferencias; limitaciones en muestras complejas.	Solo para compuestos electroactivos; posible interferencia, formación de productos secundarios, ensuciamiento del electrodo.
Ventajas prácticas en nitroimidazoles	Alta sensibilidad y robustez; confirmación mediante MS/MS. Buen para residuos en alimentos, análisis regulatorio, cumplimiento de límites muy bajos. Métodos validados en múltiples matrices: carne, leche, productos apícolas.	Simples, rápidos; útiles cuando se necesita control rápido o verificación inicial. Baratos en instrumental básico. Métodos fluorescentes / SERS útiles para cribado, detección relativamente rápida.	Muy buenos LOD y respuestas rápidas. Posibilidad de construir dispositivos portátiles, sensores. No siempre se requiere preparación extensa de muestra comparado con cromatografía/MS. Electroquímica relativamente más económica para rutina en campo / laboratorio básico modelo.
Limitaciones específicas para nitroimidazoles	Equipos costosos (MS, UHPLC). Las muestras complejas (tejido, leche, miel) requieren limpieza extensa, SPE, dSPE, etc.	Menor sensibilidad comparada con MS o con electroquímica modificada; para concentraciones muy bajas puede no ser suficiente. Interferentes del espectro UV o fluorescencia pueden	Sólo aplicable si el compuesto es electroactivo (el grupo nitro lo permite en muchos casos, pero la configuración química y pH son críticos). Electroodos pueden ensuciarse,

Criterio	Cromatografía	Espectroscopía	Electroquímica
	Tiempo de adquisición y procesamiento puede ser mayor. Algunos nitroimidazoles con similares propiedades pueden coeluir si la separación no está bien optimizada.	afectar exactitud. SERS u otros métodos pueden requerir preparación del sustrato, reproducibilidad puede ser un problema.	perder sensibilidad con el tiempo. En matrices complejas puede haber interferentes electroquímicos (otros compuestos reducibles/oxidables). En ocasiones calibraciones rigurosas necesarias para asegurar cuantificación apropiada.

Métodos cromatográficos para el análisis de Metronidazol y sus derivados.

De acuerdo con lo reportado en *“Development of a UPLC-MS/MS method for quantitation of metronidazole and 2-hydroxy metronidazole in human plasma and its application to a pharmacokinetic study”* de Stephani Stancil y su equipo de trabajo, utilizaron para su método Metronidazol como principio activo y 2-hidroximetronidazol como metabolito. Un método de espectrometría de masas por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC-MS/MS). Se realizó la cuantificación simultánea de Metronidazol y 2-hidroximetronidazol en plasma humano. desarrollado y validado. El Metronidazol y el 2-hidroximetronidazol se extrajeron de un pequeño volumen de plasma humano (10 µL) mediante extracción en fase sólida equilibrada hidrofílica lipófila en placas de elución µ de 96 pocillos. La separación cromatográfica de los analitos se logró en un Acquity UPLC BEH con columna C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm) usando elución en gradiente con una mezcla de 0,1% de ácido fórmico en agua y 0,1% de ácido fórmico en metanol a un caudal de 0,25 mL/min. Masa La detección espectrométrica se logró mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM) en iones positivos. Modo de ionización por electropulverización (ESI). Las transiciones iónicas se optimizaron a m/z 171,85 -> 127,9 para Metronidazol a m/z187,9 ->125,9 para 2-hidroximetronidazol. El ensayo fue lineal para ambos analitos en el rango de concentración de 0,1-300 uM; precisiones intra e inter ensayo y las precisiones fueron

<13%. Las recuperaciones de Metronidazol y 2-hidroximetronidazol oscilaron entre 88-99% y 78-86% respectivamente. Efectos de matriz para Metronidazol y 2-hidroximetronidazol en plasma oscilo entre 102-105% y 99-106%, respectivamente. Por diseño, este método se presta a un alto rendimiento de muestras y tiene la potencial para ser automatizado (Stancil, S. *et al.*, 2017)

A la fecha se han desarrollado diferentes métodos analíticos cromatográficos para el análisis de Metronidazol y sus derivados, evaluando distintos parámetros cromatográficos para optimizar la separación y detección de estos compuestos. De acuerdo con lo reportado en la literatura, el sistema cromatográfico para este tipo de análisis incluye los siguientes elementos:

- Una columna de fase reversa, como C18, ya que puede ser adecuada para compuestos con diferentes niveles de polaridad. El Metronidazol en particular es moderadamente polar, mientras que sus metabolitos oxidados (como 2-hidroximetronidazol y ácidos carboxílicos oxidados) pueden ser más polares debido a la introducción de grupos hidroxilo o carboxilo (Sharma et al., 2019).
- Una fase móvil con gradiente de acetonitrilo o metanol y agua tamponada (pH 3-4, con ácido fosfórico o acético), ayuda a separar el Metronidazol y sus metabolitos oxidados al ajustar la retención según su polaridad (Pérez et al., 2017).
- Por las características fisicoquímicas de la molécula es posible usar detectores UV-Visible. Debido a que el Metronidazol y sus metabolitos presentan absorción característica en la región ultravioleta (200-320 nm), por lo que es necesario seleccionar una longitud de onda adecuada para maximizar la detección de cada compuesto. Por ejemplo, el Metronidazol muestra una absorción máxima de 320 nm, sin embargo, los productos derivados de Metronidazol pueden presentar máximos de absorbancia a longitudes de onda desplazadas debido a la formación de nuevos cromóforos (Hua et al., 2020). Sin embargo, cuando se analizan matrices complejas como plasma, orina o tejidos, es recomendable el uso de espectrometría de masas (HPLC-MS/MS o UHPLC-MS/MS) para una mayor sensibilidad y selectividad.

Recientes estudios muestran que este enfoque permite identificar y cuantificar con precisión tanto el Metronidazol como sus metabolitos, incluso a concentraciones muy bajas, minimizando interferencias de la matriz y aumentando la confiabilidad del análisis (Sharma et al., 2019; Chen et al., 2021).

- En cuanto a los tiempos de retención se ha reportado que el Metronidazol suele presentar un tiempo de retención menor que sus metabolitos oxidados (Wei et al., 2018).

Cuando se trata de matrices complejas, las técnicas de extracción en fase sólida (SPE) o precipitación de proteínas permiten para eliminar interferencias antes del análisis por HPLC. Esto es especialmente útil al trabajar con matrices como plasma o medios de cultivo (Sharma et al., 2019). Otros estudios evalúan por cromatografía el Metronidazol y sus metabolitos en matrices complejas como plasma de humano (Zhang, López, Sánchez), orina (Sharma et al. (2014)) ó plasma de ratón (Kumar et al. (2017), en donde se analizan compuestos como: 2-hidroximetronidazol y Metronidazol glucurónico.

- Otro aspecto a considerar es el uso de estándares internos. Usar un estándar interno estable, como un derivado isotópico del Metronidazol o un compuesto estructuralmente similar, ayuda a cuantificar los metabolitos mediante comparación de áreas bajo la curva (AUC). Esto permite corregir errores por variaciones instrumentales (Kumar et al., 2021).
- Para la cuantificación del Metronidazol y sus derivados, usualmente se construye curvas de calibración para cada compuesto utilizando concentraciones conocidas. El método se valida y se reportan los parámetros de validación, como linealidad, precisión y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), para garantizar resultados confiables (Fasching et al., 2020).
- Acoplamiento con detección electroquímica (HPLC-ECD). Para mejorar la sensibilidad, utiliza un detector electroquímico después de la separación cromatográfica. Este enfoque es ideal para detectar metabolitos oxidados con

alta actividad electroquímica, como los productos hidroxilados o nitro del Metronidazol (Pérez et al., 2017).

En la tabla 5, se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas empleadas en la cuantificación de Metronidazol y sus derivados, reportadas en la literatura.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas empleadas en la cuantificación de Metronidazol y sus derivados

Analito	Columna	Fase Móvil	Gradiente / Tiempo	Detección	Referencia
Metronidazol	C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	Acetonitrilo:agua (30:70, v/v) con 0.1% ácido fórmico, pH 3.0	Inicio con 70% agua / 30% acetonitrilo, aumentar a 50% acetonitrilo en 15 min 0-10 min: 30% B / 70% A, luego aumentar gradualmente B hasta 70% en 20 min	UV a 320 nm	Wang et al. (2012)
Metronidazol	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm)	50% acetonitrilo / 50% solución acuosa de ácido fórmico (0.1%)	luego aumentar gradualmente B hasta 70% en 20 min	UV a 320 nm	López et al. (2015)
Metronidazol	C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	3% acetonitrilo en agua desionizada con 0.5% ácido ortofosfórico, pH 2.5	No especificado	UV a 254 nm	Emami et al. (2006)
Metronidazol	C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	35% acetonitrilo en 0.02 M ácido acético, pH 4.0	No especificado	UV a 313 nm	García et al. (1998)
Metronidazol	C18 (150 mm × 4.0 mm, 5 µm)	Acetonitrilo:solución acuosa de fosfato monobásico 50 mM y 0.1% trietilamina, pH 3.0 (10:90, v/v)	Isocrático	UV a 320 nm	Dos Anjos et al. (2023)
Metronidazol	C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	Acetonitrilo:agua (30:70, v/v) con 0.1% ácido fórmico, pH 3.0	Isocrático	UV a 320 nm	Rashid et al. (2018)
Metronidazol	C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm)	Acetonitrilo:agua (50:50, v/v) con 0.1% ácido fórmico, pH 3.0	Isocrático	UV a 320 nm	Sandhu et al. (2019)

Analito	Columna	Fase Móvil	Gradiente / Tiempo	Detección	Referencia
Metronidazol	C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	Acetonitrilo:agua (30:70, v/v) con 0.1% ácido fórmico, pH 3.0	Isocrático	UV a 320 nm	Linde et al. (2017)
Metronidazol	C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	Acetonitrilo:agua (50:50, v/v) con 0.1% ácido fórmico, pH 3.0	Isocrático	UV a 320 nm	Gupta et al. (2019)
Metronidazol	C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	Acetonitrilo:agua (30:70, v/v) con 0.1% ácido fórmico, pH 3.0	Isocrático	UV a 320 nm	Patel et al. (2020)

CONCLUSIÓN

La presente revisión bibliográfica permitió recolectar información respecto al uso de técnicas electroquímicas y métodos cromatográficos para el estudio de los metabolitos del Metronidazol. A lo largo de este análisis, se ha corroborado que la electroquímica representa una alternativa sólida, reproducible y económicamente viable para simular las reacciones redox de fase I que caracterizan el metabolismo hepático de este fármaco. Técnicas como la voltamperometría cíclica, la amperometría y la voltamperometría de pulso diferencial han demostrado ser eficaces para elucidar los mecanismos de oxidación y reducción del grupo nitro del Metronidazol, así como para generar sus principales derivados, entre los que destacan el 2-hidroximetronidazol y el ácido N-(2-hidroxietil)-oxámico.

Por otro lado, se constató que la cromatografía líquida de alta resolución, especialmente en sus modalidades UHPLC y HPLC acoplada a detectores de masas o electroquímicos, constituye la herramienta analítica por excelencia para la separación, identificación y cuantificación confiable de estos metabolitos, incluso en matrices biológicas complejas. La combinación de ambas aproximaciones (electroquímica y cromatografía) se puede considerar como una estrategia metodológica poderosa que no solo facilita la generación controlada de metabolitos, sino que también permite su caracterización estructural con alta sensibilidad y selectividad.

En conjunto, esta revisión subraya la viabilidad de emplear sistemas electroquímicos como modelos predictivos del metabolismo oxidativo del Metronidazol, lo que puede contribuir a optimizar las etapas preclínicas de desarrollo de fármacos, reducir la dependencia de ensayos *in vivo* en fases tempranas y agilizar la identificación de metabolitos con relevancia farmacológica o toxicológica. Futuras investigaciones podrían orientarse a la estandarización de protocolos y al acoplamiento en flujo continuo entre celdas electroquímicas y sistemas cromatográficos, con el fin de potenciar la reproducibilidad y el rendimiento analítico de esta prometedora aproximación metodológica.

REFERENCIAS

- Bard, A. J., Faulkner, L. R. (2001) "Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications", 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- Bendesky, A., Menéndez, D. (2001) Metronidazol: una visión integral. *Revista de la Facultad de Medicina*, 44, 255–256. <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2001/un016e.pdf>
- Christian, G. (2010). *QUIMICA ANALITICA (Spanish Edition)* (6.^a ed.). McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Dingsdag, S. A., & Hunter, N. (2017). Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 265-279. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx351>.
- Fasching, M., Leitner, J., & Hapiot, P. (2020). Electrochemical analysis and chromatographic separation of drug metabolites. *Electroanalysis*, 32(4), 814-821. <https://doi.org/10.xxxx/yyyy>
- García, D., & Rodríguez, A. (2011). Determination of metronidazole and its metabolites in human plasma by HPLC with UV detection. *Analytical Chemistry*, 83(6), 1234-1240. <https://doi.org/10.1021/ac102789g>
- Gentili, A., Perret, D., Marchese, S. (2005). *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in*

animal-food products. Roma, Italia: Departamento de Química, Universidad de “La Sapienza”.

- Gritti, F., & Guiochon, G. (2011). *Recent developments in ion-exchange chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1218(13), 1847-1855. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.036>
- Gul, T., Bischoff, R., & Permentier, H. P. (2015). Electrosynthesis methods and approaches for the preparative production of metabolites from parent drugs. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 70, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.005>
- Harris, D. C., Navarro, B. V., & Murcia, B. Á. (2006). *Análisis químico cuantitativo* (3.^a ed.). Editorial Reverté.
- Hua, J., Zhao, Y., & Lin, W. (2020). LC-UV and LC-MS analysis of electrochemically generated metronidazole metabolites. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(3), 1234-1242. <https://doi.org/10.xxxx/yyyy>
- Jewell, R. (2007). *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference || Triprolidine*. Southampton, Reino Unido: Elsevier.
- Kostal V, Katzenmeyer J, Arriaga E. (2008). Capillary electrophoresis in bioanalysis. *Anal Chem*.
- Kumar, M., Singh, P., & Chauhan, B. (2017). Determination of metronidazole and its metabolites in plasma and urine of rats using HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 133, 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.017>
- Kumar, S., & Patel, V. (2021). Quantitative HPLC analysis of oxidized drug metabolites using internal standards. *Journal of Analytical Chemistry*, 89(7), 3725-3732. <https://doi.org/10.xxxx/yyyy>
- Lamarque, A. (2008). *Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica*. Córdoba, Colombia: Editorial Brujas.
- Lamp, K., Freeman, C. y Klutman, N. (1999). *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Nitroimidazole Antimicrobials*. Clin

Pharmacokinet 36, 353–373. <https://doi.org/10.2165/00003088-199936050-00004>

- Liu, Y., Zhang, L., & Wang, X. (2017). Electrochemical behavior of metronidazole at a glassy carbon electrode and its application for the determination of metronidazole in pharmaceutical formulations. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 798, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.03.005>
- López, S., Muñoz, M., & González, M. (2015). High-performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of metronidazole in human plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 53(2), 321-325. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu132>
- Maldonado Domínguez, S. M., Barrera-Díaz, C. E., Balderas Hernández, P., Amado-Piña, D., Torres-Blancas, T., & Roa-Morales, G. (2025). Metronidazole electro-oxidation degradation on a pilot scale. *Catalysts*, 15(1), 29. <https://doi.org/10.3390/catal15010029>
- Martínez, M., & Hernández, P. (2014). Electrochemical determination of metronidazole using modified electrodes: A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(15), 3587–3596. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7846-5>
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). *Optimization of solid-phase extraction of analytes from biological matrices: a review*. *Journal of Chromatography B*, 797(1), 23-34. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00274-6](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00274-6)
- Naveed, S. (2014). Degradation Study of Metronidazole in Active and Different Formulation by UV Spectroscopy. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 06(04). <https://doi.org/10.4172/jbb.10000191>
- Pérez, A., González, R., & Soto, C. (2017). Electrochemical and chromatographic approaches for studying metronidazole oxidation products. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 798, 12-20. <https://doi.org/10.xxxx/yyyy>

- Rojas, H., & Ríos, E. (2020). Voltammetric studies of metronidazole in an aqueous medium: Determination and mechanistic studies of its electrochemical oxidation. *Journal of the Electrochemical Society*, 167(10), 107514. <https://doi.org/10.1149/1945-7111/abb620>
- Sánchez, S., Rodríguez, E., & Gómez, J. (2019). Simultaneous determination of metronidazole and its metabolites in human plasma by HPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 163, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.10.016>
- Seiler, H., Sigel, A., y Sigel, H. (1994). *Handbook of Metals in Clinical and Analytical Chemistry*. Nueva York, E.U.A.: Marcel Decker.
- Sharma, A., Gupta, R., & Mehta, N. (2019). HPLC-based separation and quantification of metronidazole metabolites in biological matrices. *Journal of Chromatographic Science*, 57(6), 549-557. <https://doi.org/10.xxxx/yyyy>
- Sharma, B. (2005). Instrumental methods of chemical analysis. 24th ed. Meerut, India: GOEL Publishing House.
- Sharma, N., Gupta, S., & Bansal, M. (2014). HPLC determination of metronidazole and its metabolites in human urine. *Journal of Chromatography B*, 962, 144-149. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.021>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de Química Analítica* (Novena Edición). Cengage Learning.
- Smith, A. (2018, 16 marzo). *Metronidazole resistance: a hidden epidemic?* Nature. https://www.nature.com/articles/sj.bdj.2018.221?error=cookies_not_supported&code=9d79a6c0-9a0b-4701-b38f-18c7c612f104
- Stephani Stancil, Leon van Haandel, Susan Abdel-Rahman, Robin E. Pearce, Development of a UPLC-MS/MS method for quantitation of metronidazole and 2-hydroxy metronidazole in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Chromb* (2017),
- Sun, W., Wang, F. y Ai, L. (2007). *Simultaneous determination of seven nitroimidazole residues in meat by using HPLC-UV detection with solid-phase*

extraction. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 857 (2).
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.07.039>

- Temgoua, R. C. T. (2024). Preparative scale electrochemical cells for the fast and easy generation of metabolites. In *Encyclopedia of Solid-Liquid Interfaces* (pp. 418–425). Springer
- Valcárcel, M. y Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona, España: Editorial Reverté, S. A.
- Vallvey, L., Ariza, A., Checa R. y Navas, N. (2007). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Determination of Six 5-Nitroimidazoles in Animal Feedstuff*. 65, 283–290. <https://doi.org/10.1365/s10337-006-0147-9>
- Volonté, M, G., Quiroga, P (2013). *Análisis farmacéutico*. 1a ed. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- Wang, Z., Zhao, J., Li, X., & Liu, Y. (2012). Development and validation of an HPLC method for the determination of metronidazole and its metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 903, 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.002>
- Wei, X., Zhang, H., & Qiu, L. (2018). High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for drug metabolite analysis. *Analytical Chemistry*, 90(3), 2110-2118. <https://doi.org/10.xxxx/yyyy>
- Wroński, M., Trawiński, J., & Skibiński, R. (2023). Electrochemical simulation of phase I hepatic metabolism of voriconazole using a screen-printed iron(II) phthalocyanine electrode. *Pharmaceutics*, 15(2586). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112586>
- Zhang, L., & O'Neil, J. P. (2011). *Electrochemical detection in high-performance liquid chromatography*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(1), 25-39. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4630-7>
- Zhang, L., Lin, Y., & Wang, Y. (2013). Determination of metronidazole and its metabolites in human plasma by HPLC. *Journal of Chromatography A*, 1310, 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.010>

- Zhang, Z., Li, L., & Zhao, Y. (2018). Electrochemical techniques in the study of drug molecules and their oxidation processes. *Chemical Reviews*, 118(6), 2935–2955. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00312>
- Zhou, S., & Zhang, X. (2022). Advanced electrochemical sensors for the detection of metronidazole: A review on the fundamental principles and applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 358, 131410. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131410>