



**Casa abierta al tiempo**

**Evaluación cuantitativa de metronidazol en formas farmacéuticas empleando un método electroquímico**

**Proyecto genérico: Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico, biológico y o microbiológico de productos relacionados con la salud**

**Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**

**Alumno: Carlos Esteban Rodríguez Cortes**

**Matrícula: 2173028747**

Vo. Bo. De los asesores con respecto a los contenidos académicos.

*Georgina Alarcón Angeles.*

-  
Dra. Georgina Alarcón Angeles  
No Eco. 34432

-  
Dr. Martín Gómez Hernández  
No Eco. 30642

# Indice

1 Justificación.....	3
2 Objetivos.....	4
3 Antecedentes.....	5
4 Marco teórico.....	7
5 Material y reactivos.....	23
6 Aparatos.....	24
7 Metodología.....	25
8 Resultados y discusión.....	31
9 Conclusión.....	40
10 Bibliografía.....	41
11 Anexos.....	42

## 1 Justificación

El metronidazol o (1-( $\beta$ -hidroxietil (-2-metil-5-nitroimidazol) es un compuesto sintético derivado de la familia de los nitroimidazoles con actividad antibacteriana y anti protozoaria (National Center for Biotechnology Information, 2022). En la actualidad este medicamento es uno de los más eficaces para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias anaerobias tanto Gram negativas como positivas, y en el tratamiento de infecciones provocadas por protozoarios como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, también es útil en el tratamiento de la enfermedad de Crohn y en afecciones dérmicas como la rosácea, el acné vulgaris y la dermatitis perioral (Bendesky *et al.*, 2001).

A pesar de que sus efectos secundarios más comunes no son graves, se han encontrado en estudios en animales que algunos de sus metabolitos hidroxilados podrían ser carcinogénicos, aunque no hay suficiente evidencia de que esto suceda de igual manera en humanos. Debido a su amplio uso, es importante el monitoreo del metronidazol para asegurar la salud de las personas que lo utilizan (Yiliyasi Baikeli, 2020).

Existen múltiples métodos analíticos actualmente, con los cuales se pueden obtener resultados confiables, sin embargo, tienen algunas desventajas como el alto costo de los equipos y la complejidad para operarlos (Yosef Nicodimos, 2016). Los métodos electroquímicos debido a su bajo costo, alta sensibilidad y portabilidad son una alternativa a estos métodos. Por lo que es importante desarrollar estos

métodos para que se aumente su uso tanto en industria como en investigación (Yosef Nicodimos, 2016).

## 2 Objetivos

### 2.1 General

- Desarrollar un método electroquímico para la evaluación cuantitativa de metronidazol

### 2.2 Específicos

- Cuantificar el metronidazol de grado analítico por voltamperometría diferencial de pulso
- Evaluar el efecto del pH de la muestra en la cuantificación de metronidazol.
- Evaluar el efecto de variar el potencial aplicado en la detección de metronidazol.
- Validar el método electroanalítico.
- Aplicar el método voltamperométrico en la evaluación de metronidazol en formas farmacéuticas.

### 3 Antecedentes

El metronidazol fue desarrollado en 1960 con el objetivo de tratar las infecciones por *Trichomonas vaginalis* pero poco después se encontró que era efectivo en infecciones provocadas por protozoarios como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, es útil en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias anaerobias tanto Gram negativas como positivas, y en el tratamiento de la enfermedad de Crohn y en afecciones dérmicas como la rosácea, el acné vulgaris y la dermatitis perioral (Bendesky *et al.*, 2001).

Recientemente se ha reportado que el metronidazol tiene efectos genotóxicos, carcinogénicos y mutagénicos (Andrés Bendesky, 2002), esto en estudios hechos en animales, ya que se utiliza como un suplemento alimenticio a largo plazo, sin embargo, no existe suficiente información que indique que posee efectos carcinogénicos en humanos (David Love, 2017). Debido a estos datos, se buscó desarrollar un método analítico capaz de monitorear los niveles de este fármaco en lo utilizan a largo plazo, y que también sea capaz de detectar el metronidazol acumulado en el ambiente (P.F. Lanzky, 1997).

A lo largo de la última década se han tenido avances en el desarrollo de nuevas técnicas analíticas capaces de cuantificar metronidazol en diferentes muestras, tales como comida, medio ambiente, formas farmacéuticas, muestras biológicas; entre otras. Desafortunadamente la gran mayoría de estos métodos suelen ser muy caros, consumen mucho tiempo y no suelen ser amigables con el medio ambiente (S. Meenaskshi, 2021).

**Tabla 1:** Diversas técnicas para la determinación de metronidazol en diferentes muestras (Elsa Maria Materón, 2021).

MÉTODO	RESOLUCIÓN	MUESTRA
ESPECTROFOTOMETRÍA	<sup>1</sup> 0.008 µg/mL, <sup>2</sup> 0.257µg/mL, <sup>3</sup> 0.15 µM	<sup>1</sup> orina y plasma, <sup>2</sup> miel y tabletas, <sup>3</sup> plasma de conejo.
CROMATOGRAFÍA DE GASES	0.1 µg kg	tejidos
HPLC	<sup>1</sup> 40 ng/mL, <sup>2</sup> 0.002 µg/g, <sup>3</sup> 0.33 µg/mL, <sup>4</sup> 0.25 µg/gm, <sup>5</sup> 2.1 µg/mL	<sup>1</sup> Plasma humano, <sup>2</sup> músculos de tilapia, <sup>3</sup> Óvulos, <sup>4</sup> Artemias, <sup>5</sup> Efluentes
HPLC ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	<sup>1</sup> 0.5 µg/kg, <sup>2</sup> 0.17 µg/kg, <sup>3</sup> 1.0 µg/kg, <sup>4</sup> 3.4 ng/L, 0.4 ng/L y 0.3 ng/L	<sup>1</sup> Huevo, <sup>2</sup> musculo Bovino, <sup>3</sup> Miel, agua, sedimentos y tejido de pez
CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA	0.32 µg band <sup>-1</sup>	Tabletas
COLORIMETRÍA	2 nM	Leche y agua
SERS	10 µg/mL,	Suelo y agua de lagos y estanques
ELECTROFORESIS	6.0 × 10 <sup>7</sup> mol/L	Orina humana

Recientemente se ha comenzado a utilizar los métodos electroquímicos para la determinación de especies activas electroquímicamente, debido a su bajo costo, su fácil manejo, portabilidad, rapidez y sensibilidad, además de su rápido aprendizaje y sus límites de detección bajos.

Se han hecho estudios para utilizar esta técnica en la detección y cuantificación del metronidazol, esto es posible gracias a que el metronidazol contiene un grupo nitro, como se puede ver en la figura 1. La mayoría de las reducciones del grupo

nitro (-NO<sub>2</sub>) se dan gracias a la transferencia de 4 electrones, para dar lugar a una hidroxilamina (-NHOH), para después, con la ayuda de 2 electrones más, reducirlo para obtener la correspondiente amina (-NH<sub>3</sub>) (S. Meenakshi, 2021).

El cual puede ser fácilmente reducido utilizando una amplia gama de electrodos, como el electrodo de carbono vitreo, electrodo de oro, de fibra de carbono, de grafito, entre otros (Elsa Maria Materón, 2021).

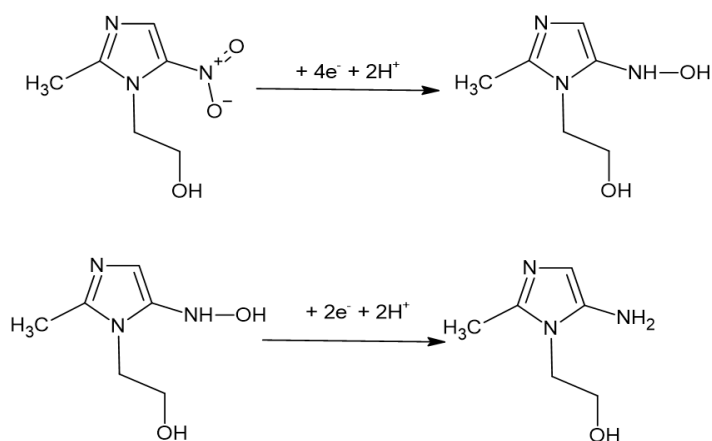


Figura 1: Mecanismo de reacción de la reducción electroquímica del metronidazol

## 4 Marco teórico.

### 4.1 Metronidazol

El metronidazol o (1-(β-hidroxietil (-2-metil-5-nitroimidazol) es un compuesto sintético derivado de la familia de los nitroimidazoles con actividad antibacteriana y anti protozoaria, se encuentra como un polvo cristalino de un color blanco a amarillo pálido inodoro, con un peso molecular de 171.15 g/mol, su fórmula molecular es C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, tiene un punto de fusión de 160°C y un pKa de 2.38 (National Center for Biotechnology Information., 2022).

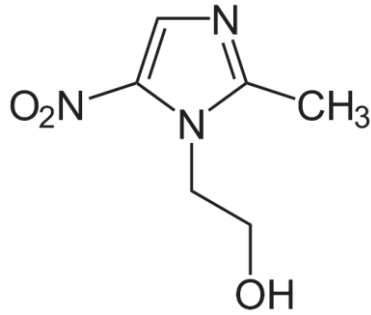


Figura 2: Estructura química de metronidazol

Este medicamento se desarrolló con el objetivo de tratar las infecciones por *Trichomonas vaginalis* pero poco después se encontró que era efectivo en infecciones provocadas por protozoarios como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. En la actualidad el Metronidazol es uno de los medicamentos más eficaces para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias anaerobias tanto Gram negativas como positivas, también es útil en el tratamiento de la enfermedad de Crohn y en afecciones dérmicas como la rosácea, el acné vulgaris y la dermatitis perioral (Bendesky *et al.*, 2001). El metronidazol se encuentra principalmente en 4 formas farmacéuticas que son, comprimidos, comprimidos vaginales, suspensiones y soluciones inyectables, comercializadas bajo diferentes marcas tanto genéricas como de patente, (Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables para farmacias y público en general, 2007)

Algunos de los efectos secundarios más comunes del metronidazol son cefalea, náusea, sequedad en la boca, y sabor metálico, también se puede presentar vómito, diarrea y dolor abdominal (American Society of Health-System Pharmacists, 2017). Se ha encontrado que un metabolito hidroxilado del metronidazol podría



ser carcinogénico ya que tienen la capacidad de inducir daño al ADN en linfocitos humanos (Bendesky *et al.*, 2001).

En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos se describen los métodos que se emplean para la valoración de los medicamentos, en el caso del metronidazol, las principales técnicas utilizadas son la cromatografía, espectroscopia de uv visible y la volumetría (Comisión permanente de la Farmacopea De los Estados Unidos Mexicanos, 2022).

## 4.2 Cromatografía

La cromatografía líquida de alta resolución o HPLC, es una de las técnicas más utilizadas en la industria, gracias a su gran versatilidad, un amplio rango en sus aplicaciones y a sus excelentes resultados. Por estas razones esta técnica se aplica en casi todos los laboratorios donde se realizan análisis químicos, bioquímicos y farmacéuticos (Volonté, 2013).

La cromatografía líquida de alta resolución es la sucesora de la cromatografía líquida, ya que el fundamento es el mismo, sin embargo, en la cromatografía de alta resolución se utilizan partículas de sílice de alta pureza de un diámetro de 5 a 10  $\mu\text{m}$ . Este tamaño de partícula tan pequeño permite reducir el diámetro de las columnas, pero ocasiona que se tenga que utilizar una bomba para mantener el flujo de la fase móvil. Estas serían las principales diferencias entre la cromatografía líquida convencional y la cromatografía líquida de alta resolución (Christian, 2009).

Esta técnica ofrece muchas ventajas como lo es su velocidad para obtener separaciones en minutos o hasta segundos, permite separar mezclas complejas, presenta una gran información cuantitativa, el deterioro en las columnas es muy bajo y por último una de las mayores ventajas es que permite automatizar los instrumentos.

## 4.3 Espectroscopia de UV visible

La espectrofotometría o espectroscopia electrónica ultravioleta-visible, es un método instrumental que se encarga de medir la atenuación de un haz de luz después de pasar a través de una muestra (Gómez, 2017). Es una técnica utilizada para

diferentes fines, como la detección de grupos funcionales, detección de impurezas, análisis cualitativos y cuantitativos, entre otras aplicaciones (Owen, 1996).

Esta técnica se basa en la absorción de la radiación de una frecuencia determinada, el rango de la zona UV-Visible va de 100 a 800 nanómetros dentro del espectro de la radiación electromagnética, esta absorción es realizada por una molécula para producir una transición de un nivel de baja energía a un nivel de mayor energía (Velandia Cabra, 2018).

La espectrometría tiene varias ventajas, desde su precisión, simplicidad ocupacional, su elevada velocidad analítica y su bajo costo, también presenta como muchas otras técnicas algunos problemas como, la interferencia en el espectro, el tratamiento de la muestra y la baja resolución y el ruido en las mediciones (Velandia Cabra, 2018) (Volonté, 2013).

#### 4.4 Volumetría

Las titulaciones son técnicas empleadas para la determinación cuantitativa de múltiples sustancias, en diversas áreas y para diferentes fines como el control de calidad de materia prima, la producción agropecuaria y el medio ambiente, entre otras (Christian, 2009).

Las titulaciones consiste en determinar el punto de equivalencia o equilibrio en una solución, ya sea directa, residual, complejo métrica o de oxido-reducción, para lo cual se necesita conocer el volumen de una solución de concentración conocida, a la que se le denomina solución valorada, esta solución se va agregando con una

bureta a la solución que se quiere analizar, también es necesario tener un sistema especializado que indique el momento en el que el reactivo añadido sea equivalente al analito (Pajuelo Bustamante, 2019).

Para que se pueda llevar a cabo esta técnica el analito debe de cumplir ciertas condiciones que dificultan la aplicación de este método en diversas moléculas; la reacción debe de ser rápida y sencilla, ya que esta reacción servirá para hacer los cálculos, la reacción debe de ser estequiométrica, debe de existir un indicador que señale el punto final de la valoración y deben de utilizarse aparatos de medición exactos y debe de existir una disolución patrón como reactivo valorante (Jesica Gallegos, 2009) .

#### 4.5 Métodos electroquímicos

La electroquímica envuelve diversos fenómenos químicos asociados con la separación de cargas. A menudo la separación de cargas da paso a la transferencia de cargas, que puede ocurrir de manera homogénea en soluciones, o de forma heterogénea en la superficie de un electrodo. En los métodos electroquímico un analito se oxida o se reduce utilizando un electrodo apropiado dentro de una celda electrolítica gracias a la aplicación de un voltaje y la cantidad de corriente usada la cual se relaciona con la cantidad de analito. En estos métodos se incluyen algunas de las técnicas instrumentales más exactas y sensibles (Christian, 2009).

Para poder calcular el potencial de una celda es necesario conocer el potencial del electrodo de la respectiva semirreacción.

$$E_{cel} = E_r - E_l$$

Donde por convención, la semirreacción que está en la izquierda (Ei) se considera como oxidación y la que está en la derecha (Er) se considera como reducción. Los potenciales de estas semirreacciones se obtienen de la ecuación de Nernst. Este potencial depende de la concentración de la especie y varía con respecto a un potencial estándar. El potencial estándar ( $E^0$ ) es el valor del potencial relativo al electrodo estándar de hidrógeno (Brett & Oliveira, 1993). De forma general la ecuación de Nernst queda como:

$$E = E^0 - \frac{2.3026 * R * T}{n} * \log \frac{[Red]^b}{[Ox]^a}$$

Donde E es el potencial de reducción a las concentraciones específicas; n es el número de electrones que participan en la semirreacción; R, es la constante de los gases ideales ( $8.3143 \text{ V coul grado}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ); y T, es la temperatura absoluta.

Es necesario para las técnicas electroquímicas la correcta elección de los electrodos empleados en la técnica, ya que el uso de estos depende de diversos factores como lo son:

- La composición del solvente.
- La formación de capas semiconductoras en la superficie del electrodo
- La volatilidad del electrolito de soporte de la solución.

(S. Meenaskshi, 2021).

## 4.5.1 Electrodo

A demás de esto existen otros factores que pueden afectar a la elección de un electrodo, como en el caso de los electrodos sólidos, los cuales se pueden ver afectados al contaminarse con el contacto con las soluciones. Se pueden encontrar electrodos de muchos tipos, pero algunos de los más comunes son los siguientes.

### 4.5.1.1 Metales

Estos electrodos son mayormente utilizados en reacciones redox, desplazando así al electrodo de mercurio líquido. Este tipo de electrodos es utilizado para el estudio del mecanismo y la cinética de la transferencia de electrones, y la determinación de sus parámetros termodinámicos, los materiales más utilizados para este tipo de electrodos suelen ser el platino, oro y plata.

Una ventaja del uso de estos electrodos es que por su gran conductividad resulta en bajas o nulas corrientes de fondo. Con esto se logra incrementar la sensibilidad y aumentar la reproducibilidad de los experimentos. Otra ventaja es su fácil construcción y ensamblaje, y su facilidad para pulirlos (Brett & Oliveira, 1993).

### 4.5.1.2 Carbono

El carbono existe en diversas formas, las cuales tienen propiedades conductoras. Se pueden encontrar electrodos de carbonó vitreo, fibra de carbono, diversas formas de grafito, y pasta de carbono, el cual es un derivado de el grafito que está hecho con partículas de este dentro de una matriz. En este tipo de electrodos las reacciones son más lentas que en los electrodos metálicos y la transferencia de electrones depende de su estructura y en su superficie.

Los electrodos de carbono tienen una gran superficie donde pueden tener interacciones, lo cual causa que sean muy susceptibles a la contaminación por compuestos orgánicos. Se pueden generar enlaces en la superficie del electrodo con hidrogeno, y grupos carboxilo, lo que los hace muy susceptibles a los cambios de pH.

Uno de los electrodos más usados es el electrodo de carbón vitreo. Sin embargo, debido a su rigidez y fragilidad, su fabricación es muy difícil, lo que limita mucho su uso y las dimensiones y formas en la que se puede encontrar. Su fabricación consiste en la carbonización por calentamiento de polímeros de fenol-formaldehido, este calentamiento es entre 1000°C y 300°C bajo presión (Brett & Oliveira, 1993).

#### *4.5.1.3 Otros materiales solidos*

Otro material solido que se utiliza para los electrodos son los semiconductores, por ejemplo, los óxidos de metales, como estaño e indio, también se puede usar platino y oro, y sales orgánicas que tengan capacidad conductiva. Estas últimas son las más interesantes, ya que tienen la capacidad de inmovilizar compuestos orgánicos como las enzimas (Brett & Oliveira, 1993).

#### *4.5.1.4 Mercurio*

Por mucho tiempo, el mercurio fue el material más utilizado como electrodo, principalmente se utiliza el electrodo de gota de mercurio. Este electrodo tiene un potencial negativo muy grande, lo que permite tener rangos negativos mayores que con cualquier otro material. Este se utiliza principalmente cuando se desean estudiar procesos de reducción (Brett & Oliveira, 1993).

Es sumamente importante la pureza del mercurio utilizado, ya que es necesario que este no este disuelto con otro elemento o forme alguna amalgama ya que esto limita sus capacidades y bloquea su capilaridad. El proceso para la purificación del mercurio consiste básicamente en cuatro pasos:

- Remover los óxidos y la suciedad filtrando el mercurio con un filtro de papel con agujeros muy finos.
- Remover los metales agregando ácido nítrico durante 1 a 3 días aspirando con vacío.
- Destilar para remover otros metales como el oro y la plata
- Lavar con agua, dejar secar, filtrar y repetir el proceso de destilado dos veces más.

Una de las mayores desventajas de este electrodo es que el mercurio es sumamente toxico, en especial sus vapores, y de debe de ser muy cuidadoso en su uso; cualquier gota se pudiera escapar debe de ser recolectada por una bandeja que se encuentre debajo de la celda, para evitar que se esparza, y el laboratorio debe de estar muy bien ventilado (Brett & Oliveira, 1993).

#### *4.5.1.5 Electrodo de referencia*

Además de esta clasificación para los electrodos según los materiales de lo que están hechos existe otra clasificación, pero para los electrodos de referencia, que como su nombre lo dice, nos da un valor de potencial el cual podemos tomar como base para compararlo con otro y así poder registrar su diferencia, ya que solo se pueden medir estos valores de esta manera. Por esto los electrodos de referencia deben de tener un potencial que sea estable con el tiempo, que no se altere con la

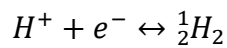


temperatura, ni con pequeñas perturbaciones en el sistema (Christian, 2009).

Estos electrodos se pueden distinguir en tres tipos:

- Tipo 1: Electrodo de referencia de hidrógeno
- Tipo 2: Electrodo de calomel
- Tipo 3: Electrodo de vidrio

El electrodo normal de hidrogeno es el más importante, ya que con este se definió la escala de potenciales. Se uso este electrodo gracias a su gran reproducibilidad, ya que solo tiene una variación de 10  $\mu\text{V}$  entre diferentes electrodos del mismo tipo. Este electrodo normalmente este compuesto por lamina de platino que esta platinada, ya que esto ayuda a que se lleve a cabo de la mejor manera la reacción:



Existen diversos procesos para la latinización, pero normalmente involucra el uso de platino negro de una solución al tres por ciento de ácido  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  que contenga pequeñas cantidades de acetato de plomo para proteger el electrodo (Brett & Oliveira, 1993).

#### 4.5.2 Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (CV) es una técnica muy versátil para el estudio de especies electroactivas, se utiliza para la investigación en diferentes áreas como la química orgánica, bioquímica, química inorgánica, entre otras.

Consiste en la aplicación de un potencial a una solución donde existan especies capaces de reducirse u oxidarse, y se observa la corriente resultante, la cual se registra como una función del potencial aplicado (Christian, 2009).

Para realizar esta técnica se necesita tener en la celda 3 electrodos diferentes, un microelectrodo de trabajo; en este se lleva a cabo las reacciones, suele construirse de un material inerte como carbón vitreo u otro similar, un electrodo auxiliar; el cual generalmente es de platino, y un electrodo de referencia; el cual suele ser el electrodo saturado de calomel o un electrodo Ag/AgCl. Se utiliza un aparato llamado potenciostato para controlar el potencial, el cual aplica un potencial de forma lineal al electrodo gradualmente y luego invierte el sentido hasta retornar a su posición inicial, y una computadora con un software para realizar la interpretación de los datos, estos datos se representan en gráficos llamados voltamogramas (Brett & Oliveira, 1993).

La corriente que es aplicada en el electrodo de trabajo es registrada en función a su potencial medio contra el electrodo de referencia. Las mediciones se realizan con tres electrodos para reducir el efecto de la resistencia de la solución, ya que según la ley de Ohm el voltaje ( $E$ ) es igual al producto de la corriente ( $i$ ) por la resistencia ( $R$ ), esta fórmula queda como:

$$E = iR$$

Si el efecto de la resistencia de la solución es muy perceptible, puede ocasionar que la curva resultante se distorsione y se distribuya sobre un intervalo de potencial más grande (Brett & Oliveira, 1993).

### 4.5.3 Voltamperometría pulso

En las pruebas de voltamperometría de pulso se debe de elegir un potencial base ( $E_{base}$ ), el cual es aplicado al electrodo; la principal diferencia entre la voltamperometría de pulso y la cíclica es que, como su nombre lo indica, en la voltamperometría de pulso se aplican pequeños pulsos los cuales van incrementando su potencial de manera constante. En la técnica de voltamperometría diferencial de pulso (DPV) se mide la corriente antes y después de cada pulso, lo que registra al final es la diferencia entre estos (Huertas, 2017).

Las técnicas voltamperometricas de pulso fueron desarrollados originalmente para ser utilizados con el electrodo de gota de mercurio. El objetivo de estas era sincronizar el pulso con la caída de la gota y de esta manera reducir la contribución de la corriente capacitiva, de tal manera que después de ser aplicado el potencial en forma de pulso, la corriente capacitiva se extinguiese más rápido que la corriente faradaica, para poder ser medida al final del pulso. Esto aumenta la sensibilidad de la técnica y ayuda a disminuir algunos problemas que pueden presentar los electrodos sólidos, ya que bloquean las reacciones de adsorción del electrodo y así ayudan a que el electrodo no se contamine.

### 4.6 Validación

Para poder desarrollar un método analítico es necesario asegurar que este nuevo método sea confiable, esto se realiza mediante un proceso de validación. Existen tres tipos de validación, que se aplican en diferentes circunstancias y dependiendo del tipo de método que se está tratando de validar. Estos son:

- validación prospectiva: Se aplica cuando se desarrolla un método analítico nuevo.
- validación retrospectiva: Se aplica en métodos los cuales no estén validados, pero se tenga una amplia historia de resultados.
- Revalidación: Se emplea cuando un método analítico ya validado se le realiza algún cambio que lo afecte de manera significativa.

Con cualquiera de estas se tiene que comprobar si el método es confiable y si los resultados que se puedan llegar a obtener se encuentran dentro de las condiciones previstas.

No existe un modelo que se aplique a todo el mundo para poder validar un método analítico ya que los parámetros que se avalúan dependen de las agencias regulatorias y las leyes vigentes en cada país, como lo son en México la COFEPRIS, la Comisión Permanente de la Farmacopea y las normas oficiales mexicanas, como la NOM-059-SSA1 o la NOM-164-SSA1, donde se determina la obligación de validar los métodos analíticos.

A pesar de esto existe un organismo internacional conocido como la Conferencia internacional de armonización o ICH, por sus siglas en inglés, que trata de estandarizar los métodos para que puedan ser aplicables en todo el mundo.

En la guía de la ICH sobre la validación de métodos analíticos, estos se separan en tres tipos, a los cuales se le aplican diferentes ensayos según sea necesario:

- Ensayos de identidad: son los métodos en los que se dese asegurar la identidad de algún analito en una muestra. Esto normalmente se realiza con la comparación de propiedades con algún estándar de referencia.

- Test de impurezas: son los métodos en los cuales se desee encontrar o cuantificar impurezas en la muestra. Esto con el fin de reflejar la pureza de la muestra.
- Ensayos cuantitativos: estos métodos pretenden medir la cantidad de analito presente en una muestra. También se puede aplicar a productos del fármaco y otros componentes.

Las características que son necesarias para cada tipo de ensayo se muestran en la siguiente tabla

**Tabla 2:** Pruebas a realizar para la validación según la ICH, - no se tiene que realizar, + es necesaria para la validación.

Característica por analizar	Ensayos de identidad	Test de impurezas	Ensayos cuantitativos
<b>Exactitud</b>	-	+	+
<b>Precisión</b>	-	+	+
<b>Repetibilidad</b>	-	+	+
<b>Reproducibilidad</b>	-	+	+
<b>Especificidad</b>	+	+	-
<b>Limite de detección</b>	-	-	-
<b>Linealidad</b>	-	+	+

### 4.6.1 Exactitud

La exactitud es la capacidad del método analítico para obtener el resultado más próximo al valor determinado como el valor convencional de una referencia. Esto ayuda a encontrar errores sistemáticos en el método. El error en la exactitud suele ocurrir en métodos muy laboriosos o que tengan muchos pasos antes del análisis.

La exactitud se puede calcular de diferentes maneras, una de ellas es con el recobro. Para esto se puede comparar con un método ya validado que funcione como referencia o se puede utilizar un analito de pureza conocida y calcular el recobro.

### 4.6.2 Precisión

La precisión es la cercanía que tienen los valores de una serie de ensayos que se realizan a una misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones. Esta suele ser reflejado por la variación estándar o el coeficiente de variación de una serie de muestras.

Dentro de la precisión encontramos la repetibilidad, la cual refleja la precisión de un método, en la cual una misma muestra es analizada bajo las mismas condiciones, tanto del instrumental como del analista. Esto quiere decir que esa muestra es analizada repetidamente por el mismo analista, en el mismo laboratorio, utilizando los mismos instrumentos y reactivos.

También dentro de la precisión se encuentra la reproducibilidad, este a diferencia del anterior es ejecutado por un analista diferente, se realiza el ensayo sobre la misma muestra homogénea pero el único factor que cambia es el analista. Este ensayo

revela las variaciones que puede haber entre analistas y la capacidad del método a sufrir cambio.

#### 4.6.3 Especificidad

La especificidad es la capacidad del método para detectar el analito, si la interferencia de impurezas, productos de degradación o cualquier otro elemento que pueda estar presente en la muestra. Esta prueba se le realiza principalmente a los métodos que buscan identificar algún analito o detectar las impurezas que pueda tener.

#### 4.6.4 Límite de detección

Este se define como la cantidad mínima con la cual puede ser detectado utilizando el método, sin embargo esta cantidad no debe de ser necesariamente cuantificable con un valor exacto.

#### 4.6.5 Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o a la cantidad de analito en un rango definido. El rango puede variar, pero se recomienda que sean de 3 a 5 puntos y que estos puntos representen intervalos entre el 80 al 120% de la cantidad teórica del analito. Una vez teniendo esto se realiza una regresión lineal la cual da información como la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación.

A partir de los datos obtenidos de la regresión se obtiene información de sobre el método, por ejemplo: la pendiente indica que tan sensible es el método y es inversamente proporcional a con la capacidad de detectar pequeñas diferencias en las

concentraciones del analito, el límite de detección y el límite de cuantificación del método, también poder ser conocidos.

## 5 Material y reactivos:

- Ácido acético glacial
- Ácido clorhídrico
- Ácido fosfórico
- Ácido sulfúrico
- Ácido bórico
- Cloruro de potasio
- Hidróxido de sodio
- Metanol
- Estándar de metronidazol Fluka® Lote: SLBD5470V
- Suspensión de metronidazol Flagyl® de 120 mL Lote: BMXA 002
- Óvulos vaginales de metronidazol Flagyl®V de 500 mg Lote: BMXA 002
- Electrodo de plata-cloruro de plata (electrodo de referencia)
- Electrodo de platino (electrodo auxiliar)
- Electrodo de grafito (electrodo de trabajo)

## 6 Aparatos:

- Parrilla magnética
- Agitador magnético CIVEQ® 79-MASTER
- Potenciómetro



- Potenciostato
- Micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$
- Micropipeta de 20-200  $\mu\text{L}$
- Balanza analítica
- Thermo-Shaker biosan® TS-100C

## 7 Metodología

Primeramente, se determinaron las condiciones voltamperométricas experimentales, como lo son el pH de la muestra, la velocidad de medición y las condiciones de la celda y los electrodos, para posteriormente observar la precisión, exactitud, linealidad, robustez y el límite de detección del método, antes de realizar las pruebas a la suspensión.

Para la celda se ocuparon tres electrodos, un electrodo de platino, como el electrodo auxiliar, un electrodo de plata cloruro de plata (Ag/AgCl), como electrodo de referencia, al cual se le adiciono un capuchón que contenía en su interior una solución de cloruro de potasio saturado para completar el circuito, y por ultimo un electrodo de grafito, como electrodo de trabajo, el cual antes de cada una de las mediciones se pulía, con ayuda de una lija 200, haciendo 20 círculos aproximadamente del mismo tamaño para así obtener una superficie uniforme. Todas las mediciones se hicieron en una celda de vidrio inerte y con agitación magnética constante.

## 7.1 pH

Para la determinación del pH se prepararon 50 ml de buffer Britton Robinson a diferentes intervalos de pH (de 2 hasta 10), a partir de soluciones madre de ácido fosfórico 0.3 M, ácido bórico 0.3 M, ácido acético glacial 0.3 M, hidróxido de sodio 1 M y cloruro de potasio.

Una vez obtenidas las soluciones con diferentes valores de pH, se preparó una solución estándar de metronidazol, con una concentración de 1.72 mg/mL. Posteriormente se prepararon las soluciones de trabajo a diferentes intervalos de pH haciendo diluciones 1:10 con el buffer. Se repitió este proceso hasta tener las 9 soluciones preparadas.

## 7.2 Velocidad.

En las pruebas de velocidad de medición se tomaron intervalos de 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200  $\text{mVs}^{-1}$ , para lo cual se preparó una solución Buffer Britton-Robinson a un pH de 7 como se muestra en la tabla 3.

## 7.3 Metodología para el tratamiento de la suspensión de metronidazol.

Para el tratamiento de la suspensión, la cual es una suspensión de la marca Flagyl® de 120 mL, la cual contiene 125 mg de metronidazol por cada 5 mL de producto, se tomó como referencia el método farmacopeico, al cual se le hicieron algunas modificaciones para adecuarlo a la técnica voltamperométrica.

- Se toma una alícuota de la suspensión, previamente agitado, equivalente a 62.5mg de metronidazol (1.25 mL).
- Se coloca en un matraz volumétrico de 50 mL con 25 mL de metanol con agitación magnética durante 15 minutos, sin filtrar.
- Transcurridos los 15 minutos se lleva a aforo con metanol.
- Se pasa una alícuota de 1 mL a un matraz volumétrico de 10 mL.
- Se lleva a volumen con buffer Briton-Robinson, para obtener una concentración final de 12.5µg/mL.

#### 7.4 Metodología para el tratamiento de los óvulos de metronidazol.

Se probaron 3 métodos para el tratamiento de los óvulos de metronidazol, de la marca Flagyl ®V de 500 m, los cuales contiene 500 mg de metronidazol por cada ovulo, para los cuales se preparó una solución de HCl 1:100 y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:350, se utilizaron un Thermo-Shaker, una parrilla de calentamiento con agitación magnética, agitador magnético, micropipeta de 100-1000µL y micropipeta de 20-200µL. Finalmente se decidió por uno, ya que los otros métodos no mostraban diferencias significativas y solo agregaban mas pasos a este.

#### 7.5 Muestra

- Se pesa el ovulo completo. Teniendo el peso total del ovulo se toma la parte proporcional a 50mg de metronidazol.
- Se coloca la parte proporcional en un vial de 2mL, posteriormente se afora con solución de HCl 1:10, el vial se coloca en el Thermo-Shaker con agitación constante a 250 rpm a una temperatura de 40°C durante 30 minutos.

- Transcurrido el tiempo, se extrae el sobrenadante y se lava el vial con HCl 1:10, el líquido extraído se coloca en un matraz de 25mL, llevar a aforo con la solución de HCl 1:10 (concentración 2mg/mL de metronidazol).
- Se toma una alícuota de 5mL y se coloca en un matraz de 25mL, se lleva a aforo con la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:350 (concentración 0.4mg/mL de metronidazol).
- Se toma una alícuota de 0.5mL en un matraz de 10mL, llevar a volumen con Buffer R-B con un pH de 7 (concentración de 20µg/mL de metronidazol).

#### 4.6 Estándar

- Se pesan aproximadamente exactamente, 50mg de metronidazol.
- Se coloca en un matraz de 25mL, se lleva a aforo con HCl 1:10.
- Se toma una alícuota de 5mL a un matraz de 25mL, se lleva a aforo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1:350.
- Se toma una alícuota de 0.5mL y se coloca en un matraz de 10mL, se lleva a aforo con buffer R-B con un pH de 7.

#### 7.7 Validación

Una vez desarrollada la metodología se procedió a validar el procedimiento, según lo establecido por la ICH, para ensayos cuantitativos.

##### *7.7.1 Linealidad suspensión*

Se realizaron soluciones estándar de 5 niveles de concentración del 60 a 140% de la concentración de referencia, que es de 20µg/mL, ya que esta es la cantidad que se utiliza en el método farmacopeico. Posteriormente se realizaron 3 curvas utilizando

un intervalo de concentraciones del 60 a 140%. Cada curva estuvo compuesta por 5 intervalos de concentración, como se muestra en la tabla siguiente.

**Tabla 4:** *Tabla de concentraciones a la que se realizó la curva.*

Muestra	Porcentaje	Concentración $\mu\text{g/mL}$
1	60	12
2	80	16
3	100	20
4	120	14
5	140	28

### 7.7.2 Linealidad Óvulos

Se siguió una metodología similar a la utilizada en la suspensión oral, sin embargo, se le realizaron algunas modificaciones para ser aplicada al método. Por lo que se realizaron soluciones estándar a 5 niveles de concentración del 40 a 160% de la concentración de referencia que es de  $20\mu\text{g/mL}$ . Utilizando una solución estándar. Posteriormente se realizaron 3 curvas utilizando los óvulos vaginales, para obtener un intervalo de concentración del 40 a 160%. Cada curva compuesta por intervalos de concentración como se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 5:** *Tabla de concentraciones de los puntos en los que se realizó la curva para linealidad en óvulos.*

Muestra	Porcentaje	Concentración $\mu\text{g/mL}$
1	40	8
2	70	14
3	100	20
4	130	26
5	160	32

### *7.7.3 Repetibilidad suspensión*

Se prepararon 7 muestras al 100%, de la suspensión, las cuales se leyeron por separado.

Se calculo la desviación estándar y el coeficiente de variación de las 7 muestras.

### *7.7.4 Repetibilidad óvulos*

Se prepararon 3 grupos de tres muestras a diferentes intervalos de concentración, utilizando los óvulos vaginales, pesando una cantidad equivalente a 20 µg de metronidazol, de la siguiente manera, Grupo 1 concentración del 100%, Grupo 2 concentración del 130%, y por último, grupo 3 con una concentración del 70%, las cuales se leyeron por separado. Se calculo la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada uno de los grupos.

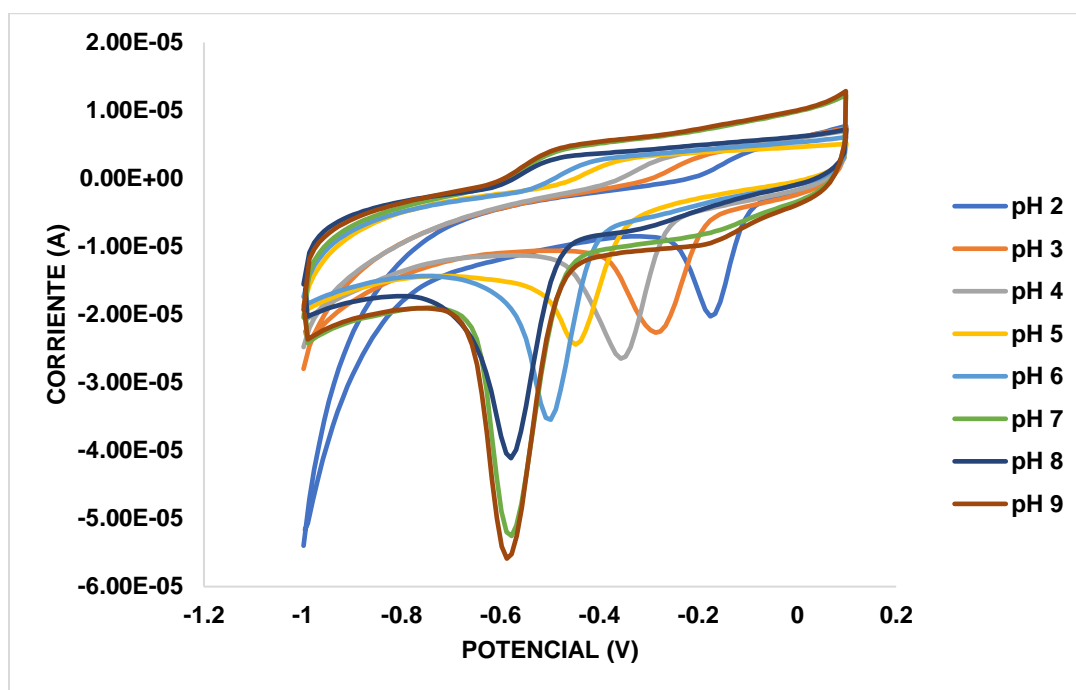
### *7.7.5 Exactitud óvulos*

Se prepararon soluciones de muestra enriquecidas a 5 niveles de concentración del 40 al 160% de la concentración normal, aumentando la concentración de 30 en 30%, finalmente se calculó el porcentaje recuperado de este.

## 8 Resultados y discusión

### 8.1 pH

A continuación, se muestra una figura donde se puede observar el efecto que tiene el valor de pH de la solución sobre la intensidad de la señal que obtenemos en el voltamperograma. Se realizaron estas pruebas con el fin de encontrar en que pH tenía una mayor sensibilidad, para poder realizar el análisis cuantitativo.



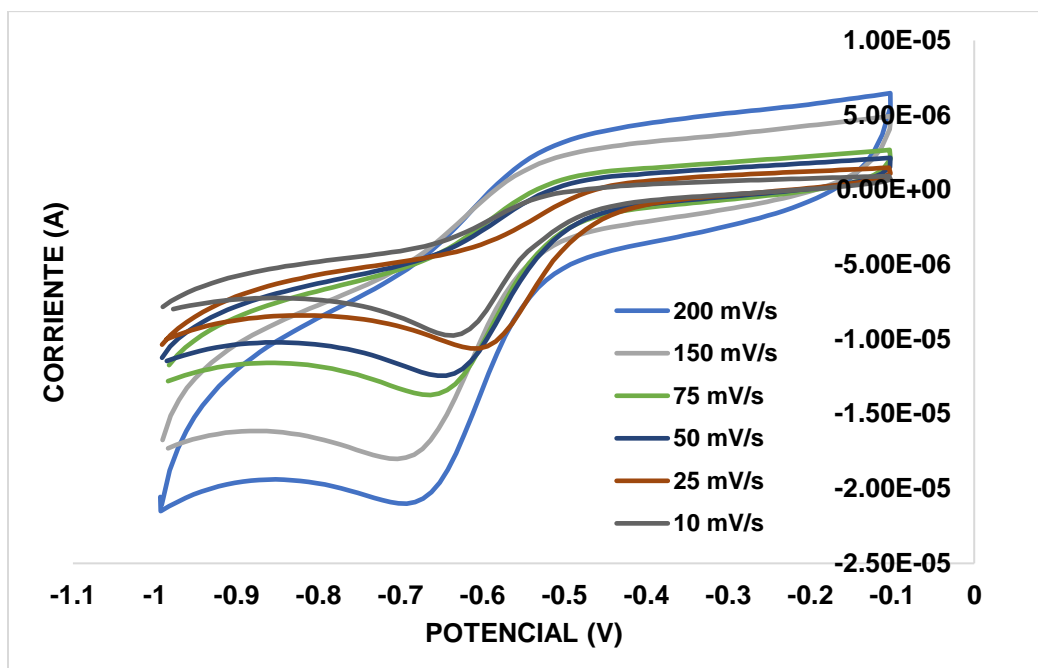
**Figura 3:** Efecto del cambio de pH de la solución sobre el comportamiento de la señal voltamperométrica, a una misma concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$  de metronidazol.

Como se puede observar en la figura anterior, las señales de reducción se desplazan a valores potenciales más negativos a medida que aumenta el pH. A valores de pH entre 8 y 9 la corriente de reducción es más intensa y se presenta a potenciales

muy similares, de ese comportamiento se deduce que los valores óptimos para medir la señal voltamperométrica entre 7 y 9 de pH. Para trabajar se decidió usar el buffer de pH=7, ya que es más fácil de manejar las soluciones a este pH.

## 8.2 Velocidad

Para las pruebas de velocidad se realizaron pruebas con una solución de metronidazol a una concentración de  $17.2\mu\text{g/ml}$ , la cual se analizó con diferentes velocidades de barrido de potencial, de  $10\text{ mV/s}$  hasta  $200\text{ mV/s}$ .



**Figura 4:** Efecto del cambio en la velocidad del barrido en los voltamperogramas. Se realizaron 9 pruebas a distintas velocidades con una concentración de  $17.2\mu\text{g/ml}$  de metronidazol.

La altura de cada uno de los picos se midió trazando una línea base desde el punto donde inicia la señal hasta donde termina, una vez trazada esta línea, se mide la



altura del punto mas alto de la señal hasta esta base, sacando así la intensidad de la corriente de reducción del metronidazol.

Como se puede observar en la figura 4, entre mayor sea la velocidad de barrido de potencial la señal de reducción del metronidazol se hace más ancha, y el potencial del pico se desplaza a valores más negativos, A velocidades de barrido bajas, se definen mejor el pico de reducción. Una de las desventajas de las velocidades de barrido de potencial bajas es que se genera una mayor cantidad de productos de reducción, esto puede propiciar que el electrodo se contamine afectándose la superficie del electrodo por adsorción de las moléculas, además el tiempo que tarda el análisis aumenta.

Con base en los resultados de la figura 4. Se decidió hacer el barrido de potencial a 75 mV/s, a esta velocidad se obtuvo una buena sensibilidad en los picos y se tiene un tiempo de análisis cercano a 30 segundos.

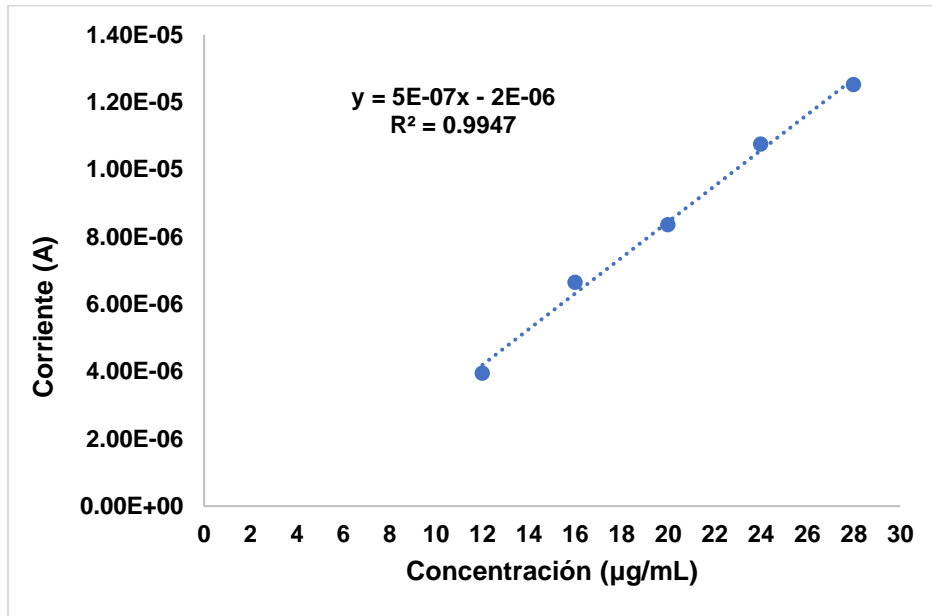
## 8.3 Linealidad

### 8.3.1 Suspensión oral.

Se realizo la curva de calibración a 5 niveles de concentración de metronidazol 12, 16, 20, 24, 28  $\mu\text{g/mL}$ . En la figura 5 se muestra la curva de calibración obtenida de la corriente de reducción frente a la concentración de una solución estándar de metronidazol. En esta se puede observar que utilizando el método estadístico de mínimos cuadrados la ecuación de la recta queda como:

$$i=5 \times 10^{-7}C-2 \times 10^{-6}, \text{ con una } R^2=0.9947$$

lo que indica que existe una relación lineal en el método, y que la sensibilidad corresponde a  $0.5 \mu\text{A}/(\mu\text{g}/\text{mL})$ , donde el límite de detección es de  $1.59 \mu\text{g}/\text{mL}$  y de cuantificación es  $5.33 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

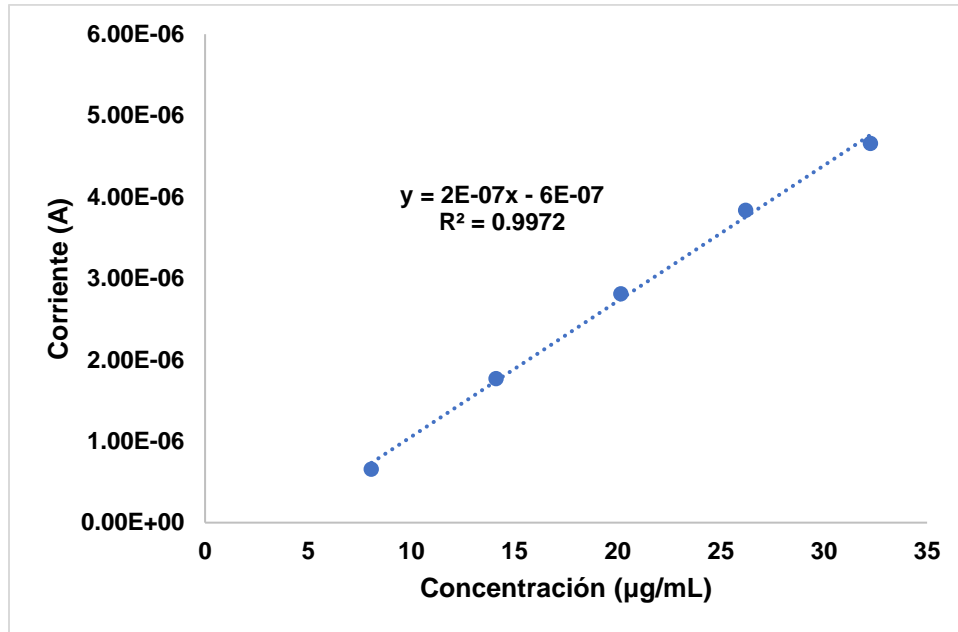


**Figura 5:** Curva de calibración de la suspensión oral de metronidazol, usando 5 concentraciones de metronidazol, 12, 16, 20, 24, 28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Usando la técnica de voltamperometría cíclica, se obtuvo un potencial de reducción de  $3.95 \times 10^{-6}$ ,  $6.65 \times 10^{-6}$ ,  $8.35 \times 10^{-6}$ ,  $1.05 \times 10^{-5}$ ,  $1.25 \times 10^{-5}$  respectivamente.

### 8.3.2 Óvulos vaginales.

De igual manera se realizó una curva de calibración para los óvulos vaginales de metronidazol a 8.064, 14.112, 20.16, 26.208, 32.256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En la figura 6 se observa la curva de calibración representando la corriente de reducción del metronidazol. En este se observa que la ecuación de la recta queda como:

$i = 2 \times 10^{-7} C - 6 \times 10^{-7}$ , con una  $R^2 = 0.9972$  lo que indica que este método lineal, es decir la corriente está en función de la concentración de forma directa.



**Figura 6:** Curva de calibración de metronidazol contenido en óvulos vaginales de metronidazol, utilizando la técnica de voltamperometría diferencial de pulso, con un intervalo de concentración entre 8 y 32 µg/ml.

## 8.4 Repetibilidad

### 8.4.1 Suspensión oral.

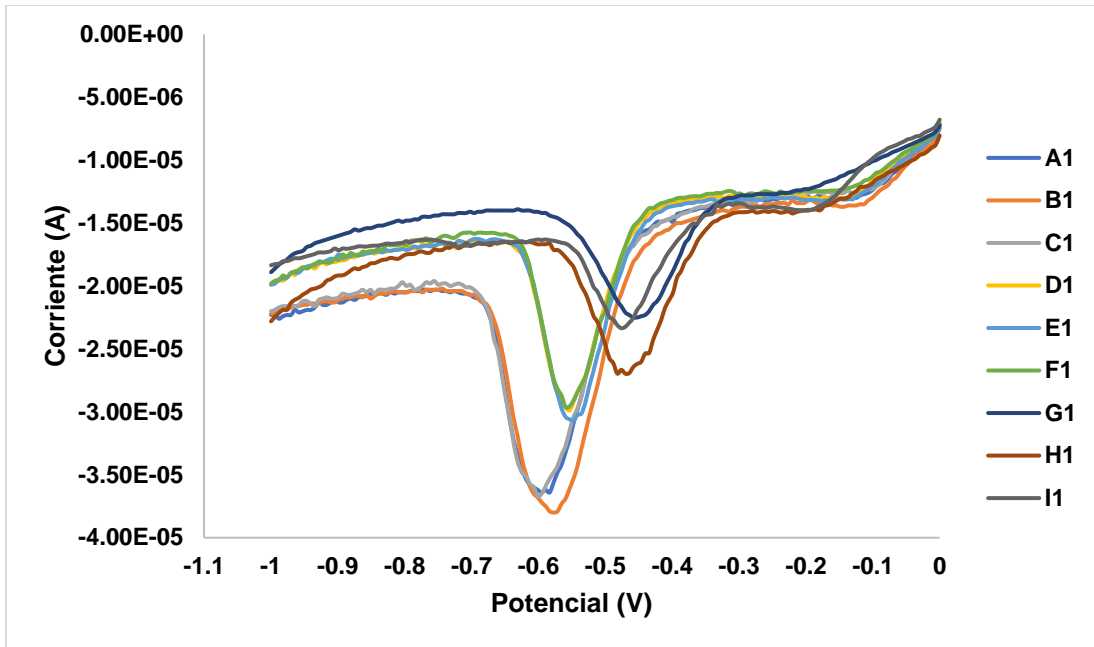
Para la exactitud con el método para la suspensión oral se realizaron 7 soluciones a una concentración de 20 µg/mL en la tabla 5 se pueden observar que se obtuvo un coeficiente de variación de 2.19%, lo que está por encima de los criterios de aceptación de la ICH que es de máximo 2%, posiblemente la variación en el método está asociada con el tratamiento de la muestra.

**Tabla 6:** Reproducibilidad en la suspensión oral, se realizaron 7 mediciones con la misma concentración de metronidazol 20 µg/ml, posteriormente se sacó la desviación estándar, el promedio y el coeficiente de variación.

Muestra	Concentracion	Corriente
1	20	8.05E-06
2	20	8.16E-06
3	20	8.14E-06
4	20	8.17E-06
5	20	7.98E-06
6	20	7.73E-06
7	20	7.81E-06
	Promedio	8.01E-06
	Desv. Est.	1.75741E-07
	CV%	2.194961392

#### 8.4.2 Análisis de óvulos vaginales.

El caso de los óvulos vaginales, se realizaron 3 grupos de 3 concentraciones, cada grupo a diferente concentración 20.206, 26.2679, 14.144µg/mL. Como se puede observar en la Tabla 7, el coeficiente de variación para los tres grupos es menor al 2%, por lo que el método cumple con los criterios de aceptación de la ICH, y da cuenta de que el método es preciso.



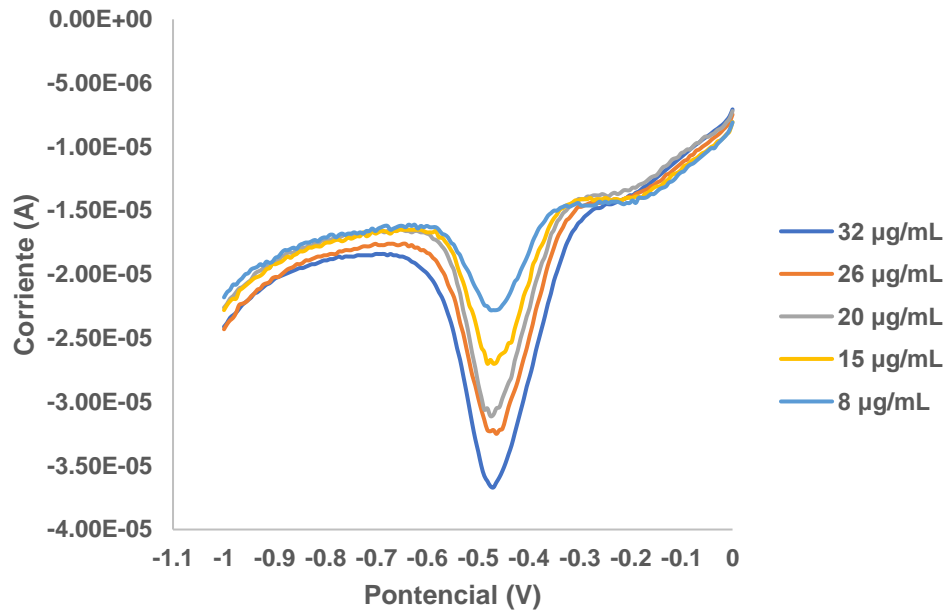
**Figura 7:** Respuesta voltamperométrica para el análisis de la reproducibilidad de la cuantificación de metronidazol en los óvulos vaginales. Se puede observar un ligero cambio de potencial entre cada concentración, esto debido a un ligero cambio en el pH por la cantidad de ácido agregado a cada muestra.

**Tabla 7:** Evaluación de la reproducibilidad en la cuantificación de metronidazol de óvulos vaginales, a tres niveles de concentración.

Muestra	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Corriente
1	14.144	1.346E-06
2	14.144	1.325E-06
3	14.144	1.302E-06
	Media	1.324E-06
	Desviación estándar	2.201E-08
	Coficiente de variación %	1.66
4	20.206	2.832E-06
5	20.206	2.938E-06
6	20.206	2.901E-06
	Media	2.890E-06
	Desviación estándar	5.3799E-08
	Coficiente de variación %	1.86134271
7	26.2679	4.224E-06
8	26.2679	4.096E-06
9	26.2679	4.194E-06
	Media	4.171E-06
	Desviación estándar	6.6943E-08
	Coficiente de variación %	1.60

### 8.5 Exactitud de la cuantificación de metronidazol en óvulos.

En la tabla 8 se presentan los porcentajes de recuperación del metronidazol en soluciones (preparadas a partir de óvulos) enriquecidas con una concentración de 8.1, 14.18, 20.26, 26.34, 32.42 $\mu\text{g/mL}$ , se utilizó la curva de calibración obtenida en la linealidad del método. Los resultados de porcentaje de recuperación obtenidos se encuentran dentro de los valores aceptados por la ICH que se establece entre 98% a 102% en promedio



**Figura 8:** Voltamperogramas obtenidos durante la evaluación del porcentaje de metronidazol contenido en óvulos vaginales.

**Tabla 8:** Recobro de metronidazol analizado en óvulos vaginales. cantidad teórica del analito agregado en la muestra y la cantidad de analito recuperado, y el porcentaje de recobro.

C analito µg/mL	C recuperada µg/mL	% recobro
32	31.4256	98.7353342
26	26.3458	99.1424011
20	20.2660	98.7283055
15	14.1862	99.6503861
8	8.1064	100.623834
<b>Promedio</b>		<b>99.3760523</b>

## 9 Conclusión

Se desarrolló un método electroquímico para la evaluación cuantitativa de metronidazol utilizando la voltamperometría. El método de análisis se realizó en un buffer de pH =7.0, evaluando la corriente de reducción del metronidazol.

Se demuestra que es posible la cuantificación de metronidazol en formas farmacéuticas utilizando una curva de calibración directa. La cuantificación del metronidazol en una suspensión tiene incertidumbre en la medición mayor al 2% por lo que se deben corregir errores experimentales y del analista.

Por otra parte, el método analítico para la cuantificación de metronidazol en una forma farmacéutica (Óvulos vaginales), cumple satisfactoriamente los criterios de validación para poder ser utilizado, además presenta ventajas sobre el método volumétrico oficial, reduce los pasos para su análisis, tiene una buena sensibilidad y exactitud.

En el caso de la suspensión oral, en la cual se encontraron mayor variabilidad del método analítico, se sugiere la implementación de una estrategia para el tratamiento de la muestra, lo que contribuirá a un resultado confiable en la medición electroquímica.

Si bien este nuevo método presenta ventajas sobre el método actual, se presentan áreas de oportunidad como la estandarización de los electrodos y la capacitación de los analistas, ya que estos se presentan como las principales contribuciones en el error analítico.



## 10 Bibliografía

American Society of Health-System Pharmacists. (15 de Diciembre de 2017). *Medline plus*.

Obtenido de <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a689011-es.html>

Brett, C. M., & Brett, A. M. (1993). *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*.

Coimbra, Portugal: Oxford University Press INC., New York.

Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables para farmacias y público en general. (3

de agosto de 2007). *facmed*. Obtenido de

[http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Metronidazol.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Metronidazol.htm)

Christian, G. D. (2009). *Química analítica*. México: The McGraw-Hill.

Elsa Maria Materón, A. W. (2021). A sensitive electrochemical detection of metronidazole in

synthetic serum and urine samples using low-cost screen-printed electrodes. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 646-652.

Flores, E. (1995). Voltamperometría cíclica: la espectroscopía electroquímica. Parte 1. *Revista*

*de Química*, 9(2), 165-172.

Gómez, M. &. (2017). *Análisis multivariado de componentes terpénicos, en aceite esencial de*

*Hierba Luisa (Cymbopogon citratus), mediante espectrofotometría UV-visible derivada*.

Quito: UPS.

Jesica Gallegos, A. M. (2009). *Actualización de una guía de prácticas de laboratorio de análisis*

*químico cuantitativo*. San Salvador: Universidad de el Salvador.

National Center for Biotechnology Information. (2022). Metronidazole. *PubChem*, 3.

Owen, T. (1996). *Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna: conceptos básicos*. .

Hewlett Packard.

Pajuelo Bustamante, M. A. (2019). *Volumetría de precipitación*. Lima Peru: Universidad nacional Enrique Guzmán y valle.

Velandia Cabra, J. R. (2018). *Aplicaciones y generalidades de un espectrofotómetro UV-VIS UV-1800*. Colombia: Ediciones EAN.

Volonté, M. G. (2013). *Análisis farmacéutico*. Buenos Aires: Universidad de la Plata.

Yiliyasi Baikeli, X. M. (2020). Electrochemical Determination of Metronidazole Using a Glassy Carbon Electrode Modified with Nanoporous Bimetallic Carbon Derived from a ZnCo-Based Metal-Organic Framework. *Journal of The Electrochemical Society*.

Yosef Nicodimos, M. A. (2016). Electrochemical Determination of Metronidazole in. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 7.

## 11 Anexos

	H3BO3/M	H3PO4/M	CHCOOH/M	NaOH /M
<b>pH</b>	Vol en mL	Vol en mL	Vol en mL	1 M
<b>2.00</b>	<b>5.03</b>	<b>5.03</b>	<b>5.03</b>	<b>0.70</b>
<b>3.00</b>	<b>4.50</b>	<b>4.51</b>	<b>4.51</b>	<b>1.66</b>
<b>4.00</b>	<b>4.33</b>	<b>4.32</b>	<b>4.33</b>	<b>2.00</b>
<b>5.00</b>	<b>4.00</b>	<b>4.00</b>	<b>4.00</b>	<b>2.59</b>
<b>6.00</b>	<b>3.79</b>	<b>3.79</b>	<b>3.79</b>	<b>2.98</b>
<b>7.00</b>	<b>3.55</b>	<b>3.54</b>	<b>3.54</b>	<b>3.44</b>
<b>8.00</b>	<b>3.33</b>	<b>3.33</b>	<b>3.33</b>	<b>3.85</b>
<b>9.00</b>	<b>3.18</b>	<b>3.18</b>	<b>3.18</b>	<b>4.12</b>
<b>10.00</b>	<b>3.00</b>	<b>3.00</b>	<b>3.00</b>	<b>4.45</b>