UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

Universidad de Concepción

Desarrollo de un método cinético espectrofotométrico para la determinación de Cefoperazona en muestras de agua potable y orina.

Cristian Poza Retamales
TESISTA

César Soto Salazar
Cristian Pereira Aburto
TUTORES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y MEDIO AMBIENTE
CARRERA DE INGENIERÍA DE EJECUCCIÓN EN QUÍMICA
MENCIÓN CONTROL 2021

Desarrollo de un método cinético espectrofotométrico para la determinación de Cefoperazona en muestras de agua potable y orina.

Cristian Poza Retamales
2021

Resumen.

Los métodos de espectrofotometría cinética tienen niveles de precisión y sensibilidad que son comparables a los de otros métodos, permitiéndoles ser utilizados en la cuantificación de analitos de formulaciones farmacéuticas en diferentes matrices. En este trabajo se describe un método cinético espectrofotométrico indirecto para la determinación de cefoperazona por oxidación alcalina con permanganato en muestras de agua de agua potable y orina fortificadas con cefoperazona. Las mediciones de cambios en la absorbancia a 610 nm fueron utilizadas como criterio del progreso de la reacción. La optimización de las variables químicas de la reacción de oxidación se realizó utilizando un diseño experimental mediante análisis multivariado. Los valores optimizados fueron 5 minutos de tiempo de reacción (tiempo fijo), $KMnO_4$ 1.11×10^{-3} mol L^{-1} y NaOH 0.27 mol L^{-1}. Bajo estas condiciones se construyeron curvas de calibración, para las cuáles los límites de detección obtenidos en muestras fortificadas de agua potable y orina fueron 3.75×10^{-7} mol L^{-1} y 3.74×10^{-7} mol L^{-1}, respectivamente. El método es simple y no requiere instrumentos costosos o pasos de extracción complicados del producto de reacción.

Índice.

1. Introducción…….5
2. Hipótesis…….. 6
3. Objetivos……..6
3.1. Objetivo general……...6
3.2. Objetivos específicos……..6
4. Parte experimental……... 7
4.1. Insumos……7
4.1.1. Reactivos……..7
4.1.2. Equipos, Instrumentos y Programas computacionales…… 7
4.1.3. Materiales…… 8
4.2. Procedimientos experimentales……... 8
4.2.1. Preparación de soluciones……8
4.2.2. Procedimiento para determinación de CPZ en soluciones estándar ……..…… 9
4.2.3. Procedimiento para determinación de CPZ en agua Potable…….. 9
4.2.4. Procedimiento para determinación de CPZ en Orina…….. 9
5. Resultados y discusión……..……10
5.1. Estudios preliminares……...10
5.1.1. Conducta espectral del sistema CPZ……..…. 10
5.1.2. Estudios del efecto de las variables experimentales……...….. 10
5.1.3. Optimización de las variables……...……...13
5.2. Determinación estequiométrica de la reacción…...……15
5.3. Estudios cinéticos ……...…… 15
5.3.1. Cinética de la reacción…… 15
5.3.2. Evaluación del método cinético de cuantificación…….. 15
5.4. Curva de calibración y parámetros analíticos con solución estándar de CPZ…..... 16
5.5. Validación y aplicación……... 17
6. Conclusiones……..... 20
7. Agradecimientos..……..... 20
8. Referencias bibliográficas……... 21

1. Introducción.

En las últimas décadas, los tratamientos terapéuticos para las enfermedades infecciosas han sido mejoradas y ampliado su uso a través de nuevos medicamentos más eficaces y menos tóxicos. Cefoperazona (CPZ) (Fig. 1) es una cefalosporina semisintética de tercera generación ampliamente utilizada para tratar una variedad de infecciones bacterianas en humanos y animales [1]. CPZ es una molécula polar, soluble en agua, (pK_a=3.38) [2].

Además, presenta una fracción tetrazolio que es resistente a la beta-lactamasa. Al igual que todos los antibióticos betalactámicos, CPZ se fija a proteínas específicas de unión a penicilina (PBPs) ubicadas dentro de la pared celular bacteriana, inhibiendo la tercera y última etapa de la síntesis de la pared bacteriana. CPZ es útil para el tratamiento de infecciones bacterianas graves en el cerebro, sistema respiratorio, urinario y en pacientes trasplantados de órganos. CPZ se administra por vía intramuscular o intravenosa como suero fisiológico. Aunque el fármaco se excreta principalmente en la bilis, la excreción urinaria principalmente por filtración glomerular representa hasta el 30% de una dosis sin cambios dentro de las 12 a 24 horas [2]. El monitoreo de medicamentos es esencial en el control farmacéutico y para evitar la intoxicación. La USP ha publicado un método estándar para la determinación de CPZ en formulaciones farmacéuticas por HPLC [3]. Otros métodos reportados en formulaciones farmacéuticas incluyen espectrofotometría UV-vis [4 5 6 7 8 9 10], HPLC [11], Electroanalítica [11 12 13 14], Espectroscopia IR [15 16], Quimioluminiscencia con y sin FIA [17 18 19 20]. La determinación de CPZ en fluidos humanos se ha realizado mediante Espectrofotometría [8], Electroforesis [21], Electroanalítica [12 13 14], Quimioluminiscencia [18] y diferentes métodos cromatográficos [22 23 24 25 26 27 28]. Didamony et al. [4] publicó un método de determinación experimental basado en la oxidación CPZ con $KMnO_4$ en medio alcalino. Este método tiene las desventajas inherentes al procedimiento experimental univariado, además del tiempo de reacción seleccionado (obtenido) y el límite de detección. Se han utilizado métodos espectrofotométricos cinéticos en la cuantificación de CPZ y otros fármacos en diferentes matrices biológicas [29]. La utilidad analítica de un método cinético se basa en la viabilidad de controlar el cambio en la concentración (variación de absorbancia) de un reactivo en función del tiempo [30]. Para la cuantificación del analito, se evalúa el método analítico cinético más adecuado teniendo en cuenta, aplicabilidad y parámetros lineales [17 19 20]. Este trabajo describe la determinación espectrofotométrica cinética indirecta de CPZ agregado en muestras de orina y agua potable. El método desarrollado utiliza el monitoreo a 610 nm del producto (Manganato) resultante de la reducción en medio alcalino de MnO_4^- por la oxidación de CPZ. Además, se estudió la optimización de las variables químicas dependientes de la reacción mediante el uso de diseño experimental de análisis multivariado.

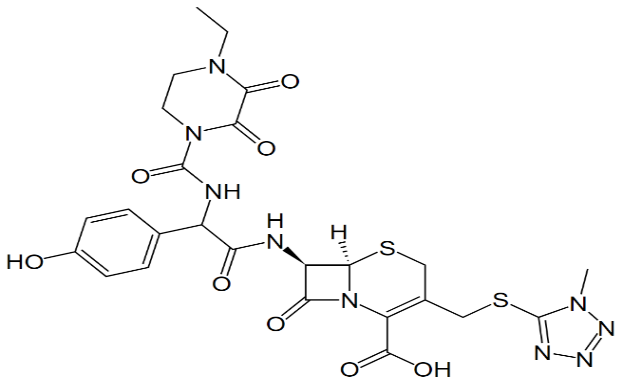

Figura 1. Cefoperazona (CPZ). Ácido (6*R*,7*S*)-7-{[2-[(4-etil-2,3-dioxo-piperazina-1-carbonil)amino]-2-(4-hidroxifenil)acetil}amino]-3-[(1-metiltetrazol-5-il)sulfanilmetil]-8-oxo-5-tia-1-azabiciclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxílico.

2. Hipótesis.

En base a la estructura molecular y comportamiento químico (grupos funcionales) de CPZ, se postula que la molécula podrá ser atacada por un agente oxidante, en determinadas condiciones experimentales óptimas de trabajo, con lo que será posible su monitoreo cinético para desarrollar una metodología de análisis cuantitativo usando la técnica de espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis.

3. Objetivos.

3.1 Objetivo general.

Desarrollar un método de análisis para la determinación de CPZ, con el fin de obtener resultados confiables. Esto se logrará usando cinética química en conjunto con espectrofotometría UV-Vis.

3.2 Objetivos específicos.

- Estudiar la conducta espectral de los reactivos participantes de la reacción de oxidación en función de variables experimentales.
- Optimizar las variables involucradas en el estudio cinético de la reacción redox (CPZ–$KMnO_4$).
- Realizar la determinación de la relación estequiométrica del sistema CPZ–$KMnO_4$.
- Determinar los parámetros cinéticos (orden de reacción y constante de velocidad), para la obtención de la ley de velocidad.
- Determinar el método cinético de cuantificación que presente los mejores parámetros analíticos.
- Realizar una validación prospectiva del método cinético espectrofotométrico para la determinación de CPZ en muestras de agua potable y orina.

4. Parte experimental.

4.1. Insumos.

4.1.1. Reactivos.

- Cefoperazona de sodio, estándar grado analítico elaborado por Sigma, con una masa molar 353,97 g mol^{-1} y una pureza de 98%. No. CAS 78613-38-4

- Permanganato de Potasio ($KMnO_4$), estándar grado analítico Emsure® elaborado por Merck, con una masa molecular 158,03 g mol^{-1} y una pureza del 99 %. No. CAS 7722-64-7

- Hidróxido de Sodio (NaOH), reactivo grado ISO para análisis elaborado por Merck, con una masa molecular 40,0 g mol^{-1} y una pureza del 99 %. No. CAS 1310-73-2

- Ácido Oxálico dihidrato ($H_2C_2O_4$), reactivo analítico de grado Emsure®, elaborado por Merck, con una masa molecular 126,07 g mol^{-1} y una pureza del 99,5-102 %. No. CAS 6153-56-6

- Ácido clorhídrico (HCl)fumante, reactivo analítico de grado Emsure®, elaborado por Merck, con una densidad de 1,19 g mL^{-1} y una pureza del 37 %. No. CAS 7647-01-0

- Agua desionizada , 500 M Ω cm (0,05 µS cm^{-1}).

4.1.2. Equipos, Instrumentos y Programas computacionales.

- Espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Lambda 35.
- Software UV Win Lab DPV versión 1.00.00.0008 de Perkin Elmer.
- Software Origin Pro 8 SR0, versión 8.0724 de Origin-Lab Corporation.
- Software Modde, versión 7.0.0.1 de Umetrics AB.
- Balanza analítica Radwag AS 60/220/C/2.
- Sistema de purificación de Agua Direct-Q* 3UV, de Millipore, Merck
- pH-Metro, CE, OD y temperatura Hanna modelo HI 2020, con una precisión de ±0.01 pH.
- pH-Metro, ORP y temperatura Hanna modelo HI 2221, con una precisión de ±0.01 pH.
- Electrodo de pH Hanna modelo HI 1043
- Electrodo de pH Hanna modelo HI 1043P
- Baño ultrasónico Digital Ultrasonic Cleaner, modelo CD-4820.
- Placas calefactoras y agitadoras Lab Tech modelo LMS-1003.
- Estufa de secado MMM Group Ecocell modelo LSIS-B2V/EC55 .
- Cronómetro Lab Alert modelo Triple Timer.
- Sistema de Extracción por vacío en fase sólida Perkin Elmer Visiprep SPE 57030-U
- Bomba de vacío de membrana libre de aceite Rocker 400

4.1.3. Materiales.

- Cubeta de cuarzo Perkin Elmer, material Q, paso óptico de 10 mm.
- Imanes para agitadores magnéticos ovales 10x4 mm.
- Matraces de aforo, clase A, de diferentes volúmenes (5, 25, 50, 100, 250 y 500 mL).
- Micropipetas Transferpette® S-Brand (100 - 1000 µL y 0,1-5 mL).
- Vasos de precipitado de 25, 50 y 100 mL Duran®.
- Bureta de 25±0,05 mL, Glassco®.
- Lana de vidrio.
- Columna SPE Rec-18 200 mg/3 mL, Perkin Elmer

4.2. Procedimientos experimentales.

4.2.1. Preparación de soluciones.

Cefoperazona.

Se preparó una solución estándar de CPZ disolviendo 17.17 mg en 25 mL para obtener una concentración de 1.035×10^{-3} mol L^{-1} aforando con agua desionizada, posterior sonicación por 10 min. La misma solución se utilizó para preparar otras concentraciones con la dilución apropiada con agua desionizada.

Permanganato de Potasio.

Se preparó una solución de $KMnO_4$ disolviendo 15.88 mg en 100 mL de agua desionizada, se calentó la solución durante 30 minutos y se dejó reposar durante 5 horas. A continuación, se filtró con lana de vidrio en un embudo analítico hacia un matraz de aforo de 100 mL y se aforó la solución con agua desionizada hervida (fría).

La estandarización del $KMnO_4$ se realizó valorando la solución con Oxalato de Sodio (patrón primario) secado previamente, se consideró un gasto de volumen de 5 mL de $KMnO_4$, para lo cual se masó la cantidad necesaria de oxalato y se disolvió la sal en una solución de H_2SO_4 1.0 mol L^{-1}, realizando la valoración de esta solución cada dos semanas.

Hidróxido de Sodio.

Se preparó una solución 1.0 mol L^{-1}, para lo cual se disolvió 20 g en 500 mL de agua desionizada previamente hervida, se sonicó durante 5 min, de esta solución se prepararon las diferentes concentraciones de NaOH utilizadas.

Ácido Oxálico.

Se preparó una solución 0.1 mol L^{-1}, para lo cual se disolvió 633.8 mg en 100 mL de agua desionizada, se sonicó durante 5 minutos a 30 °C.

Ácido Sulfúrico.

Se preparó una solución 1.0 mol L^{-1}, para lo cual se agregó una alícuota de 5.56 mL de H_2SO_4 concentrado 95-97 % en 100 mL y se disolvió con agua desionizada.

4.2.2. Procedimiento para determinación de CPZ en soluciones estándar.

Para la determinación de CPZ en los ensayos correspondientes a estudios preliminares, optimización del método, parámetros cinéticos y analíticos, se utilizaron matraces aforados ámbar de 5 mL, a los cuales se les agregó los respectivos volúmenes de cada reactivo con el fin de obtener la concentración requerida de este en el volumen del matraz. El enrase de estos se llevó a cabo con agua desionizada grado analítico, mientras que la agitación de las soluciones se realizó a través de placas agitadoras. El control de la temperatura (Tº) se llevó a cabo ajustando el Peltier del espectrofotómetro a 20ºC, bajo condiciones de tiempo de reacción controladas por cronómetros de laboratorio individuales para cada ensayo. Las lecturas de absorbancia de las soluciones se realizaron en cubetas de cuarzo abarcando un espectro entre los 190 y 800 nm. Cada ensayo contempló un blanco de reactivo respectivo, el cual contenía todos los reactivos exceptuando CPZ.

4.2.3. Procedimiento para la determinación de CPZ en agua potable.

El método desarrollado se aplicó en la cuantificación de CPZ en muestras de agua potable enriquecida con cantidades conocidas de fármaco. Las muestras analizadas (500 mL) se recogieron de los grifos ubicados en dos laboratorios (Laboratorio de Química Analítica y Laboratorio de Espectroscopía Analítica). Las muestras se recogieron en botellas de polietileno sin adición de ningún agente conservante y analizadas dentro de 5 horas. Con el fin de eliminar las partículas suspendidas finas (materia orgánica e inorgánica) y gases disueltos, que son los interferentes potenciales que pueden ser oxidados por $KMnO_4$, las muestras se hirvieron (5 min) y se filtraron (0.25µm). Las alícuotas de agua potable fueron sobrecargadas con concentraciones conocidas de CPZ y luego las muestras se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

4.2.4. Procedimiento para la determinación de CPZ en Orina.

Para las muestras de orina enriquecidas con CPZ, en este estudio, se aplicó un tratamiento de extracción en fase sólida (SPE) desarrollado por nuestro equipo de investigación [31] el cual consiste en lo siguiente:

Preparar las muestras mezclando 1 parte volumétrica de orina (filtrada 0.22 µm), 2 partes volumétricas de solución CPZ 1.80×10^{-2} mol L^{-1} y 1 parte volumétrica de solución de CH_3CO_2Na 0.1 mol L^{-1} (pH=4.3).

Acondicionar la columna con 6 mL de metanol y agua desionizada (Rec-18 200 mg/3 mL, Perkin Elmer, 1 mL min^{-1}). Posteriormente cargar con 1.0 mL de muestra, lavar con 3 mL de HCl 0.1 mol L^{-1} y luego eluír con 3 mL de metanol. Tomar un tercio del volumen de elución y secar bajo un flujo de N_2(g) a 40°C y reconstituir en un volumen adecuado de agua desionizada para obtener una solución patrón de CPZ de 5.00×10^{-4} mol L^{-1}.

Para la determinación del analito se utilizaron alícuotas de este patrón.

5. Resultados y discusión.

5.1. Estudios preliminares.

5.1.1. Conducta espectral de CPZ.

En medio alcalino, durante el progreso de la reacción de CPZ con $KMnO_4$, se produce manganato (MnO_4^{2-}), y el color de la solución cambia de violeta a azul y luego a verde. El azul se origina de la mezcla de MnO_4^- (violeta) y MnO_4^{2-} (verde). El progreso de la reacción fue seguido por el monitoreo del aumento de MnO_4^{2-} a 610 nm en función del tiempo, que es proporcional a la concentración de CPZ, lo cual se puede apreciar en la Figura 2.

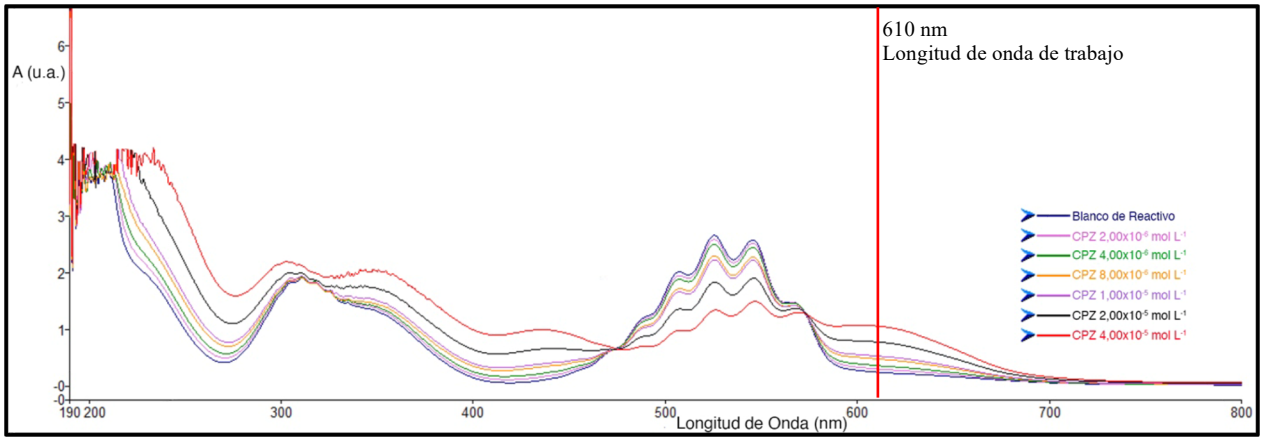

Figura 2: Sistema CPZ-$KMnO_4$ a diferentes concentraciones de CPZ en condiciones optimizadas.

5.1.2 Estudio del efecto de las variables experimentales.

Las propiedades espectrofotométricas del MnO_4^{2-} (producto coloreado) así como los efectos de variables experimentales, tiempo de reacción (t), concentraciones de NaOH (pH) y $KMnO_4$ sobre el desarrollo del color y su estabilidad fueron estudiados por un método univariado. Se realizaron las mediciones de absorbancia a 610 nm utilizando CPZ 1.00×10^{-5} mol L^{-1}. Se estudió el efecto de la concentración de $KMnO_4$ en la reacción en el rango $3.10\times10^{-4} – 2.23\times10^{-3}$ mol L^{-1}. Los resultados muestran una dependencia proporcional entre la concentración de oxidante y la velocidad de reacción. Como se muestra en la Figura 3, la señal tiene un incremento hasta concentraciones cercanas a 1.27×10^{-3} mol L^{-1}, sin embargo, a concentraciones más altas, se observa una disminución en el aumento de la señal (0.01 [au]). Sin embargo, esto no afecta la velocidad de reacción porque, solo depende de la concentración de sustrato (CPZ), por lo que se seleccionó inicialmente 1.27×10^{-3} mol L^{-1} para los siguientes estudios. La influencia de la concentración de NaOH en la velocidad de reacción se estudió entre 0 y 4.55×10^{-2} mol L^{-1}, y los resultados obtenidos muestran la influencia de la alcalinidad del medio en la reacción de oxidación (Figura 4). Las variaciones de absorbancia para cada valor de concentración de NaOH disminuyeron a partir de 2.40×10^{-3} mol L^{-1}. Por lo tanto, este valor fue elegido como la concentración más adecuada. El efecto del tiempo de reacción se estudió midiendo la absorbancia a intervalos de tiempo crecientes. Las mediciones se realizaron cada 5 min durante un intervalo de

35 min (Figura 5). Las variaciones de absorbancia para cada valor de tiempo de reacción disminuyeron desde 5 min, durante más tiempo la diferencia en la absorbancia fue despreciable. En base a esto, se seleccionaron 5 min como tiempo de reacción.

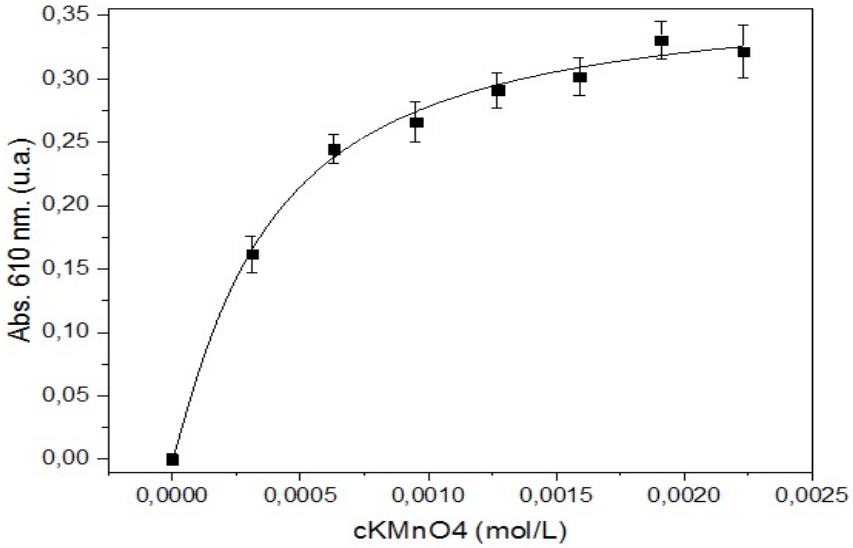

Figura 3: Efecto de la concentración de $KMnO_4$ (3.1×10^{-4} – 2.23×10^{-3} mol L^{-1}) sobre el sistema CPZ-$KMnO_4$, usando CPZ 1.00×10^{-5} mol L^{-1}, NaOH 1.68×10^{-2} mol L^{-1}, t = 5 min y monitoreando a 610 nm.

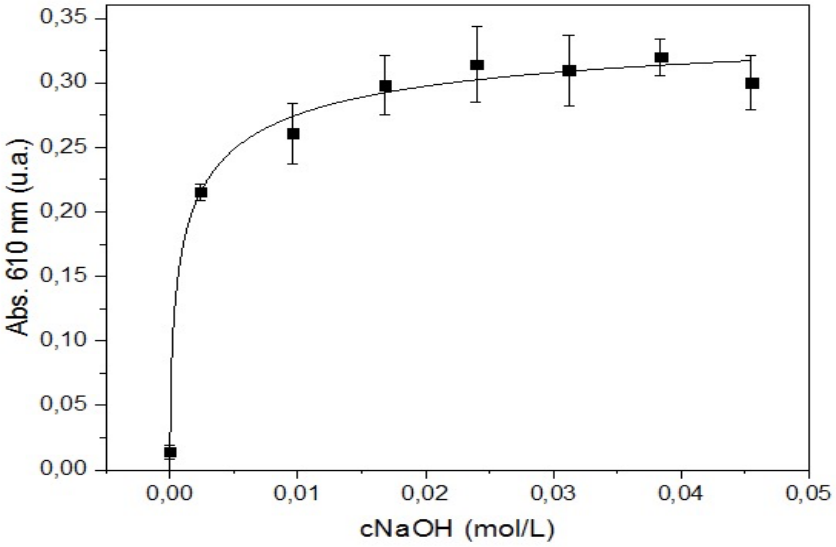

Figura 4: Efecto de la concentración de NaOH (0 and 4.55×10^{-2} mol L^{-1}) sobre el sistema CPZ-$KMnO_4$, usando CPZ 1.00×10^{-5} mol L^{-1}, $KMnO_4$ 1.27×10^{-3} mol L^{-1}, t = 5 min y monitoreando a 610 nm.

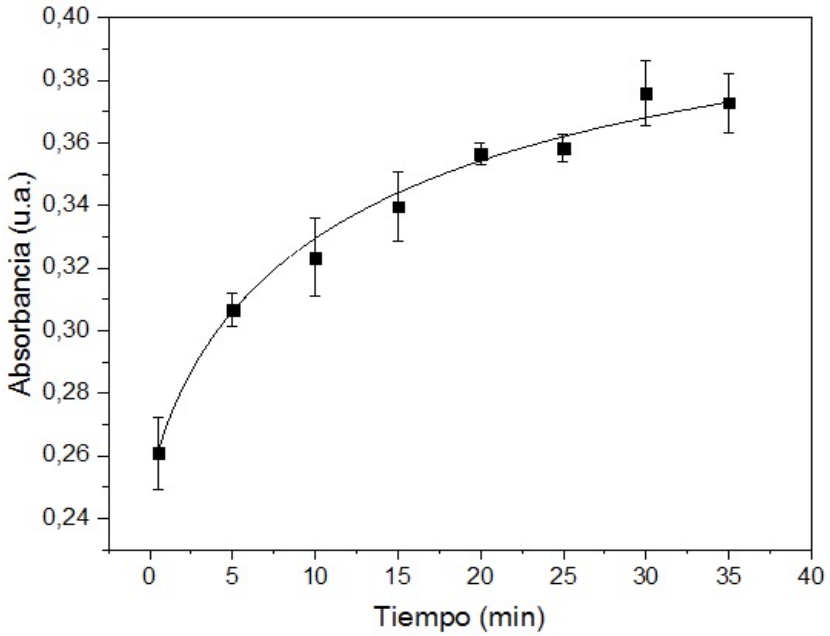

Figura 5: Efecto del tiempo de reacción (*t*) (0 - 60 min) sobre el sistema CPZ-$KMnO_4$, usando NaOH 2.40×10^{-2} mol L^{-1}, CPZ 1.00×10^{-5} mol L^{-1}, $KMnO_4$ 1.27×10^{-3} mol L^{-1} y monitoreando a 610 nm.

5.1.3. Optimización de variables.

Con los resultados obtenidos en los estudios preliminares, se realizó un diseño factorial 2^4, con las variables estudiadas en el método univariado: tiempo de reacción (t), concentraciones de NaOH (pH) y $KMnO_4$, lo cual permite describir la importancia de las variables y sus interacciones para el sistema CPZ-$KMnO_4$. Los resultados obtenidos (Figura 6) demuestran que la reacción de oxidación de CPZ con KMnO4, es influenciada principalmente por la concentración de $KMnO_4$ y luego por la concentración de NaOH (pH).

Las variables experimentales se optimizaron utilizando la metodología de superficie de respuesta, que permitió determinar los valores óptimos dentro de un rango definido con un conjunto mínimo de experimentos. Para optimizar la reacción, se aplicó un diseño circunscrito central compuesto (CCC) considerando el tiempo de reacción, las concentraciones de NaOH y $KMnO_4$, utilizando los valores indicados en la Tabla 1. El polinomio obtenido mediante la aplicación de este procedimiento indica que los valores óptimos son 2.70×10^{-2} mol L^{-1}, 1.11×10^{-2} mol L^{-1} y 18.4 min para las concentraciones de NaOH, $KMnO_4$ y tiempo de reacción, respectivamente (Figura 7). Se realizó la verificación experimental de los valores predichos por el modelo obteniendo resultados satisfactorios. Finalmente, el modelo se ajustó a 2.70×10^{-2} mol L^{-1}, 1.11×10^{-2} mol L^{-1} para las concentraciones de NaOH y $KMnO_4$ y 5 min para el tiempo de reacción, ya que entre 5 y 18 min hay un ligero aumento de 0,02 [ua] (Tabla 2).

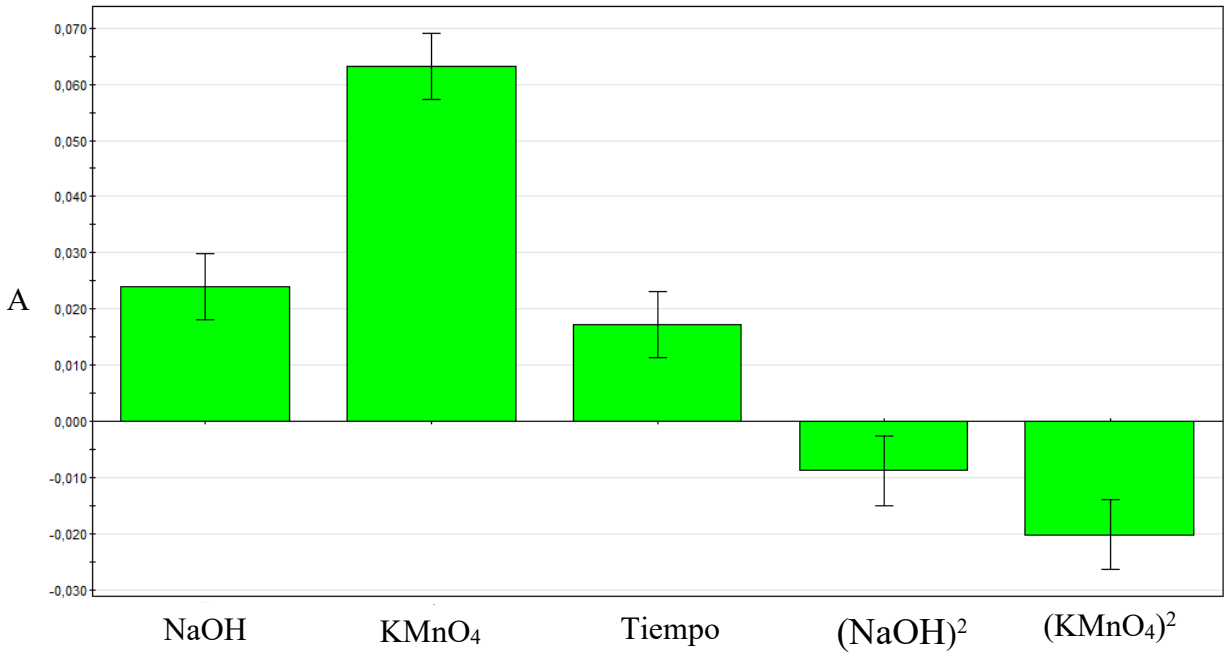

Figura 6: Influencia de las variables en el sistema CPZ-$KMnO_4$.

Tabla 1: Valores codificados para el diseño CCC.

Factor	-2	-1	0	+1	+2
NaOH [mol L^{-1}]	0.0047	0.0096	0.0168	0.0240	0.0289
$KMnO_4$ [mol L^{-1}]	9.11×10^{-5}	3.10×10^{-4}	6.31×10^{-4}	9.52×10^{-4}	1.17×10^{-3}
Tiempo [min]	2	5	10	15	18

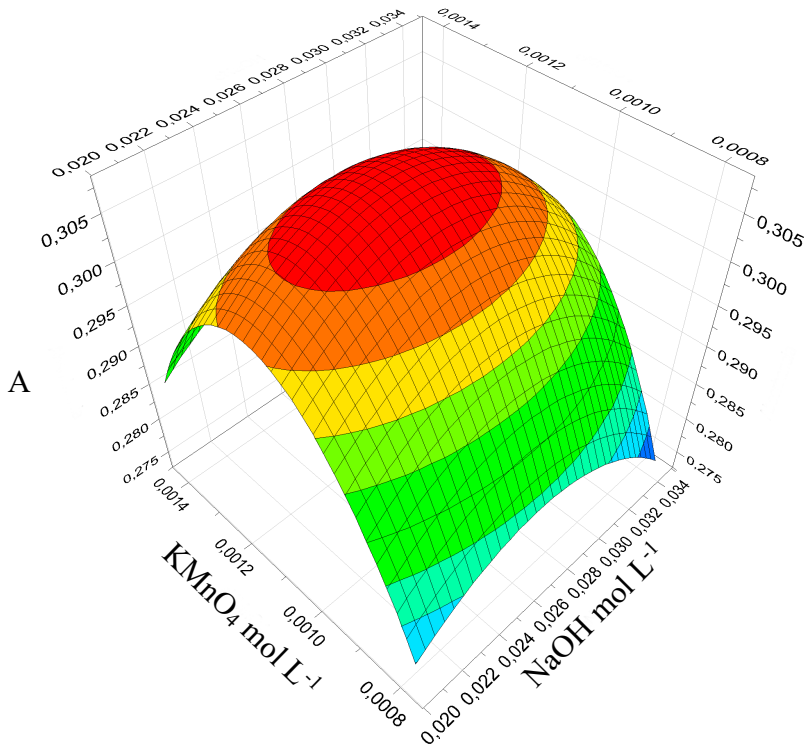

Figura 7: Gráfico de superficie de respuesta del diseño circunscrito central compuesto (CCC) para el sistema CPZ-$KMnO_4$.

Tabla 2: Verificación del modelo CCC.

Valor	NaOH [mol L^{-1}]	$KMnO_4$ [mol L^{-1}]	t [min]	A [u.a.]	Rango de A [u.a.]
Predicho	0,0267	1.11×10^{-3}	18.24	0.3550	0.3342-0.3759
Obtenido	0,0270	1.11×10^{-3}	18.24	0.3430	
Predicho	0,0270	1.11×10^{-3}	5	0.3236	0.2897-0.3273
Utilizado	0,0270	1.11×10^{-3}	5	0.3230	

P = 0.05

5.2. Determinación estequiométrica de la reacción.

La relación estequiométrica se determinó utilizando el método logarítmico [32], en condiciones experimentales optimizadas y monitoreo de absorción a 610 nm. Regresiones lineales del logA v/s log [CPZ] a concentración constante de $KMnO_4$ y logA v/s log[$KMnO_4$] a concentración constante de CPZ, permiten obtener pendientes de 0.709 y 0.842, respectivamente. Por lo tanto, la relación molar de la reacción fue 0.709 : 0.842 ≈ 1 : 1.

5.3. Estudios Cinéticos.

5.3.1. Cinética de la reacción.

Considerando condiciones de pseudo-primer orden ([$KMnO_4$] >> [CPZ]) y las variables optimizadas, el comportamiento cinético de la reacción puede ser representado por la ecuación $v=k'[CPZ]^n$. A partir de la gráfica de log v v/s log [CPZ], se obtuvieron el orden de reacción (n) y la constante de velocidad (k'). Estos valores fueron 0.907 (≈1) y 232.7 s^{-1}, respectivamente. Para determinar el cambio en la pendiente de la curva se derivó en primer orden.

5.3.2. Evaluación del método cinético de cuantificación.

De acuerdo con la ley de velocidad de reacción, $v = 232.7s^{-1}[CPZ]^{0.907}$, se realizaron experimentos para obtener la concentración de CPZ. Se probaron los métodos de velocidad inicial, velocidad constante y tiempo fijo. La selección de los métodos cinéticos se basó en la linealidad, aplicabilidad, sensibilidad y reproducibilidad. Los métodos de velocidad inicial y velocidad constante fueron descartados, porque muestran baja linealidad, reproducibilidad y sensibilidad. El método del tiempo fijo presenta correlación lineal para cada valor de tiempo estudiado. Se utilizó y midió con precisión un conjunto de valores de tiempo de reacción (0 a 35 min) y se obtuvieron sus respectivas ecuaciones lineales y parámetros estadísticos aplicando una prueba t-Student (dos colas) con n−2 grados de libertad (Tabla 3) y estableciendo como hipótesis nula (H_0) la no correlación entre la concentración de CPZ y la absorbancia medida a 610 nm.

Los resultados muestran que $t_{calculado} > t_{crítico}$, confirmando el comportamiento lineal para cada valor de tiempo y rechazando la hipótesis propuesta. La sensibilidad aumenta con el tiempo, pero la correlación lineal disminuye. A los 30 min, el comportamiento fue más lineal y presentó mayor sensibilidad, pero la ganancia en unidades de absorbancia no fue significativa. Sin embargo, para t = 5 min, los parámetros lineales y estadísticos fueron óptimos. Este método y valor de tiempo fueron seleccionados para la cuantificación CPZ porque muestra un aumento de sensibilidad.

Tabla 3: Curvas de calibración y parámetros estadísticos para diferentes tiempos establecidos, monitoreando a 610 nm y concentración de CPZ que oscilan entre 2.00×10^{-6} y 4.00×10^{-5} mol L^{-1}

t [min]	R^2	Error típico ($x10^{-2}$)	t calculado	Intercepto ($x10^{-2}$)	Pendiente
0	0.9830	4.65	10.71	5.552	15677.5
5	0.9741	5.02	12.26	7.887	19403.1
10	0.9727	5.72	11.93	8.076	21485.7
15	0.9714	6.06	11.65	8.077	22226.3
20	0.9727	5.92	11.95	8.391	22268.1
25	0.9710	6.21	11.58	8.608	22654.1
30	0.9682	6.50	11.03	9.133	22566.5
35	0.9628	7.08	10.18	1.404	22689.8

$t_{crítico}$ (P=0.05, n-2) → 2.78 para N=6

5.4. Curva de calibración y parámetros analíticos con solución estándar de CPZ.

Los parámetros analíticos se obtuvieron utilizando las condiciones experimentales óptimas y soluciones patrón CPZ con 30 blancos de reactivo (sin analito) (Tabla 4). La exactitud y la precisión se evaluaron con tres valores de concentración de CPZ (2.00×10^{-6}; 1.00×10^{-5}; 2.00×10^{-5} mol L^{-1}) a través de los porcentajes de recuperación y prueba t-Student, respectivamente. Se obtuvieron porcentajes de recuperación para intradía e interdía (Tabla 5), con 30 blancos de reactivo realizando mediciones durante 5 días consecutivos. Los resultados mostraron que, $t_{calculado}<t_{crítico}$, las diferencias entre los valores observados y esperados son aceptables según el porcentaje de confianza establecido como criterio de aceptación, presentados en los resultados de precisión y recuperación. Las recuperaciones estuvieron entre 98.25 y 102.7%, con precisión satisfactoria para el método analítico cinético evaluado.

Tabla 4: Parámetros analíticos utilizando solución estándar de CPZ.

Parámetro	Valor
Regresión lineal	A=26102.8C + $1.489x10^{-2}$
R^2	0.9993
LOD* [mol L^{-1}]	$3.50x10^{-7}$
LOQ* [mol L^{-1}]	$1.06x10^{-6}$
Rango lineal [mol L^{-1}]	$1.06x10^{-6}$ a $2.00x10^{-5}$
σ (Blancos)	$2.77x10^{-3}$

***LOD=3.3σ/m y LOQ=10σ/m**

Tabla 5: Análisis de ensayos de precisión y exactitud del procedimiento desarrollado para la determinación de CPZ en soluciones estándar intra e inter día.

Añadido $x10^{-6}$ $molL^{-1}$	Encontrado $x10^{-6}$ $molL^{-1}$	σ $x10^{-8}$	ES* $x10^{-8}$	Límites de confianza† $x10^{-8}$	t_{cal}‡	Recuperación (%)
			Intra día			
2.00	1.96	3.76	2.17	4.58	0.54	98.25
10.0	10.2	14.7	8.48	17.9	0.69	101.7
20.0	19.7	11.4	6.56	13.9	1.66	98.37
			Inter día			
2.00	1.93	3.45	1.99	4.20	1.10	96.71
10.0	10.3	9.96	5.75	12.1	1.57	102.7
20.0	19.8	21.9	12.7	26.7	0.54	98.97

*Error estándar, †límite de confianza (mol L^{-1}) con 95% y n-2 grados de libertad para los ensayos intra e interdía ($t_{crítico}$ = 4.3), y ‡ t_{cal} = $t_{calculado}$.

5.5. Validación y aplicación.

El procedimiento desarrollado fue validado y aplicado en muestras de agua potable y orina.

En las muestras de agua potable, los potenciales interferentes (materia orgánica e inorgánica) y los gases disueltos fueron eliminados de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 4.2.3. Luego, las muestras fueron fortificadas con tres concentraciones de CPZ (2.00×10^{-6}, 1.00×10^{-5} y 2.00×10^{-5} mol L^{-1}) de acuerdo con los procedimientos de la Sección 4.2.2. Además, se preparó una curva de calibración en agua potable en el rango de concentración CPZ de 2.00×10^{-6}–2.00×10^{-5} mol L^{-1} utilizando los blancos de reactivo respectivos. Los parámetros analíticos obtenidos se resumen en la Tabla 6. Para la evaluación de la precisión, los porcentajes de recuperación se obtuvieron utilizando las tres concentraciones de analito mencionadas anteriormente. Las mediciones para los ensayos intra e inter día se realizaron durante cinco días consecutivos, utilizando 30 blancos de reactivo. Los porcentajes de recuperación de los ensayos fueron 97.1-102.9% y 97.9-103.9%, respectivamente. El análisis estadístico de los resultados utilizando la prueba t-Student y el nivel de confianza del 95% mostró que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones reales y encontradas (Tabla 7).

Tabla 6: Parámetros analíticos para la determinación de CPZ utilizando una curva de calibración en agua potable.

Parámetro	Valor
Regresión lineal	A=25659.9C + $2.22x10^{-2}$
R^2	0.9989
LOD* [mol L^{-1}]	$3.75x10^{-7}$
LOQ* [mol L^{-1}]	$1.14x10^{-6}$
Rango lineal [mol L^{-1}]	$1.14x10^{-6}$ a $2.00x10^{-5}$
σ (Blancos)	$2.92x10^{-3}$

***LOD=3.3σ/m y LOQ=10σ/m**

Tabla 7: Análisis de ensayos de precisión y exactitud del procedimiento desarrollado para la determinación de CPZ en agua potable intra e inter día.

Añadido $x10^{-6}$ $molL^{-1}$	Encontrado $x10^{-6}$ $molL^{-1}$	σ $x10^{-8}$	ES* $x10^{-8}$	Límites de confianza† $x10^{-8}$	t_{cal}‡	Recuperación (%)
			Intra día			
2.00	2.04	1.34	0.77	1.63	1.62	101.9
10.0	10.4	18.4	10.6	22.4	1.14	103.6
20.0	19.5	42.3	24.4	51.5	0.74	97.30
			Inter día			
2.00	2.04	6.05	3.49	7.37	0.43	102.2
10.0	10.4	14.7	8.46	17.9	1.67	104.2
20.0	19.6	21.8	12.6	26.6	1.15	97.80

*Error estándar, †límite de confianza (mol L^{-1}) con 95% y n-2 grados de libertad para los ensayos intra e inter día ($t_{crítico}$ = 4.3), y ‡ t_{cal} = $t_{calculado}$.

Para las muestras de orina fortificada, la curva de calibración CPZ se preparó en el rango de concentraciones de 2.0×10^{-6}–2.0×10^{-5} mol L^{-1} utilizando el procedimiento respectivo. Los parámetros analíticos obtenidos se resumen en la Tabla 8. Para evaluar la exactitud, se obtuvieron porcentajes de recuperación utilizando tres concentraciones de CPZ (2.00×10^{-6}, 1.00×10^{-5} y 2.00×10^{-5} mol L^{-1}) preparadas con diferentes volúmenes de orina fortificada, que se midieron con precisión de acuerdo con el procedimiento de la Sección 4.2.2. Las mediciones para los ensayos intradía e inter día se realizaron durante cinco días consecutivos, utilizando 30 blancos de reactivo (Tabla 10), las tasas de recuperación de los ensayos fueron 100.3-101.1 % y 100.2-102.3 %, respectivamente, presentando una precisión satisfactoria. El efecto de la posible interferencia se eliminó mediante la aplicación del procedimiento de la sección 4.2.4.

Tabla 8: Parámetros analíticos para la determinación de CPZ utilizando una curva de calibración en orina fortificada.

Parámetro	Valor
Regresión lineal	A= 25727.8C + $1.85x10^{-2}$
R^2	0.9988
LOD* [mol L^{-1}]	$3.74x10^{-7}$
LOQ* [mol L^{-1}]	$1.13x10^{-6}$
Rango lineal [mol L^{-1}]	$1.13x10^{-6}$ - $2.00x10^{-5}$
σ (Blancos)	$2.92x10^{-3}$

***LOD=3,3σ/m y LOQ=10σ/m**

Tabla 9: Análisis de ensayos de precisión y exactitud del procedimiento desarrollado para la determinación de CPZ en orina fortificada intra e inter día.

Añadido $x10^{-6}$ $molL^{-1}$	Encontrado $x10^{-6}$ $molL^{-1}$	σ $x10^{-8}$	ES* $x10^{-8}$	Límites de confianza† $x10^{-8}$	t_{cal}‡	Recuperación (%)
			Intra día			
2.00	2.03	0.65	3.73	0.79	0.265	101.5
10.0	10.4	1.92	11.1	2.34	1.299	104.3
20.0	19.6	4.22	24.4	5.14	0.615	97.75
			Inter día			
2.00	2.06	0.32	1.85	0.39	1.013	102.8
10.0	10.5	1.46	8.44	1.78	2.126	105.4
20.0	19.7	2.18	12.6	2.65	0.911	98.28

*Error estándar, †límite de confianza (mol L^{-1}) con 95% y n-2 grados de libertad para los ensayos intra e inter día ($t_{crítico}$ = 4.3), y ‡ $t_{cal} = t_{calculado}$.

6. Conclusiones.

Este trabajo presenta un método cinético espectrofotométrico indirecto optimizado para la determinación de CPZ. La optimización se realizó utilizando un diseño circunscrito central compuesto (CCC) que se aplicó considerando el tiempo de reacción y las concentraciones de NaOH y $KMnO_4$. El modelo se ajustó a un tiempo de reacción de 5 min, 2.70×10^{-2} mol L^{-1}, 1.11×10^{-2} mol L^{-1} para concentraciones de NaOH y $KMnO_4$, respectivamente. La relación estequiométrica fue CPZ: $KMnO_4$ = 1:1. En la selección del método de cuantificación cinético se ensayaron tres métodos: velocidad inicial, velocidad constante y tiempo fijo. El método más adecuado fue el de tiempo fijo en 5 min porque presentaba valores satisfactorios de parámetros analíticos (R^2 y pendiente). La frecuencia de análisis y los LOD fueron mejores que las reportadas anteriormente [4].

Para evaluar la exactitud y precisión de la determinación de CPZ en las muestras propuestas, se realizaron varios ensayos que mostraron resultados estadísticamente satisfactorios con los porcentajes de recuperación y la respectiva prueba t-Student, para ambos tipos de muestras. Con esto se demostró que los efectos de interferencia de la matriz se anularon con el tratamiento desarrollado para cada muestra. Este método es simple y no requiere instrumentos de gran valor económico.

7. Agradecimientos.

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Investigación en Ciencia y Tecnología (FONDECYT), Proyecto nº 1161132.

8. Referencias bibliográficas.

1	M.S. Cohen, H.E. Washton, S.F. Barranco, Am. J. Med. 77 (1984) 35–41.
2	http://www.drugbank.ca/drugs/db01329.
3	USP 29 NF 24, 418, 2007.
4	El-Didamony, Akram M, Saad, Monir Z, El-Shaprawy, Dina S. IOS PRESS 2013, 12: 139-152.
5	Vu Dang Hoang Nguyen Thi Loan Spectrochimica Acta Part A, 121 (2014) 704–714.
6	Sha, Ou ; Liao, Y; Zhou, Y; Zhang, SL. Asian journal of chemistry. 25 : 5965-5967. a-2013.
7	Chen, L; Sha, O; Zhai, WJ ; Yang, JH. Asian journal of chemistry. 25: 7918-7920. B-2013.
8	ZHANG Xi-jun1, Feng Xiao2, Zhan Hai-hong, Li Quan-Min. Chemical Research and Application. 2011-07.
9	Senthilraja M, Sanjaypai P N. Indian J Pharm Sci 2006;68:384-5.
10	ELAZAZY Marwa S. ; Shalaby Abdalla , Scientia pharmaceutica 2003, 71: 211-228.
11	Sobhy M. El-Adl, Mohamed El. Hossinny El. Sadek, Asian J. Pharm. Ana. 2014; 4:168-173.
12	Parviz Norouzi, Bagher Larijani, Farnoush Faridbod, Int. J. Electrochem. Sci., 8 (2013) 6118 – 6130.
13	Dogan, B ; Golcu, A; Dolaz, M; Ozkan, SA. Current pharmaceutical analysis, 2009, 5: 179-189
14	Sabina Billová, René Kizek, František Jelen, Anal and Bioanal Chem. 2003, 377:362-369.
15	Vu Dang Hoang, Dao Thi Huyen, and Phan Hong Phuc Sabina Billová, René Kizek, František Jelen, Pavla Novotná. Journal of Analytical Methods in Chemistry, Volume 2013, Article ID 367914.
16	Huan-Huan Pang, Yan-Chun Feng, Xue-Bo Zhang, Chang-Qin Hu. Spectroscopy J., 2008, 17(1): 22-29
17	Pang, HH; Feng, YC; Hu, CQ; Xiang, BR. SPEC AND SPECTRAL ANALYSIS. 2006, 26: 2214-2218.
18	Li Y1, Lu J., Luminescence. 2006;21:251-5.
19	Du J1, Li H. Appl Spectrosc. 2010;64: 1154-9.
20	D. Y. Zhang, L. W. Zheng, Applied Mechanics and Materials, 333-335,. 1807-1810, 2013.
21	C Thongpoon, B Liawruangrath, S Liawruangrath, Analytica Chimica Acta, 2005, 553: 123-133.
22	Puig, P.; Tempels, F.W.; Borrull, F.; Calull, M.; Aguilar, C.; Somsen, G.W.; de Jong, G.J. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 856: 365-70 (2007).
23	Wang Rui-hua, Cheng Long-mei, Qu Heng-yan, JIPR. 2015, 42: 199-205.

24	Yingjie Zhou, Jing Zhang, Beining Guo∗, Jicheng Yu, Yaoguo Shi, Minggui Wang, Yingyuan Zhang. Journal of Chromatography B, 878 (2010) 3119–3124
25	Wu, XJ; Guo, BN; Zhang, J. Acta pharmacologica Sinica. 2006, 27: 216-216
26	GAO, Yan-hui, LI, Bao-qiu; Cheng, Xiu-min; Chin J of Pharmaceutical Analysis, 25, 2005, 1387-1390.
27	F. J. Jiménez Palacios, M. Callejón Mochón, Chromatographia 2005, Volume 62, Issue 7-8, pp 355-361
28	Borner K1, Borner E, Lode H., J Chromatogr. 1993 May 19;615(1):174-9.
29	Lafollette, G; Kaubisch, Journal of liquid chromatography,11: 683-700: 1988.
30	Effat Souri*, Aghil Rahimi, Nazanin Shabani Ravari and Maliheh Barazandeh Tehrani Iranian Journal of Pharmaceutical Research (2015), 14 (2): 435-442
31	Flow Injection Analysis (FIA) with Thermal Lens Spectrometry (TLS) for the Rapid Determination of Cefoperazone in Urine and Water César Soto, Renato Saavedra, David Contreras, Cristián Poza, Sandra Orellana & Georgina A. Olivares-Rentería, ORCID Icon Pages 1932-1944 Analytical letters Volume 55, 2022 - Issue 12
32	Rose, J., Advanced Physicochemical Experiments, Pitman, London, UK, p. 67, 1964