



Trabajo Final de Licenciatura en Química

Cuantificación simultánea de norfloxacin y sulfametoxazol por espectrofotometría UV y de fluorescencia: Validación de los métodos analíticos

Estudiante: Pablo Andrés Homoc

Directora: Dra. Graciela Pinto Vitorino

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Comodoro Rivadavia, 2024

Glosario

BLS = Bivariate Least Squares (mínimos cuadrados bivariados)

EJCR = Elliptical joint confidence region

ICH = International Council for Harmonisation

LD = Límite de detección

LQ = Límite de cuantificación

NOR = Norfloxacin

PABA = ácido *p*-aminobenzoico

PMMA = Polimetilmetacrilato

R² = Coeficiente de correlación

SMX = Sulfametoxazol

TLC = Thin Layer Chromatography

WLS = Weighted Least Squares (mínimos cuadrados ponderados)

λ_{emi} = Longitud de onda de emisión

λ_{exc} = Longitud de onda de excitación

Agradecimientos

A mi directora de Tesis, Dra Graciela Pinto Vitorino, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y por su presencia incondicional en el desarrollo del mismo.

Al Departamento de Química, por facilitarme el acceso al Laboratorio de Fotoquímica.

A la cátedra de Química General, por permitirme el uso del espectrofotómetro Uv-Visible.

A la Dra. Rosmari López, por proporcionarme las rutinas de Matlab necesarias para el análisis.

A mi familia, por su acompañamiento y comprensión a lo largo de estos años.

A Rocío, por ser mi sostén emocional y un pilar fundamental en mi vida.

A mis amigos y compañeros de estudio, por allanar y alivianar este largo camino.

“Nada es más estimable que el conocimiento, porque el conocimiento es la luz del alma racional. Así como la ausencia de luz es oscuridad, la ausencia de conocimiento es la oscuridad de la razón.”

Vishal Mangalwadi

Índice

1	Introducción	7
1.1	Validación de métodos analíticos	7
1.1.1	Generalidades	7
1.1.2	Exactitud y comparación de métodos analíticos	10
1.2	Norfloxacino.....	12
1.3	Sulfametoxazol	14
1.4	Espectroscopia de Absorción.....	16
1.4.1	Espectrofotometria “Zero crossing”	17
1.5	Espectroscopia de Fluorescencia	17
1.5.1	Efecto de filtro interno	18
1.6	Antecedentes.....	19
2	Objetivos	21
2.1	Objetivo Principal:.....	21
2.2	Objetivos Específicos:	21
3	Metodología	22
3.1	Reactivos e instrumental.....	22
3.1.1	Reactivos.....	22
3.1.2	Instrumental.....	22
3.2	Caracterización	23
3.2.1	Estándares de referencia.....	23
3.2.2	Puntos de fusión	23
3.2.3	Cromatografía en capa fina (TLC)	24
3.3	Validación por espectrofotometría Uv-visible.....	24
3.3.1	Linealidad.....	24
3.3.2	Especificidad	25
3.3.3	Precisión.....	25

3.3.4	Exactitud	26
3.4	Validación por fluorescencia	27
3.4.1	Estudio exploratorio	27
3.4.2	Linealidad.....	27
3.4.3	Especificidad.....	27
3.4.4	Precisión.....	28
3.4.5	Exactitud	28
3.5	Comparación entre métodos	28
3.6	Software.....	29
4	Resultados y Discusión	30
4.1	Caracterización.....	30
4.1.1	Puntos de fusión	30
4.1.2	Cromatografía en capa fina	30
4.2	Validación del método mediante Espectroscopía Uv-Visible	31
4.2.1	Espectros de absorción.....	31
4.2.2	Linealidad.....	32
4.2.3	Homogeneidad de varianzas.....	35
4.2.4	Rango lineal y dinámico.....	36
4.2.5	Límite de Detección y Límite de Cuantificación	36
4.2.6	Especificidad.....	37
4.2.7	Precisión.....	41
4.2.8	Exactitud	45
4.3	Validación del método fluorimétrico.....	46
4.3.1	Estudio exploratorio	46
4.3.2	Linealidad.....	47
4.3.3	Homogeneidad de varianzas.....	48
4.3.4	Rango lineal y dinámico.....	48

4.3.5	Límite de Detección y Límite de Cuantificación	48
4.3.6	Especificidad.....	49
4.3.7	Precisión.....	50
4.3.8	Exactitud	53
4.4	Comparación de métodos analíticos	54
5	Conclusiones	56
6	Bibliografía	57

1 Introducción

1.1 Validación de métodos analíticos

1.1.1 Generalidades

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, a través de estudios de laboratorio, que un método es apropiado para el uso propuesto, produciendo datos fiables. Los métodos analíticos nuevos o revisados deben contener suficiente información para evaluar los procedimientos planteados, identificando necesidades y ventajas, proporcionando una descripción detallada de los parámetros operativos del método para permitir que personas capacitadas puedan repetirlo, así como datos experimentales y cálculos que fundamenten el uso de los atributos estadísticos estudiados ¹.

Para realizar una correcta validación, la ICH (International Council for Harmonisation) define ciertos parámetros o atributos estadísticos junto con su determinación ².

Exactitud: Refiere a la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real, y debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico. Para determinar la exactitud del método se debe aplicar a una muestra de pureza conocida o sustancia de referencia, evaluándose mediante un mínimo de nueve determinaciones sobre al menos tres niveles de concentración que se encuentren dentro del intervalo especificado. Finalmente, este parámetro se calcula como el porcentaje de recuperación obtenido a partir de la valoración de una cantidad agregada conocida del analito en la muestra.

Precisión: Se define como el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. Se suele expresar como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión se considera en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La *repetibilidad* expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo corto de tiempo. La *precisión intermedia* expresa las variaciones intralaboratorio, como diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos y reactivos, etc. y se establece dependiendo de las circunstancias bajo las cuales se pretende utilizar el método analítico. Por último, la *reproducibilidad* expresa la precisión entre laboratorios (ensayos inter-laboratorios). La precisión, en todos sus niveles, se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, lo que permite un cálculo estadísticamente válido de la desviación estándar. Un método analítico se considera preciso en términos de repetibilidad si el coeficiente de variación de las

mediciones es inferior al 3%, mientras que en cuanto a la precisión intermedia no debe exceder el 5% ³.

Linealidad: La linealidad de un método analítico es la capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado. Esta se establece por medio de un método estadístico apropiado (como por ej., regresión por cuadrados mínimos). También es posible que los datos deban ser sometidos a una transformación matemática antes del análisis de regresión, como puede ser el caso del análisis mediante derivadas de primer o segundo orden.

El uso de la regresión lineal por el método de cuadrados mínimos (regresión no ponderada) para establecer una curva de calibración, supone la aceptación de tres premisas⁴:

- Los errores se deben únicamente a las señales instrumentales.
- Estos errores deben distribuirse de acuerdo a una distribución normal.
- Los errores absolutos de la señal instrumental deben ser constantes e independientes de la concentración de las disoluciones patrones del analito. Este criterio se define como criterio de *homoscedasticidad*.

Homogeneidad de varianzas: El error total de la respuesta instrumental proviene de una combinación de diferentes contribuciones en las distintas etapas del análisis, donde el error aleatorio no es dependiente de la concentración. En estos casos, se espera que los errores en la dirección de la respuesta de la curva de calibración sean iguales en todos los puntos. Esta situación se denomina caso homoscedástico u homogeneidad de varianzas, por lo que es posible efectuar una regresión lineal por cuadrados mínimos. En cambio, cuando los errores son aproximadamente proporcionales a la concentración de patrones, la varianza de la respuesta instrumental no es constante y a los datos se los denomina heteroscedásticos. En este último caso, se sugiere el uso de una regresión lineal mediante cuadrados mínimos ponderados⁵.

Dado que una regresión lineal ponderada resulta más complicada de aplicar que una regresión lineal simple, es recomendable previamente verificar la homogeneidad de la varianza. Esto puede efectuarse mediante una simple inspección visual de la gráfica de residuos de la regresión o, de forma analítica, con el uso de un parámetro estadístico como puede ser la prueba F ⁶.

Se debe tener en cuenta que existen diversas formas de evaluar la homogeneidad de varianzas (por ende, cumplir el supuesto de linealidad) del método como la presentada

anteriormente, pero ninguna es capaz de demostrar que una curva de calibración es lineal, sino que el modelo lineal planteado es razonable o se ajusta bien a los datos obtenidos.

Límite de detección y cuantificación: El límite de detección (LD) se expresa como una concentración o cantidad de analito derivada de la medida más pequeña que puede detectarse con razonable certeza para un procedimiento analítico dado. Por otro lado, el límite de cuantificación (LQ) es la concentración mínima de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión.

La ICH Q2(R2) recomienda estimar dichos límites para métodos instrumentales, utilizando uno de los siguientes enfoques:

- Basado en la inspección visual.
- Basado en la relación señal/ruido.
- Basado en la desviación estándar de una respuesta lineal y su pendiente.

En caso de utilizar el criterio basado en la respuesta lineal de la regresión, los límites pueden calcularse de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3.3\sigma/S$$

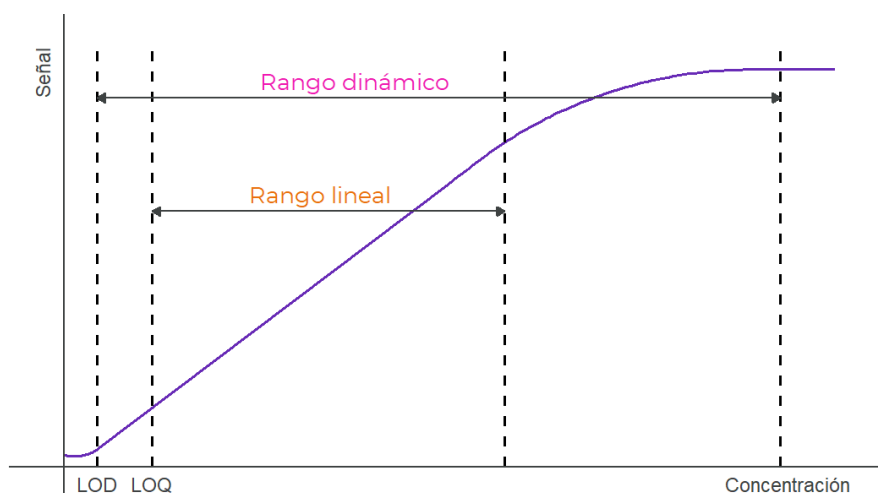
$$LQ = 10\sigma/S$$

En donde:

σ = desviación estándar del intercepto de la regresión

S = pendiente de la curva de calibración

Rango lineal y dinámico: El rango lineal comprende desde la menor concentración cuantificable (LQ) hasta la pérdida de la linealidad del método, mientras que el rango dinámico se considera que va desde la menor concentración detectable (LD) hasta la pérdida de la relación entre absorbancia y concentración (Figura 1) ⁷. En la zona de pérdida de linealidad, en principio, podría aplicarse un método de regresión polinómica para la calibración, por lo que dicha zona podría utilizarse con fines predictivos.



*Figura 1: Rango lineal y dinámico de un método analítico*⁷

Especificidad: La especificidad o selectividad es la capacidad de un método para evaluar inequívocamente al analito en presencia de los componentes que pueden estar presentes tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc. Para ensayos de valoración, la especificidad implica asegurar un resultado que permita establecer el contenido del analito en la muestra. Se debe demostrar que el método no se ve afectado por la presencia de otras sustancias, pudiéndose agregar cantidades apropiadas de impurezas o excipientes y demostrando que el resultado de la valoración no se ve afectado por la presencia de estos.

1.1.2 Exactitud y comparación de métodos analíticos

La comparación de dos métodos analíticos puede realizarse mediante el método de la región elíptica de confianza conjunta (EJCR, por sus siglas en inglés) entre la pendiente y la ordenada al origen. Sin entrar en detalles matemáticos, el procedimiento consiste en definir un intervalo de confianza conjunto (generalmente del 95%), representado como una región en el plano de dos variables (pendiente y ordenada al origen), ya que resultan ser estadísticamente dependientes. En este contexto, se evalúa si el punto (1,0), valor ideal o teórico de la pendiente y ordenada al origen, está contenido dentro de dicha región elíptica de confianza (*Figura 2*)⁸.

Esta comparación se puede llevar a cabo mediante el análisis de una serie de muestras de validación, las cuales poseen concentraciones de analito dentro del rango de linealidad previamente establecido. En primer lugar, se calculan los valores de concentraciones predichas

por ambos métodos, y posteriormente se calcula la regresión lineal que existe entre ellos. Si la recta obtenida posee una pendiente igual a 1 y un intercepto igual a 0, podemos decir ambos métodos son equivalentes en términos de exactitud, conduciendo a resultados similares.

Por otro lado, se debe tener en cuenta el supuesto de que la incertidumbre en los patrones es significativamente menor al ruido instrumental. En caso de ser así, para obtener la EJCR podemos utilizar una regresión ponderada (WLS) o, si no se cumple dicho supuesto, se debe recurrir al método de mínimos cuadrados bivariados (BLS), el cual contempla los errores en ambos ejes⁵.

Es importante considerar que el tamaño de la elipse está controlado por el desvío estándar de la regresión, por lo que resulta importante utilizar un número significativo de niveles de concentración en la prueba de exactitud. De lo contrario, si se emplean pocos niveles de concentración, la elipse puede abarcar un área considerable, resultando en una menor precisión e incluyendo al punto (1,0) solo por azar (*Figura 3*)⁵. Además, los niveles de concentración a ensayar deben realizarse al menos por triplicado, para obtener una desviación estándar acorde a las mediciones realizadas.

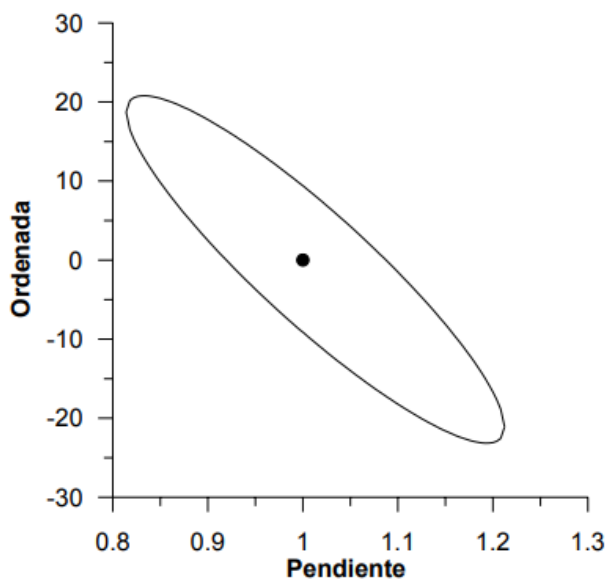


Figura 2: Región elíptica de confianza conjunta conteniendo al punto (1,0).⁸

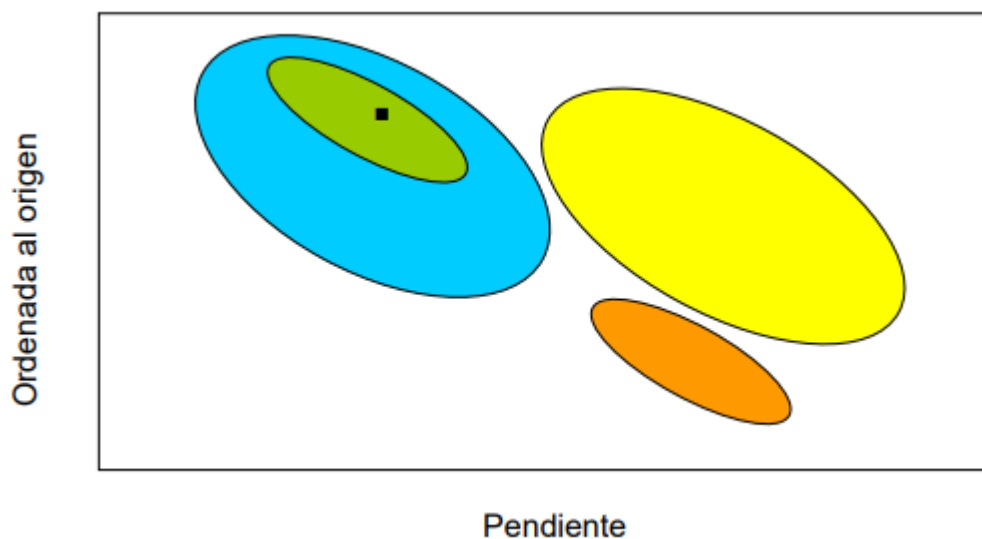


Figura 3: Distintos tipos de elipses de acuerdo con exactitud y precisión: verde, exacta y precisa; celeste, exacta e imprecisa; amarilla, inexacta e imprecisa; naranja, inexacta y precisa.⁵

1.2 Norfloxacinó

El norfloxacinó (NOR), Ácido 1-etil-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-il quinolin-3-carboxílico, cuya fórmula química es $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ y masa molar 319.33 g/mol, es un sólido cristalino amarillento con baja solubilidad en agua (0.28 mg/ml), aumentando ésta a valores de $pH < 5$ y $pH > 10$ ⁹. Pertenece al grupo de las fluoroquinolonas de segunda generación, siendo un antimicrobiano de amplio espectro utilizado en tratamientos de infecciones urinarias con rápida acción bactericida. Su estructura corresponde a la de una quinolona con un átomo de flúor en la posición C-6 (Figura 4), lo cual mejora sustancialmente la penetración de la droga en las células bacterianas tanto Gram-positivas y Gram-negativas¹⁰.

El mecanismo de acción de este antibiótico consiste en la inhibición de dos enzimas clave en la replicación, transcripción y reparación del ADN de la célula bacteriana: la ADN topoisomerasa II o ADN girasa y la ADN topoisomerasa IV. Esta inhibición se produce por la formación de un compuesto ternario ADN-Topoisomerasa-Quinolona que bloquea el movimiento de la horquilla de replicación, inhibiendo el crecimiento bacteriano y causando eventualmente la muerte celular¹¹.

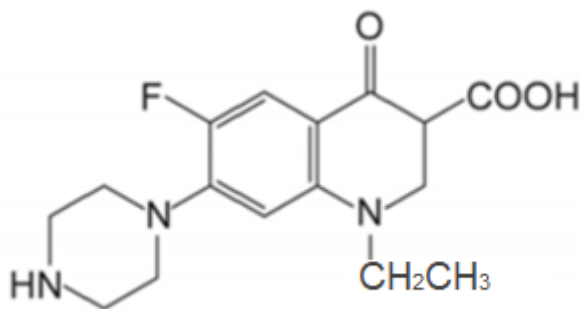


Figura 4: Estructura química del norfloxacino (NOR)

Al contener grupos tanto ácidos como básicos en su estructura química, NOR presenta distintas especies iónicas según el intervalo de pH (Figura 5)¹², por lo que muchas de sus propiedades fisicoquímicas varían dependiendo de las condiciones ácidas o básicas predominantes.

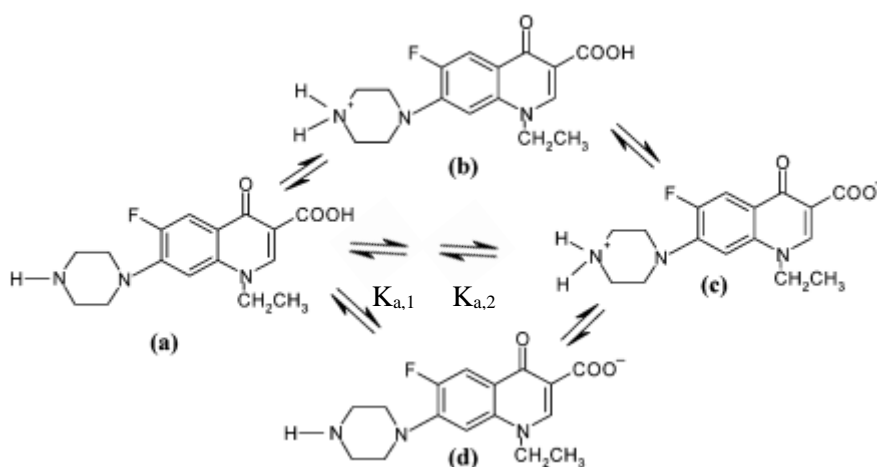


Figura 5: Diferentes estados iónicos de NOR dependiendo del pH: (a) neutral, (b) catiónico, (c) zwitteriónico y (d) aniónico.¹²

Cómo se ilustra en el diagrama de especiación de NOR (Figura 6)¹³, a valores de pH < 6.20 (pK_{a1}), tanto el grupo piperazina como el carboxilo se encuentran protonados, predominando su forma catiónica. Por su parte, la especie aniónica predomina a valores de pH > 8.55 (pK_{a2}), cuando ambos grupos piperazina y carboxilo se encuentran desprotonados. Por último, la especie zwitteriónica se presenta a valores de pH comprendidos entre pK_{a1} y pK_{a2} .

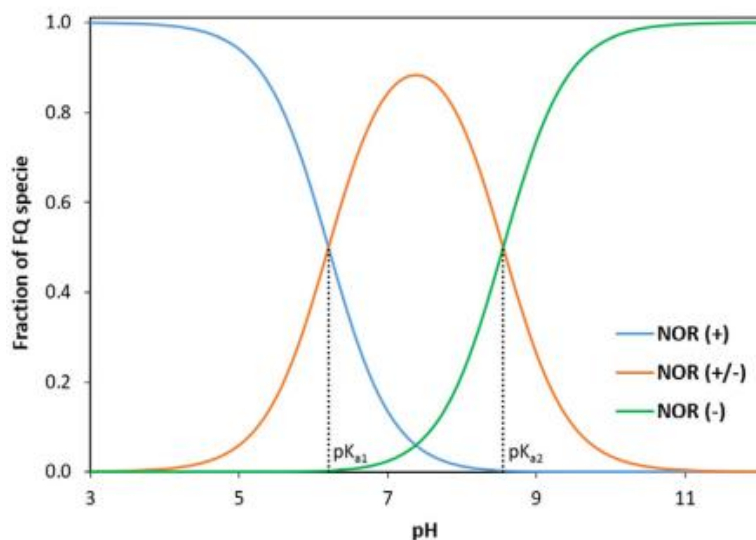


Figura 6: Diagrama de especiación de NOR.¹³

1.3 Sulfametoxazol

Sulfametoxazol (SMX), 4-amino-*N*-(5-metilisoxazol-3-il)-bencenosulfonamida, con fórmula química $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ y masa molar 253.28 g/mol, es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la clase de las sulfonamidas antibacterianas (Figura 7). A temperatura ambiente se presenta como un sólido cristalino de color blanco, con una solubilidad en agua de 1 mg/ml aumentando a pH ácido y básico, y siendo altamente soluble en etanol⁹. Posee efectos inhibitorios tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y se utiliza para tratar una variedad de infecciones bacterianas, incluyendo infecciones urinarias, respiratorias y gastrointestinales.

El SMX actúa como análogo estructural del ácido *p*-aminobenzoico (PABA), un sustrato endógeno esencial para la síntesis del ácido fólico en bacterias. Al competir con el PABA, el SMX inhibe la enzima dihidropteroato sintasa, responsable de la conversión de PABA en ácido dihidrofólico¹⁴. Esta inhibición previene la síntesis de tetrahidrofolato y la posterior producción de ADN bacteriano, impidiendo el crecimiento y reproducción de las bacterias.

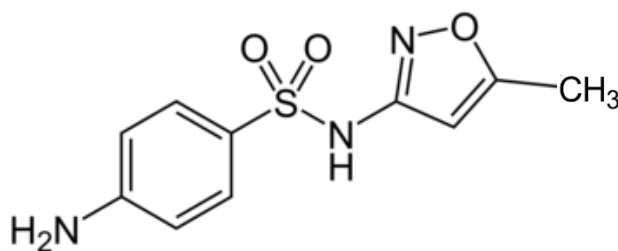


Figura 7: Estructura química del sulfametoxazol (SMX).

Al igual que NOR, SMX presenta especies diferentes en intervalos de pH definidos. A $\text{pH} < 1.7$ (pK_{a1}), predomina la especie catiónica debido a la protonación del grupo amino, mientras que a $\text{pH} > 5.6$ (pK_{a2}) lo hace la especie aniónica, ya que se encuentra desprotonado el grupo amida tal como se muestra en la Figura 8.¹⁵

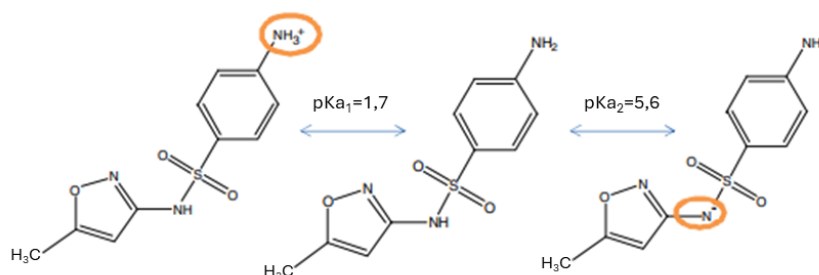


Figura 8: Especies predominantes de SMX con sus valores de pK_a correspondientes.¹⁵

La combinación de agentes antibacterianos entre sí o con sustancias no antibióticas, es actualmente una de las estrategias empleadas para combatir la resistencia antibacteriana. Estas combinaciones pueden resultar en un efecto sinérgico, generando una eficacia incrementada, aumentando el espectro de acción y reduciendo la dosis de cada antibiótico, lo cual resulta particularmente favorable en antibióticos con escasa hidrosolubilidad¹⁶.

Al obtenerse aductos moleculares de NOR y SMX con probada actividad antibacteriana, resulta imprescindible desarrollar y validar metodologías analíticas que permitan la cuantificación simultánea de ambos fármacos. Una de estas técnicas es la espectrofotometría UV-visible y, cuando los espectros de absorción de los fármacos se superponen en un amplio rango de longitudes de onda, resulta conveniente utilizar el espectro de derivadas¹⁷.

1.4 Espectroscopía de Absorción

La espectroscopía de absorción se basa en la absorción de la luz por los átomos o moléculas de una sustancia. Cuando un haz de luz pasa a través de una muestra, ciertos fotones son absorbidos por las moléculas, lo que provoca transiciones electrónicas desde un estado de energía más bajo a un estado de energía más alto. La cantidad de luz absorbida en diferentes longitudes de onda se mide y se representa en un espectro de absorción ¹⁸.

Normalmente, la concentración de un analito absorbente se relaciona en forma lineal con la absorbancia según la ley de Beer:

$$A = \epsilon lc$$

En donde A es la absorbancia de la muestra, ϵ corresponde a su absorptividad molar, l la longitud de trayectoria del haz de luz a través de la muestra y c la concentración de la sustancia absorbente.

En caso de tener dos componentes, 1 y 2, siendo ambas especies absorbentes, la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda determinada, y considerando un buen cumplimiento de la Ley de Beer, vendrá dada por:

$$A_{\lambda i} = \epsilon_{1,\lambda i} l C_1 + \epsilon_{2,\lambda i} l C_2 + E_{\lambda i}$$

Siendo $A_{\lambda i}$, la absorbancia de la mezcla a la longitud de onda λi ; $\epsilon_{1,\lambda i}$ y $\epsilon_{2,\lambda i}$, los coeficientes de absorptividad para los componentes 1 y 2; y $E_{\lambda i}$ el error residual de la recta de regresión lineal por mínimos cuadrados.

De forma generalizada, la expresión anterior puede escribirse:

$$A_{\lambda i} = l \sum_i^n (\epsilon_i C_i) + E_{\lambda i}$$

Resulta evidente, que la absorbancia en una mezcla de componentes será la suma de sus absorbancias individuales, por lo que esto dificulta el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de dichos componentes cuando existe superposición de las bandas de absorción.

1.4.1 Espectrofotometría “Zero crossing”

La espectrofotometría de derivada es una técnica utilizada para incrementar la sensibilidad y selectividad de un método analítico, facilitando la resolución directa de los espectros de absorción. El espectro de derivadas corresponde a una representación gráfica que muestra, dentro de un intervalo dado de longitudes de onda, el cociente diferencial de la absorbancia ($dA/d\lambda$). También es posible representar derivadas de orden superior de la absorbancia en función de la longitud de onda, generando así espectros de n-ésima derivada o de orden “n” ($dA^n/d^n d\lambda$).

El espectro de absorción (curva de orden cero) de una sustancia posee un máximo de absorción a una longitud de onda característica, la cual es independiente de la concentración. La señal de la función de derivada de primer orden tiene un valor de cero en dicho máximo, lo que constituye la base para aplicar la técnica de “zero crossing”. Esta consiste en encontrar la longitud de onda a la cual la señal de uno de los compuestos, cuya interferencia se desea evitar, no contribuye. Para ello, se debe utilizar el valor absoluto del espectro derivado del orden utilizado, en una longitud de onda donde el espectro derivado del componente interferente presente un valor nulo ¹⁹.

Por lo tanto, la metodología de espectrofotometría de derivadas permite identificar y cuantificar combinaciones de drogas que posean espectros de absorción superpuestos, además de eliminar interferencias de la matriz de las muestras. Esta técnica mejora la resolución de las bandas de absorción de dos componentes en una mezcla, ya que las medidas realizadas serán función únicamente de la concentración del componente que se analiza ²⁰.

1.5 Espectroscopía de Fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno de fotoluminiscencia basado en la capacidad de ciertas moléculas para absorber fotones, lo que provoca la excitación de sus electrones a niveles de energía más altos. Posteriormente, estas moléculas emiten luz al regresar a su estado fundamental, generando un espectro de emisión característico.

En la fluorescencia, las transiciones electrónicas que ocurren no implican un cambio en el espín del electrón. Esto significa que los estados excitados asociados con la fluorescencia tienen tiempos de vida extremadamente cortos, típicamente inferiores a 10^{-5} segundos ²¹. Este rápido decaimiento es una de las características que distingue a la fluorescencia de otros procesos de emisión de luz, como la fosforescencia, donde los tiempos de vida son

significativamente más largos debido a procesos no radiantes como la conversión interna y al cambio de espín.

Las fluoroquinolonas, presentan el fenómeno de fluorescencia debido a su estructura química particular, la cual incluye sistemas aromáticos conjugados como anillos bencénicos y estructuras heterocíclicas que permiten una absorción eficiente de fotones en la región Uv-visible. Además, la presencia de grupos funcionales específicos, como los cetónicos, pueden interactuar con el sistema conjugado estabilizando los estados excitados, resultando en la emisión fluorescente característica. Por otra parte, como las fluoroquinolonas son sustancias anfóteras, se espera que su fotoquímica sea pH dependiente ²², ya que los cambios por la protonación o desprotonación de sus grupos funcionales afectan la distribución de electrones en la molécula, modificando así las longitudes de onda de absorción, emisión e intensidad de fluorescencia.

1.5.1 Efecto de filtro interno

Al emplear medidas de fluorescencia para la calibración lineal de un método analítico, puede suceder que a altas concentraciones se produzca una reabsorción por parte del analito, disminuyendo la intensidad de fluorescencia real de la muestra. Este fenómeno se denomina efecto de filtro interno.

Cuando el haz de luz proveniente de la fuente de radiación a una determinada longitud de onda excita a las moléculas fluorescentes del analito, solo un pequeño volumen de la muestra es alcanzado por dicho haz, conocido este como *volumen de excitación*. A su vez, la luz emitida por la muestra se dirige en todas las direcciones posibles, pero sólo una fracción consigue alcanzar al detector. Dicha fracción observable para el detector se conoce como *volumen de detección* (Figura 9) ²³.

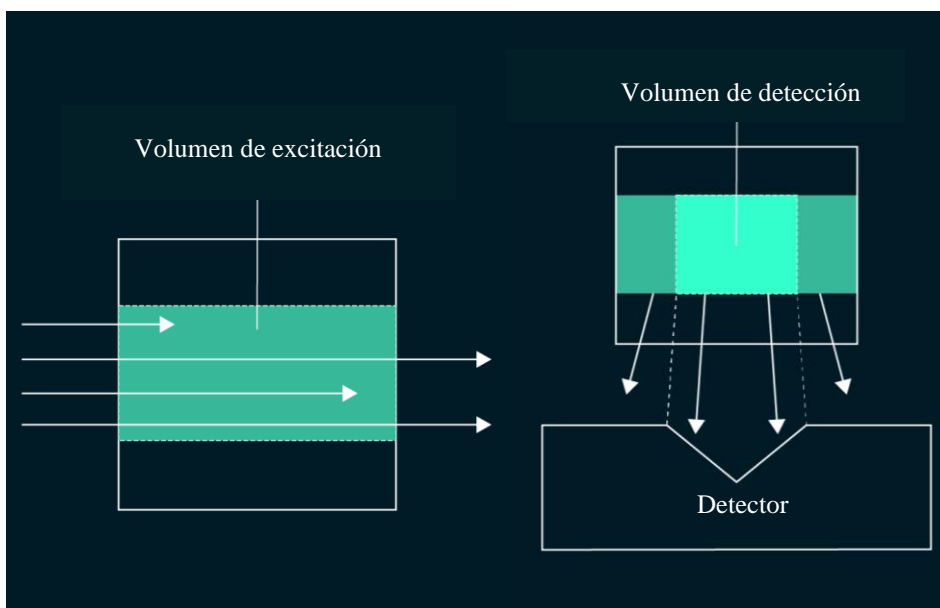


Figura 9: Izquierda, volumen de excitación; Derecha, volumen de detección.

A medida que el haz inicial de excitación atraviesa la muestra, parte de la luz es absorbida por otras moléculas del analito, esto provoca la disminución de la intensidad de fluorescencia. Por lo tanto, mientras mayor sea la concentración del analito, mayor es la absorbancia en la muestra y un menor volumen de excitación queda expuesto ante tal radiación. Este efecto se denomina efecto de filtro interno primario, el cual es, en principio, inevitable ya que se requiere una cantidad mínima de radiación absorbida para que ocurra el fenómeno de fluorescencia. Asimismo, la radiación emitida por la muestra puede reabsorberse en su camino hacia el detector, generando el llamado efecto de filtro interno secundario ²⁴.

Una consecuencia inmediata de este fenómeno es la pérdida de linealidad conforme aumenta la cantidad de moléculas de analito. Por esta razón, lo recomendable es trabajar en un rango de concentraciones lo suficientemente bajo para que el efecto sea despreciable, generalmente sin superar 0.1 unidades de absorbancia. Vale resaltar que en otros casos es posible compensar el efecto de filtro interno mediante métodos numéricos o herramientas quimiométricas ²⁵.

1.6 Antecedentes

Investigaciones llevadas a cabo por Sajwan y colaboradores ²⁶, han registrado los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de NOR, así como el efecto del pH sobre estos. En cuanto a la absorción, han concluido en que en un rango de valores pH de 4 – 7, la

sustancia presenta una longitud de onda máxima de absorción a 272 nm, junto con una segunda banda de absorción entre 323 y 335 nm. Sin embargo, a valores de pH inferiores a 4, se observa un desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores (efecto batocrómico), mientras que a valores de pH superiores a 7, se observa un leve desplazamiento hacia menores longitudes de onda (efecto hipsocrómico).

En cuanto al fenómeno de fluorescencia, el pH también influye en los máximos de emisión y la intensidad de esta. Muniz y colaboradores²⁷ han reportado que NOR posee, a un pH 7.4 y a una longitud de onda de excitación de 330 nm, una longitud máxima de emisión a 408 nm. Otros autores han reflejado la variación hacia mayores longitudes de onda de emisión en medio ácido y la abrupta desactivación de fluorescencia de esta sustancia a pH mayores a 10^{26,28}. Respecto al cumplimiento del rango lineal para la determinación de norfloxacin, se ha registrado que existe una respuesta lineal entre 0.3 – 4.1 µg/ml a una longitud de onda de excitación de 278 nm y 448 nm de emisión²⁹.

Por su parte, SMX no muestra fluorescencia en soluciones acuosas sin la presencia de sustancias co-fluorescentes o que reaccionen con sus grupos funcionales formando derivados fluorescentes³⁰. A pesar de esto, se ha encontrado que SMX fluoresce en acetonitrilo como solvente a una longitud de onda de excitación de 270 nm y emitiendo a una longitud de onda de 335 nm³¹.

No se ha reportado en bibliografía una metodología concreta para la validación conjunta de norfloxacin y sulfametoxazol en solución. Sin embargo, se han registrado estudios de determinación de sulfonamidas y fluoroquinolonas mediante diversas técnicas, como cromatografía líquida de alta performance (HPLC), análisis electroquímicos y electroforesis capilar en matrices variadas que incluyen aguas de desecho, ganado bovino y alimentos animales³²⁻³⁵.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Principal

- ❖ Validar la cuantificación simultánea de norfloxacino y sulfametoazol por espectrofotometría Uv-Vis y de fluorescencia.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Aplicar la espectrofotometría Uv-Vis de derivadas para la cuantificación simultánea de norfloxacino y sulfametoazol.
- ❖ Emplear espectrofotometría de fluorescencia para la cuantificación simultánea de norfloxacino y sulfametoazol.
- ❖ Comparar los resultados de ambas metodologías analíticas.

3 Metodología

3.1 Reactivos e instrumental

3.1.1 Reactivos

Se utilizaron como sustancias de referencia norfloxacino (99.6% de pureza) y sulfametoxazol (99.2% de pureza). Ambos fueron provistos por Parafarm, Argentina y se utilizaron luego de un proceso de purificación por recristalización.

La validación del método se efectuó utilizando norfloxacino (L130666) y sulfametoxazol (L980171), ambos provistos por Parafarm, Argentina.

Para la preparación del buffer pH 7.4, se utilizó agua destilada, fosfato monopotásico e hidróxido de sodio (99.5%). Estos últimos fueron provistos por Mallinckrodt Chemical Works y Anedra S.A. respectivamente. Se siguió la técnica descrita por la Farmacopea Argentina 7° Ed. ¹

Para el estudio exploratorio mediante espectrofotometría de fluorescencia se utilizó ácido clorhídrico (36.5 % pureza) marca Biopack.

3.1.2 Instrumental

Se utilizó un espectrofotómetro Uv-Vis Agilent 8453E, y un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, ambos con lámpara de tungsteno acoplada a una lámpara de deuterio como fuente de radiación junto con una celda de cuarzo para la validación por espectrofotometría Uv-vis.

Se utilizó un espectrofluorómetro Jasco FP-6200 con lámpara de xenón (Xe) de 150 W y celda de polimetilmetacrilato (PMMA) con paso óptico de 1 cm para la validación del método fluorimétrico.

Además, se utilizó el siguiente equipamiento para la caracterización de las sustancias y preparación de soluciones:

- Fusiómetro digital Optimelt MPA100
- Balanza analítica Sartorius 2842 (0.1 mg)
- Medidor de pH digital Checker® (Hanna Instruments) con resolución ± 0.01 unidades

3.2 Caracterización

3.2.1 Estándares de referencia

Los Materiales de Referencia Certificados (MRCs) son patrones que ofrecen un valor o medida de referencia para la calibración de instrumentos o validación de métodos analíticos. Como las técnicas espectrofotométricas empleadas en el presente trabajo son de naturaleza comparativa, es pertinente el uso de estos materiales para verificar la exactitud del método utilizado.

Ante la falta de disponibilidad de MRCs, se propuso la preparación de un estándar interno de trabajo (EIT). Este proceso involucró la purificación de las sustancias mediante recristalización, seguida de su caracterización y evaluación de pureza por medio de la determinación de su punto de fusión y perfil cromatográfico.

En primer lugar, se pesaron 300 mg de NOR y la misma cantidad de SMX obtenidos del producto comercial y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 25 ml. Las sustancias pesadas se disolvieron en 25 ml de etanol, aplicando agitación y calentamiento.

Posteriormente, se preparó un sistema de reflujo con agitación y calentamiento hasta ebullición, evitando que esta fuera vigorosa. El sistema se mantuvo en calentamiento durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la solución para favorecer la recristalización y realizar una posterior filtración al vacío. El residuo sólido obtenido se dejó secar en desecador por 24 h.

3.2.2 Puntos de fusión

Normalmente, los puntos de fusión se determinan para caracterizar compuestos orgánicos e inorgánicos y para establecer su pureza. Las sustancias puras funden en un rango de temperatura muy definido (0.5 a 2 °C), mientras que si contienen impurezas dicho intervalo se amplía.

Para la determinación del punto de fusión de NOR y SMX, tanto del producto comercial como del EIT, se colocaron muestras previamente desecadas en tubos capilares y se introdujeron en un fusiómetro. Se empleó un rango de temperaturas de 10 °C por encima y 10 °C por debajo de la temperatura de fusión de la sustancia reportada en bibliografía. La velocidad de aumento de la temperatura en el equipo fue de 1°C/min en todos los casos.

3.2.3 Cromatografía en capa fina (TLC siglas en inglés de Thin Layer Chromatography)

Una técnica de separación sencilla y muy utilizada en química es la cromatografía en capa fina. Esta técnica nos permite identificar sustancias, así como monitorear la presencia de impurezas presentes en la misma.

Con el fin de detectar impurezas en las sustancias recristalizadas, se preparó una TLC utilizando como fase estacionaria una placa de SILICAGEL 60 F254 en soporte de aluminio (MERCK KGaA®) y una fase móvil de *n*-butanol-cloroformo-éter etílico (1:1:1). Inicialmente, se saturó la cuba cromatográfica durante 15 minutos con la fase móvil establecida mientras que la fase estacionaria se activó en estufa a 100°C. Se sembraron en la placa 2 muestras de SMX y 2 de NOR, en cada caso una muestra correspondía al EIT y la otra proveniente del lote comercial, disolviendo previamente las muestras en un volumen adecuado de diclorometano-metanol (1:1). Se efectuó el desarrollo ascendente de la fase móvil y finalizada la cromatografía, se procedió al revelado mediante luz Uv- 254 nm.

3.3 Validación por espectrofotometría Uv-visible

3.3.1 Linealidad

Se prepararon por triplicado 7 patrones de calibración de NOR y 7 de SMX en buffer pH 7.4 para la construcción de la curva de calibración abarcando un rango de 0.32 – 6.30 µg/ml y 0.25 – 5.00 µg/ml respectivamente. La intensidad de absorción se midió en un rango de 200 a 400 nm. Posteriormente, la derivada de primer orden del espectro de absorción registrado $dA/d\lambda$ se obtuvo matemáticamente utilizando el software OriginPro 8.5.

Se realizaron gráficos de absorbancia vs concentración de cada droga, medidas en la longitud de onda correspondiente a su máximo de absorción. Además, para NOR se graficó el valor de su derivada primera (altura) a 257 nm vs concentración, mientras que para SMX se utilizó su altura a 272 nm.

Para establecer el rango dinámico del método, se evaluaron concentraciones superiores a las mencionadas hasta observar desviaciones significativas en la curva por saturación del detector en la variable respuesta.

3.3.2 Especificidad

A fin de evaluar la especificidad del método, se prepararon mezclas binarias de NOR y SMX mediante dos sets de cinco muestras, cada uno por triplicado. El primer set se preparó en un rango de concentraciones comprendido entre 0.63 – 4.73 $\mu\text{g/ml}$ de NOR con el agregado de una concentración fija de SMX de 2.50 $\mu\text{g/ml}$. El segundo set se preparó utilizando un rango de concentraciones comprendido entre 0.50 – 3.75 $\mu\text{g/ml}$ de SMX con el agregado de una concentración fija de NOR de 1.6 $\mu\text{g/ml}$.

Se obtuvieron los espectros de absorción promedio de cada set, así como su derivada de primer orden correspondiente. Para el primer set, se graficó el valor de su derivada primera a 257 nm vs longitud de onda (nm), mientras que para el segundo set se utilizó el valor de su derivada primera a 272 nm.

3.3.3 Precisión

3.3.3.1 Repetibilidad

Se evaluó la repetibilidad del equipo y del método utilizado.

Para la **repetibilidad del equipo**, se midió 12 veces la absorbancia a un valor de concentración nominal de 3.15 $\mu\text{g/ml}$ de NOR en el espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV-1800.

Para la **repetibilidad del método**, se evaluaron los coeficientes de variación de los valores de la derivada primera para NOR y SMX medidos en 3 días diferentes por triplicado y a 3 niveles de concentración diferentes.

3.3.3.2 Precisión intermedia

Para expresar las variaciones intralaboratorio, se compararon las medidas realizadas por triplicado de mezclas de NOR y SMX (ver apartado 3.3.2) por dos analistas diferentes, en días diferentes y utilizando equipos y reactivos diferentes. Se analizaron los coeficientes de variación promedio de las medidas obtenidas por cada analista a partir de las curvas de calibrado, así como los parámetros de regresión mediante la prueba *t*-student y la prueba F de Snedecor para la evaluación de igualdad de varianzas entre analistas, bajo el supuesto de que no existen diferencias en las mediciones de ambos analistas.

3.3.4 Exactitud

La exactitud se evaluó aplicando el método de adición estándar ³⁶, el cual consiste en agregar cantidades conocidas de un patrón de referencia a las soluciones preparadas a un nivel de 80, 100 y 120% del valor nominal del ensayo para NOR y SMX respectivamente, ensayándose por triplicado. De esta manera, la exactitud se puede expresar como el porcentaje de recuperación en un método analítico de una cantidad conocida de analito.

El porcentaje de recuperación resulta del cociente entre la concentración experimental obtenida a partir de la curva de calibrado de la derivada de primer orden para cada droga, y la concentración teórica de la muestra más el patrón añadido.

Se utilizaron concentraciones de 25.00 y 31.50 µg/ml de SMX y NOR respectivamente, tanto para los EIT como para la preparación de la muestra, con un volumen final de 10 ml en todos los casos. En la *Tabla 1* se resume el esquema de preparación de las soluciones.

Tabla 1. Esquema de trabajo aplicado a la evaluación de la exactitud del método mediante porcentaje de recuperación.

Solución	Nivel (%)	NOR (ml)	SMX (ml)	NOR_{EIT} (ml)	SMX_{EIT} (ml)
1	80	0.5	1	0.4	-
2	100	0.5	1	0.5	-
3	120	0.5	1	0.6	-
4	80	0.5	0.5	-	0.4
5	100	0.5	0.5	-	0.5
6	120	0.5	0.5	-	0.6

Paralelamente, se evaluó la exactitud del método para NOR aplicando el método EJCR (sección 1.1.2). Para esto, se prepararon por triplicado 6 niveles de concentraciones diferentes a las de la calibración lineal efectuada previamente, respetando el rango de linealidad obtenido. En la *Tabla 2* se detallan las concentraciones de las soluciones preparadas.

Tabla 2. Esquema de trabajo aplicado a la evaluación de la exactitud del método mediante la rutina EJCR.

Muestra	Concentración NOR ($\mu\text{g/ml}$)
1	1.42
2	1.26
3	1.10
4	0.88
5	0.76
6	0.50

3.4 Validación por fluorescencia

3.4.1 Estudio exploratorio

Se efectuó un análisis exploratorio para conocer las condiciones apropiadas de medición tales como el pH y longitudes máximas de excitación y emisión. Para esto se prepararon soluciones de NOR de concentración 1.58 $\mu\text{g/ml}$ en HCl 0.1 M, NaOH 0.1 M y en solución buffer ajustado a pH 7.4. Posteriormente, se realizó un barrido espectral mediante matrices de excitación-emisión (MEE) en un rango de excitación comprendido entre 250 – 400 nm y en un rango de emisión entre 350 – 550 nm.

Asimismo, se preparó una solución de 2.50 $\mu\text{g/ml}$ de SMX en HCl 0.1M y en la solución buffer de pH 7.4 para realizar el barrido espectral bajo las mismas condiciones mencionadas previamente.

3.4.2 Linealidad

Se prepararon por triplicado 7 soluciones de NOR en buffer pH 7.4 para la construcción de la correspondiente curva de calibración, abarcando un rango de 0.25 – 2.36 $\mu\text{g/ml}$. La intensidad de fluorescencia se midió a una λ_{exc} de 335 nm y una λ_{emi} de 408 nm, a una velocidad de escaneo de 8000 nm/min. Se controló la absorbancia de las soluciones de manera tal que no superen las 0.1 unidades de absorbancia.

El rango dinámico se estableció siguiendo la misma metodología ya mencionada en el apartado 3.3.1

3.4.3 Especificidad

Con el objetivo de evaluar la selectividad del método, se prepararon mezclas de concentración fija de NOR (1.58 $\mu\text{g/ml}$) y de SMX (2.50 $\mu\text{g/ml}$) en buffer pH 7.4. La evaluación

de la selectividad se basó en una comparación de las matrices obtenidas respecto de la de los componentes individuales.

3.4.4 Precisión

3.4.4.1 Repetibilidad

Se evaluó la repetibilidad del equipo y del método utilizado.

Para la **repetibilidad del equipo**, se midió 12 veces la intensidad de fluorescencia a un valor de concentración nominal de 3.15 µg/ml de NOR.

Para la **repetibilidad del método**, se evaluaron los coeficientes de variación de los valores de intensidad de fluorescencia para NOR medidos en 3 días diferentes por triplicado y a 3 niveles de concentración diferentes.

3.4.4.2 Precisión intermedia

Se compararon las medidas realizadas por triplicado de soluciones de NOR por dos analistas diferentes, en días diferentes y utilizando reactivos diferentes. Se analizaron los coeficientes de variación promedio de las medidas obtenidas por cada analista a partir de las curvas de calibrado, así como los parámetros de regresión mediante la prueba *t*-student y la prueba F de Snedecor para la evaluación de igualdad de varianzas entre analistas.

3.4.5 Exactitud

Al igual que el método de absorbancia, la exactitud del método por fluorescencia se estimó por medio del estudio de la región de confianza elíptica (EJCR), detallándose los niveles de concentración utilizados en la sección 3.3.4.

3.5 Comparación entre métodos

Para comparar las predicciones obtenidas por ambos métodos, se preparó un set de concentraciones nominales de NOR por triplicado, respetando los rangos de linealidad de ambos métodos, tal como se detalla en la *Tabla 3*. En primer lugar, se realizaron las mediciones correspondientes calculando los valores de concentraciones predichas por ambos métodos, para posteriormente calcular la regresión lineal existente entre ellos y el estudio mediante la elipse correspondiente. El cálculo de esta última se realizó empleando mínimos cuadrados bi-variados (BLS) a una confianza del 95%, siendo este tipo de regresión apropiada para comparar resultados entre métodos diferentes.

Tabla 3. Preparación de soluciones de NOR para comparación de métodos analíticos.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
1	1.42
2	1.26
3	1.10
4	0.88
5	0.76

Por último, se determinó la sensibilidad analítica (γ) de ambos métodos con el fin de comparar respuestas instrumentales de diferente naturaleza. Esta sensibilidad se determinó mediante el cociente entre la pendiente de cada curva de calibrado y el desvío estándar de los residuos de la regresión lineal. Como γ posee unidades de la inversa de la concentración, se utiliza $1/\gamma$ como parámetro analítico de comparación.

3.6 Software

Para la obtención de los parámetros estadísticos de la regresión, se utilizó Microsoft Excel 2016, mientras que para el análisis de residuos de la regresión y reproducibilidad se utilizó el software Matlab R2010a, en su versión DEMO al igual que el programa OriginPro 8.5 utilizado para el cálculo de derivadas. Por su parte, el estudio de comparación de métodos analíticos por el método EJCR se ejecutó mediante el uso del lenguaje de programación R de software libre.

Por otro lado, las ilustraciones de curvas de calibración, así como las matrices de excitación-emisión, fueron confeccionadas mediante el lenguaje de programación de alto nivel Python 3. El código base es de acceso libre y se encuentra disponible como repositorio en https://github.com/Pablo798/Graficos_Trabajo_Final.

4 Resultados y Discusión

4.1 Caracterización

4.1.1 Puntos de fusión

Los rangos de fusión del estándar de trabajo y del producto comercial, tanto para NOR como para SMX, se visualizan en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Puntos de fusión de NOR y SMX pertenecientes al lote y al EIT.

	Punto de fusión teórico (°C) *	Punto de fusión experimental (°C)
NOR_{EIT}	220.0 – 222.0	216.8 – 218.7
NOR lote		217.1 – 221.8
SMX_{EIT}	166.0 – 169.0	167.7 – 169.9
SMX lote		168.6 – 169.8

*Extraído de PubChem.org

En el caso de NOR, el rango de fusión del estándar interno se encuentra por debajo del punto de fusión teórico, mientras que el del producto comercial presenta un rango de fusión más amplio que incluye al reportado en bibliografía.

Por su parte, tanto el estándar como el producto de lote de SMX presentan puntos de fusión acotados que incluyen al valor teórico.

Estos resultados son un indicador de que ambas sustancias se encuentran de forma pura, sin existir diferencias sustanciales respecto a sus valores teóricos.

4.1.2 Cromatografía en capa fina

El cromatograma correspondiente se observa en la *Figura 10*, en dónde se identifican notoriamente las sustancias sin la presencia de algún tipo de impureza. Para SMX en su forma comercial (A) y purificada (B), prácticamente no hubo desplazamiento alguno lo cual concuerda con la fase polar utilizada. En cambio, NOR tanto en su forma comercial (C) como purificada (D) recorrió prácticamente con el frente de solvente.

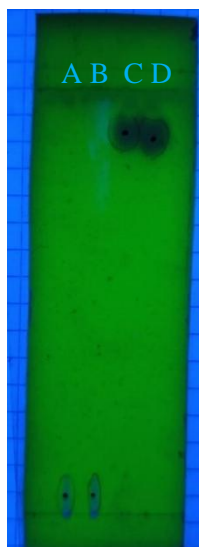


Figura 10: Cromatografía en capa delgada de NOR y SMX.

De izquierda a derecha: A, SMX comercial; B, SMX purificado; C, NOR comercial; D, NOR purificado.

4.2 Validación del método mediante Espectroscopía Uv-Visible

Se validó el método para los parámetros de linealidad, límites de detección y cuantificación, especificidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), y exactitud.

4.2.1 Espectros de absorción

De acuerdo con la *Figura 11*, podemos visualizar los espectros de absorción de NOR y SMX, en donde ambos se superponen en un amplio rango de longitudes de onda. NOR presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 272 nm y luego una segunda banda de absorción característica a 323 nm. Por su parte, SMX presenta un único máximo de absorción a 257 nm.

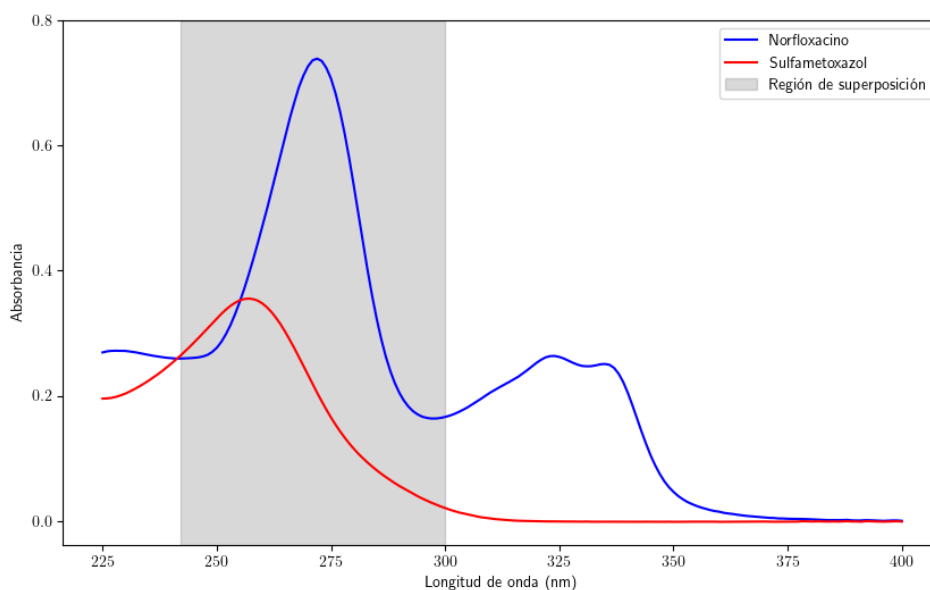


Figura 11: Espectros de absorción NOR (azul), SMX (rojo) y la región de superposición (gris).

Esta superposición imposibilita el uso de una calibración analítica basada en los valores de absorbancia, por lo que resulta pertinente el uso de la espectrofotometría de derivadas para aumentar la selectividad del método.

4.2.2 Linealidad

Las curvas de calibración para NOR y SMX obtenidas pueden visualizarse en las Figuras 12 y 13 respectivamente.

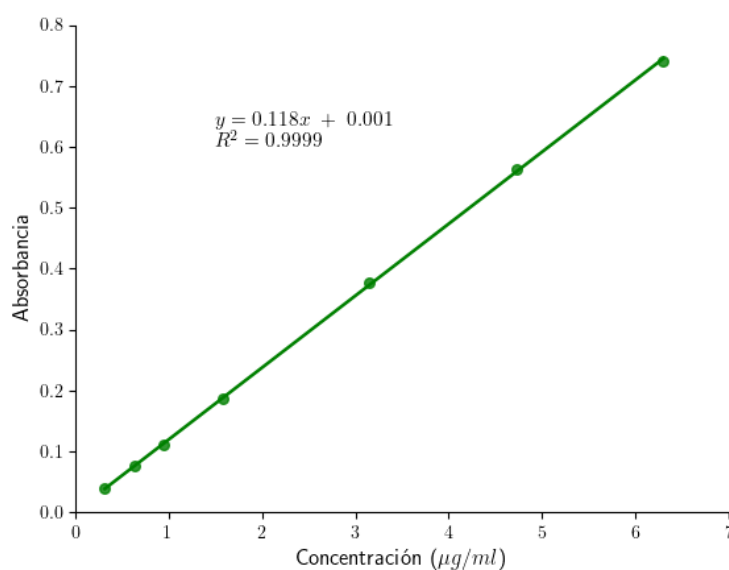


Figura 12: Curva de calibración para NOR mediante espectrofotometría de absorción.

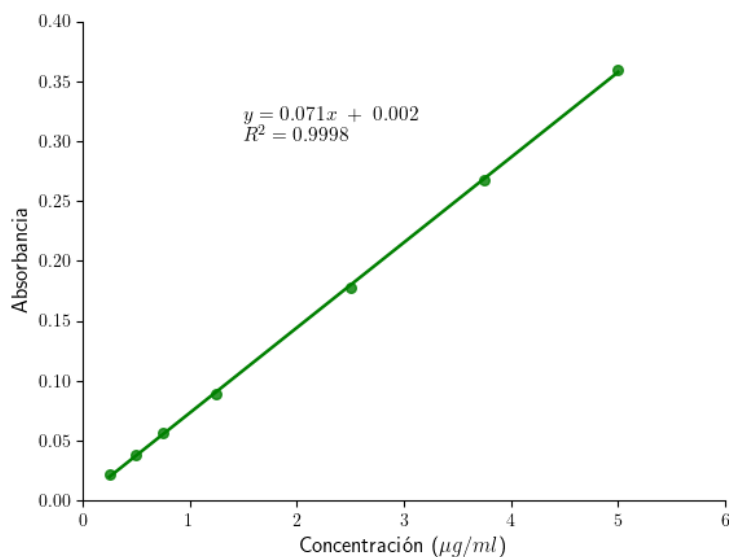


Figura 13: Curva de calibración para SMX mediante espectrofotometría de absorción.

Generalmente, como prueba de linealidad, se recurre al parámetro r^2 o coeficiente de correlación, aunque esto resulta incorrecto debido a que dicho parámetro sólo mide la relación entre dos variables aleatorias, sin tener mucho sentido en la calibración analítica ya que los valores de concentración no se encuentran distribuidos al azar ³. A pesar de esto, existen diversos métodos y tests para evaluar la linealidad, de los cuales algunos se mencionan a continuación:

Un indicativo de linealidad es que el intercepto de la regresión no difiera significativamente de cero, por lo que se evaluó a través del estadístico t de Student. La fórmula general del mismo para la media de la pendiente (x), su desviación estándar (s) y número de replicados (n) resulta en:

$$t = \frac{x - u}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Si tenemos en cuenta las hipótesis planteadas, y que el término $\frac{s}{\sqrt{n}}$ es el error estándar de la pendiente (SE), podemos reescribir el estadístico t como:

$$t = \frac{x}{SE_x}$$

De esta manera, calculamos el valor de t_{exp} para luego compararlo con un valor extraído de tabla.

Se plantearon las siguientes hipótesis, visualizándose los resultados en la *Tabla 5*.

H0 = El intercepto (u) no es diferente de cero

H1 = El intercepto es significativamente distinto de cero

Tabla 5. Parámetros de validación de linealidad del método para la determinación de NOR y SMX.

	NOR ($\lambda_{m\acute{a}x}$ a 272 nm)			SMX ($\lambda_{m\acute{a}x}$ a 257 nm)				
	CV (%)	t_{tab}^*	t_{exp}	CV (%)	t_{tab}^*	t_{exp}		
Intercepto	0.001	-	2.09	0.56	0.002	-	2.09	1.50
Pendiente	0.118	0.07	-	-	0.071	0.29	-	-
R²	0.9999	-	-	-	0.9998	-	-	-

* Valor para n-1 g.l. ³⁷

Como los valores de t_{exp} son menores a los valores tabulados, no hay evidencias en contra de H0 y afirmamos, con un nivel de significación $\alpha = 0.05$, que las intercepciones de ambas calibraciones no son diferentes de cero y cumplen con la linealidad en el rango evaluado.

Otro enfoque para evaluar la linealidad implica examinar la relación entre la variancia de la regresión ($s_{x/y}$) y la del ruido instrumental (s_y). Si la primera es significativamente mayor a la segunda, podemos suponer que existen factores de desvío de la linealidad que son estadísticamente superiores al ruido aleatorio en la respuesta. Para realizar esta prueba se debe cumplir el supuesto bajo el cual se realiza el ajuste lineal, esto es, que los errores en las concentraciones de calibrado sean menores que en la respuesta. De lo contrario, podrían acumularse incertidumbres provenientes de la imprecisión en la preparación de las concentraciones de calibrado, que no tienen ninguna relación con el ruido instrumental o las pérdidas en la linealidad. La prueba estadística utilizada para determinar si los datos se ajustan a la linealidad es el test o prueba F, en el cual se calcula un valor experimental según la siguiente ecuación:

$$F_{exp} = \frac{(s_{y/x})}{(s_y)}$$

Este valor se compara con un valor F teórico para $\alpha=0.05$, $m - 2$ y $m - p$ grados de libertad (g.l.), en donde m es el número de datos disponibles y p el número de niveles de concentración estudiados. A continuación, se listan los valores experimentales y tabulados de la prueba F (*Tabla 6*).

Tabla 6. Resultados prueba F para evaluación de la linealidad.

Curva de Calibrado	F_{tab}*	F_{exp}
NOR	2.40	1.85
SMX	2.40	1.92

* Valor para (m-2)(m-p) g.l. ⁵

Como en todos los casos $F_{tab} > F_{exp}$, se cumple la linealidad en todo el intervalo de concentraciones evaluado para NOR (0.32 – 6.30 $\mu\text{g/ml}$) y SMX (0.25 – 5.00 $\mu\text{g/ml}$), coincidiendo con el test previo.

4.2.3 Homogeneidad de varianzas

Como ya fue mencionado previamente, otra de las premisas de la regresión lineal por mínimos cuadrados es que la varianza de la variable respuesta (absorbancia) sea aproximadamente constante u homoscedástica. Para esto, los gráficos de la distribución de los residuos de la regresión nos permiten visualizar si la distribución es al azar y si la variabilidad interna de las réplicas a cada nivel es comparable o no a la variabilidad global. Puede determinarse si se distribuye linealmente (residuos al azar), si existe comportamiento parabólico, o si existe incertidumbre en las concentraciones nominales de los patrones de calibración. Al examinarse visualmente dicha distribución para ambas curvas de calibración, se sospechó que el ajuste no fuera el apropiado y que los residuos no se distribuían de manera constante.

Para evaluar esta constancia, se hizo uso del parámetro estadístico F, calculando su valor experimental definido por el cociente entre el máximo y mínimo valor de las variancias en las réplicas de los patrones para n replicados. Los resultados se exhiben en la *Tabla 7*.

$$F_{exp} = \frac{\max(s_{yi})^2}{\min(s_{yi})^2}$$

Tabla 7. Resultados prueba F para evaluación de la homogeneidad de variancias.

Curva de Calibrado	F _{tab} *	F _{exp}
NOR	9.27	0.53
SMX	9.27	0.53

* Valor para n-1 g.l en el numerador y denominador. ³⁷

Al ser $F_{tab} > F_{exp}$ en ambos casos, se cumple la homogeneidad de varianzas en todo el intervalo de concentraciones evaluado, por lo que el error instrumental se distribuye de forma normal.

4.2.4 Rango lineal y dinámico

Los rangos lineales y dinámicos obtenidos de las calibraciones correspondientes para ambas sustancias se muestran en la *Tabla 8*.

Tabla 8. Rangos lineales y dinámicos de las curvas de calibrado por Uv-Visible.

	NOR (µg/ml)	SMX (µg/ml)
Rango Lineal	0.20 – 6.30	0.19 – 5.00
Rango Dinámico	0.07 – 31.50	0.06 – 25.00

4.2.5 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Al utilizar el criterio basado en la desviación estándar de la respuesta lineal y su pendiente, podemos determinar los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) para ambas calibraciones. Los resultados se evidencian en la *Tabla 9*.

Tabla 9. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) para NOR y SMX.

Parámetro	NOR ($\lambda_{m\acute{a}x}$ a 272 nm)	SMX ($\lambda_{m\acute{a}x}$ a 257 nm)
LD (µg/ml)	0.07	0.06
LQ (µg/ml)	0.20	0.19

4.2.6 Especificidad

Al realizar la operación de derivada primera por medio del software correspondiente, se obtuvieron los espectros de primer orden para NOR (*Figura 14*) y SMX (*Figura 15*) a diferentes concentraciones. En ellos se refleja la intersección de las curvas con el eje de las abscisas, correspondiendo esta intersección con la longitud de onda de máxima absorción, tal como se comentó en la sección 4.2.1.

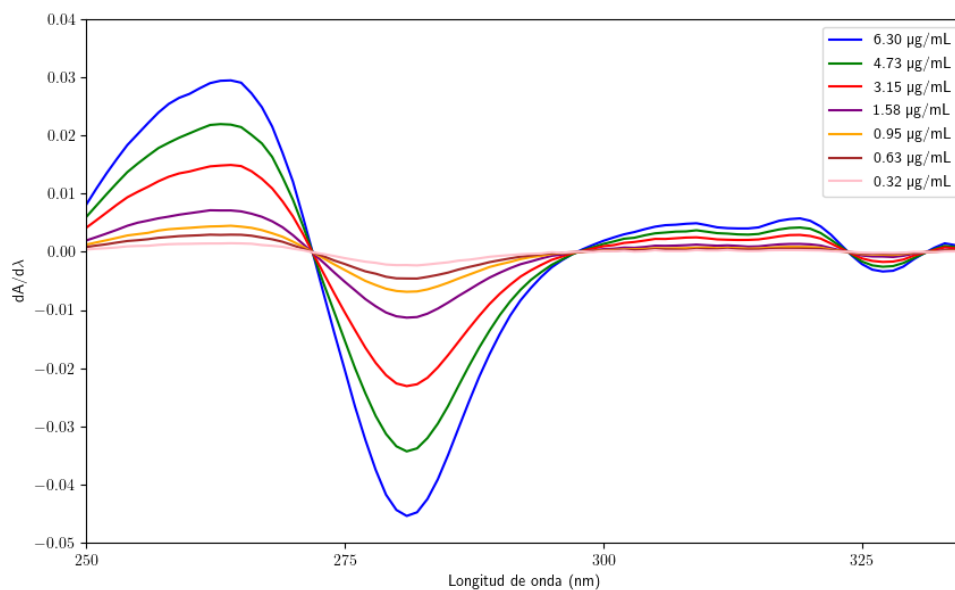


Figura 14: Derivada primera del espectro Uv-Vis de NOR (0.32 – 6.30 µg/ml).

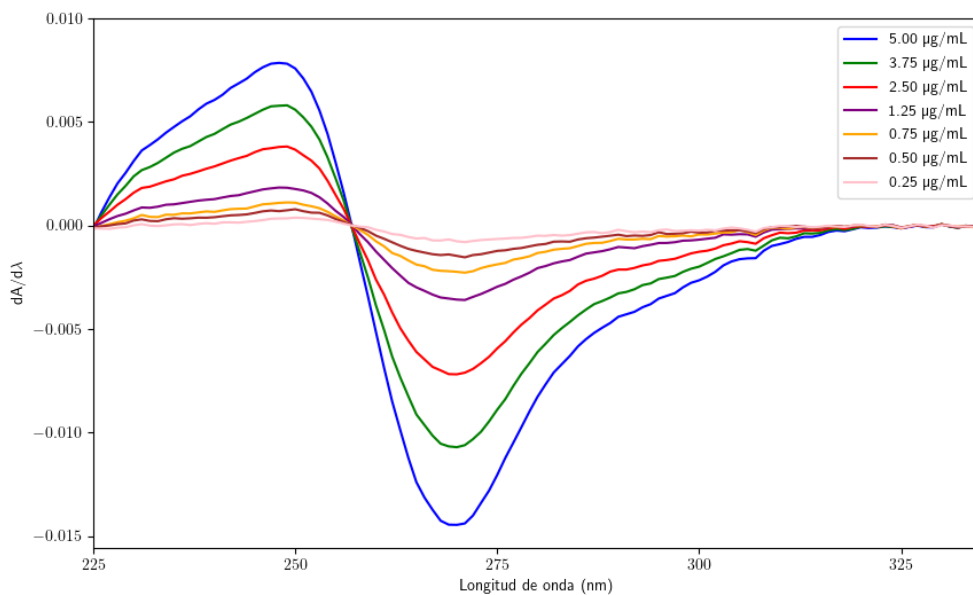


Figura 15: Derivada primera del espectro Uv-Vis de SMX (0.25 – 5.00 µg/ml)

Los espectros de mezclas de ambas sustancias no permiten evidenciar de forma clara la absorción efectuada por los componentes individuales (*Figuras 16 y 17*), por lo que se recurrió al análisis del espectro de derivada de primer orden para una correcta determinación.

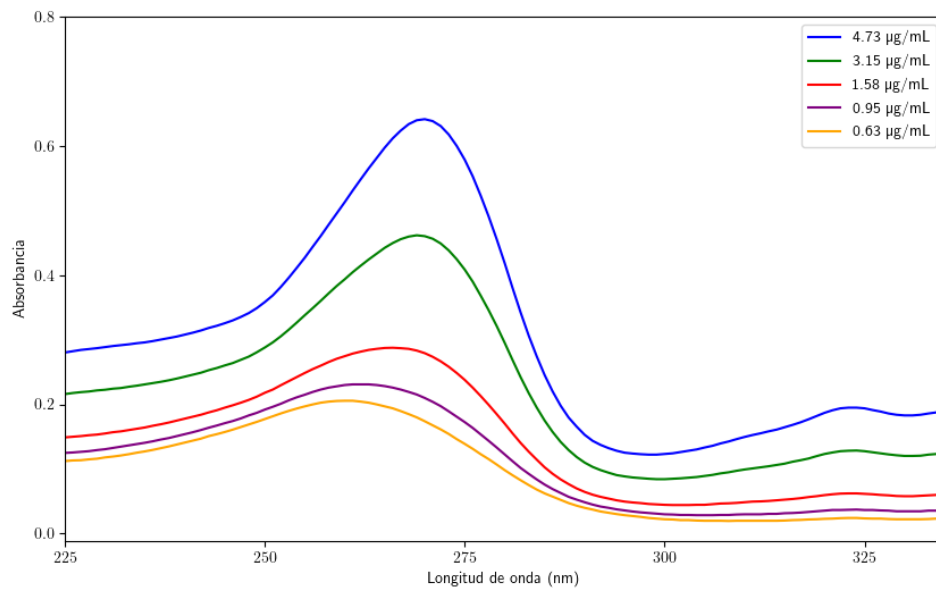


Figura 16: Espectro de absorción mezcla NOR (0.63 – 4.73 µg/ml) y SMX (2.50 µg/ml).

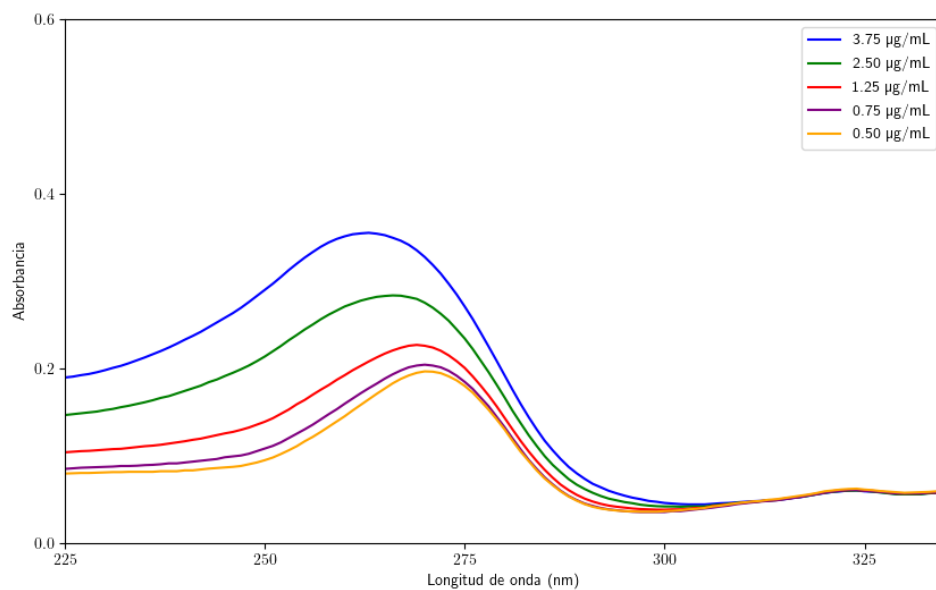


Figura 17: Espectro de absorción mezcla SMX (0.50 – 3.75 µg/ml) y NOR (1.58 µg/ml).

La selectividad del método se evaluó a partir del análisis de las curvas de calibrado por derivada de primer orden para mezclas de NOR y SMX (concentración fija) y SMX y NOR (concentración fija) respecto a la de sus componentes individuales. Las Figuras 18 y 19 ilustran estos resultados respectivamente.

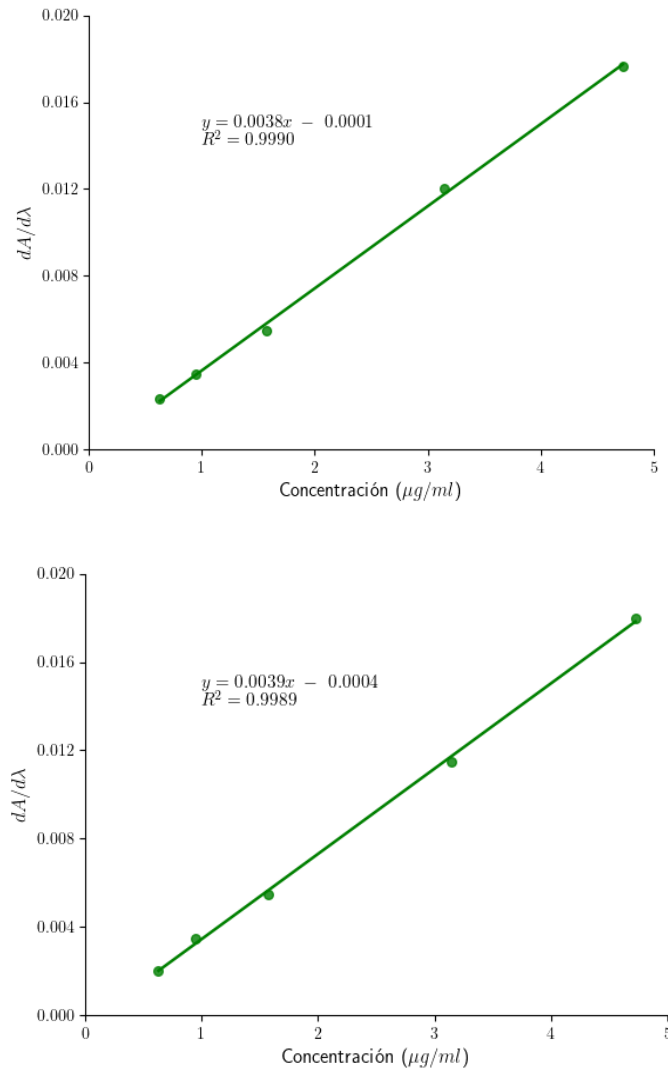


Figura 18: Calibración por derivada 1° para NOR, de forma individual (arriba) y en mezcla de dos componentes (abajo).

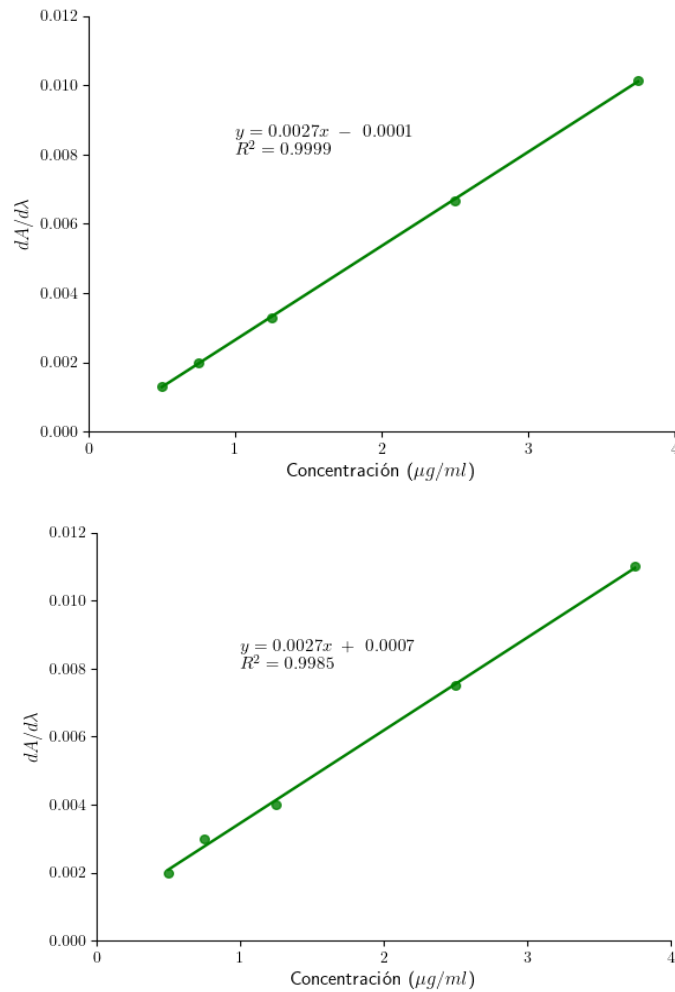


Figura 19: Calibración por derivada 1° para SMX, de forma individual (arriba) y en mezcla de dos componentes (abajo).

Para estimar la similitud de las ecuaciones de regresión se realizó el test-*t* de Student con un nivel de significación $\alpha = 0.05$ y $n = (n_1 + n_2) - 2$ grados de libertad, dónde la hipótesis nula (H_0) indica que las ecuaciones de la regresión no poseen diferencias significativas en términos de su pendiente. Los resultados se exhiben en la *Tabla 10*.

Tabla 10. Evaluación de la especificidad del método para NOR y SMX.

	NOR (dA/dλ a 257nm)				SMX (dA/dλ a 272nm)			
	NOR	NOR (mezcla)	t _{tab} *	t _{exp}	SMX	SMX (mezcla)	t _{tab} *	t _{exp}
Intercepto	-0.0001	-0.0004	-	-	-0.0001	0.0007	-	-
Pendiente	0.0038	0.0039	2.30	0.75	0.0027	0.0027	2.30	0.24
R²	0.9990	0.9989			0.9999	0.9985		

* Valor de t para (n1 + n2) – 2 g.l.³⁷

Al comparar los valores de t_{exp} con los valores tabulados, podemos aceptar la hipótesis nula, por lo que las ecuaciones de regresión son similares y no existirían interferencias entre las drogas, pudiéndose así cuantificar el analito en las mezclas mediante el método de “zero crossing” o espectrofotometría de derivada de primer orden.

4.2.6.1 Precisión

4.2.6.2 Repetibilidad

Para la **repetibilidad del equipo** se obtuvo un coeficiente de variación de 0.15%, menor al 1% propuesto por la ICH (*Tabla 11*).

Tabla 11. Parámetros para la estimación de la repetibilidad del equipo.

Parámetro	NOR (3.15 µg/ml)
Desviación estándar	5.8E ⁻⁰⁴
Promedio (12 replicados)	0.375
CV (%)	0.15

Para la **repetibilidad del método**, se visualizan en la *Tabla 12* los promedios del coeficiente de variación tanto para NOR y SMX. Se obtuvieron coeficientes de variación de 2.17 y 2.90 %, inferiores al 3% propuesto por la ICH.

Tabla 12. Coeficientes de variación para la estimación de la repetibilidad del método.

	Concentración (µg/ml)	CV (%)	CV Promedio (%)
NOR	4.73	2.08	2.17
	3.15	2.38	
	0.95	2.05	
SMX	3.75	3.13	2.90
	2.50	3.12	
	0.75	2.46	

4.2.6.3 Precisión intermedia

Las Figuras 20 y 21 representan las curvas de calibrado de los valores de la derivada de primer orden en función de la concentración de NOR y SMX medidas a 257 nm y 272 nm respectivamente, realizadas por un segundo analista.

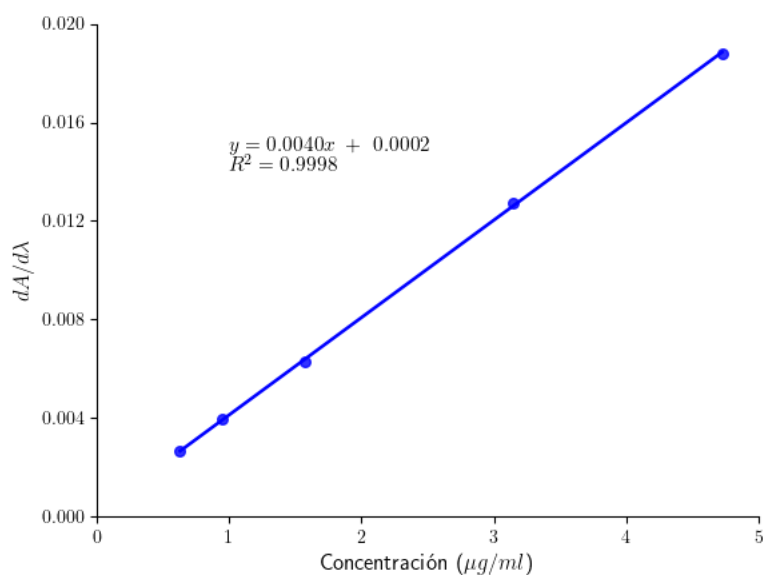


Figura 20: Curva de calibración de NOR a concentración fija de SMX realizada por 2º analista medida a 257 nm.

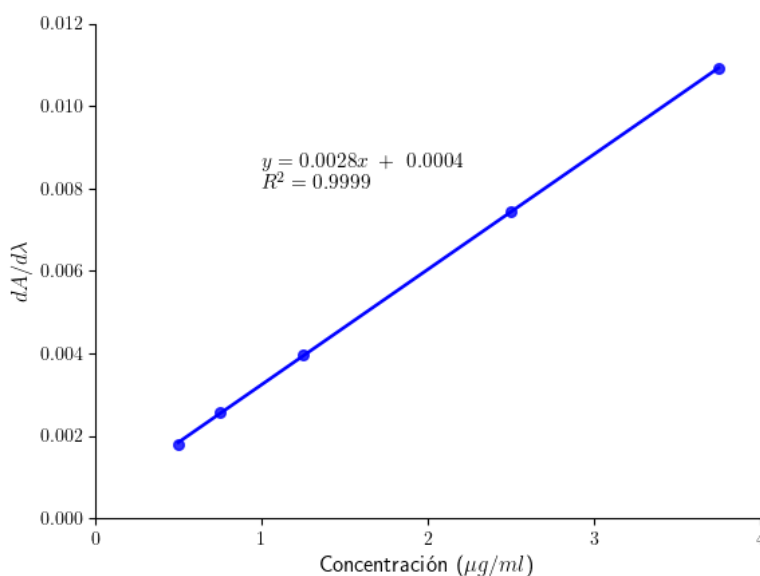


Figura 21: Curva de calibración de SMX a concentración fija de NOR realizada por 2° analista medida a 272 nm.

A su vez, los parámetros de los ensayos de precisión intermedia se visualizan en la Tabla 13.

Tabla 13. Parámetros obtenidos de los ensayos de precisión intermedia.

	NOR (dA/dλ a 257nm)				SMX (dA/dλ a 272nm)			
	Analista 1	Analista 2	t_{sub}^*	t_{sub}	Analista 1	Analista 2	t_{sub}^*	t_{sub}
Intercepto	-0.0004	0.002	2.45	2.03	0.0007	0.0004	2.45	2.15
Pendiente	0.0039	0.0040	2.45	1.25	0.0027	0.0028	2.45	1.07
R²	0.9989	0.9998			0.9985	0.9999		

* Valor de t para (n1 + n2) - 4 g.l.

Al comparar los valores de t_{exp} con los valores tabulados, podemos aceptar la hipótesis nula, por lo que las ecuaciones de regresión son similares y el método es reproducible en condiciones de analistas, días, reactivos y equipos diferentes.

Por otro lado, podemos analizar la reproducibilidad del método mediante una prueba F para varianzas de dos muestras (Tabla 14), utilizando $n - 1$ grados de libertad. En este caso, n corresponde a la cantidad de concentraciones de calibración utilizadas.

Tabla 14. Prueba F para varianzas de dos muestras.

Precisión Intermedia	F_{tab}*	F_{exp}
NOR (dA/dλ a 257nm)	6.40	4.63
SMX (dA/dλ a 272nm)	6.40	4.43

* Valor n-1 g.l para el numerador y denominador. ³⁷

Como $F_{exp} < F_{tab}$, podemos afirmar que ambas mediciones son consistentes entre sí y no existen grandes variaciones en las mediciones entre ambos analistas.

Por último, podemos evaluar la precisión intermedia mediante los coeficientes de variación obtenidos a partir de las medidas realizadas por triplicado, lo cual refleja la dispersión de las medidas entre ambos analistas (*Tablas 15 y 16*).

Tabla 15. Estimación de la precisión entre analistas para la mezcla de NOR a concentración variable.

Analista	Concentración (M)	CV (%)	CV Promedio (%)
ANALISTA 1	1.5×10^{-5}	1.68	2.41
	9.9×10^{-6}	1.26	
	3.0×10^{-6}	3.01	
ANALISTA 2	1.5×10^{-5}	0.80	0.75
	9.9×10^{-6}	0.71	
	3.0×10^{-6}	0.76	

Tabla 16. Estimación de la precisión entre analistas para la mezcla de SMX a concentración variable.

Analista	Concentración (M)	CV (%)	CV Promedio (%)
ANALISTA 1	1.5×10^{-5}	0.26	2.12
	9.9×10^{-6}	1.90	
	3.0×10^{-6}	4.19	
ANALISTA 2	1.5×10^{-5}	0.78	0.67
	9.9×10^{-6}	0.27	
	3.0×10^{-6}	0.97	

Se observa en los resultados anteriores que los coeficientes de variación promedio son inferiores al doble de los correspondientes a la repetibilidad del método, lo que verifica que las mediciones cumplen con los rangos establecidos por la ICH en condiciones diferentes de trabajo. Además, evidenciamos que el segundo analista posee, en ambos casos, menores desviaciones en las medidas realizadas respecto del primer analista, lo que indica mayor precisión en el trabajo realizado.

4.2.7 Exactitud

Los porcentajes de recuperación para NOR y SMX figuran en la *Tabla 17*.

Tabla 17. Porcentajes de recuperación para NOR y SMX según el método de adición estándar.

Nivel (%)	Recuperación (%)	
	NOR	SMX
80	100.94 ± 1.31	92.97 ± 1.38
100	100.44 ± 1.18	93.17 ± 0.60
120	100.03 ± 1.88	93.33 ± 0.27

La recuperación para NOR se encuentra dentro del porcentaje esperado, aunque para SMX se encuentra por debajo del 100% de recuperación esperado, posiblemente por la presencia de interferentes (efecto matriz)³⁶.

Por su parte, al evaluar las concentraciones nominales de NOR frente a las de ensayo, se obtuvieron los siguientes valores (*Tabla 18*).

Tabla 18. Concentraciones nominales y de ensayo para evaluación de exactitud.

Muestra	Concentración (µg/ml)	Concentración predicha - Uv-visible (µg/ml)
1	1.42	1.41
2	1.26	1.26
3	1.10	1.10
4	0.88	0.89
5	0.76	0.77
6	0.50	0.51

La *Figura 22* representa la región de confianza elíptica conjunta para la pendiente y ordenada al origen. Se puede observar que el punto (1,0) se encuentra casi en el centro de la elipse, por lo que el método planteado demuestra ser exacto frente a concentraciones incógnita o de validación.

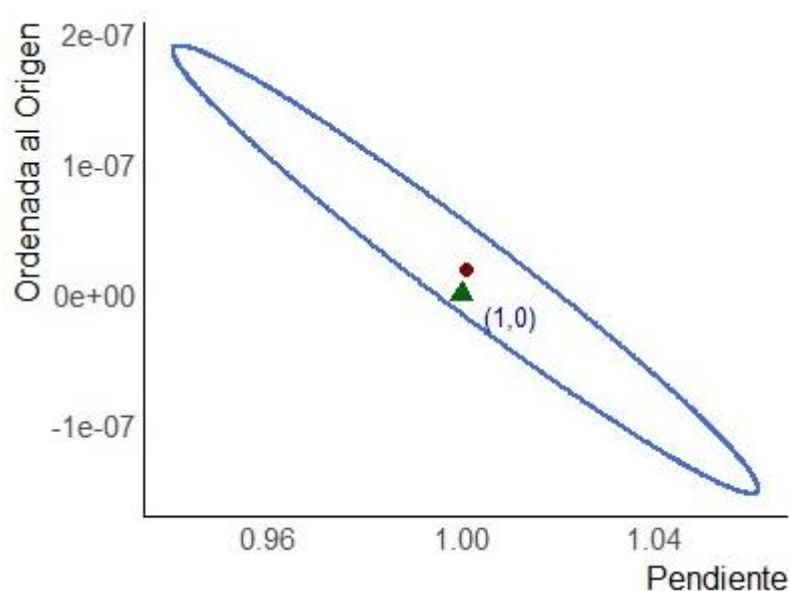


Figura 22: Región elíptica de confianza conjunta al evaluar la exactitud mediante espectrofotometría Uv-visible.

4.3 Validación del método mediante Espectrofotometría de Fluorescencia

4.3.1 Estudio exploratorio

Al realizar el análisis exploratorio mediante la medición de matrices de excitación-emisión, se pudo observar que, para NOR, la máxima intensidad de emisión se daba a un pH 7.4, mientras que a pH básico prácticamente la intensidad de fluorescencia se vio disminuida de forma completa. Los valores de longitud de onda de excitación y emisión en donde se daba la mayor intensidad de fluorescencia se especifican en la *Tabla 19*.

Tabla 19. Resultados del análisis exploratorio de NOR bajo diferentes condiciones de pH.

	$\lambda_{\text{máx}} \text{ excitación (nm)}$	$\lambda_{\text{máx}} \text{ emisión (nm)}$	Intensidad de Fluorescencia
HCl 0.1 M	330	448	50.28
Buffer pH 7.4	335	408	150.59
NaOH 0.1 M	-	-	-

Como era de esperar, SMX no presentó fluorescencia al hacer el barrido espectral, por lo que el método de medición por espectrofluorimetría sólo es aplicable para NOR.

4.3.2 Linealidad

La curva de calibración se ilustra en la *Figura 23*, mientras que los resultados de la evaluación de la linealidad mediante el test estadístico *t* de Student, se detallan en la *Tabla 20*.

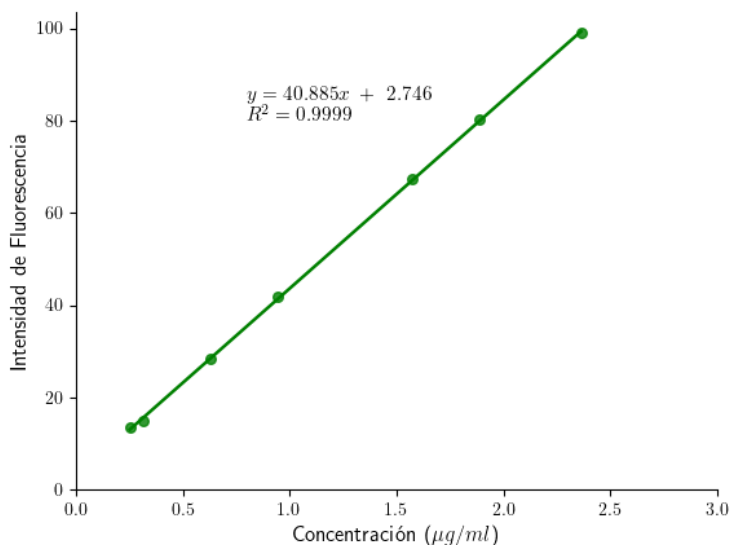


Figura 23: Curva de calibración para NOR mediante espectrofluorimetría.

Tabla 20. Parámetros de validación del método para la determinación de NOR mediante espectrofotometría de fluorescencia.

NOR ($\lambda_{exc} = 335\text{nm}$; $\lambda_{emi} = 408\text{ nm}$)					
			CV (%)	t_{tab}^*	t_{exp}
	Intercepto	2.746	-	2.09	1.74
Linealidad	Pendiente	40.885	1.14	-	-
	R^2	0.9999	-		

* Valor para n-1 g.l.³⁷

De igual manera respecto al método anterior, los resultados de la prueba F se visualizan en la *Tabla 21*.

Tabla 21. Resultados prueba F para evaluación de la linealidad mediante espectrofotometría de fluorescencia.

Curva de Calibrado	F _{tab} *	F _{exp}
NOR	2.40	1.66

* Valor para (m-2)(m-p) g.l. ³⁷

Contrastando ambos resultados, podemos afirmar que la linealidad se cumple en el intervalo estudiado (0.25 – 2.36 µg/ml).

4.3.3 Homogeneidad de varianzas

Según lo planteado en la sección 4.1.3, para evaluar la homogeneidad de varianzas, se puede hacer uso del parámetro F. Los resultados se exhiben en la *Tabla 22*.

Tabla 22. Resultados prueba F para evaluación de la homogeneidad de variancias.

Curva de Calibrado	F _{tab} *	F _{exp}
NOR	9.27	2.82

* Valor para (n-1)(n-1) g.l. ³⁷

Al ser $F_{tab} > F_{exp}$, se cumple la homogeneidad de varianzas en todo el intervalo de concentraciones evaluado.

4.3.4 Rango lineal y dinámico

Los rangos lineales y dinámicos de la curva de se muestran en la *Tabla 23*.

Tabla 23. Rangos lineales y dinámicos de la curva de calibrado de NOR obtenida por fluorescencia.

	NOR (M)	NOR (µg/ml)
Rango Lineal	7.9E ⁻⁰⁷ – 7.4E ⁻⁰⁶	0.07 – 2.36
Rango Dinámico	5.9E ⁻⁰⁷ – 1.97E ⁻⁰⁵	0.02 – 6.30

4.3.5 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Utilizando el criterio basado en la desviación estándar de la respuesta lineal y su pendiente, determinamos los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) para la calibración realizada por fluorescencia. Los resultados se evidencian en la *Tabla 24*.

Tabla 24. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) para NOR.

Parámetro	NOR
LD (µg/ml)	0.02
LQ (µg/ml)	0.07

Al comparar estos valores con los obtenidos mediante espectrofotometría Uv-visible, podemos afirmar que la técnica por fluorescencia permite detectar concentraciones menores de analito.

4.3.6 Especificidad

Al realizar una comparación entre las matrices de excitación-emisión de una muestra de NOR de forma individual, y otra en presencia de SMX (Figuras 24 y 25), podemos notar que no existen diferencias en los máximos de longitud de onda de excitación y emisión.

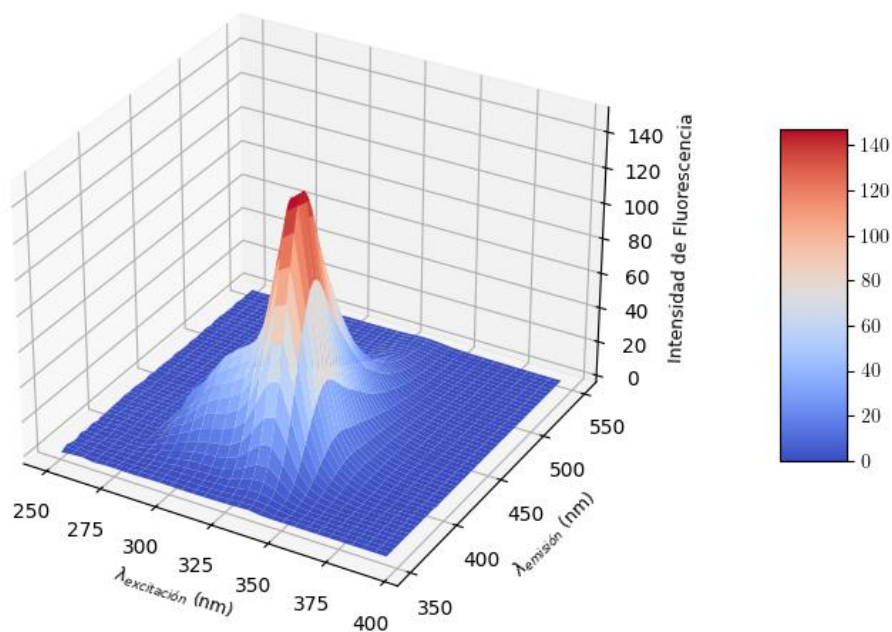


Figura 24: Matriz excitación-emisión para NOR de forma individual.

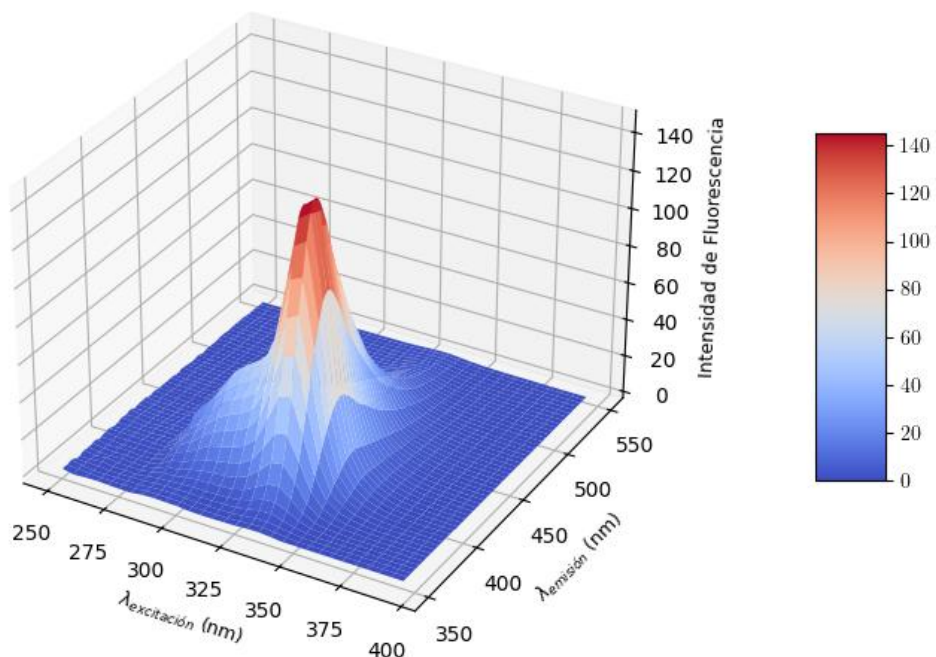


Figura 25: Matriz excitación-emisión para mezcla de NOR y SMX.

Tampoco se observan cambios en las intensidades máximas de fluorescencia lo que sugiere que no hay interferencias por parte de SMX en las propiedades fluorescentes de NOR.

4.3.7 Precisión

4.3.7.1 Repetibilidad

Para la **repetibilidad del equipo** se obtuvo un coeficiente de variación de 0.65%, menor al 1% propuesto por la ICH (*Tabla 25*).

Tabla 25. Parámetros para la estimación de la repetibilidad del equipo.

Parámetro	NOR (3.15 µg/ml)
Desviación estándar	1.93
Promedio Intensidad de fluorescencia	295.10
CV (%)	0.65

Para la **repetibilidad del método**, se visualizan en la *Tabla 26* los promedios del coeficiente de variación para NOR. Se obtuvo un coeficiente de variación de 2.13%, menor al 3% propuesto por la ICH.

Tabla 26. Coeficientes de variación para la estimación de la repetibilidad del método.

	Concentración (µg/ml)	CV (%)	CV Promedio (%)
NOR	1.58	2.11	
	0.95	2.16	2.13
	0.63	2.12	

4.3.7.2 Precisión Intermedia

La *Figura 26* representa la curva de calibración de NOR efectuada por un segundo analista para el estudio de precisión intermedia.

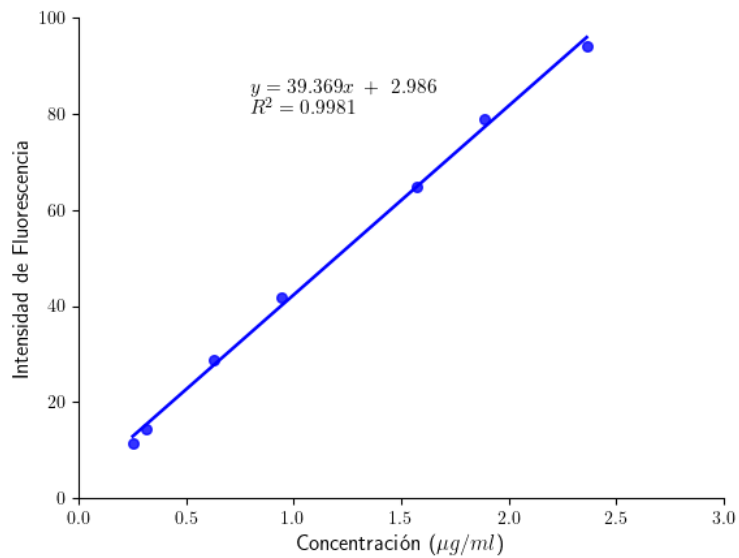


Figura 26: Curva de calibración de NOR realizada por segundo analista.

Los parámetros para la comparación entre las rectas de calibrado entre ambos analistas se expresan en la *Tabla 27*.

Tabla 27. Parámetros obtenidos de los ensayos de precisión intermedia.

NOR ($\lambda_{emi} = 408nm$)				
	Analista 1	Analista 2	t_{tab}*	t_{exp}
Intercepto	2.746	2.986	2.45	0.22
Pendiente	40.885	39.369	2.45	1.90
R²	0.9999	0.9981		

* Valor para (n1 + n2) - 4 g.l. ³⁷

Al comparar los valores de t_{exp} con los valores tabulados, podemos aceptar la hipótesis nula, ya que las ecuaciones de regresión son similares y el método es reproducible en condiciones de analistas, días y reactivos diferentes

Por otro lado, podemos analizar la reproducibilidad del método mediante una prueba F para varianzas de dos muestras (*Tabla 28*), utilizando $n - 1$ grados de libertad.

Tabla 28. Prueba F para varianzas de dos muestras.

Precisión Intermedia	F_{tab}*	F_{exp}
NOR	4.28	4.22

* Valor n-1 g.l para el numerador y denominador. ³⁷

Si bien $F_{exp} < F_{tab}$, en principio podemos afirmar que ambas mediciones son consistentes entre sí y no existen variaciones en las mediciones entre ambos analistas, pero estos valores resultan muy próximos entre sí, por lo que existe la posibilidad de cometer el error de aceptar este supuesto sin ser verdadero.

Por último, podemos evaluar la precisión intermedia mediante los coeficientes de variación obtenidos a partir de las medidas realizadas por triplicado, lo cual refleja la dispersión de las medidas entre ambos analistas (*Tabla 29*).

Tabla 29. Estimación de la precisión entre analistas para la mezcla de NOR a concentración variable.

Analista	Concentración (µg/ml)	CV (%)	CV Promedio (%)
ANALISTA 1	1.58	0.39	0.86
	0.95	0.52	
	0.63	1.68	
ANALISTA 2	1.58	2.30	2.08
	0.95	1.12	
	0.63	2.80	

Podemos observar que los coeficientes de variación promedio son inferiores al 5%, lo que verifica que las mediciones cumplen con los rangos establecidos por la ICH en condiciones diferentes de trabajo y de analistas.

4.3.8 Exactitud

La Figura 27 representa la región de confianza elíptica conjunta para la pendiente y ordenada al origen. Se puede observar que el punto (1,0) se encuentra muy próximo al centro de la elipse, por lo que el método de espectroscopía de fluorescencia demuestra ser exacto frente a concentraciones incógnita o de validación, dentro del rango evaluado.

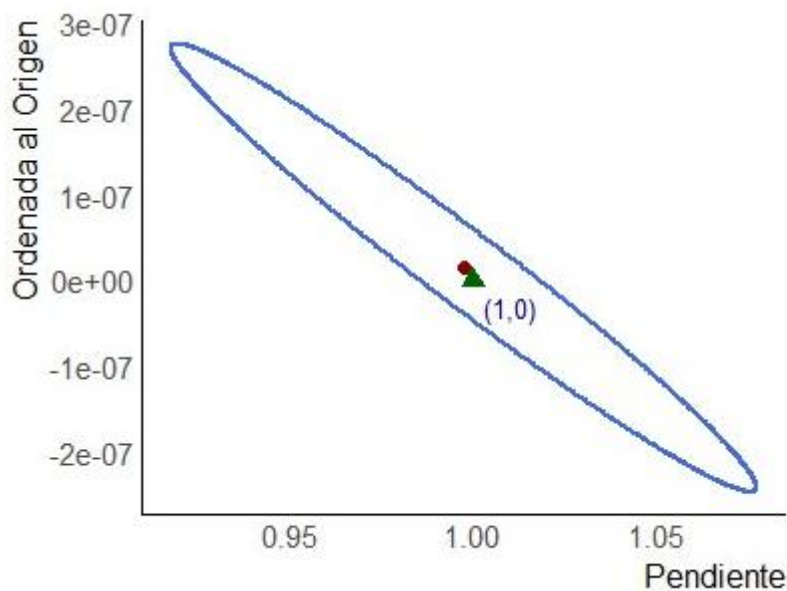


Figura 27: Región elíptica de confianza conjunta al evaluar la exactitud en la determinación de NOR mediante espectrofotometría de fluorescencia.

4.4 Comparación de métodos analíticos

En primer lugar, de acuerdo con las calibraciones obtenidas individualmente, se obtuvo la sensibilidad entre ambos métodos (*Tabla 30*), indicando que la espectrofotometría de fluorescencia es una técnica mucho más sensible que la espectrofotometría Uv-visible, por lo que una cantidad menor de analito logra una mayor respuesta en las mediciones, minimizando la incertidumbre de la calibración.

Tabla 30. Sensibilidad analítica de ambos métodos

Método	Pendiente	Residuos de la regresión ($s_{y/x}$)	Sensibilidad analítica (γ) en $(\mu\text{g/ml})^{-1}$	$1/\gamma$ ($\mu\text{g/ml}$)
Fluorescencia	40.885	0.523	78.148	0.013
Uv-visible	0.118	0.0039	30.474	0.033

En la *Tabla 31* se muestra la concentración nominal de NOR y los promedios de concentraciones predichas por triplicado.

Tabla 31. Predicción de concentraciones entre método Uv-visible y fluorescencia.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración predicha - Uv-visible ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración predicha - fluorescencia ($\mu\text{g/ml}$)
1	1.42	1.41	1.39
2	1.26	1.26	1.27
3	1.10	1.10	1.10
4	0.88	0.89	0.90
5	0.76	0.77	0.77

Teniendo en cuenta las desviaciones estándar de cada medida por triplicado, se realizó el gráfico de la región elíptica de confianza (*Figura 28*).

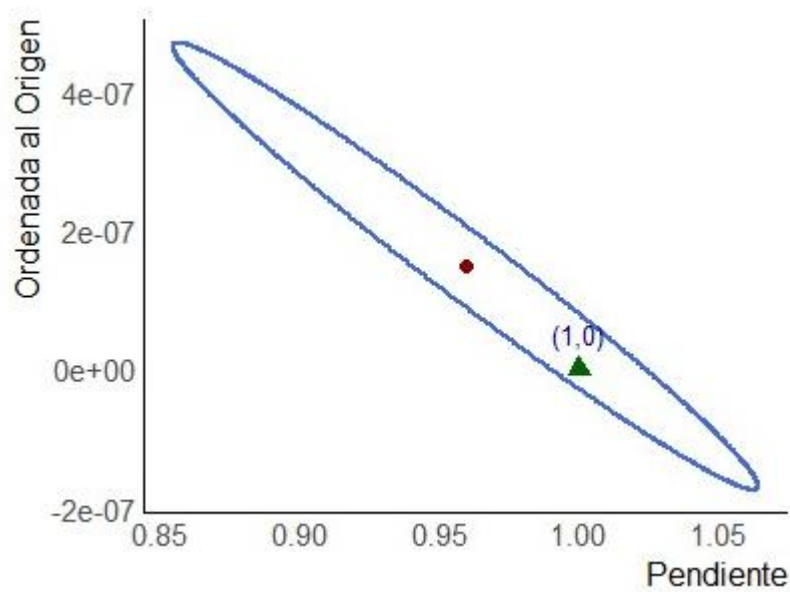


Figura 28: Región elíptica de confianza conjunta obtenida a partir de las concentraciones predichas por ambos métodos.

Como podemos visualizar en la imagen anterior, el punto (1,0) se encuentra incluido en la región elíptica de confianza conjunta, lo que sugiere que ambos métodos son precisos. Sin embargo, la desviación del punto respecto al centro de la elipse indica cierta falta de exactitud entre los métodos evaluados. A partir de este resultado, no encontramos evidencia alguna en los datos experimentales de que ambos métodos, espectrofotometría Uv-visible y de fluorescencia, conduzcan a resultados estadísticamente diferentes.

5 Conclusiones

Se ha realizado satisfactoriamente la validación del método de cuantificación simultánea de norfloxacin y sulfametoxazol mediante espectrofotometría Uv-visible de derivada. Asimismo, se ha validado el método de cuantificación de norfloxacin en presencia de sulfametoxazol por espectroscopía de fluorescencia.

Se ha establecido de forma correcta el rango de linealidad adecuado, así como los límites de detección y cuantificación de las metodologías propuestas, demostrando precisión, exactitud y selectividad, conforme a los estándares establecidos por los organismos de control correspondientes.

Por su parte, se ha demostrado que diferentes analistas bajo distintas condiciones de trabajo no afectan en la reproducibilidad de los resultados en ambas técnicas, pudiéndose determinar el contenido de ambas sustancias de manera confiable.

Las metodologías empleadas demuestran ser técnicas simples, rápidas y económicas en términos de reactivos e instrumental.

6 Bibliografía

- 1 Anmat. *Farmacopea Argentina*, 7th ed.; 2013.
- 2 ICH. International Commission on Harmonisation. ICH Q2 (R2) Validation of Analytical Procedures. *European agency for the evaluation of medicinal products* **2023**, 2 (December 2023).
- 3 Kapoor, N.; Khandavilli, S.; Panchagnula, R. Simultaneous Determination of Lamivudine and Stavudine in Antiretroviral Fixed Dose Combinations by First Derivative Spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, 41 (3), 761–765. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.007>.
- 4 Montgomery, D. C. *Introduction To Statistical Quality Control.*, 6th ed.; 2009. <https://doi.org/10.2307/2988304>.
- 5 Olivieri, A. C. Curso de Quimiometría Calibraciones Univariada y Multivariada de Primer Orden. **2017**, 1–96.
- 6 *ISO 11095:1996 - Linear calibration using reference materials.* <https://www.iso.org/standard/1060.html> (accessed 2024-08-12).
- 7 Currie, L. A. Limits for Qualitative Detection and Quantitative Determination: Application to Radiochemistry. *Analytical Chemistry* **1968**, 40 (3), 586–593. https://doi.org/10.1021/AC60259A007/ASSET/AC60259A007.FP.PNG_V03.
- 8 González Gómez, D. Utilización de Señales de Primer y Segundo Orden Para El Análisis de Fluoroquinolonas y Carbamacepinas En Fluidos Biológicos. *Philologia Hispalensis* **2007**, 21, 97–117.
- 9 *PubChem.* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed 2024-09-02).
- 10 Chierentin, L.; Salgado, H. R. N. Review of Properties and Analytical Methods for the Determination of Norfloxacin. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2016**, 46 (1), 22–39. <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.941456>.

- 11 Chávez-Jacobo, V. M.; Ramírez-Díaz, M. I.; Silva-Sánchez, J.; Cervantes, C.; Chávez-Jacobo, V. M.; Ramírez-Díaz, M. I.; Silva-Sánchez, J.; Cervantes, C. Resistencia Bacteriana a Quinolonas: Determinantes Codificados En Plásmidos. *REB. Revista de educación bioquímica* **2015**, *34* (1), 4–9.
- 12 Musa, K. A. K.; Eriksson, L. A. Theoretical Assessment of Norfloxacin Redox and Photochemistry. *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113* (40), 10803–10810. https://doi.org/10.1021/JP904671S/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JP-2009-04671S_0009.GIF.
- 13 Fabregat-Palau, J.; Rigol, A.; Yu, Z.; Vidal, M. Using a Batch Test to Derive Sorption Data of Fluoroquinolone Antibiotics in Humic Acids. *MethodsX* **2023**, *10*. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102109>.
- 14 *Sulfamethoxazole: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01015> (accessed 2024-08-12).
- 15 Chen, H.; Gao, B.; Li, H.; Ma, L. Q. Effects of PH and Ionic Strength on Sulfamethoxazole and Ciprofloxacin Transport in Saturated Porous Media. *Journal of Contaminant Hydrology* **2011**, *126* (1–2), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2011.06.002>.
- 16 León-Buitimea, A.; Garza-Cárdenas, C. R.; Garza-Cervantes, J. A.; Lerma-Escalera, J. A.; Morones-Ramírez, J. R. The Demand for New Antibiotics: Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies as Future Strategies in Antibacterial Agent Design. *Frontiers in Microbiology* **2020**, *11* (July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01669>.
- 17 Avila, C. D.; Ayala Gómez, R.; Mazzieri, M. R.; Pinto Vitorino, G. Simultaneous Determination of Norfloxacin and Sulfadiazine by First-Derivative Spectrophotometry. *Journal of Chemistry Letters* **2023**, *4*, 130–135.
- 18 Daniel C. Harris. *Quantitative Chemical Analysis - W.H. Freeman & Company*, 8th ed.; 2010.
- 19 López Martínez, L.; López de Alba, P. L. Una Introducción a La Espectrometría de Derivadas. *Educación Química* **2018**, *4* (3), 160. <https://doi.org/10.22201/FQ.18708404E.1993.3.66813>.

- 20 Khutle Nilesh M, P. H. A. and V. C. “Zero-Crossing” First-Order Derivative Spectroscopy Method for Analysis of Sertraline Hydrochloride in Novel Self Micro Emulsifying Drug Delivery System. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*. **2014**, *1* (3), 1–7.
- 21 Skoog, D.; Holler, F. J.; Nieman, T. *Principios de Análisis Instrumental*; 2009.
- 22 Fasani, E.; Albini, A.; Mella, M.; Rampi, M.; Negra, F. B. Light and Drugs: The Photochemistry of Fluoroquinolone Antibiotics. *International Journal of Photoenergy* **1999**, *1* (1), 7–11. <https://doi.org/10.1155/s1110662x99000021>.
- 23 Kumar Panigrahi, S.; Kumar Mishra, A. Inner Filter Effect in Fluorescence Spectroscopy: As a Problem and as a Solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2019**, *41*, 100318. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEMREV.2019.100318>.
- 24 Automatic Correction of Fluorescence Spectra for Primary and Secondary Inner-Filter Effects (IFE) with Duetta™.
- 25 Wang, T.; Zeng, L. H.; Li, D. L. A Review on the Methods for Correcting the Fluorescence Inner-Filter Effect of Fluorescence Spectrum. *Applied Spectroscopy Reviews* **2017**, *52* (10), 883–908. <https://doi.org/10.1080/05704928.2017.1345758>.
- 26 Sajwan, R. K.; Lakshmi, G. B. V. S.; Singh, A. K.; Solanki, P. R. Study of PH-Dependent Fluorescent Property of Fluoroquinolone Antibiotics. *Applied Research* **2023**, *2* (2). <https://doi.org/10.1002/appl.202200026>.
- 27 Muniz, G. S. V.; Teixeira, L. R.; Louro, S. R. W. Interaction of the Antibiotic Norfloxacin with Ionic Micelles: PH-Dependent Binding. *European Biophysics Journal* **2014**, *43* (10–11), 477–483. <https://doi.org/10.1007/s00249-014-0978-5>.
- 28 Drakopoulos, A. I.; Ioannou, P. C. Spectrofluorimetric Study of the Acid-Base Equilibria and Complexation Behavior of the Fluoroquinolone Antibiotics Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin and Pefloxacin in Aqueous Solution. *Analytica Chimica Acta* **1997**, *354*, 197–204.
- 29 Montero, M.; Hernández Borell, J. Fluoroquinolone Distribution in a Phospholipid Environment Studied by Spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta* **1994**, *290*, 58–64.

- 30 Jamal, S.; Baderia, V. K.; Agrawal, Y. K.; Sanghi, S. K. Fluorescence Detection and Identification of Eight Sulphonamides Using Capillary Electrophoresis on Released Excipients in Lake Water. *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, *12* (7), 1338–1344. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2014.10.039>.
- 31 Chen, L. Z.; Wu, H. L.; Long, W. J.; Wang, T.; Tong, G. Y.; Yu, R. Q. Rapid Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim Illegally Added to Health Products Using Excitation-Emission Matrix Fluorescence Coupled with the Second-Order Calibration Method. *Analytical Methods* **2021**, *13* (42), 5075–5084. <https://doi.org/10.1039/d1ay01391b>.
- 32 Senta, I.; Terzić, S.; Ahel, M. Simultaneous Determination of Sulfonamides, Fluoroquinolones, Macrolides and Trimethoprim in Wastewater and River Water by LC-Tandem-MS. *Chromatographia* **2008**, *68*:9 (9), 747–758. <https://doi.org/10.1365/S10337-008-0780-6>.
- 33 Wang, N.; Su, M.; Liang, S.; Sun, H. Sensitive Residue Analysis of Quinolones and Sulfonamides in Aquatic Product by Capillary Zone Electrophoresis Using Large-Volume Sample Stacking with Polarity Switching Combined with Accelerated Solvent Extraction. *Food Analytical Methods* **2016**, *9* (4), 1020–1028. <https://doi.org/10.1007/S12161-015-0269-5/METRICS>.
- 34 Li, C.; Jiang, H. Y.; Zhao, S. J.; Zhang, S. X.; Ding, S. Y.; Li, J. C.; Li, X. W.; Shen, J. Z. Simultaneous Determination of Fluoroquinolones and Sulfonamides in Chicken Muscle by LC with Fluorescence and UV Detection. *Chromatographia* **2008**, *68* (1–2), 117–121. <https://doi.org/10.1365/S10337-008-0664-9/METRICS>.
- 35 Lopes, R. P.; De Freitas Passos, érica E.; De Alkimim Filho, J. F.; Vargas, E. A.; Augusti, D. V.; Augusti, R. Development and Validation of a Method for the Determination of Sulfonamides in Animal Feed by Modified QuEChERS and LC–MS/MS Analysis. *Food Control* **2012**, *28* (1), 192–198. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.04.026>.
- 36 Andersen, J. E. T. The Standard Addition Method Revisited. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2017**, *89*, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.013>.

- 37 Kokoska, S.; Nevison, C. Statistical Tables and Formulae. 1989.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4613-9629-1>.