

## Trabajo completo

# Estrategia de validación aplicada a un método potenciométrico desarrollado para la determinación de fluoruro total en pastas dentales

RECIBIDO: 29/06/2011

ACEPTADO: 11/08/2011

**Caro, Y. • Santiago, G. • Robles, J. C. • Cámara, M. S. • De Zan, M. M.**

Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos (LCCM),  
Cátedra de Química Analítica I, Facultad de Bioquímica y  
Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, C.C.  
242, S3000ZAA Santa Fe, Argentina. e-mail: yami\_caro@  
yahoo.com.ar; mmdezan@fcb.unl.edu.ar

**RESUMEN:** Sobre la base de las directrices establecidas por normas internacionales se seleccionaron los parámetros relevantes y los criterios de aceptación necesarios en el diseño de estudios experimentales, llevados a cabo para validar un nuevo método analítico destinado a la determinación de fluoruro total en pastas dentales. El método fue desarrollado para el control de calidad rutinario de estas preparaciones que contienen fluoruro de sodio y monofluorofosfato de sodio como ingredientes activos. El mismo consiste en una hidrólisis ácida y medición de fluoruro total con un electrodo ión selectivo por potencimetría directa. Los resultados de la validación demostraron selectividad, comportamiento lineal en el rango de trabajo deseado, ausencia de efecto matriz, valores de recuperación buenos

(96.9–101.3%), y muy buena precisión en estudios de repetibilidad y precisión intermedia con valores de CV < 3.0%. El procedimiento presenta además la ventaja de ser rápido, sencillo y mucho más económico en relación a la cromatografía iónica y la titulometría.

**PALABRAS CLAVES:** Validación, Potencimetría, Pastas dentales, Flúor

**SUMMARY:** *Validation strategy applied to a potentiometric method developed for the determination of total fluoride in toothpastes.* Based on guidelines established by international regulations we selected relevant parameters and acceptance criteria required for designing experimental studies needed to validate a new analytical method for determination of total fluoride in toothpastes. The method was developed for routine quality control of preparations

containing sodium fluoride and sodium monofluorophosphate as active ingredients. It consists of acid hydrolysis and the measurement of total fluoride using ion selective electrode by direct potentiometry. The validation results demonstrated selectivity, linear behavior in the working range, lack of matrix effect, good recoveries

(96.9 -101.3%) and excellent precision in repeatability and intermediate precision studies with CV <3.0%. In addition, the procedure has the advantage of being fast, easy and much cheaper in relation to ion chromatography.

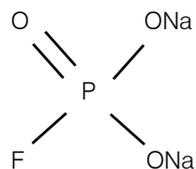
**KEYWORDS:** Validation, Potentiometry, toothpastes, Fluoride.

## 1. Introducción

Las pastas dentales son productos comerciales de uso masivo cuya finalidad no es meramente cosmética, sino que están fundamentalmente diseñadas para prevenir diferentes afecciones dentales. El flúor es uno de los componentes más importante de los dentífricos, cuya función es la de colaborar en la prevención de las caries. Se sabe que el ión fluoruro se incorpora al esmalte dentario formando la fluorapatita y la hidroxifluorapatita, compuestos mucho más resistentes a los ácidos bacterianos que la hidroxiapatita [1]. Por otro lado, el flúor inhibe el sistema enzimático bacteriano limitando el crecimiento del biofilm. Sin embargo, la acción cariostática del fluoruro es ejercida dentro de un rango de bajas concentraciones del mismo, mientras que, administrado en altas cantidades se convierte en una sustancia peligrosa. La ingesta aguda de una alta dosis de fluoruro, o la administración crónica de flúor en niveles por encima de lo recomendado, puede conducir a la generación de gastritis, daño renal y fluorosis, una afección dentaria y ósea de gravedad [2,3]. Es así que, el control de la concentración de flúor en las pastas dentales es una medida estrictamente necesaria para el aseguramiento de la salud pública, que en nuestro país está reglamentada por ANMAT. Esta entidad establece, en consonancia con otros organismos

del MERCOSUR, que las pastas dentales deben contener un máximo de 0.15 g % p/p de flúor. [4]. Este principio activo puede ser provisto en los dentífricos en más de una forma química. Hoy en día los compuestos más utilizados son el fluoruro de sodio (FS) y el monofluorofosfato de sodio (MFFS), cuya estructura molecular se presenta en la Figura 1. Mientras que FS es una fuente rápida de flúor en la boca durante el cepillado, el MFFS, que contiene flúor unido covalentemente, se hidroliza lentamente, liberando pequeñas cantidades de fluoruro y de fosfato en forma continua [1].

**Figura 1.** Estructura molecular de mono-fluorofosfato de sodio.



El contenido de flúor libre y total en las pastas dentales se ha determinado por diferentes técnicas analíticas tales como la, absorción atómica [5,6], titulometría [7], potenciometría [1] y más recientemente por cromatografía iónica [2]. De todas ellas, la determinación potenciométrica utilizando un electrodo ión selectivo (EIS), es, sin dudas, la más conveniente desde el punto de vista

económico a lo que se suma la ventaja de su sencillez y rapidez.

La validación de nuevos métodos analíticos, es decir, la confirmación mediante pruebas objetivas de que el mismo es adecuado para el uso pretendido, es un requisito de exigencia primaria por parte de las autoridades regulatorias. Sin embargo, el tipo de experimentos de validación a realizar en cada caso, es variado y está sujeto, muchas veces, a la interpretación del analista [8]. En la actualidad existe literatura disponible sobre varias estrategias de validación aplicadas a métodos cromatográficos, siendo aún escasos los procedimientos publicados para la validación de métodos potenciométricos. Siguiendo los lineamientos de las guías ICH [9] y los criterios establecidos por la AOAC [10], se han seleccionado los parámetros y los criterios de aceptación relevantes para diseñar los estudios experimentales necesarios a los fines de llevar a cabo la validación de un nuevo método analítico para la determinación potenciométrica de flúor total en pastas dentales. El método desarrollado está basado en un procedimiento establecido en la Norma Oficial Mexicana [11].

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Instrumental

Para las lecturas potenciométricas se utilizó un electrodo de ión selectivo (EIS) para fluoruro OAKTON y un potenciómetro ORION 410A. Para las mediciones de pH se usó un electrodo de membrana de vidrio HANNA HI1230.

### 2.2. Reactivos

Como estándares se utilizaron FS (99.4 % p/p), y MFFS (94.6 % p/p) caracterizados en nuestro laboratorio según los requerimien-

tos de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para la elaboración de estándares secundarios [12]. Se emplearon como reactivos cloruro de sodio p.a. (Cicarelli, Argentina), acetato de sodio p.a. (Cicarelli, Argentina), ácido acético glacial p.a. (Cicarelli, Argentina), hidróxido de sodio p.a. (Anedra, Argentina) y ácido perclórico (AP) 70 % p/p (Sintorgan, Argentina). El agua de laboratorio utilizada fue calidad Milli-Q.

### 2.3. Muestras

Las muestras utilizadas para el desarrollo y la validación del método fueron: pastas dentales FLUOR FOR Mentol y FLUOR FOR Frutilla de laboratorios LAFORMED S.A. que contienen como principio activo FS (0.10 % p/p) y MFFS (0.76 % p/p), siendo la dosis declarada de flúor total de 1455 mg Kg<sup>-1</sup>. Las matrices utilizadas como muestras blanco, fueron pasta base de FLUOR FOR Mentol y FLUOR FOR Frutilla elaboradas y cedidas por laboratorios LAFORMED.

### 2.4. Soluciones estándares

Se prepararon distintas soluciones estándares a los fines de llevar a cabo los diferentes experimentos de validación: (1) solución de FS conteniendo 100 mg L<sup>-1</sup> de fluoruro, (2) solución de FS conteniendo 1130 mg L<sup>-1</sup> de fluoruro y (3) solución de MFFS conteniendo 2375 mg L<sup>-1</sup> de flúor unido covalentemente.

### 2.5. Soluciones auxiliares

Para el desarrollo del método se utilizaron soluciones de AP 70 % p/p, NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> y una solución TISAB (*Total Ionic Strength Adjustment Buffer*). Esta última solución se preparó pesando 58.5 g de cloruro de sodio, 61.4 g de acetato de sodio y 0.30 g de citrato trisódico y disolviendo

todo en 900 mL de agua. Luego se agregaron 15.00 mL de ácido acético glacial y se ajustó el pH a 5.5. Por último se llevó a un volumen final de 1000 mL con agua.

#### 2.6. Pretratamiento de la muestra

El pretratamiento de la muestra se basó en una hidrólisis de la pasta con la solución de AP, en condiciones controladas, para liberar el ión fluoruro del MFFS y de iones complejos con metales que pueden formarse durante el almacenamiento de la pasta. De esta manera se logró que la totalidad del flúor presente en la pasta quedara disponible para la determinación potenciométrica. La producción de ácido fluorhídrico (HF) durante la hidrólisis hizo indispensable el uso de vasos plásticos, ya que este ácido ataca rápidamente al vidrio formando tetrafluoruro de silicio.

Para obtener la solución muestra mediante hidrólisis, se pesaron exactamente en un vaso de precipitado de plástico de 250.0 mL, alrededor de 1.400 g de pasta dental, a partir de un pool bien homogeneizado de la misma. Se agregaron 20.0 mL de agua sobre la muestra pesada y se agitó suavemente para dispersar la pasta. Luego, se adicionaron 25.0 mL de AP 70 % p/p y se agitó durante 15 minutos en agitador magnético. Al cabo de este tiempo se diluyó la solución a 100.0 mL con agua y se agitó otros 15 minutos. Finalmente, se trasvasó el hidrolizado a un matraz aforado de 250.0 mL, se adicionaron 25.0 mL de NaOH 10 mol L<sup>-1</sup> para neutralizar la solución y se llevó la misma a volumen con agua. La solución muestra resultante, con una concentración de fluoruro de aproximadamente 8.0 mg L<sup>-1</sup>, se trasvasó inmediatamente a un recipiente de plástico y se tomó una porción de 10 mL para centrifugar a 2000 rpm durante 15 min, a los fines de eliminar restos de la pasta en suspensión.

#### 2.7. Mediciones potenciométricas

Para las mediciones potenciométricas se tomaron 2.00 mL del sobrenadante límpido de las soluciones muestras y se trasvasaron a matraz aforado de 20.0 mL, llevando a volumen con solución TISAB. Esta solución cumple tres funciones fundamentales tanto en los calibradores como en las muestras: mantener constante la fuerza iónica en las soluciones de lectura, eliminar potenciales interferentes que formen complejos con el fluoruro y asegurar el pH necesario para que la relación molar de las especies F<sup>-</sup>/HF (fluoruro/ácido fluorhídrico) sea mayor al 99%, de manera de tener el fluoruro disponible para la interacción con el EIS.

#### 2.8. Calibración

La calibración se realizó mediante la obtención de una curva de calibrado por regresión lineal simple, aplicando el método de los cuadrados mínimos. Las variables utilizadas para la regresión fueron el logaritmo de las concentraciones de calibrado y las correspondientes señales expresada en mV, obtenidas en cada caso en la lectura potenciométrica con el EIS.

#### 2.9. Procedimiento de validación

El método desarrollado fue sometido a un proceso de validación completa utilizando la estrategia experimental y los criterios de aceptación que se presentan en la Tabla 1. En primer lugar, se evaluó la especificidad del método mediante el análisis de la respuesta del solvente (solución TISAB) y de la matriz (pasta base libre de flúor) a los fines de verificar la ausencia de compuestos interferentes.

**Tabla 1.** Estrategias experimentales y criterios de aceptación para la validación del método.

<b>Parámetro de validación</b>	<b>Experimental</b>	<b>Criterio de aceptabilidad</b>	<b>Prueba estadística aplicada</b>
<b>Especificidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lectura del blanco de reactivos: solución TISAB (n=3).</li> <li>- Lectura del blanco de muestra: solución de matriz (n=3).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Las respuestas promedios no deben ser diferentes entre si.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prueba t de dos colas para la comparación de promedios (<math>\alpha=0.05</math>)</li> </ul>
<b>Linealidad y Rango</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Curvas de calibrado en 5 niveles (n=3 para cada nivel).</li> <li>- Rango 50 -150 % de la concentración esperada de fluoruro en las soluciones muestra.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Homocedasticidad de los datos</li> <li>- Valor de la pendiente (b): <math>(-57 \pm 2)</math> mV</li> <li>- Coeficiente de determinación (<math>r^2</math>) <math>\geq 0.99</math></li> <li>- Ajuste a un modelo lineal</li> <li>- Predicciones en el punto medio de calibración entre el 97-103% de valor nominal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Análisis de gráfica de distribución de residuos.</li> <li>- ANOVA de los residuos: F de una cola (<math>\alpha=0.05</math>).</li> <li>- ANOVA para la falta de ajuste al modelo: F de una cola (<math>\alpha=0.05</math>).</li> </ul>
<b>Efecto matriz</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Curvas de calibrado en matriz en 5 niveles (n=3 para cada nivel).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pendiente de la curva en matriz no debe ser diferente a la pendiente de la curva en base acuosa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ANOVA para comparación de pendientes (<math>\alpha=0.05</math>)</li> </ul>
<b>Exactitud</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Matrices fortificadas con FS y MFF en concentraciones de 50, 100 y 150 % de las esperadas en las muestras (n=3 para cada nivel)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Recuperación (R) en cada nivel en el rango 95.0 - 105.0 %</li> <li>- CV de las recuperaciones <math>&lt; 3.7\%</math></li> <li>- Recuperación global (Rg) no diferente a 100.0%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prueba t de dos colas para comparación de Rg con 100% (<math>\alpha=0.05</math>)</li> </ul>
<b>Precisión</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Procedimiento completo sobre una muestra comercial, mismo día y mismo analista (Serie 1, n=6)</li> <li>- Procedimiento completo sobre la misma muestra comercial, otro día, analista diferente (Serie 2, n=6)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CV de cada serie <math>&lt; 3.7\%</math></li> <li>- Varianzas comparables entre ambas series</li> <li>- Promedios comparables de resultados de ambas series</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prueba F de dos colas para comparación de varianzas (<math>\alpha=0.05</math>)</li> <li>- Prueba t de dos colas para la comparación de medias (<math>\alpha=0.05</math>)</li> </ul>

Para construir la curva de calibrado se prepararon soluciones calibradoras de FS a partir de la solución estándar de fluoruro 100 mg L<sup>-1</sup>. Los calibradores se prepararon en cinco niveles de concentración 4.00, 6.00, 8.00, 10.00 y 12.00 mg L<sup>-1</sup> tratadas con AP y solución TISAB de la misma manera que las muestras (por triplicado cada nivel) abarcando un rango comprendido entre 50 -150 % de la concentración esperada de fluoruro total en la solución muestra. A los fines de determinar la existencia de efecto matriz en la señal analítica se realizó también una calibración en matriz para cada uno de los tipos de pastas (mentol y frutilla), para lo cual se trabajó con las pastas base a las que se adicionaron cantidades adecuadas de la solución estándar de fluoruro 100 mg L<sup>-1</sup>.

La precisión del método se evaluó en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia; para lo que se llevó a cabo la determinación de fluoruro en muestras comerciales por sextuplicado en días diferentes y por distintos analistas.

La exactitud se estudió en términos de recuperación porcentual, para lo cual se adicionó a porciones exactamente pesadas de las matrices, volúmenes exactos de las soluciones de FS y de MFFS de manera de alcanzar concentraciones correspondientes a los niveles 50, 100 y 150 % de la con-

centración esperada de flúor en la muestra (Tabla 4). Estas matrices fortificadas fueron sometidas luego, al procedimiento analítico completo.

Finalmente, los resultados de cada ensayo de validación fueron evaluados mediante pruebas estadísticas adecuadas.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Selectividad

Las experiencias realizadas en el estudio de selectividad demostraron que las respuestas del solvente y de las matrices (103.6 y 106.4 mV respectivamente, n=3), no son estadísticamente diferentes entre sí ( $\alpha=0.05$ ), por lo que no se registraron interferencias entre los componentes de las matrices estudiadas.

Además, el uso de la solución TISAB aseguró un pH adecuado, evitando las interferencias debidas al OH<sup>-</sup>, ión que tiene también afinidad por el electrodo. Por otro lado, esta solución logra la destrucción de iones complejos que puede formar el fluoruro con cationes multivalentes tales como aluminio o hierro y que impiden su interacción con el EIS.

#### 3.2. Linealidad y rango

En la Tabla 2 se muestran los resultados del estudio de linealidad.

**Tabla 2.** Resultados del estudio de linealidad.

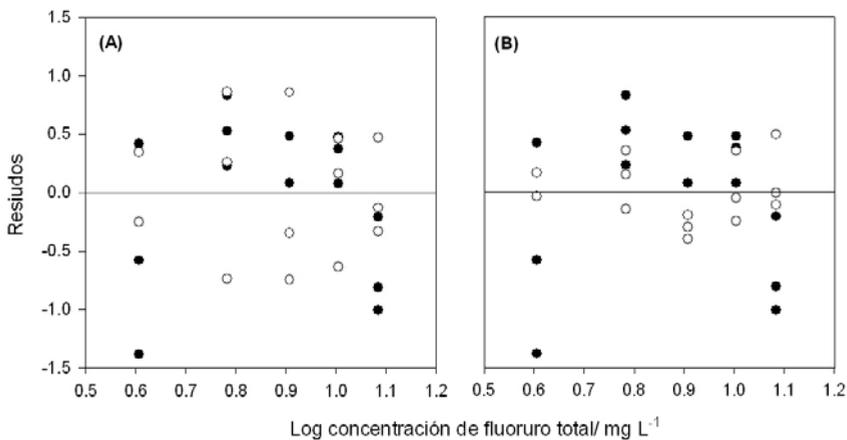
Parámetros	Curva de Calibrado		
	Patrones puros	Matriz fortificada Mentol	Matriz fortificada Frutilla
b	-57.7	-58.88	-59.31
DE (b)	1.0	0.85	0.39
r <sup>2</sup> (%)	99.5	99.7	99.9
F <sub>cal</sub> (homocedasticidad)	4.70	1.70	7.79
F <sub>cal</sub> (linealidad)	1.97	0.78	1.17
Predicción en el nivel medio (%)	101.1 (0.7) <sup>a</sup>	99.5 (2.8) <sup>a</sup>	99.3 (0.2) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> DE entre paréntesis, n=3.

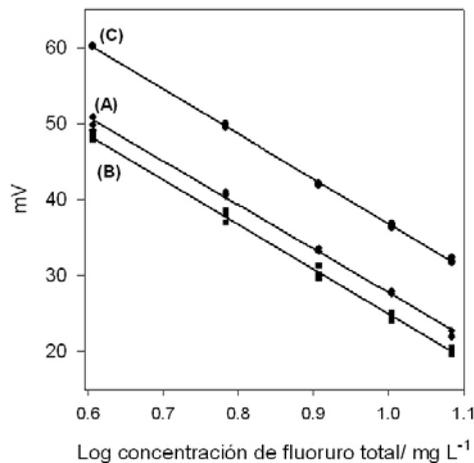
Se verificó que el sistema presenta comportamiento lineal en el rango de trabajo de 4.00 a 12.00 mg L<sup>-1</sup> de fluoruro. Los datos de calibrado fueron homocedásticos tanto en la curva en solvente, como en las distintas matrices, lo que se verificó tanto por inspección visual de las gráficas de distribución de los residuos (Fig. 2), como por la prueba F aplicada a las varianzas de las

lecturas para las concentraciones extremas (50 y 150%). En todos los casos el estadístico calculado  $F_{cal}$  fue menor al tabulado,  $F_{tab} 2,2(0.05) = 19.0$ . Por otro lado, el ajuste al modelo lineal, comprobado mediante ANOVA ( $\alpha=0.05$ ), dio como resultado en todos los casos un valor de  $F_{cal}$  menor al tabulado  $F_{tab} 13,10(0.05) = 2.89$ .

**Figuras 2.** Distribución de los residuos de los patrones puros en agua y de la matriz fortificada mentol (A) y frutilla (B). Patrones puros (●) y matriz fortificada (○).



**Figura 3.** Rectas de regresión de los patrones puros en agua (A), de la matriz fortificada mentol (B) y frutilla (C).



Finalmente, la prueba de ANOVA para comparación de pendientes demostró que las pendientes (b) de las rectas obtenidas en ambas matrices no diferían estadísticamente de la obtenida con estándares puros, situación que se verificó también gráficamente (Fig. 3). Se comprobó de esta manera la ausencia de efecto matriz para ambos tipos de muestra, pudiendo establecerse para los controles de rutina un procedimiento de calibración externa, mucho más sencillo que la calibración en matriz.

Por último, la relación porcentual entre la lectura estimada por la regresión y la lectura experimental, en la concentración corres-

pondiente al 100 % ( $8.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), estuvo en todos los casos entre 97 y 103 %, cumpliéndose el criterio establecido.

### 3.3. Precisión y exactitud

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en los estudios de repetibilidad y precisión intermedia. La prueba *t* de comparación de promedios demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los promedios obtenidos para ambas series. Los coeficientes de variación (CV) calculados fueron siempre menores al 3.7 %; criterio recomendado por la AOAC para componentes que están entre 0.1 – 1.0 % p/p.

**Tabla 3:** Resultados del estudio de precisión

Serie	Repetibilidad			
	Matriz Mentol		Matriz Frutilla	
	Promedio (ppm)	CV (%)	Promedio (ppm)	CV (%)
1	1434 (38) <sup>a</sup>	2.6	1403 (28) <sup>a</sup>	2.0
2	1418 (30) <sup>a</sup>	2.1	1405 (13) <sup>a</sup>	0.96
	Precisión Intermedia			
$F_{\text{cal}}$ (varianzas)	1.52		4.63	
$t_{\text{cal}}$ (promedios) <sup>b</sup>	0.82		0.20	
CV (%)	0.79		0.10	

<sup>a</sup> DE entre paréntesis, n=6. <sup>b</sup>  $t_{\text{tab}_{10(0.05)}} = 2.23$ .

Las recuperaciones promedios obtenidas para cada nivel estudiado (Tabla 4), se encontraron comprendidas en el rango de 95-105% cumpliendo el criterio establecido, el cual se basa en la recomendación de la AOAC para los niveles de concentración

estudiados. Por otro lado, la prueba *t* aplicada para la evaluación de la recuperación global indicó que, en ambas matrices, la misma no difiere estadísticamente de 100%, verificándose de esta manera una excelente capacidad predictiva del método.

**Tabla 4.** Resultados del estudio de exactitud

<b>Matriz Mentol</b>							
Nivel (%)	Sol. 2 ( $\mu$ L)	Sol. 3 ( $\mu$ L)	Masa matriz (g)	Fluoruro total adicionado (ppm)	Fluoruro total recuperado (ppm)	R (%)	R promedio por nivel (%)
50	285	285	1.4303	700.0	702.0	100.3	100.3 (0.4) <sup>a</sup>
50	285	285	1.4293	700.5	705.3	100.7	
50	285	285	1.4166	706.8	706.0	99.9	
100	567	567	1.4163	1406	1366	97.2	98.6 (1.3)
100	567	567	1.4415	1379	1374	99.7	
100	567	567	1.4099	1410	1394	99.0	
150	844	844	1.4157	2090	2049	98.0	96.9 (1.0)
150	844	844	1.4102	2098	2017	96.1	
150	844	844	1.4087	2100	2027	96.5	
<b>Recuperación Global</b>							<b>98.6 (1.7)</b>
<b>Matriz Frutilla</b>							
50	285	285	1.4171	704.9	716.0	101.6	101.3 (0.8)
50	285	285	1.4754	677.1	690.4	101.9	
50	285	285	1.4370	695.1	698.0	100.4	
100	567	567	1.4375	1373	1348	98.2	98.7 (0.5)
100	567	567	1.4345	1376	1362	99.0	
100	567	567	1.4324	1378	1364	99.0	
150	844	844	1.4473	2044	1976	96.7	98.0 (1.9)
150	844	844	1.4872	1989	1991	100.1	
150	844	844	1.4251	2076	2015	97.1	
<b>Recuperación Global</b>							<b>99.3 (1.8)</b>

<sup>a</sup> CV(%) entre paréntesis.

### 3.4. Aplicaciones

Una vez desarrollado y validado el método propuesto se aplicó el mismo al análisis de diferentes lotes de pastas dentales, no solo para llevar a cabo la identificación y la valoración de la cantidad de fluoruro dosificado,

sino también para realizar estudios de estabilidad de las muestras. En todos los casos los resultados obtenidos fueron satisfactorios y cumplieron con los criterios establecidos para su comercialización.

#### 4. Conclusiones

Se realizó una extensa caracterización y validación del método propuesto siguiendo las directrices internacionales obteniéndose excelentes resultados. El método desarrollado demostró ser rápido, económico, sencillo y eficaz sin requerir del uso de instrumentos sofisticados.

Si bien los métodos potenciométricos requieren de una calibración instrumental en varios puntos previa a las lecturas de los potenciales de las muestras, en el presente trabajo se demostró la ausencia de efecto matriz, por lo que puede implementarse una calibración externa con resultados satisfactorios.

Estas ventajas admiten la aplicación del método propuesto en el control de calidad de rutina de pastas dentales.

#### Bibliografía

1. Pavic, M.; Carevic, D.; Cimerman, Z. 1999. Potentiometric determination of monofluorophosphate in dentifrice: a critical discussion and a proposal for new improved procedures. *J. of Pharm. Biomed. Analysis* **20**:565–571.
2. Chen, Y.; Ye, M.; Cui, H.; Wu, F.; Zhua, Y.; Fritz, J.S. 2006. Determination of glycerophosphate and other anions in dentifrices by ion chromatography. *J. Chromatogr. A* **1118**:155–159.
3. Yadav A.K.; Kaushik, C.P.; Haritash, A.K.; Singh, B.; Raghuvanshi, S.P.; Kansal, A. 2007. Determination of exposure and probable ingestion of fluoride through tea, toothpaste, tobacco and pan masala. *J. Hazard. Mater.* **142**:77–80.
4. Reglamento técnico MERCOSUR sobre lista de sustancias que los productos de higiene personal, cosméticos y perfumes no deben contener, excepto en las condiciones y con las restricciones establecidas. MERCOSUR/GMC/RES 48/02.
5. Gomez, M.; Palacios, M.A.; Cámara, C. 1993. Determination of fluoride by AIF-MAS in N<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> flame: Application to toothpaste. *Microchem. J.* **47**:399–403.
6. Gleisner, H.; Einax, J.W.; Morés, S.; Welz, B.; Carasek, E. 2011. A fast and accurate method for the determination of total and soluble fluorine in toothpaste using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and its comparison with established techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54**:040-1046.
7. Borissova, R.; Debouki, A.; Nikolov, T. 1993. Titrimetric determination of phosphates and monofluorophosphates in toothpastes. *Fresenius J. Anal. Chem.* **347**:63–66.
8. Ermer J. 2001. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**:755-767.
9. International Conference on Harmonisation. 1996. Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: Methodology.
10. AOAC. 1993. Peer verified methods program. Manual on policies and procedures.
11. Norma Oficial Mexicana. 2002. PROY-NOM-219-SSA1.
12. ANMAT. 2004. Disposición 2819/04: Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos. Anexo IV: Estánd.