

Universidad Autónoma De Baja California
Instituto de Ingeniería
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



ANALISIS VOLTAMETRICOS DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS

Tesis que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

PRESENTA

Claudia Susana Meza Calvillo

Directora de tesis:

Dra. Margarita Stilianova Stoytcheva

Codirector de tesis:

† Dr. Roumen Zlatev

Dr. Alan Gabriel Ayala Bautista

Mexicali, B.C.; Junio 2023

Agradecimientos

Quisiera aprovechar este espacio para agradecer a todos aquellos que de una u otra forma me apoyaron para lograr este objetivo.

Primeramente, quisiera empezar por agradecer a mis padres, por darme el impulso para iniciar con esta misión y llevarla a su término; y a mi esposo, por su apoyo incondicional.

Agradezco enormemente todo lo brindado por mi directora y co-director de tesis, la Dra. Margarita Stilianova Stoytcheva y el Dr. Roumen Zlatev. Gracias por todas sus valiosas enseñanzas, tanto las directas como las que indirectamente me brindaron; por ejemplo, la importancia del rigor en la ciencia, los valiosos conocimientos en este campo de estudio, y otros todavía más valiosos e irremplazables, como la forma de vivir en armonía con la naturaleza y todo lo que esto implica; además del hecho de no perder de vista las prioridades de la vida, y aprender a vivirla de manera alegre.

También quisiera agradecer al Dr. Alan Gabriel Ayala Bautista, por sus valiosos consejos en este campo de estudio y brindarme su apoyo siempre que lo necesité.

Agradezco al personal del laboratorio de química ambiental por los materiales proporcionados, y la calidez del trato brindado por sus miembros.

Agradezco a los compañeros del laboratorio de nanotecnología por su amistad.

Agradezco a CONACYT por la beca brindada para realizar este proyecto.

Por último, y no menos importante, agradezco a Dios por poner a todas estas personas en mi camino, y todas las enseñanzas recibidas.

Contenido

Introducción	6
Hipótesis	8
Objetivos	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos	9
Antecedentes.....	10
Técnicas analíticas utilizadas en la determinación de fármacos	10
Técnicas titrimétricas.....	10
Técnicas cromatográficas	12
Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	12
Cromatografía de capa delgada	14
Cromatografía de capa delgada de alta resolución	15
Cromatografía de gases	16
Técnicas espectrométricas	16
Espectroscopia de espectro infrarrojo	17
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear	19
Espectrofotometría	22
Métodos electroforéticos	23
Electroforesis capilar	24
Métodos electroquímicos	26
Voltametría	30
Tipos de voltametría	31
Electrodo de trabajo.....	34
Métodos electroquímicos para análisis farmacéuticos.....	35
Métodos de calidad en industria farmacéutica en México	37
Fármacos	40
Paracetamol	40
Cafeína.....	41
Parte experimental	43
Condiciones generales de los experimentos.....	43
Celda electroquímica	43

Tratamiento de los electrodos.....	45
Elaboración del electrodo	45
Pulido del electrodo	45
Acondicionamiento del electrodo de trabajo	46
Acumulación.....	46
Parámetros de la voltametría cíclica	47
Paracetamol	47
Cafeína.....	47
Parametros de la voltametría diferencial de pulso	48
Paracetamol	48
Cafeína.....	48
Aplicación analítica	49
Paracetamol	49
Cafeína.....	50
Mediciones SIMULTÁNEAS	51
Preparación de las soluciones de paracetamol y cafeína con tabletas.....	52
Determinación de la concentración en tabletas	52
Resultados y discusión	54
Comportamiento electroquímico del paracetamol y la cafeína	54
Efecto del pH en la respuesta voltamétrica.....	54
Efecto de la variación de la velocidad de barrido	56
Número de electrones transferidos	57
Superficie cubierta.....	59
Optimización de las condiciones	61
Valor óptimo de pH.....	61
Tiempo de acumulación.....	61
Validación del método de medición: Paracetamol.....	63
Curva de calibración.....	63
Rango lineal	63
Límite de detección.....	63
Reproducibilidad.....	64
Validación del método de medición: Cafeína	65
Curva de calibración.....	65
Rango lineal	65

Límite de detección.....	66
Reproducibilidad.....	66
Aplicación analítica	67
Paracetamol	67
Cafeína.....	68
Análisis simultáneo de paracetamol y cafeína	69
Curva de calibración de cafeína en presencia de una concentración constante de 200 μ M de paracetamol	69
Curva de calibración de paracetamol en presencia de una concentración constante de 150 μ M de cafeína	70
Discusión de los resultados obtenidos con cada electrodo de trabajo utilizado	71
Mediciones simultaneas en productos farmacéuticos comerciales	72
Conclusión.....	74
Bibliografía.....	75
Anexos.....	83
Derecho de autor publicado	83
Artículo publicado.....	91

Introducción

El desarrollo e innovación en el campo de los compuestos farmacéuticamente activos se aceleró considerablemente en los últimos años, tanto en ámbitos de técnicas de síntesis, descubrimiento de nuevos compuestos y la forma de administrarse. Esto significó una mejora en el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades humanas, teniendo como resultado, una mejora en la calidad de vida general de la humanidad, lo cual se ve reflejado en el aumento de la esperanza de vida a nivel mundial ^{1,2}.

Para su comercialización, estos productos deben pasar por múltiples pruebas desde su síntesis hasta la elaboración del producto final; pues las concentraciones del compuesto activo utilizadas están delicadamente estudiadas y documentadas para cumplir con su función en el organismo sin causar o causando el mínimo daño colateral u efectos secundarios. Estas pruebas implican la utilización un método analítico, el cual debe permitir obtener información sobre la pureza de los reactivos y su concentración de forma confiable, eficaz y precisa ³.

Actualmente existen varios métodos analíticos que satisfacen las necesidades en la determinación de compuestos farmacéuticos. En los manuales de los métodos analíticos estandarizados para la determinación de fármacos se incluyen los métodos volumétricos, cromatográficos, espectrométricos, y electroforéticos capilares ⁴. Cada método, de acuerdo a sus propiedades, permite la identificación de diferentes propiedades de los fármacos. Los métodos volumétricos se utilizan para la determinación de fármacos como haloperidol⁵, albendazol⁶, y gabapentina en medicamentos terminados; así como también, para determinar productos de degradación en fármacos.

Los métodos cromatográficos más utilizados en la industria farmacéutica son los métodos de cromatografía de capa delgada, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de capa delgada de alta resolución, y cromatografía de gas. Los métodos cromatográficos de capa delgada permiten señalar elementos desconocidos que se encuentran en el bulto de los fármacos y analizar muestras selectivamente. Además, requieren de una muestra pequeña para efectuar el análisis y es un método económico

de implementar. Su máximo aprovechamiento cuantitativo se logra al implementarlo en conjunto con métodos espectrométricos. Los métodos de capa delgada de alta resolución realizan una separación más rápida de los compuestos y permiten analizar una gran variedad de compuestos. Por último, el método de cromatografía líquida de alta resolución es el método que presenta la mejor especificidad de moléculas en un determinado compuesto, posee gran precisión y alta fiabilidad; sin embargo es uno de los métodos más caros. Para detectar compuestos orgánicos volátiles se puede utilizar la cromatografía de gas, detectando el fármaco y también impurezas en los medicamentos.

Uno de los métodos más importantes de ensayo mencionado en farmacopeas son los métodos espectrométricos. Los métodos espectrofotométricos presentan ventajas como tiempos de análisis cortos y alta fiabilidad, mientras no sea necesaria la implementación de derivaciones. La espectroscopia cercana al espectro infrarrojo no requiere un pretratamiento de la muestra y brinda información física y química en un solo análisis.

Algunos de los métodos mencionados, son altamente costosos, requieren de personal altamente calificado y/o presentan tiempos de análisis largos. Ciertamente, estas desventajas suelen ser compensadas por la fiabilidad que estos métodos ofrecen, pero existe una alternativa a estos métodos que puede contrarrestar estas desventajas, conservando la fiabilidad y la selectividad en los resultados. Esta alternativa son los métodos electroquímicos de análisis. Se documentó que las técnicas electroquímicas presentan ventajas como alta sensibilidad, resolución y precisión, menor costo y mayor portabilidad de las mediciones. Dentro de estas técnicas podemos encontrar a la potenciometría, la cual no requiere de una aplicación de energía; la coulombimetría que no requiere de sustancias estándar para su utilización; y las técnicas voltamétricas y amperométricas, que permiten realizar mediciones a nivel traza de partículas electroactivas, determinación del mecanismo de reacción, así como caracterizar sus propiedades de oxidación-reducción.

La voltametría consiste observar la respuesta en corriente en una celda electroquímica en base a un potencial aplicado en condiciones de polarización de concentración, obteniendo así información del analito ⁷. Existe una variedad de técnicas

voltamétricas, que se diferencian según la señal de voltaje aplicada a la muestra, y observando que cada una de ellas permite identificar ciertas propiedades de los analitos. Algunas de estas son la voltametría cíclica, voltametría de onda cuadrada y voltametría diferencial de pulsos.

En particular, esta última es una técnica voltamperométrica que posibilita obtener límites de detección a nivel traza de partículas electroactivas ^{1,8,9}. Para implementar esta técnica es esencial contar con un potenciostato que va a permitir aplicar un potencial y registrar el cambio de la corriente en función de la concentración del analito. En esta investigación, se busca evaluar el potencial de un electrodo de carbono extraído de una batería AA agotada como electrodo de trabajo para la determinación de cafeína y paracetamol de manera simultánea e individual en productos farmacéuticos terminados, siendo este electrodo más barato, ecológico, y disponible que otros electrodos reportados.

En la literatura científica, no hay reporte del desempeño de un electrodo de carbono de pila para la determinación de medicamentos. Por lo tanto, esta investigación tiene el potencial de encontrar un método de medición de fármacos, con el que se pueda obtener la precisión y sensibilidad necesaria para procesos de calidad en la industria, que sea más económico, disponible y ecológico que los que actualmente se utilizan para este propósito, además que no requiere de personal altamente especializado para su implementación.

Los fármacos paracetamol y cafeína son utilizados para el tratar el dolor, pues además de su eficacia son fármacos que se comercializan libremente en un mismo medicamento. Por su amplia comercialización, se optó por validar el método de ensayo propuesto utilizando estos medicamentos, tanto para la determinación individual de cada uno, como para su determinación simultánea.

Hipótesis

El electrodo de carbono de pila usada puede ser utilizado como electrodo de trabajo en la determinación voltamétrica cuantitativa de los fármacos paracetamol y cafeína, con mediciones que sean satisfactorias según la normatividad vigente.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Realizar la determinación voltamétrica del paracetamol y la cafeína, y ambos de manera simultánea por voltametría diferencial de pulsos utilizando un electrodo de carbono de pila.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el comportamiento electroquímico del paracetamol y de la cafeína
- Optimizar los parámetros del método de medición
- Evaluar el desempeño analítico del método
- Aplicar el método en la determinación de medicamentos comerciales

Antecedentes

TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS EN LA DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS

La determinación de fármacos es importante en varias fases de fabricación de medicamentos, donde se requiere identificar y cuantificar algunas características del fármaco. En el campo de la investigación de fármacos, y de pruebas preclínicas, es importante tener disponibles métodos analíticos que permitan realizar el análisis de la droga a granel, intermediarios presentes, medicamentos terminados, formulaciones farmacéuticas, impurezas, productos de degradación, muestras biológicas y sus metabolitos. La investigación de ingredientes activos de utilidad médica avanzó hasta el punto de tener la necesidad de diferenciar entre compuestos quirales, por lo tanto, los métodos analíticos para estos casos deben ser capaces de diferenciarlos ⁴.

En este punto, es importante destacar que, en la práctica, cada método analítico tiene sus ventajas particulares, como la posibilidad de poder detectar alguna característica del analito, poder realizar su cuantificación a nivel traza, detectar impurezas, entre otras; pero cada fármaco tiene características distintas y para su apropiada determinación puede ser necesario utilizar un método analítico en específico.

Algunos métodos están estandarizados para el análisis de un determinado fármaco. La descripción, ventajas y desventajas de los métodos estándar más utilizados en la industria farmacéutica se presentarán en este apartado.

Técnicas volumétricas

Este método de análisis también se conoce como titulación volumétrica y consiste en añadir volúmenes discretos de una solución con concentración conocida de una sustancia que va a reaccionar con otra de concentración desconocida. De esta forma, por medio de un indicador, se puede lograr obtener la concentración desconocida. El

indicador servirá para mostrar en qué momento ambas sustancias llegan a un equilibrio siendo este el punto final de la reacción ¹⁰.

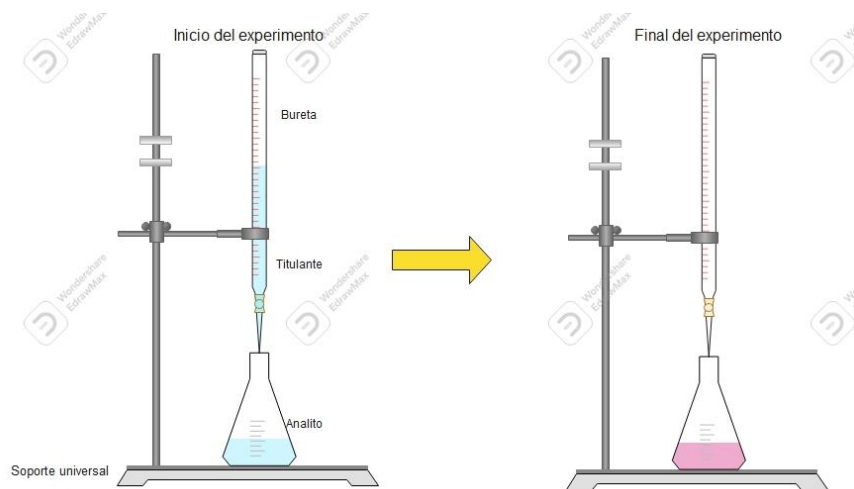


Figura 1. Esquema de un experimento de titulación básico.

En los procedimientos de análisis de grupos funcionales de los ingredientes activos farmacéuticos, los métodos volumétricos son útiles para determinar la medición cinética (velocidad de reacción) ¹¹. Las ventajas asociadas a este método de análisis son que el tiempo de análisis es corto, el instrumental es económico, puede tener una alta precisión y no requiere del uso de reactivos estándar. Este método se utilizó recientemente para determinar fármacos con potencial de diuréticos ahorradores de potasio ¹², clorhidrato de valganciclovir ¹³, citrato de sildenafil ¹⁴ y aceclofenaco sódico ¹⁵.

Como desventaja, cuando el análisis se desarrolla con el esquema básico de experimentación, depende de la capacidad del analista para lograr detectar el punto final del procedimiento, y normalmente, este no coincide con el punto de equivalencia. Otra limitante de este procedimiento es que depende de la precisión de pipetas, buretas y matraces. Actualmente existen equipos que realizan este proceso de una forma más automatizada; sin embargo, esta técnica carece de la selectividad que requieren algunos análisis en la industria farmacéutica ¹¹.

Técnicas cromatográficas

Dentro de las definiciones básicas que la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) incluyó en sus publicaciones, menciona que la cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases; fase móvil, que consiste en un fluido que penetra a través o a lo largo del lecho estacionario, o fase estacionaria, en una dirección determinada. Dependiendo del estado físico del fluido, se puede distinguir a los tres tipos principales de cromatografía. Si es líquido, se trata de cromatografía de líquidos. Si se encuentra en estado gaseoso, es cromatografía de gases; y en el caso de un fluido supercrítico, es cromatografía de fluidos supercríticos ¹⁶.

Los componentes se pueden separar en base a diferentes condiciones físicas. En el caso de la cromatografía de gases, se pueden separar sustancias gaseosas según sea su adsorción o su partición en una fase estacionaria a partir de una fase gaseosa. La fase estacionaria puede encontrarse en otro estado físico. En la cromatografía de líquidos, dependiendo del mecanismo de separación de los componentes, se pueden derivar técnicas como la de exclusión de tamaño, que se basa en el tamaño molecular; la de intercambio iónico, que toman en cuenta las cargas eléctricas; y la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) basada en la adsorción o separación de una fase líquida ¹⁰. Se mencionará una descripción de las técnicas más utilizadas en la industria farmacéutica, en la cual tiene una amplia utilización ¹⁷.

Cromatografía de líquidos de alta eficiencia

La cromatografía líquida tradicional era un método eficiente para lograr la separación de compuestos; sin embargo, las velocidades del procedimiento eran muy bajas. A través de la investigación, se llegó a la conclusión de que al disminuir el tamaño de partícula de los empacamientos de las columnas de vidrio que integraban la fase estacionaria, se podría aumentar la velocidad del proceso. Fue hasta la década de 1970 que la tecnología se desarrolló hasta el punto de poder producir pequeñas partículas de sílice silanizadas, haciendo posible usar columnas de volumen pequeño y mayor longitud, apareciendo así la cromatografía de líquidos de alta eficiencia. Así, se pudo lograr hacer separaciones de compuestos y mediciones en minutos ^{10,18}.

Un aparato de cromatografía de líquidos de alta eficiencia se compone de cuatro componentes principales: Sistema de suministro de fase móvil, sistema de inyección de muestra, columna y detector. En la industria farmacéutica, estas técnicas reportaron ser de utilidad para el análisis, la estimación y la identificación de la estructura de fármacos que contienen impurezas y productos que se degradan o se utilizan para aislar y caracterizar el potencial del fármaco a partir de diversas fuentes naturales y sintéticas¹⁹. El beneficio más importante, es que permite realizar esto en grandes cantidades farmacológicas y composición farmacéutica, tanto en fármacos y formulaciones sintéticas, como de medicamentos a base de hierbas²⁰.

Para poder lograr separaciones más rápidas y eficientes con los empaques de columna, como ya se explicó, teniendo un tamaño de partícula más fina, se deben utilizar altas presiones y componentes especiales para poder manejarlas. Se requieren de presiones de hasta 1000 a 3000 libras por pulgada cuadrada para tener una rapidez de flujo de 1 a 2 mL/min, en columnas de 3 a 5 mm de diámetro y de 10 a 30 cm de longitud. La mayoría utiliza presiones menores a 1200 psi, aunque algunas separaciones pueden requerir 6000 psi. Es por estas altas presiones que los equipos de cromatografía líquida de alta eficiencia suelen ser más elaborados y costosos que los de otros tipos de cromatografía, siendo esta una desventaja de esta técnica. Además, carecen de reproducibilidad a largo plazo debido a la naturaleza patentada del precio de la columna, el solvente y el relleno de la columna²¹.

Como un ejemplo de la aplicación de HPLC para el análisis de paracetamol y cafeína, una columna que cumple con las condiciones necesarias suministrada por la compañía Sigma-Aldrich cuesta alrededor de \$16000.00 MXN. Las condiciones del ensayo requieren de una temperatura de 35°C, una fase móvil que puede ser una solución 5mM de fosfato monobásico de amonio a un pH de 2 con ácido fosfórico y acetonitrilo en una proporción de 98:2; a un flujo de 0.4 mL/min. La muestra debe estar en una concentración de 100 µg/mL en una solución de agua y metanol en una proporción de 95:5; y adicionar 1 µL al equipo utilizando un detector UV con una longitud de onda de 210 nm²².

Cromatografía de capa delgada

Se realiza como cromatografía en plano, donde la fase estacionaria es un plano o está sobre un plano. En el caso de esta cromatografía, el plano es una capa de partículas sólidas de adsorbente que recubren un soporte, como por ejemplo una placa de vidrio o una banda de plástico. Se utiliza para el cribado a gran escala para análisis cualitativo, aunque también se puede usar en análisis cuantitativos. Cualquiera de los sólidos que se usan en cromatografía de líquidos en columna puede ser utilizado para esta técnica, mientras se use un aglutinante adecuado para tener buena adherencia a la placa.

Para comenzar la técnica de separación, la muestra se deposita sobre la placa con una micropipeta. El lado contrario de donde se colocó la muestra en la placa, o punto de aplicación, se coloca en un disolvente adecuado. Posteriormente, se espera que este disolvente ascienda por la placa como efecto de la acción capilar, y como resultado, los componentes de la muestra suben también por la placa a diferentes velocidades que dependen de su solubilidad y de su grado de retención por la fase estacionaria. Una vez terminado este proceso, se debe de aplicar un reactivo que forme un derivado colorido con los componentes separados en la placa, observándose manchas individuales de soluto. Estas manchas se mueven a cierta fracción de la velocidad con la que se mueve el disolvente, eso hace que sean diferenciables, y se puedan identificar posteriormente^{10,16}.

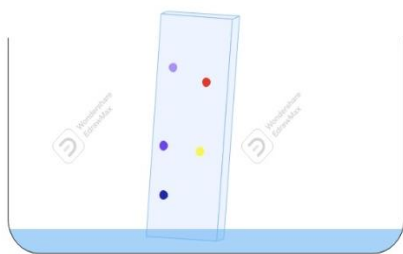


Figura 2. Esquema representativo de la cromatografía de capa delgada

En la industria, esta técnica es utilizada para realizar la separación de una mezcla de fármacos, ya sea de origen químico o biológico, extractos de plantas, etc. También, permite realizar la identificación de compuestos relacionados con los medicamentos, así como realizar la detección de productos de descomposición y de sustancias extrañas en fármacos²³.

Los equipos que aplican esta técnica no son muy complejos. Sin embargo, la técnica tiene inconvenientes, como el hecho de solo poder realizar análisis cualitativos, solo puede analizar componentes solubles, tiene problemas de reproducibilidad, y condiciones ambientales como la temperatura y la humedad pueden afectar al análisis.

Cromatografía de capa delgada de alta resolución

Para esta técnica, se usa una capa de partículas muy finas, lo que permite obtener separaciones más rápidas y eficientes. El tamaño de partícula promedio en la cromatografía de capa delgada es de 20 μm , en el caso de la cromatografía de capa delgada de alta resolución, el tamaño de partícula promedio es de 5 μm . También, para lograr una operación más reproducible y reducir el diámetro inicial de los puntos de aplicación, se utilizan aplicadores mecánicos, por lo tanto, se utiliza menor volumen de muestra, aproximadamente la décima parte de lo utilizado en la cromatografía descrita con anterioridad, y los tiempos de separación se reducen también diez veces.

Debido al pequeño tamaño de las partículas utilizadas, el movimiento de la fase móvil pierde velocidad después de recorrer una distancia corta, por lo que, para evitar que el tiempo de la técnica se alargue, se emplea una técnica de flujo forzado, donde se utiliza una cámara de presión. La fase móvil se dosifica con ayuda de una bomba a velocidad constante a través de una rendija bajo una hoja de plástico que cubre la fase estacionaria.

Esta cromatografía puede complementar a la HPLC. Permite procesar muchas muestras en paralelo, con análisis de bajo costo de mezclas simples para las cuales es alta la carga de trabajo de muestras. Las placas de cromatografía de capa delgada funcionan como detectores de almacenamiento del analito si estas se guardan ¹⁰.

En la industria farmacéutica, esta técnica permite analizar los fármacos en un corto periodo de tiempo, en muestras complejas; se utiliza también en estudios de degradación, estabilidad y pureza, además de que limpiar y manejar las muestras de fármacos es un procedimiento simple ²⁴. Se lograron obtener límites de detección menores a los 100 ng de ingredientes activos como ácido ascórbico, cortisona, atrazina, prometrina, o-aminofenol, teofilina, cannabis, entre muchos otros ^{25,26}.

Existen complicaciones relacionadas a la técnica debido a que la cama de separación corta es una desventaja de la técnica, se puede probar un número limitado de muestras por placa, y durante la etapa de detección el gel de sílice puede ser una interferencia.

Cromatografía de gases

Como ya se había mencionado, esta técnica se caracteriza porque la fase móvil es un gas. Se lleva a cabo siempre en columna, esto es que el lecho estacionario está dentro de un tubo. Esta fase estacionaria sólida y el soporte recubierto de la fase estacionaria líquida contienen partículas que pueden llenar el volumen interno del tubo (también llamado columna rellena), o se pueden concentrar sobre o a lo largo de la pared interna del tubo, lo que permite dejar un camino abierto sin restricción, en la parte media, por el que circula la fase móvil (columna abierta) ¹⁶.

Dentro de la industria, permite evaluar la pureza de fármacos como aceite de clavo, sulfato de atropina, ácido esteárico. Se utiliza como control de calidad y análisis de productos farmacéuticos como antibióticos, anestésicos generales, antivirales, etc. Y puede determinar el nivel de metabolitos en fluidos corporales como plasma sanguíneo, suero y orina ²⁷.

Técnicas espectrométricas

Estos métodos se basan en las interacciones de la materia, tanto a nivel atómico como molecular, con varios tipos de radiación. Esto brinda información sobre la muestra en estudio, a través de la medición de la intensidad de la radiación que puede obtener un transductor electrónico.

Para poder obtener esta información de la muestra en estudio, esta debe ser estimulada mediante la aplicación de algún tipo de energía, como energía en forma de calor, energía eléctrica, luz, partículas o reacciones químicas; con el objetivo de que a través de la aplicación de este estímulo, los componentes que integran a la muestra pasen de un estado de baja energía, o también llamado estado basal, hacia un estado energético superior o estado excitado. La información que brinda este proceso son las mediciones de la radiación electromagnética emitida cuando las especies del analito

regresan al estado energético bajo, o se puede obtener información sobre la cantidad de radiación absorbida o difundida.

Los métodos espectroscópicos, pueden obtener información de las muestras a partir de seis tipos de interacción con la radiación: absorción, fluorescencia, fosforescencia, dispersión, emisión y quimioluminiscencia.

Para la aplicación de estos métodos, se utiliza un instrumento llamado espectrómetro, el cual proporciona información sobre la intensidad de la radiación en función ya sea de la longitud de onda o de la frecuencia.

Los instrumentos típicos de este tipo están compuestos por cinco componentes básicos: una fuente estable de energía radiante; un recipiente transparente en donde se coloca la muestra; un dispositivo que aísla una región restringida del espectro para efectuar las mediciones; un detector de radiación que convierte la energía radiante en una señal eléctrica útil; y una unidad que procesa las señales y despliega resultados ⁷.

En la industria farmacéutica, los métodos espectrométricos más utilizados son los del espectro infrarrojo (FTIR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear, la fluorimetría, fosforimetría y la espectrofotometría ⁴.

Espectroscopia de espectro infrarrojo

Este método realiza mediciones de la interacción de la materia con la radiación de la región infrarroja (IR) que comprende la radiación con número de onda que varía entre longitudes de onda de 0.78 a 1000 μm . Esta región de la radiación se suele dividir, por conveniencia en tres regiones, que son la del infrarrojo cercano, infrarrojo medio e infrarrojo lejano.

La región del infrarrojo más utilizada pertenece al rango del infrarrojo medio, con una longitud de onda de 2.5 a 15 μm . El análisis de compuestos utilizados en la industria farmacéutica se puede realizar en este rango. Dentro de las aplicaciones de este tipo de espectroscopía están los análisis cualitativos y cuantitativos de muestras simples y complejas, en los diferentes estados de la materia, de compuestos orgánicos e inorgánicos, utilizando espectrometría de absorción y emisión.

La interacción de la materia con este tipo de radiación, que produce espectros de absorción, emisión y reflexión tiene lugar debido a distintos cambios energéticos, los cuales se producen por la transición de las moléculas de unos estados energéticos vibracionales y rotaciones en otros. A causa de que la radiación infrarroja no tiene la suficiente energía para provocar la misma clase de transiciones producidas por las radiaciones ultravioleta y visible; la absorción de esta radiación se restringe en su mayoría a moléculas para las que las diferencias de energía entre los diferentes estados vibracionales y rotacionales es pequeña. Solo con la excepción de compuestos homonucleares, todas las demás especies moleculares pueden absorber radiación infrarroja.

Actualmente, hay algunas opciones de espectrómetros para realizar mediciones en el infrarrojo mediano y lejano, pero uno de los más desarrollados y que posee ventajas en cuanto a la velocidad de análisis, confiabilidad, mejor relación señal-ruido y comodidad son los espectrómetros de transformada de Fourier. Aunque anteriormente, estos instrumentos podían tener un costo superior a los \$100,000.00 USD, eran voluminosos, caros y requerían de frecuentes ajustes mecánicos, su uso solía limitarse para aplicaciones en las cuales era necesario asegurar mediciones con las características que este instrumento poseía, como rapidez, alta resolución, sensibilidad, y una precisión y exactitud de la longitud de onda inmejorable. Hoy en día, los espectrómetros de transformada de Fourier evolucionaron para hacer frente a estas desventajas instrumentales, siendo ahora más pequeños, manejables, confiables y de fácil mantenimiento; con un costo que va desde los \$15,000.00 USD en los equipos más sencillos.

Además, de lo mencionado, la espectroscopía de espectro infrarrojo tiene una de las mejores selectividades que puede ser igualada por pocos métodos de medición, por lo que es un excelente método de análisis cualitativo, pudiendo ser útil incluso para la identificación de la forma de una molécula, pues el comportamiento de las moléculas con este tipo de radiación puede variar según su linealidad y otras consideraciones de su geometría.

En el campo farmacéutico, este método se utiliza para la identificación del compuesto activo, y más específicamente, puede identificar el grupo funcional y

elucidación de la estructura del compuesto. Permite el estudio de polímeros, realizar una relación de isómeros cis-trans en una mezcla de compuestos ²⁸.

Dentro de las desventajas de este método se encuentran que, en el caso de las moléculas complejas, que pueden contener distintos tipos de átomos y enlaces, la gran cantidad de vibraciones posibles hace que los espectros de infrarrojo resulten muy difíciles de analizar.

Además, la manipulación de la muestra es a menudo la parte más difícil del análisis espectrométrico infrarrojo y la que requiere más tiempo. También, los análisis cualitativos también tienen sus complicaciones, pues la labor de identificación de las muestras es difícil y requiere de realizar una comparación del espectro resultante con colecciones amplias de compuestos. En el caso del análisis cuantitativo, donde se utiliza la ley de Beer, está el inconveniente de que, con frecuencia, no se cumplan las condiciones teóricas de esta ley.

Aunque los espectros resultantes, pueden brindar mucha información de la muestra, esta riqueza aumenta la probabilidad de que se traslapen las bandas de absorción, complicando una cuantificación adecuada. Además, para muchos análisis se requieren celdas angostas, las cuales resultan ser poco prácticas de utilizar, y pueden dar como resultado, importantes incertidumbres analíticas. Por estas razones, los errores analíticos, incluso poniendo mucho cuidado y esfuerzo, pocas veces pueden reducirse a la escala de los que se producen con los métodos ultravioleta y visible ⁷.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

En este tipo de espectroscopía, se mide la absorción de la radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias, que se encuentra en el rango de 4 a 900 MHz. En este caso, son los núcleos de los átomos sobre los que se realiza el proceso de absorción de la radiación, a diferencia de lo que ocurre con la absorción de radiación ultravioleta, visible e infrarroja donde los participantes son los electrones exteriores. Esta técnica requiere, aparte de la aplicación de radiación, exponer al analito a un campo magnético intenso, de esta forma, se formaran los estados de energía en los núcleos que harán posible la absorción.

El método aprovecha las propiedades magnéticas de los núcleos para proporcionar información sobre su estructura molecular. Para poder obtener esta información, se observan las características de las moléculas y el efecto del campo magnético aplicado.

Cuando se aplica el campo magnético a lo largo de una dirección en un eje espacial definido, las energías de los núcleos de la muestra en estudio se ven afectadas, habiendo una tendencia a que los momentos magnéticos se muevan a lo largo de la dirección positiva del campo, en lugar de la dirección opuesta. Los núcleos con un giro de $\frac{1}{2}$ asumen solo estos dos modos de movimiento.

Hay varios factores que determinan el contenido de los espectros de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Para la comprensión del método y su adecuada descripción, se describirán brevemente. Uno de los factores más relevantes es la ubicación de la resonancia en el espectro, esto es, la frecuencia de resonancia. La frecuencia de resonancia depende del entorno molecular y del campo aplicado; por esta dependencia en la estructura es que esta característica tiene una gran importancia en la química. Además, esta frecuencia puede variar con una propiedad llamada blindaje, dando lugar a lo que es el desplazamiento químico. El blindaje se entiende a partir de la definición de que la nube de electrones que rodea al núcleo también tiene carga, movimiento y, por lo tanto, un momento magnético. El campo magnético generado por los electrones altera el campo en el microambiente alrededor del núcleo. Finalmente, el campo real presente en un núcleo dado depende de la naturaleza de los electrones circundantes. A esto se le llama blindaje.

En la actualidad, los dos tipos generales de espectrómetros de RMN que se utilizan son el de onda continua y el de impulsos, o de transformada de Fourier. Siendo este último el que actualmente domina el mercado.

En ambos espectrómetros, la muestra a estudiar es expuesta a un potente campo magnético con una intensidad de varios teslas. En la cuestión de los espectrómetros de onda continua, se supervisa la señal de absorción a medida que se realiza un barrido lento de la frecuencia de la fuente, similar a los instrumentos ópticos de absorción. En los instrumentos de pulsos, la muestra es irradiada con pulsos periódicos de energía de radiofrecuencia que se conducen a travesando la muestra en sentido perpendicular al

campo magnético. Esto resulta en la aparición de una señal en el dominio del tiempo, que va disminuyendo en el lapso entre los pulsos. Posteriormente, es convertida a una señal en el dominio de la frecuencia, utilizando una transformación de Fourier, así se obtiene un espectro análogo común.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se pueden clasificar en su mayoría como de línea ancha o de alta resolución. Sin embargo, también se pueden diferenciar según el instrumento utilizado, tipo de núcleo, estado físico de la muestra, entorno del núcleo del analito y del uso que se haga de los datos.

Los espectros dan información de la frecuencia que absorbe un núcleo dentro de la radiación de radiofrecuencia. Esta frecuencia está influenciada por el entorno químico del núcleo, lo cual incluye a los núcleos y electrones de alrededor. Por lo tanto, por medio de la información espectral se puede conocer la estructura química de una molécula.

Sin embargo, estos espectros pueden ser insuficientes para lograr la identificación de un compuesto orgánico; a menos que sea utilizado en conjunto con espectros de masa, infrarrojo y ultravioleta, y análisis elemental. De esta forma, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear es de las herramientas más indispensables para la identificación de compuestos puros.

Existe una proporcionalidad directa entre las áreas de los picos y el número de núcleos que causan la aparición de un pico en el espectro de resonancia magnética nuclear; esta relación es útil para poder realizar una determinación cuantitativa de un compuesto específico, así que, no requiere de muestras puras del compuesto para la calibración, siendo esta una gran ventaja.

El precio de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear de alta resolución es muy alto. Su valor va a partir de los \$100 000.00 hasta más del millón de dólares. Esto es porque debe contar con una serie de componentes para poder obtener los mejores resultados, a continuación se mencionaran los componentes fundamentales de estos instrumentos.

Para la utilización de este instrumento, se debe de contar con un imán de gran estabilidad, donde se colocará la muestra. Este componente es el principal, y se encuentra rodeado con una bobina transmisora/receptora. Para producir la radiación de

radiofrecuencia, el instrumento debe contar con un sintetizador de frecuencia controlado con un cristal. La señal de radiofrecuencia debe pasar por un interruptor pulsador y un amplificador de potencia. Posteriormente, la señal que resulta de este proceso se recoge por medio de la bobina, es amplificada y transmitida a un detector sensible. La señal se digitaliza y se almacena en una computadora para su análisis.

La técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear fue muy utilizada en el proceso de desarrollo de fármacos, debido a su utilidad para identificar y analizar de forma cuantitativa molecular. Logrando la caracterización de la composición de fármacos, productos químicos y su determinación en formulaciones farmacéuticas y fluidos biológicos ²⁹.

Estos métodos tienen una gran precisión en cuanto a la identificación de compuestos e incluso en la cuantificación de estos. Sin embargo, a pesar todas las aplicaciones en las cuales pueden ser implementados, el costo de los instrumentos es demasiado alto, y es una gran limitante en la utilización de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Otros inconvenientes del método es el traslape de resonancias en el espectro, lo cual es más probable que pase en cuanto más compleja es la muestra o analito en estudio; y por otro lado, este método no es tan sensible ni tan conveniente como otras técnicas existentes ^{7,30}.

Espectrofotometría

Para esta técnica se utiliza un espectrofotómetro. Este es un espectrómetro equipado con una o más rendijas de salida y transductores fotoeléctricos que facilitan la determinación de la relación entre la potencia radiante de dos haces en función de la longitud de onda.

En este caso, a diferencia de las otras técnicas espectroscópicas, la función de excitación es luz de diferentes longitudes de onda; la función de respuesta es la fracción de luz transmitida por el sistema en estas longitudes de onda, llamada transmitancia; que a partir de la ley de Beer, se puede las concentraciones de especies absorbentes, sus absorptividades o sus energías de transición.

Los compuestos farmacéuticos presentan gran estabilidad en el análisis por medio de espectrofotómetros UV/Vis. El espectro de absorción UV se usa comúnmente para identificar compuestos y olefinas aromáticas. El análisis cualitativo a través de métodos espectrofotométricos produce resultados rápidos y precisos utilizando solo pequeños volúmenes de muestra. Este material rápido y eficiente se ha convertido en una herramienta indispensable en la industria farmacéutica, gracias a su adaptabilidad y valor económico. El análisis cualitativo demostró ser altamente efectivo en muchos niveles altos de compuestos orgánicos ²⁰.

Métodos electroforéticos

Los métodos electroforéticos son métodos de separación de sustancias. Esta separación se realiza al aplicar un campo eléctrico sobre las sustancias a separar, las cuales, debido a las diferencias de carga y masa de las moléculas y partículas que la integran, migraran a diferentes velocidades, provocando que se comiencen a separar. Estos métodos pueden ser utilizados para separar partículas coloidales cargadas o iones macromoleculares.

Existen tres tipos de electroforesis, la electroforesis de zona, electroforesis de límite móvil, isotacoforesis (ITP) y enfoque isoelectrico (IEF). De estos, la más común es la electroforesis de zona, que consiste básicamente en que las sustancias a separar se suspenden en un sólido, junto con una solución amortiguadora de concentración y pH constante. Al estar suspendidas las sustancias a separar, factores como las fuerzas eléctricas de migración y las fuerzas cromatográficas convencionales influyen en la separación de las sustancias. Este tipo de electroforesis se puede clasificar en subtipos dependiendo del sólido, o soporte, en el cual se suspenden las sustancias. Los sólidos más comúnmente utilizados son los de almidón, de poliacrilamida, espuma de poliuretano y papel.

Para el desarrollo de la electroforesis de zona, se debe preparar un bloque del soporte a utilizar. La muestra se aplica formando una banda angosta o simplemente una línea atravesando el bloque de lado a lado. Se conectan las puntas de una fuente de voltaje de forma perpendicular a la banda de la muestra, convirtiéndose en una celda. Al pasar corriente por la celda, los diversos componentes de las mezclas migran con

velocidades que dependen de sus cargas eléctricas, tamaños y formas. Conforme corre el tiempo de aplicación de la corriente, los componentes con carga negativa migran hacia el ánodo, y los que tienen carga positiva migran hacia el cátodo. Resultado de la aplicación del método, se obtienen una serie de bandas o líneas separadas, que representan a los diferentes componentes que integran a la muestra, visualizándose como una mancha.

Los parámetros que tienen influencia en las diferentes velocidades de migración de los componentes de la muestra son el tipo de moléculas que la integran, la concentración y pH de la solución amortiguadora utilizada, la temperatura, la intensidad del campo eléctrico y por la naturaleza del material de soporte que se utilice. El voltaje aplicado se expresa en voltios por centímetro. Es hasta de 500 V en electroforesis de bajo voltaje, y puede ser de varios miles de voltios en electroforesis de alto voltaje. Esta última se usa para tener separaciones rápidas de sustancias de bajo peso molecular ^{10,18,31}.

Electroforesis capilar

Es una variante de la electroforesis de zona. Este método tiene la ventaja de ser capaz de separar cantidades muy pequeñas de sustancia en un corto periodo de tiempo con una alta resolución. Lo que distingue a esta técnica es que el soporte en el que se realiza la separación varía de lo descrito anteriormente. El medio de separación es un tubo capilar de sílice fusionada que contiene un electrolito apropiado. La muestra se introduce como un volumen pequeño por medio de una inyección electrocinética o de presión por un extremo del capilar. Posteriormente en cada extremo del capilar se introduce una solución amortiguadora del electrolito. En cada extremo se introducen electrodos de platinos, sumergidos en esta solución, y son conectados a una fuente de corriente directa de alto voltaje. Esta fuente debe poder suministrar voltajes de 1000 a 3000 V y una corriente de hasta 250 μ A. Cerca de un extremo del capilar se coloca un detector.

La clave de la eficiencia de esta técnica está en el tubo capilar utilizado como medio de separación. Las paredes internas del capilar contienen en su superficie grupos silanol (SiOH) ionizables. Estos grupos se ionizan a un pH mayor de 2, produciendo una

carga negativa en la superficie del capilar, al llenarlo con la solución amortiguadora al pH adecuado. El potencial negativo atrae cationes de la solución amortiguadora, los cuales forman una doble capa eléctrica a lo largo de las paredes. Posteriormente, al aplicar voltaje, las cargas positivas de la doble capa eléctrica comienzan a migrar en dirección del cátodo.

La solución amortiguadora es arrastrada por las cargas que van migrando, formando un flujo de solución del disolvente, llamado flujo electroosmótico. Las moléculas del analito también se ven afectadas por la migración de las moléculas, produciéndose un flujo unidireccional de todos los analitos hacia el cátodo. Sin embargo, este movimiento de los analitos no es uniforme, si no que migraran a diferentes velocidades, donde los iones pequeños con carga más positiva son los que llegarán más rápido al detector, y donde las moléculas con carga neutra irán a la misma velocidad que el flujo electroosmótico, pues no se aceleran ni se retardan por el campo eléctrico. De esta forma se produce la separación del analito.

En la electroforesis capilar no hay difusión por arremolinamiento ni efectos de transferencia de masa; solo hay ensanchamiento por difusión molecular. La eficiencia de separación de la electroforesis capilar es 10 a 100 veces mayor que en HPLC ^{10,18}.

MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

El campo de la electroquímica se encarga de estudiar las transformaciones entre la energía química y la energía eléctrica, a través de la investigación de las reacciones de oxidación-reducción entre compuestos, en las cuales ocurre una transferencia de electrones. Esta transferencia puede incluir transferencia de átomos o iones, o no incluirlo ³².

En una reacción de reducción el compuesto gana electrones, mientras que el otro compuesto los pierde. Al perder los electrones, este compuesto se convierte en un compuesto oxidado; y se convierte a su vez en un agente reductor. Aunque en una reacción química la fuerza impulsora para que la reacción ocurra son las características de los elementos involucrados y la espontaneidad de la reacción; en el caso de las reacciones electroquímicas, la fuerza impulsora es la diferencia del potencial entre las partículas, siendo esta una propiedad que se puede controlar ³².

De este principio, se desprenden múltiples aplicaciones, entre ellas, y la que es de interés en este trabajo, se encuentra la electroanalítica. En este campo, se busca realizar mediciones cuantitativas o cualitativas mediante las propiedades eléctricas de una disolución que contiene al analito que se desea investigar, estando en una celda electroquímica.

La celda electroquímica es cualquier dispositivo en el que ocurren reacciones de oxidación-reducción, promoviendo un cambio de un tipo de energía a otra, siendo comúnmente este cambio entre energía química y energía eléctrica. La celda electroquímica básica está compuesta por dos electrodos sumergidos en una disolución iónica. Un electrodo tiende a ganar electrones, convirtiéndose en el cátodo, y otro tiende a perder electrones, siendo el ánodo. Este intercambio de electrones ocurre por un conector externo. En la disolución, existe una corriente generada por la migración de aniones y cationes. Y en la superficie de los electrodos tiene lugar la conexión entre la conducción electrónica del electrodo y la conducción iónica de la disolución.

Existen dos tipos de celdas electroquímicas, las cuales son las celdas galvánicas y las celdas electrolíticas. La diferencia entre estos tipos de celdas radica en la espontaneidad de la reacción electroquímica a ocurrir en la celda. Esta espontaneidad se puede describir según la variación de la energía libre de Gibbs de los electrodos en la

celda. Cuando la suma de los cambios de energía libre en ambos electrodos es negativa, ocurre una liberación de energía, siendo esta una celda galvánica. Al contrario, si la suma da un número positivo, para que la reacción electroquímica ocurra, se debe suministrar energía eléctrica externa, obligando a que se produzcan las reacciones en los electrodos y de lugar a ciertos productos. En estos casos, se habla de una celda electrolítica ³³.

Por lo tanto, se puede resumir la diferencia entre los tipos de celda como que las celdas galvánicas son las celdas que producen energía eléctrica, y por el contrario, las celdas electrolíticas consumen energía eléctrica. Para que circule una intensidad de corriente en la celda (ya sea galvánica o electrolítica), se requiere de una fuerza que dé el impulso para vencer la resistencia de los iones al movimiento hacia el ánodo y el cátodo, este impulso es en forma de potencial. Este potencial es equivalente al producto de la intensidad de corriente (A) producida en la celda y la resistencia de la celda (Ω). Esta fuerza es el potencial óhmico o caída IR, la cual se resta del potencial de celda teórico.

A la disposición de las cargas en la superficie del electrodo y en la disolución adyacente a la superficie cuando se le aplica un potencial positivo al electrodo se le conoce como “Doble capa eléctrica”, debido a los cambios físicos y químicos que ocurren en la interfaz solución-electrodo, provocando que esta zona tenga una composición distinta al resto de la solución.

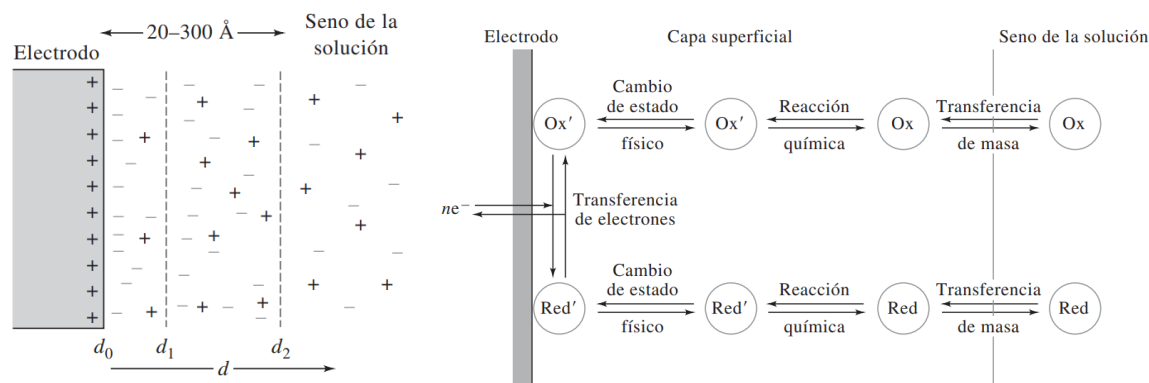


Figura 3. En la imagen de la izquierda, se observa una representación de la doble capa eléctrica. La imagen de la derecha muestra el recorrido de la reacción en el electrodo ⁷.

En la figura 3 se observa una representación esquemática de la doble capa eléctrica. En este diagrama se puede observar que en la superficie del electrodo, denotada como d_0 , hay una acumulación de cargas positivas debido a la aplicación de un potencial positivo. Como resultado, los aniones de la disolución se ven atraídos por esta carga, existiendo una acumulación principalmente de aniones a partir de d_0 a d_1 en la disolución, disminuyendo esta acumulación de forma lineal hasta llegar a d_1 , siendo esta la capa compacta de la doble capa. A partir de d_1 hasta d_2 , la disminución de los aniones va de forma exponencial, siendo esta la capa difusa. Después de esta capa, la distribución de cargas es la misma en toda la solución.

Hay dos procesos que pueden conducir corriente por la interface electrodo-solución, los procesos faradaicos y los procesos no-faradaicos. Los procesos faradaicos están gobernados por la ley de Faraday que establece que la extensión de una reacción química en un electrodo es proporcional a la intensidad de corriente; las corrientes resultantes son llamadas corrientes faradaicas.

Al aplicar un voltaje a los electrodos, puede ocurrir que no se puedan presentar los procesos faradaicos; y sin embargo, exista una conducción continua de corriente alterna. Esto puede ser por razones termodinámicas o por razones cinéticas. En el caso de las primeras, los procesos faradaicos se inhiben porque los electrones carecen de la energía necesaria para traspasar la barrera de energía de potencial en la interface; en el otro caso, estos procesos no ocurren porque la reacción de transferencia de electrones no es suficientemente rápida en la escala de tiempo del experimento.

Esta corriente es la proveniente de procesos no-faradaicos, y es similar a una corriente capacitiva, debido a que en cada ciclo tiene lugar una inversión de relaciones de carga cada medio ciclo, según los iones que son atraídos a la superficie del electrodo, que se comporta como una placa de capacitor. Esta corriente capacitiva aumenta con la frecuencia y con el área del electrodo.

Tanto los procesos faradaicos como los no faradaicos ocurren cuando tienen lugar las reacciones de los electrodos. Aunque los procesos faradaicos suelen ser de interés principal en la investigación de una reacción de electrodo (excepto en los estudios de la naturaleza de la propia interface electrodo-solución), los efectos de los procesos no

faradaicos deben tenerse en cuenta al utilizar datos electroquímicos para obtener información sobre la transferencia de carga y las reacciones asociadas ³⁴.

Las corrientes faradaicas requieren una transferencia de masa continua de especies reactivas desde el seno de la solución hasta la superficie del electrodo. Los tres mecanismos por los cuales puede ocurrir esta transferencia de masa son:

- **Difusión:** La difusión es el tipo de transporte de masa en el cual, el transporte ocurre por el movimiento molecular, debido a la diferencia de concentraciones que aparece en la doble capa molecular, la cual se forma entre la superficie del electrodo y la solución que la rodea, y que va a favor del gradiente de concentración.
- **Convección:** Este tipo de transporte de masa es el movimiento molecular que ocurre por alguna fuerza externa de movimiento, como vibración o agitación en la solución.
- **Migración:** El movimiento molecular en este tipo de transporte de masa ocurre ante la diferencia de cargas eléctricas en la doble capa molecular, donde el movimiento ocurre a favor del gradiente eléctrico.

En general, la corriente (o velocidad de reacción del electrodo) se rige por las velocidades de procesos como:

1. Transferencia de masa (por ejemplo, de la solución a granel a la superficie del electrodo).
2. Transferencia de electrones en la superficie del electrodo.
3. Reacciones químicas que preceden o siguen a la transferencia de electrones. Estos pueden ser procesos homogéneos (por ejemplo, protonación o dimerización) o heterogéneos (por ejemplo, descomposición catalítica) en la superficie del electrodo.
4. Otras reacciones superficiales, como adsorción, desorción o cristalización (electrodeposición).

Las constantes de velocidad para algunos de estos procesos (p. ej., transferencia de electrones en la superficie del electrodo o adsorción) dependen del potencial ³⁴. Tanto el potencial de las mediciones, como la corriente producida por estos procesos dan información sobre la muestra en estudio.

Dentro de los métodos electroquímicos de análisis encontramos a los métodos amperométricos, potenciométricos, coulombimétricos y voltamétricos. En la literatura, es posible encontrar trabajos que describen la utilización de métodos electroquímicos para la determinación de una gran cantidad de compuestos y en diferentes matrices, donde se involucran aplicaciones industriales, médicas, hasta medio ambientales.

En el campo farmacéutico, de igual manera se produjeron innumerables trabajos reportando la aplicabilidad de estos métodos analíticos para la determinación de diferentes fármacos ^{35,36}. En este trabajo se implementó un método voltamétrico para realizar la determinación de paracetamol y cafeína utilizando los electrodos propuestos.

Voltametría

La voltamperometría se basa en la medición en la respuesta en corriente a un potencial interfacial aplicado. Esta respuesta puede deberse principalmente a la tasa de transferencia de carga entre el electrodo de trabajo y la disolución, así como a la tasa de transporte de masa de la solución a la superficie del electrodo. A diferencia de técnicas electroquímicas de análisis como la coulombimetria o la potenciometría, la voltametría tiene limitaciones en cuanto a la cantidad de problemas en los cuales puede ser aplicada; sin embargo, a comparación de las primeras técnicas mencionadas, esta técnica permite obtener límites de detección más bajos y que ofrece un rango lineal de medición más amplio ³⁷.

La información que se puede extraer de los experimentos voltamétricos puede ser cuantitativa o cualitativa. Los datos cuantitativos se pueden extraer al conocer el tipo de transporte de masa que ocurre según la naturaleza del experimento. Anteriormente se mencionaron los diferentes transportes de masa que pueden ocurrir para generar corrientes faradaicas en la interface electrodo-solución. Algunos de los mecanismos pueden estar presentes en la celda electroquímica por añadidura y pueden provocar errores en las mediciones. Por lo cual, deben controlarse para que sea estable durante todo el análisis.

Para poder controlar la estabilidad del transporte de masa en los análisis, se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones. Para poder eliminar el efecto de

la migración de las moléculas electroactivas bajo la influencia de un campo eléctrico se utiliza un electrolito de soporte para transportar la corriente, y a su vez, disminuir la resistencia de la solución. La convección se puede eliminar utilizando una solución sin agitar, o controlando la velocidad de agitación en un caso particular, como en los experimentos donde se utiliza la convección forzada de la solución, llamada voltametría hidrodinámica.

Estas condiciones se utilizan en muchos experimentos voltametricos, donde la difusión, o por ejemplo en el caso de la voltametría hidrodinámica, la difusión y la convección, son las únicas formas de transporte de masa disponibles ³⁸.

En la voltametría, se emplean tres electrodos en la celda electroquímica, sumergidos en una solución del electrolito soporte con el analito. Uno de los tres electrodos es el electrodo de trabajo, al cual se le hace variar el potencial linealmente con el tiempo. El segundo electrodo es el de referencia, que usualmente es uno de calomel saturado o de Ag/AgCl, su potencial permanece constante durante todo el experimento, de esta forma, sirve como una referencia para poder obtener el potencial relativo de la celda, pues no se puede obtener el potencial absoluto de la celda. Por último, el tercer electrodo es un contraelectrodo, casi siempre es una espiral de alambre de platino; su función es conducir la electricidad desde la fuente de la señal (que es un generador de voltaje), a través de la solución, hasta el electrodo de trabajo ⁷.

Tipos de voltametría

Los tipos de voltametría se diferencian entre sí de acuerdo con la señal de excitación de potencial variable aplicado a un electrodo de trabajo en una celda electroquímica. Esta señal, causa una correspondiente respuesta en corriente, dando como resultado una medición. Las señales más comunes usadas en voltametría son cuatro, y aparecen en la figura 4, siendo utilizadas en diferentes tipos de voltametría: voltametría cíclica, voltametría de onda cuadrada, voltametría de barrido lineal y voltametría de diferencial de pulso ^{35,39}.

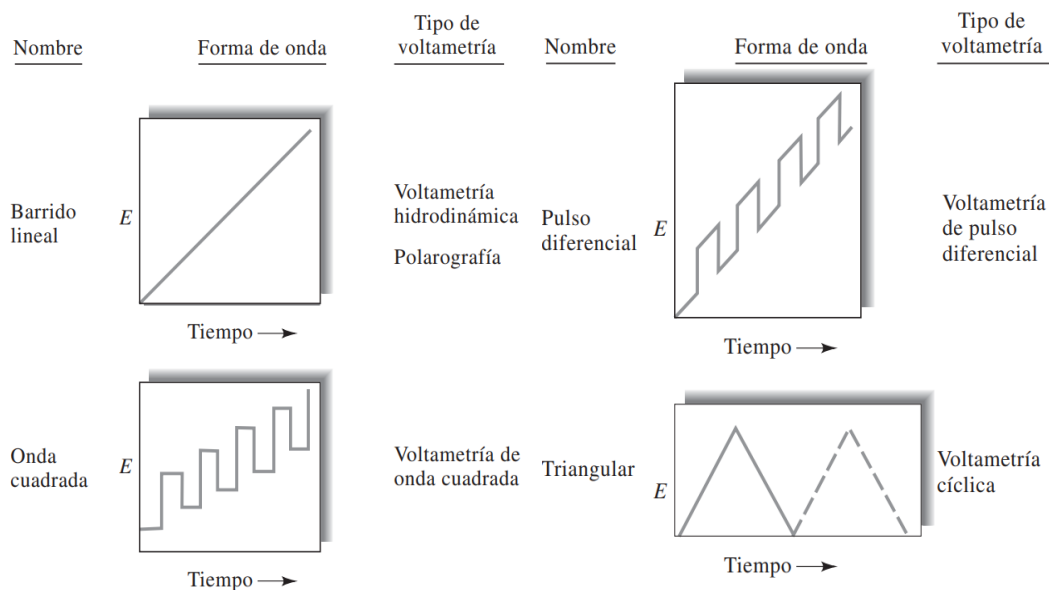


Figura 4. Forma de las señales de voltaje con respecto al tiempo aplicadas en cada uno de los tipos de voltametría ⁷

La voltametría cíclica y la voltametría de barrido lineal pueden ser utilizadas para procesos de caracterización del electrodo y la relación de este con el analito. Sin embargo, en el caso de la voltametría cíclica, esta no suele ser utilizada para la cuantificación de la concentración de un analito porque no es lo suficientemente sensible. Aun así, la aplicación de esta técnica brinda información importante en el estudio de los mecanismos y de las velocidades de los procesos de oxidación/reducción, en particular para sistemas orgánicos y organometálicos. A menudo, los voltamperogramas cíclicos revelan la presencia de intermedios en las reacciones de oxidación/reducción. En el caso de la voltametría de barrido lineal, puede brindar información de caracterización así como también, ofrece un mejor desempeño en la cuantificación de analitos, es simple y es rápida de aplicar, pero no permite realizar cuantificaciones a nivel traza de partículas. Para elegir un intervalo de potencial de inversión para un experimento en la voltametría cíclica, se debe de tomar el potencial en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o más analitos.

La voltametría de onda cuadrada y la voltametría diferencial de pulso, en cambio, son dos técnicas que si permiten obtener la sensibilidad adecuada para la cuantificación

de un analito. Ambas están en la clasificación de técnicas de pulsos. Estas, se basan en la aplicación de cambios de pulso de potencial, y la respuesta se mide en un tiempo adecuado en relación con el tiempo del pulso. La base de todas las técnicas de pulso es la diferencia en la velocidad de decaimiento de las corrientes de carga y faradaicas que siguen después del pulso de potencial ¹.

La señal de excitación de la voltametría de onda cuadrada está representada por una forma de onda escalonada, donde la medición de corriente se realiza al inicio y al final del escalón, al igual que en la voltametría diferencial de pulso, solo que la señal de excitación de esta técnica esta superpuesta en una rampa de potencial lineal ⁷.

Para este trabajo se utilizó la técnica de voltametría diferencial de pulsos. En esta técnica en particular, la corriente se muestrea dos veces en cada período de pulso, una vez antes del pulso y el segundo muestreo se realiza al final del pulso. La diferencia entre estos dos valores actuales como una función del potencial se registra y se muestra, teniendo un patrón como un de un pico definido.

Además, estas técnicas se pueden acompañar de alguno de los métodos de redisolución. Estos métodos consisten en agregar un paso de acumulación del analito en la superficie del electrodo para incrementar su cuantificación ⁴⁰. De esta forma, estos métodos logran límites de detección más bajos. Existen cuatro tipos de métodos de redisolución, estas son redisolución voltamperométrica y potenciométrica anódica, catódica, y adsortiva.

Estos métodos se dividen en tres pasos definidos. El primer paso es la acumulación electroquímica o de deposición de los compuestos electroactivos objetivo en o sobre el electrodo de trabajo. En este paso, a un potencial de deposición (este deberá estar definido y dependiendo de la técnica), la solución generalmente se agita durante un tiempo establecido. Después del paso de acumulación, se detiene el proceso de agitación. El último paso es el paso de medición, que sigue a este paso, que implica la disolución del analito depositado ^{1,7,40}.

En este trabajo, se utilizó la voltametría diferencial de pulsos en conjunto con el método de redisolución adsortivo. El principio de este método de redisolución es el mismo que las demás, con la excepción de que no se transfiere ninguna carga en el paso de acumulación, en donde no se produce ninguna reacción electroquímica. La principal

característica de este método es que utiliza un proceso de adsorción espontánea durante el paso de preconcentración ^{1,7}.

Electrodo de trabajo

En voltametría se utilizan una variedad de configuraciones y formas en los electrodos de trabajo. Suelen estar compuestos de un material conductor, normalmente discos planos, que llevan incorporado un alambre de contacto. El material del electrodo puede ser un metal noble, como platino y oro; un material de carbono, como pasta de carbono, fibra de carbono, grafito pirolítico o carbono vítreo, diamante o nanotubos de carbono; un semiconductor, como estaño y óxido de indio; o un metal revestido con una película de mercurio; o de cualquier otro material de trabajo, pero los anteriores son los más utilizados.

Dependiendo del material del electrodo y de la composición de la solución en la que se sumerge se pueden utilizar en un intervalo de potenciales definido. Esto se debe a que en potenciales positivos, se comienzan a generar corrientes elevadas debido a la oxidación del agua produciendo oxígeno molecular. Los límites negativos se deben a la reducción del agua para producir hidrógeno. Otra consideración importante sobre los electrodos es que es ideal poder obtener una superficie nueva entre los análisis, porque las corrientes que se obtienen en voltametría son muy sensibles a las variaciones en la limpieza e irregularidades de la superficie.

Entonces, el rango de potencial sobre el cual se pueden usar las técnicas voltamétricas depende del material del electrodo sólido, el solvente del analito, el electrolito de soporte, la concentración de este y el pH de la solución estudiada. Así también, el buen funcionamiento de la técnica está muy influenciado por el material del electrodo de trabajo ¹.

La figura 5 muestra el intervalo de potenciales en el cual trabajan electrodos de tres diferentes materiales dependiendo del electrolito soporte utilizado.

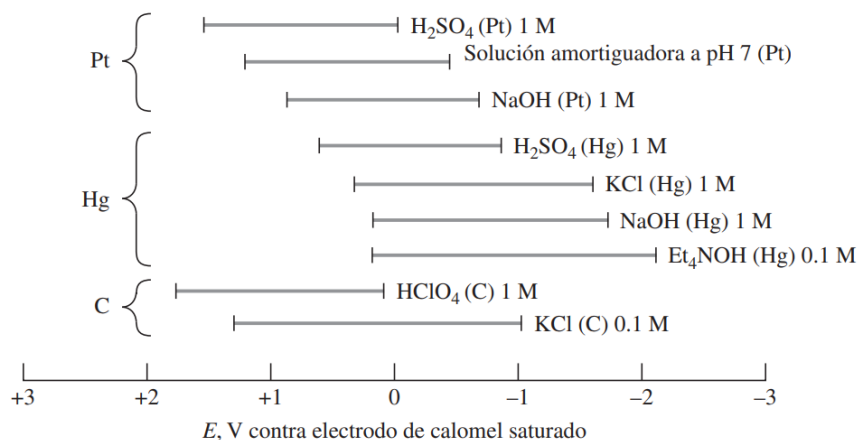


Figura 5. Intervalo de potencial de los electrodos de trabajo según el electrolito utilizado ⁷

Métodos electroquímicos para análisis farmacéuticos

La electroquímica proporciona técnicas analíticas caracterizadas por la simplicidad instrumental, el costo moderado y la portabilidad. Estas técnicas han introducido los métodos más prometedores para aplicaciones específicas. La selectividad de este método es normalmente excelente porque el analito puede identificarse fácilmente por su potencial-pico voltamétrico, lo que permite determinar la concentración de diferentes estados de oxidación de un compuesto. Además, la mayoría de los compuestos farmacéuticos son electroactivos, a diferencia de los excipientes que los acompañan en las fórmulas farmacológicas ^{1,7}.

También, dadas las mediciones de los picos de corriente, se pueden obtener mediciones cuantitativas precisas a nivel de concentraciones trazas; un nivel adecuado para la determinación de la concentración de compuestos farmacológicamente activos. Los avances en las técnicas electroquímicas experimentales en el campo del análisis de fármacos se deben a su simplicidad, bajo costo y tiempo de análisis relativamente corto en comparación con otras técnicas ^{7,35}.

A través de las técnicas electroquímicas de análisis, es posible realizar la medición simultánea de compuestos electroactivos. Esto es debido a que, el potencial al cual ocurre la reacción de oxidación o reducción correspondiente es propia de cada compuesto en particular. Sin embargo, esto no evita que el pico de potencial en el cual ocurre esto no se pueda traslapar con el pico de potencial de otro compuesto que ocurra

a un potencial similar. Además pueden acontecer otras relaciones entre los compuestos analizados que pueden interferir con la medición ⁷.

Se ha encontrado, que además de las ventajas en el aspecto analítico que ofrecen los métodos electroquímicos en el campo de las formulaciones farmacéuticas, el estudio electroquímico del fármaco da información sobre cómo se va a comportar este con las células del paciente in vivo, y cómo se comportara o cómo será su recorrido en el metabolismo de la persona ³⁷.

Se han construido sensores de principio electroquímico para la determinación de varios tipos de medicamentos. La construcción de este tipo de sensores para un fármaco requiere cumplir con las demandas específicas relativas a la estructura de la molécula en cuestión, para que ocurran, de manera óptima, las reacciones de oxidación y reducción, y obtener límites de detección más bajos, con una mejora en la sensibilidad y estabilidad del sensor ³⁶.

Los métodos de voltametría cíclica y voltametría de barrido lineal son adecuados para estudios analíticos dedicados a la determinación rápida, simple y precisa de fármacos en materias primas, productos farmacéuticos o muestras biológicas. Existen varios ejemplos de compuestos farmacéuticamente activos que pueden ser determinados utilizando estas técnicas, algunos son: antibióticos, diuréticos, antineoplásicos, relajantes musculares, neurolépticos, analgésicos, vitaminas, hormonas y otros ^{1,41-45}.

MÉTODOS DE CALIDAD EN INDUSTRIA FARMACÉUTICA EN MÉXICO

El proceso de fabricación de insumos para la salud, según el reglamento de los Estados Unidos Mexicanos, es realizado bajo cuatro conceptos: Médicos, que se realizan con propósitos de diagnóstico, preventivos, terapéuticos o de rehabilitación; científicos, destinados a la investigación; industriales, destinados a la producción de insumos o sus materias primas; política sanitaria, los que por razones de eficacia terapéutica y de beneficio colectivo sean determinados por la secretaria o por el consejo de salubridad general⁴⁶.

En particular, se indica que los fabricantes de medicamentos deberán, entre otras acciones, analizar los fármacos y aditivos que utilicen con el propósito de asegurar que cumplen con las condiciones sanitarias de identidad, pureza, calidad, entre otras. Y, además, en el artículo 37 del reglamento mencionado se establece que en caso de que el insumo carezca de seguridad, eficacia, pureza o estabilidad aplicara medidas de seguridad previstas en la ley y podrá revocar el registro de la entidad que lo produzca. Por lo tanto, es imperativo que cualquier entidad que pretenda fabricar medicamentos deba de cumplir con estos requisitos básicos, incluso cuando se revoque el registro, el titular del registro puede demostrar cumplir los requisitos de seguridad y eficacia que determine la SSA y así suspender la revocación.

Por lo tanto, dada la legislación vigente, es de interés de los comerciantes mantener un proceso seguro. Sobre todo por el responsable sanitario de la fábrica o laboratorio de medicamentos o materias primas para la elaboración de medicamentos⁴⁶.

En la NOM-059-SSA1-2015 se establece que los medicamentos se pueden comercializar o suministrar únicamente cuando una persona calificada haya certificado previamente que cada lote de fabricación se ha producido y controlado según los requisitos establecidos en la Autorización de Comercialización y cualquier otra regulación relativa a la producción, control y liberación de medicamentos⁴⁷.

Como parte de las buenas prácticas exigidas en estos establecimientos, debe establecerse un sistema documental que soporte el conocimiento y mejoramiento continuo del proceso a lo largo de todo el Ciclo de Vida del Producto, desde su desarrollo hasta su discontinuación en el mercado.

Cada establecimiento define desde la etapa de diseño la forma de controlar su proceso, desde la materia prima, hasta el producto finalizado.

Constantemente, los establecimientos, como parte de su sistema de gestión de calidad, deben estar generando datos que permitan mantener sistemas de control funcionales, los cuales deben detectar cambios en la variabilidad de los procesos para mantener las condiciones de validación de los procesos. Además, para estos procesos, es conveniente utilizar técnicas de medición que permitan aplicar herramientas estadísticas.

Para utilizar un método de medición, se debe demostrar su aplicabilidad al producto, bajo las condiciones de operación del laboratorio

Los métodos de medición se implementan en cada lote, el cual debe muestrearse y analizarse para ser liberado. Cuando algún insumo pase la vigencia de aprobación también debe someterse a un método de medida antes de ser descartado totalmente. Los niveles de variabilidad del insumo, historial de calidad de los proveedores van a definir además que tantas muestras se deben tomar de un lote y la cantidad de material a analizar. No se debe repetir el mismo análisis de una muestra ni promediar cuando alguno de los resultados está fuera de especificación.

Según la NOM-173-SSA1-1993, un método electroquímico, como el propuesto puede ser utilizado como método analítico indicativo de estabilidad, pues estos métodos son cuantitativos, se basan en características químicas estructurales de cada fármaco de un medicamento y es capaz de distinguir cada ingrediente activo de otras sustancias y de sus productos de degradación, de manera que permite cuantificar a un fármaco con exactitud y precisión ⁴⁸.

En el estudio de estabilidad de un medicamento, se determina cuál sería su periodo de caducidad, las condiciones de almacenamiento en que sus características físicas, químicas y fisicoquímicas permanecen dentro de los límites aceptables, y la influencia de los factores ambientales a los que pueda ser sometido en su periodo de vida, como temperatura, humedad y luz.

En el caso del paracetamol y la cafeína, cuya presentación suele ser en tabletas, las pruebas de estabilidad incluyen analizar parámetros como concentración del fármaco, características organolépticas, desintegración y/o disolución, humedad cuando proceda.

Con respecto a la limpieza que se debe mantener de acuerdo al sistema de gestión de la fabricación de fármacos, la NOM-164-SSA1-2015 establece que se deben utilizar métodos analíticos validados, con la sensibilidad requerida, considerando la técnica de muestreo y los límites de aceptación establecidos con base en la actividad mínima farmacológica, toxicológica o fisiológica del fármaco, para detectar trazas de contaminantes, detergentes y/o sanitizantes ⁴⁹.

FÁRMACOS

Paracetamol

El paracetamol, también conocido como acetaminofén (I, N-acetil-p-aminofenol), es uno de los medicamentos de uso común más utilizados. Es un analgésico y un antipirético, se utiliza para tratar dolores, reducir la fiebre, y calmar la tos; y se encuentra en varias presentaciones como jarabe, tabletas regulares, tabletas efervescentes, etc. Puede tratar casos de dolores desde de cefalea tensional, migraña, dolores musculares, dolor crónico, neuralgia, hasta dolor de espalda, dolor articular, dolor general y dolor de muelas.

Cuando se usa en la dosis terapéutica adecuada, el paracetamol se metaboliza fácilmente. Aunque no se han realizado estudios de perfusión en humanos, la absorción de paracetamol parece ser insignificante en el estómago, pero muy rápida en el intestino delgado. La absorción es por transporte pasivo con una cinética de primer orden y no parece haber un sitio particular de absorción preferencial en el intestino delgado. Sin embargo, parece que puede haber un proceso de metabolización también en esta parte del cuerpo ⁵⁰. Ocupa uno de los primeros lugares, junto con la aspirina, en sobredosis accidental e intencional. Una sobredosis aguda de paracetamol puede provocar daños al hígado.

Las sobredosis de paracetamol producen una acumulación de metabolitos tóxicos que causa necrosis hepática aguda, induciendo morbilidad y mortalidad en humanos ⁵¹. La reunión anual del 2010 de la AAPCC, reveló que los datos de envenenamiento de ese año indicaban que el paracetamol solo y en combinación con otro ingrediente activo causó entre 130 a 240 muertes respectivamente en Estados Unidos ⁵². Al año, se estima que entre 82 000 y 90 000 pacientes en el Reino Unido ingresan al hospital con una sobredosis de paracetamol y se producen entre 150 y 250 muertes por esta razón ⁵³.

Cafeína

La cafeína es un compuesto que permite estimular la acción de un medicamento. En la actualidad se utiliza ampliamente en conjunto con el paracetamol para calmar el dolor y la inflamación.

La cafeína proviene de los granos de café, aunque de manera natural también puede ser encontrada en varios té y granos de cacao. Como fármaco puede servir para varios propósitos, entre ellos está el tratar afecciones respiratorias de recién nacidos prematuros, aliviar el dolor, y evitar el sueño. Se utiliza también en suplementos energéticos, productos para la mejora del desempeño deportivo y en una variedad de cosméticos ⁵⁴

La cafeína tiene efectos en el sistema respiratorio, en el sistema nervioso central, en el sistema cardiovascular y en el sistema renal. Tiene un mecanismo de acción complejo y no totalmente definido, pero dentro de los efectos de la cafeína está estimular el sistema nervioso central, aumentar el estado de alerta, relajar el músculo liso, estimular la contracción del músculo cardíaco, mejorar el rendimiento deportivo, promover la secreción del ácido gástrico, y actuar como un diurético suave.

Gracias a sus propiedades y efectos, es ampliamente utilizada, pero un exceso en su consumo puede tener consecuencias mortales en humanos. Algunos de los síntomas provocados por una intoxicación de cafeína son náuseas, vómitos, diarrea, malestar gastrointestinal, agitación, ansiedad, taquicardia, y en los casos más graves pueden presentarse convulsiones. La dosis aguda mortal es de aproximadamente 10 a 14 gramos ⁵⁴.

Debido a las posibles consecuencias del exceso en la ingesta de cafeína es necesario su monitoreo de manera precisa, sensible y tomando en cuenta la amplitud de sus usos y aplicaciones, se requiere lograr mediciones selectivas. Existen algunos métodos para lograr su cuantificación como cromatografía líquida de alta eficacia, cromatografía de gases con espectrometría de masas, espectrofotometría UV, resonancia magnética nuclear, etc. ⁵⁵. Sin embargo cada uno de estos métodos presentan desventajas particulares en cada caso, algunos son muy costosos, requieren de un pretratamiento largo y complicado, y/o requieren de personal altamente calificado ⁵⁶.

Los métodos electroquímicos han reportado buenos resultados en la cuantificación de la cafeína, sin embargo, una de las dificultades en la aplicación de estos para su determinación es que este compuesto tiene un pico de corriente oxidativa muy alto, esto dificulta su medición porque puede coincidir con la oxidación de otros compuestos de fondo del medio ⁵⁶. En este trabajo, se propone un método que permite realizar la medición de cafeína a pesar de estas dificultades.

Parte experimental

De acuerdo a lo mencionado en los objetivos específicos al inicio de este trabajo, en la fase experimental, para comprobar el funcionamiento del electrodo de carbono de pila, se realizó en una serie de etapas, según los objetivos establecidos en el trabajo.

CONDICIONES GENERALES DE LOS EXPERIMENTOS

Como condiciones generales de los experimentos, es importante mencionar que todo se realizó bajo condiciones normales (a 25°C, 1 atm). Para obtener las mediciones, se utilizó un potenciostato modelo 440 A de CH Instruments Inc, conectado a una computadora con el software compatible con el instrumento instalado (CHI versión 9.23).

Para obtener la ventana de potencial necesaria en las mediciones, se preparó un buffer acetato a una concentración 0.1M utilizando ácido acético (CH_3COOH) y acetato de sodio (CH_3COONa), adquiridos de Sigma-Aldrich y Spectrum Chemical. Se ajustó el pH de la solución amortiguadora utilizando hidróxido de sodio (NaOH) y ácido acético. La solución principal se ajustó a pH 5, y se utilizaron soluciones pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5 y 6. El volumen utilizado fue de 5 mL.

Los materiales de laboratorio se lavaron después de cada análisis con jabón, se enjuagaron con agua corriente, agua purificada, y los elementos más delicados fueron enjuagados con agua desionizada, se dejaron escurrir hasta secar.

Celda electroquímica

Para las mediciones electroquímicas, se utilizó un electrodo auxiliar de platino (BASi MW-1033) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (BASi MF-2052), almacenado en una solución de cloruro de potasio (KCl) mientras no se encontraba en uso, para su mantenimiento.

Se utilizó un soporte de celdas (BASi RDE-2) como sistema de rotación para los experimentos con electrodos de disco giratorio, con contactos para electrodo de bajo ruido. Se utilizó el vial de celda de vidrio para voltametría (BASi MF-1208) de 5-15 mL de capacidad.

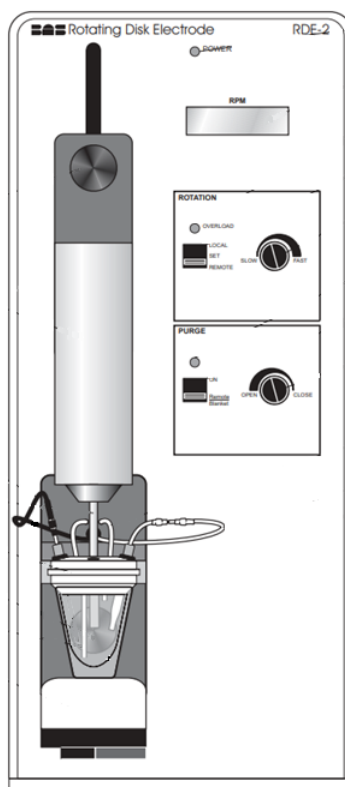


Figura 6. Diagrama de implementación de celda electroquímica. Extraído de manual del proveedor.

TRATAMIENTO DE LOS ELECTRODOS

Elaboración del electrodo

Durante las actividades experimentales, se utilizaron dos electrodos de trabajo. El electrodo de carbono de pila fue utilizado para las mediciones de paracetamol, pero no pudo ser utilizado para la determinación de cafeína. Para la medición de este último, se utilizó un electrodo espectroscópicamente puro.

La elaboración del electrodo de carbono de pila consistió en los siguientes pasos:

- Extracción del tubo de grafito de las baterías de zinc-carbono
- Elaboración de la cubierta del electrodo con acrílico
- Ensamble de los contactos eléctricos del electrodo

El electrodo de grafito espectroscópicamente puro se consiguió de forma comercial (Ringsdorff Werke, Germany, diámetro de 6mm, 13 % de porosidad). Se le añadió una cubierta de acrílico y los contactos eléctricos para su uso.

Pulido del electrodo

Con el fin de poder realizar cada una de las mediciones electroquímicas bajo las mismas condiciones, se le dio un tratamiento a la superficie del electrodo entre cada medición. Con el tratamiento se buscó regenerar la superficie mediante un proceso de pulido. Este tratamiento se realizó antes de cada medición, y fue el mismo para los dos electrodos de trabajo utilizados en este proyecto.

El proceso de pulido del electrodo demostró ser un factor importante en la reproducibilidad de los resultados de las mediciones electroquímicas realizadas utilizando cualquiera de los electrodos mencionados. Por lo cual, se desarrolló un método de pulido que busca asegurar la homogeneidad de la superficie en cada repetición. Este método consistió en cuatro etapas de pulido (pulido con lija de granos de 600, de 1000, de 1200 y de 1400) utilizando una fresadora a 2500 rpm, en donde se colocó la lija en la mesa de la fresadora y el electrodo en el portaherramientas de la misma.

Acondicionamiento del electrodo de trabajo

Previamente a cada una de las mediciones, se realizó un pretratamiento al electrodo de trabajo, para desprender cualquier partícula proveniente del proceso de pulido del electrodo entre cada medición, y acondicionar el electrodo en la celda de trabajo. Este pretratamiento fue el mismo en los dos electrodos utilizados y consiste en realizar 10 segmentos de barrido de voltametría cíclica con el electrolito de soporte, según los parámetros de voltametría cíclica que se obtuvieron como los óptimos de cada analito.

Acumulación

Después del proceso de acondicionamiento, se añadió la concentración de analito correspondiente a la prueba a realizar en la celda; y por medio de una deposición por adsorción física, el analito se acumula en la superficie del electrodo al sumergirlo en la celda con una agitación de 700 rpm. El tiempo óptimo según los resultados que se describirán más adelante fue de 3 min manteniendo la agitación.

PARÁMETROS DE LA VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Para conocer el comportamiento químico y electroquímico de los fármacos y establecer los parámetros óptimos de la técnica, se realizaron mediciones voltamétricas utilizando la técnica de voltametría cíclica. Para ello, a continuación, se especifican los parámetros más importantes de la técnica. Especificando que la polaridad de escaneo fue positiva.

Paracetamol

Analizando las mediciones electroquímicas realizadas con voltametría cíclica se determinaron los parámetros de la técnica que arrojaban resultados satisfactorios, en el rango adecuado del analito son:

- i. Potencial inicial= 0 V
- ii. Potencial máximo = 0.8 V
- iii. Potencial mínimo = 0 V
- iv. Rango de escaneo = 0.1 V/s
- v. Segmentos de barrido = 2
- vi. Intervalo de muestreo = 0.01 V
- vii. Sensibilidad = 2×10^{-4} A/V

Cafeína

Las especificaciones de los parámetros utilizados con la cafeína como analito son:

- i. Potencial inicial= 0 V
- ii. Potencial máximo = 1.6 V
- iii. Potencial mínimo = 0 V
- iv. Tasa de escaneo = 0.1 V/s
- v. Segmentos de barrido = 2
- vi. Intervalo de muestreo = 0.01 V
- vii. Sensibilidad = 1×10^{-4} A/V

En el caso de la cafeína, el acondicionamiento fue 12 segmentos de barrido de voltametría cíclica con el electrolito de soporte.

PARAMETROS DE LA VOLTAMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO

Como parte de los objetivos del trabajo, se utilizó la voltametría diferencial de pulsos (DPV) porque es una técnica que permite obtener mejores resultados cuantitativos del analito debido al notable aumento de la sensibilidad que proporciona su aplicación.

Paracetamol

De acuerdo a la literatura existente, los parámetros que mejor se ajustan para la determinación cuantitativa del paracetamol con la técnica de diferencial de pulso son:

- i. Potencial inicial = 0.2 V
- ii. Potencial final = 0.6 V
- iii. Incremento de potencial = 0.005 V
- iv. Amplitud = 0.05 V
- v. Ancho de pulso= 0.05 s
- vi. Ancho de muestreo = 0.0167 s
- vii. Periodo del pulso = 0.5 s
- viii. Sensibilidad= 2×10^{-4} A/V

Cafeína

Los parámetros que mejor se ajustan para la determinación cuantitativa de la cafeína con la técnica de diferencial de pulso son:

- i. Potencial inicial = 0.85 V
- ii. Potencial final = 1.5 V
- iii. Incremento de potencial = 0.005 V
- iv. Amplitud = 0.05 V
- v. Ancho de pulso= 0.05 s
- vi. Ancho de muestreo = 0.0167 s
- vii. Periodo del pulso = 0.5 s
- viii. Sensibilidad= 1×10^{-4} A/V

APLICACIÓN ANALÍTICA

Para validar los métodos analíticos de este trabajo, se utilizaron medicamentos comerciales que contenían los ingredientes activos en estudio. Las muestras recibieron un tratamiento para poder ser analizadas, buscando a su vez la representatividad de la misma.

Paracetamol

La experimentación del método en desarrollo con muestras reales se realizó utilizando tabletas de paracetamol de 500 mg del laboratorio Sopharma proveniente de Bulgaria. El procedimiento de preparación de la solución madre con este reactivo fue el siguiente:

- a) Se pesaron 5 tabletas del producto en una balanza analítica y se registró el peso como PI .
- b) Después, con ayuda de un mortero, se pulverizaron las tabletas en su totalidad.
- c) El polvo se transfirió a un recipiente color ámbar. Se realizó un cálculo para preparar una solución de paracetamol 0.05 M (CD), tomando en cuenta que las tabletas contienen 500 mg de Paracetamol y se buscaba tener 5 mL de la solución. Se tuvo un resultado de masa necesaria (Mn) y se procedió a pesar.
- d) El peso real (Mr) difirió de la cantidad requerida así que se hicieron los cálculos de Molaridad para conocer el volumen necesario (Vn) para tener la concentración de 0.05M.
- e) A la Mr se le agregó el Vn de alcohol etílico absoluto, medido con micropipeta, utilizando un vaso de precipitado. Se agitó la solución y se dejó reposar unos minutos. Para terminar de disolver el paracetamol, se le dio un baño de ultrasonido durante aproximadamente 3 minutos hasta notar la ausencia de grumos.
- f) Para separar los excipientes presentes en la muestra, se realizó un procedimiento de filtrado utilizando un instrumento diseñado por los doctores Margarita Stilianova y Roumen Zlatev, en donde se creó una fuerza succionadora para hacer pasar la solución a través de una membrana de triacetato de celulosa con

un tamaño de poro de 0.5 μm para caer en un recipiente de plástico para reservarla.

- g) La solución madre se almacenó en refrigeración para su conservación y su uso posterior.

Cafeína

La experimentación del método en desarrollo con muestras reales se realizó utilizando capsulas de cafeína de 200 mg. El procedimiento de preparación de la solución madre con este reactivo fue el siguiente:

- h) La cafeína se encontraba encapsulada en un polisacárido en forma de polvo. Se liberó cuidadosamente, asegurándose de obtener todo el polvo dentro de un recipiente. Se hizo este procedimiento con 10 capsulas.
- i) Se pesaron las 10 capsulas en una balanza analítica y se registró el peso.
- j) El polvo se transfirió a un recipiente color ámbar.
- k) Se realizó un cálculo para preparar una solución de cafeína 0.005 M, tomando en cuenta que las tabletas contienen 200 mg de cafeína y se buscaba tener 5 mL de la solución. Se tuvo un resultado de masa necesaria y se procedió a pesar.
- l) El peso real medido difirió de la cantidad requerida, por lo que se hicieron los cálculos de la concentración teniendo en cuenta este ajuste para conocer el volumen necesario para tener la concentración de 0.005M.
- m) Se diluyó el polvo en el volumen necesario de acuerdo a los cálculos anteriores en alcohol etílico absoluto con micropipeta utilizando un vaso de precipitado. Se agitó la solución y se dejó reposar unos minutos. Para terminar de disolver la cafeína, se le dio un baño de ultrasonido durante aproximadamente 5 minutos hasta notar la ausencia de grumos.
- n) La solución madre se almacenó en refrigeración para su conservación y su uso posterior.

MEDICIONES SIMULTÁNEAS

La compatibilidad para la medición simultánea de estos fármacos esta sostenida por los siguientes argumentos:

- i. Hay una diferencia mayor a 100 mV en el pico de potencial de los elementos
- ii. Las condiciones óptimas de pH, tiempo de acumulación, solución electrolítica, velocidad de escaneo coinciden para ambos elementos
- iii. Pueden utilizar el mismo electrodo de trabajo

Para comprobar que ninguno de los fármacos interfería con la determinación del otro, se elaboraron dos curvas de calibración con las siguientes condiciones

1. Se determinó la curva de calibración de cafeína de 25 a 150 μM en presencia de una concentración constante de paracetamol de 200 μM con el electrodo de grafito espectroscópicamente puro.
2. Se determinó la curva de calibración de paracetamol de 25 a 200 μM en presencia de una concentración constante de cafeína de 150 μM utilizando el electrodo de carbono de pila

Las mediciones fueron realizadas por voltametría diferencial de pulso, utilizando los siguientes parámetros:

- i. Potencial inicial = 0.2 V
- ii. Potencial final = 1.5 V
- iii. Incremento de potencial = 0.005 V
- iv. Amplitud = 0.05 V
- v. Ancho de pulso= 0.05 s
- vi. Ancho de muestreo = 0.0167 s
- vii. Periodo del pulso = 0.5 s
- viii. Sensibilidad= 1e-004 A/V

La determinación de paracetamol y cafeína de manera simultánea en tabletas comerciales marca Tempra® se realizó en dos etapas para obtener los errores

correspondientes a cada uno de los fármacos en el medicamento utilizando los electrodos propuestos en esta investigación. Estas etapas consistieron en:

- Preparar una solución, que contenía, según lo establecido por el fabricante, una concentración de 0.005 M de paracetamol, diluido en alcohol etílico absoluto. Posteriormente, realizar la determinación por voltametría diferencial de pulsos utilizando el electrodo de carbono de pila con el método de adición estándar del paracetamol en cada tableta.
- Preparar una solución que contenga una concentración de 0.005 M de cafeína diluida en alcohol etílico absoluto. Se realizó la determinación por voltametría diferencial de pulsos utilizando el electrodo de grafito espectroscópicamente puro con el método de adición estándar de la cafeína en cada tableta.

Preparación de las soluciones de paracetamol y cafeína con tabletas

Se seleccionaron diez tabletas del empaque y se trituraron en un mortero. Después se pesó y registró el polvo resultante. Se realizó el cálculo para obtener 5 mL de una solución de paracetamol 0.005 M, y posteriormente el cálculo para obtener 5 mL de una solución de cafeína 0.005 M tomando en cuenta que el fabricante indicó que cada tableta contiene 500 mg de paracetamol y 65 mg de cafeína.

Se utilizó alcohol etílico como diluyente; se etiquetaron como corresponde y se almacenaron en refrigerador para su conservación.

Determinación de la concentración en tabletas

La solución de paracetamol se midió utilizando el electrodo de pila de carbono y la solución de cafeína se midió utilizando el electrodo de grafito espectroscópicamente puro.

La determinación del contenido de paracetamol y cafeína en una tableta se realizó utilizando el método de adición estándar, en donde se añadió un volumen de una solución de concentración conocida (C_1) en la celda, se agitó durante 3 minutos como periodo de acumulación, y se obtuvo la corriente de pico (I_1); consecutivamente, se añadió

en la misma celda un volumen conocido de la solución de concentración a determinar (C_2) del medicamento y se obtuvo la corriente de pico correspondiente (I_t).

De esta forma, se obtiene de forma proporcional al método, y sin la necesidad de realizar una curva de calibración, la concentración C_2 añadida mediante la relación (1):

$$C_2 = \frac{(I_2 \cdot C_1)}{I_1} - C_1 \quad (1)$$

Por último, para comparar la concentración obtenida del método en investigación con la concentración indicada por el fabricante en cada tableta, se obtuvo el error relativo.

Resultados y discusión

COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DEL PARACETAMOL Y LA CAFEÍNA

Efecto del pH en la respuesta voltamétrica

Se realizaron mediciones por la técnica de voltametría cíclica para observar el efecto del pH. Se analizaron muestras de paracetamol y cafeína por separado utilizando solución amortiguadora 0.1M a pH 4, 4.5, 5, 5.5 y 6, a concentraciones de 100 y 200 μM respectivamente.

Este ejercicio permitió encontrar el número de protones y electrones intercambiados en la reacción de oxidación-reducción entre el electrodo y el analito, utilizando la relación entre la variación del potencial de pico anódico en función de la variación de pH.

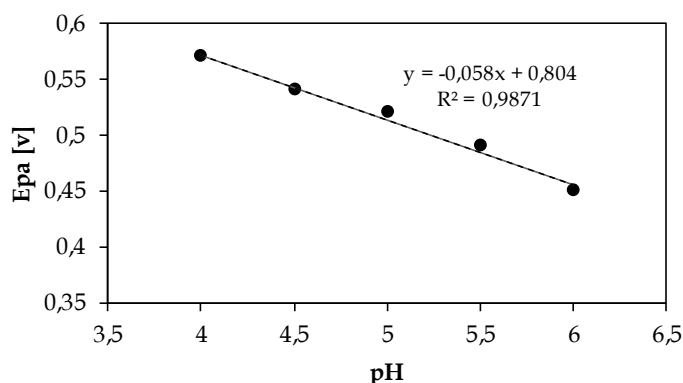


Figura 7. Cinética de la reacción del paracetamol. Representación gráfica de la relación entre el pH y el potencial de pico anódico obtenido mediante voltametría cíclica.

De esta gráfica se obtiene una relación lineal entre ambos parámetros. Para obtener la representación matemática se realizó una regresión lineal de los datos ($R^2 = 0,9871$):

$$E_{pa} = -0.058 \text{ pH} + 0.804 \quad (2)$$

El resultado fue de -0.058, valor que se corresponde con el valor de -0.059 establecido por Nernst para una reacción en donde la cantidad de electrones y protones que intervienen en la reacción son iguales.

En el caso de la cafeína se observó en base a los resultados que los valores del potencial de pico anódico de la voltametría cíclica no dependen del pH. A continuación se muestra una tabla de los resultados.

TABLA 1. Valores de potencial de pico anódico según el pH de la cafeína

pH	E _{pa} [V]
4	1.42
4.5	1.42
5	1.42
5.5	1.41
6	1.41

Se observan valores de 0.01 V de diferencia, lo que es una dispersión y no un cambio del potencial de pico anódico. Por lo tanto, este voltaje no se ve afectado por la variación de pH.

Los resultados directos de las mediciones mencionadas se representan en los siguientes voltamogramas. Se puede observar dos picos de oxidación-reducción definidos en el caso del paracetamol, a diferencia de la cafeína que solo muestra el pico de oxidación y no el de reducción.

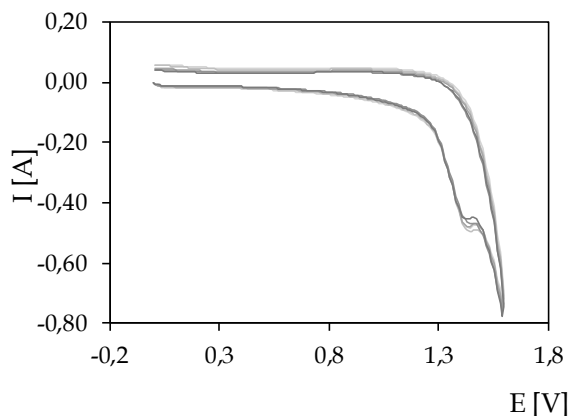


Figura 8. Voltamogramas de las mediciones realizadas por voltametría cíclica para la medición de cafeína a una concentración de 200 µM, variando el pH de 4 a 6.

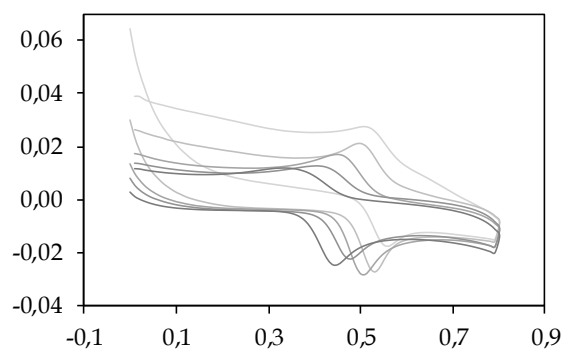


Figura 9. Voltamogramas de las mediciones realizadas por voltametría cíclica para la medición de paracetamol a una concentración de 100 µM, variando el pH de 4 a 6.

Además, estos resultados permiten visualizar los desplazamientos de los picos de corriente en ambos analitos. Se debe prestar atención al notable desplazamiento del pico en los voltamogramas del paracetamol a comparación del desplazamiento de la cafeína con la variación del pH.

Efecto de la variación de la velocidad de barrido

Para conocer el efecto de la variación de la velocidad de barrido de potencial en el resultado de las mediciones y conocer algunas propiedades electroquímicas del electrodo de trabajo y el analito, a cada medición se le ajustó el parametro de velocidad de barrido de potencial con los valores 20, 50, 100, 150, 200 mV/s, en el caso del paracetamol a una concentración de 100 μM . Los valores utilizados para la cafeína fueron de 20, 30, 50, 75, 100, 150 mV/s, con un valor constante de concentración de 200 μM .

Con estos datos, se construyeron relaciones para conocer el número de electrones de la reacción, determinar si el proceso es controlado por difusión o adsorción, para conocer la cantidad de analito que se absorbe en la superficie, y para realizar conclusiones sobre la irreversibilidad de la reacción.

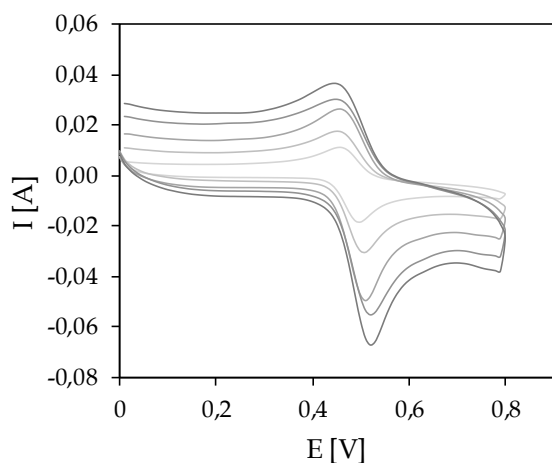


Figura 10. Voltamogramas resultantes de la variación de la velocidad de barrido de potencial del paracetamol

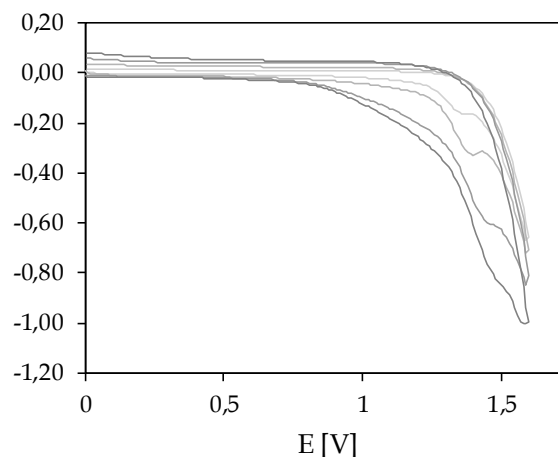


Figura 11. Voltamogramas resultantes de la variación de la velocidad de barrido de potencial de la cafeína

Número de electrones transferidos

El número de electrones transferidos en la reacción de oxidación-reducción que ocurre en el proceso se puede calcular a partir de la relación entre el logaritmo natural de la velocidad de barrido de potencial y el potencial de pico anódico por medio de la ecuación de Laviron (3) ⁵⁷.

$$E_{pa} = E^0 - \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \frac{RTk_s}{(1-\alpha)nF} + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln v \quad (3)$$

E^0 es el potencial formal, α es el coeficiente de transferencia de electrones, k_s es el coeficiente de velocidad estandar heterogenea de la reacción, n es el numero de transferencia de carga, T es la temperatura que fue de 298 K, F es la constante de Faraday que es 96500 C·mol⁻¹ a 298 K, y R es la constante de los gases que tiene un valor de 8.314 J·mol⁻¹·K⁻¹.

En el caso del paracetamol esta relación está dada por la línea que se observa en la figura 12.

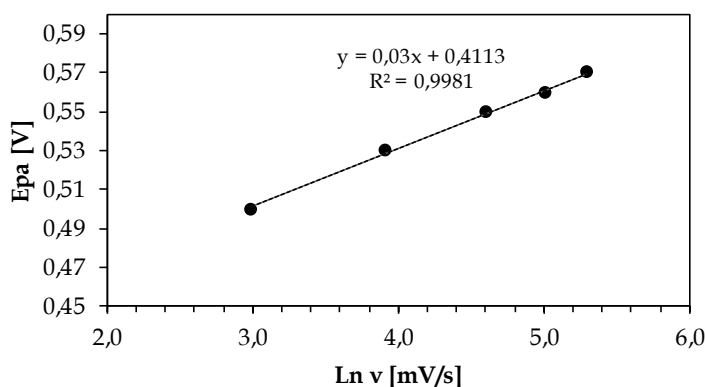


Figura 12. Representación gráfica de la relación lineal entre logaritmo natural de la velocidad de barrido de potencial y el potencial de pico anódico en voltametría cíclica en el paracetamol.

Al realizar la regresión lineal de los datos de E_{pa} contra $\ln v$ se obtiene la siguiente ecuación ($R^2 = 0,9981$):

$$E_{pa} = 0,03 \ln v + 0,4113$$

Conociendo la pendiente y asumiendo a α como 0.5 se obtiene el el número de transferencia de carga es de 1.6, aproximadamente 2, lo cual coincide con lo reportado en la literatura sobre la cantidad de electrones compartidos. Este resultado esta de

acuerdo a lo reportado en la literatura ⁵⁸, donde se sugiere que el mecanismo de reacción del paracetamol es el que se muestra a continuación:

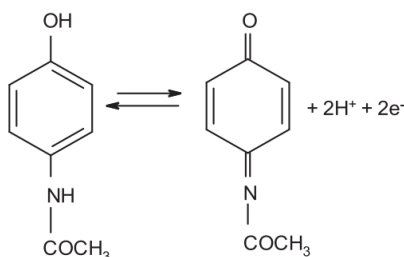


Figura 13. Reacción de oxidación electroquímica del paracetamol.

Para la cafeína, se obtuvo un resultado similar (figura 14).

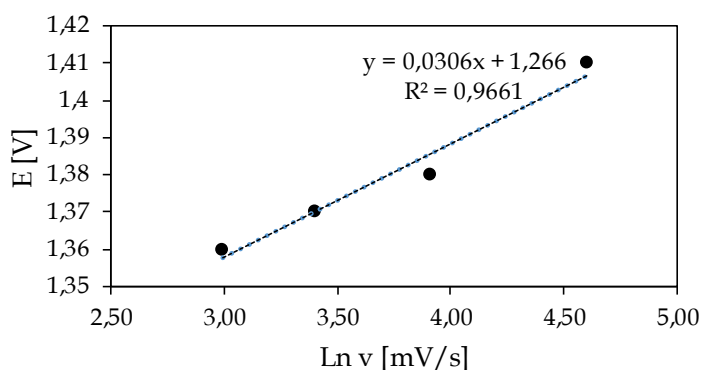


Figura 14. Representación gráfica de la relación lineal entre logaritmo natural de la velocidad de barrido de potencial y el potencial de pico anódico en voltametría cíclica en la cafeína

Al realizar la regresión lineal de los datos de E_{pa} contra $\ln v$ se obtiene la siguiente ecuación ($R^2 = 0,9661$):

$$E_{pa} = 0,0306 \ln v + 1.266$$

Conociendo la pendiente y asumiendo a α como 0.5 se obtiene el el número de transferencia de carga es de 1.67, aproximadamente 2, lo cual coincide con lo reportado en la literatura ⁵⁹ sobre la cantidad de electrones compartidos. Esto sugiere que el mecanismo de reacción esta de acuerdo con que la cafeína tiene un paso de oxidación lenta y otro de oxidación rápida, como se muestra en la figura 15, donde en la oxidación lenta, $2H^+$, $2e^-$ del enlace C 8 - N-9 da ácido úrico sustituido, seguido de la oxidación rapida $2H^+$, $2e^-$ oxidación al análogo 4,5-diol del ácido úrico, que se fragmenta

inmediatamente. Por tanto, la velocidad de la reacción está limitada por el primer paso lento.

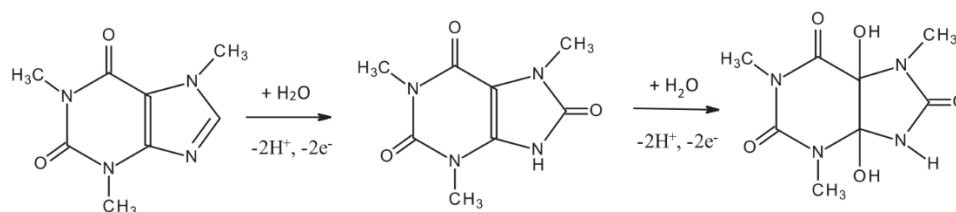


Figura 15. Reacción de oxidación electroquímica de la cafeína.

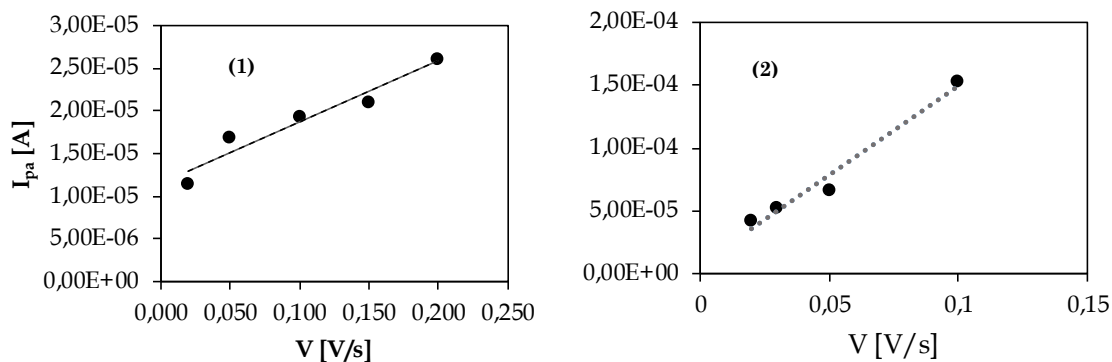
Además, existe una relación lineal del pico de potencial contra la velocidad de escaneo tanto en el caso del paracetamol como el de la cafeína, esto indica que las reacciones de oxidación en los electrodos correspondientes esta limitado por el proceso de adsorción, lo que quiere decir que es el proceso de transferencia de masa que ocurre a menor velocidad.

Superficie cubierta

Se refiere a la cantidad de especies adsorbidas en la superficie del electrodo. La superficie cubierta se obtiene de la pendiente de la grafica y la regresión lineal del pico de corriente anodico (I_{pa}) contra la tasa de escaneo (v), siguiendo la siguiente ecuación ³⁴:

$$I_{pa} = \frac{n^2 F^2}{4RT} A \Gamma v$$

Donde previamente se definieron los valores de n, F, R y T , donde Γ es la superficie cubierta, y donde A es el área geometrica de la superficie del electrodo. En el caso del electrodo de carbono de pila, el valor fue de 0.071 cm^2 ; del electrodo de grafito espectroscopicamente puro fue de 0.2827 cm^2 .



Figuras 16 y 17. Gráficas de la velocidad de barrido de potencial (v) contra la corriente pico anódica (I_{pa}). (1) Utilizando el electrodo de carbono de pila. (2) Utilizando el electrodo espectroscópicamente puro

La ecuación de la regresión lineal de la pendiente de la gráfica en el caso del primer electrodo es ($R^2 = 0,9338$):

$$I_{pa} = 7 \times 10^{-5} v + 1 \times 10^{-5}$$

Obteniendo un valor de Γ de $0.2623 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-2}$.

En el caso del segundo electrodo, la pendiente de la grafica obtenida por regresión lineal para el electrodo espectroscópicamente puro utilizando cafeína como analito fue ($R^2 = 0,9738$):

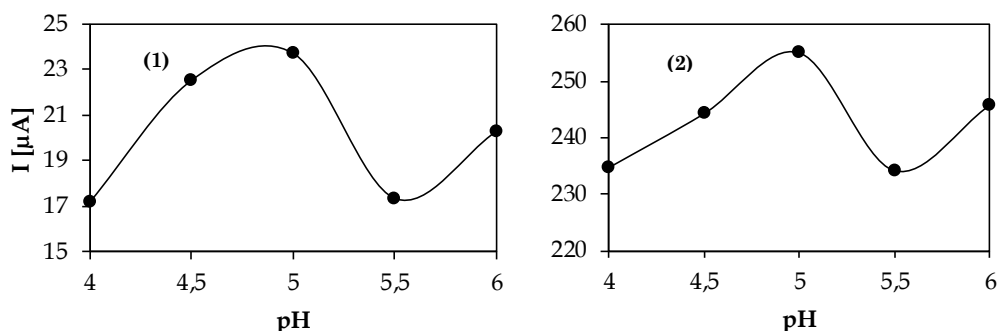
$$I_{pa} = 0.0014 v + 8 \times 10^{-6}$$

A traves de la pendiente de esta ecuación se obtuvo que Γ es $1.318 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-2}$.

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES

Valor óptimo de pH

A través de la variación controlada de pH se puede determinar el valor óptimo a utilizar durante las mediciones; además de conocer la cantidad de electrones y protones compartidos en la reacción de oxidación reducción.



Figuras 18 y 19. Graficas de relación de pH contra corriente (I) para localizar el pH optimo del proceso. (1) pH optimo paracetamol. (2) pH optimo cafeína

El valor de pH óptimo en las mediciones electroquímicas con el electrodo de carbono de pila se observa como el valor de pH al que le corresponde la señal más alta en intensidad de corriente de pico anódico, donde este caso corresponde a pH 5.

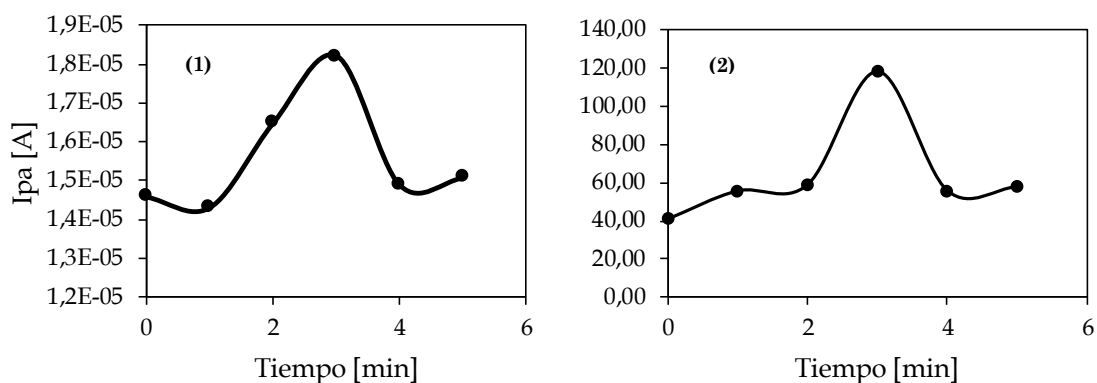
Mismo resultado en el caso de la cafeína como analito utilizando el electrodo espectroscópicamente puro.

Tiempo de acumulación

Uno de los parametros que afectan al resultado de la medición por métodos voltametricos es el tiempo de acumulación, es decir, el intervalo en el cual se acumula analito en la superficie del electrodo por adsorción mediante convección provocada por una agitación uniforme en la celda.

Para conocer cual era el tiempo de acumulación con el cual se obtenía un mejor resultado, se realizó la medición de paracetamol con tiempos de acumulación desde 0

hasta 5 minutos, y se seleccionó el tiempo en el cual se obtuvo una corriente de pico anodico más alto.



Figuras 20 y 21 . Gráficas del tiempo de acumulación contra corriente de pico anodico utilizando la técnica de voltametría ciclica (1) Con paracetamol. (2) Con cafeína.

Como resultado, se obtuvo un mayor pico de corriente anodica al aplicar un tiempo de acumulación de 3 minutos tanto en el caso del paracetamol, como en la cafeína. Este parametro se aplico en todos los experimentos posteriores.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN: PARACETAMOL

Curva de calibración

Para obtener el límite de detección se realizaron nueve mediciones de paracetamol a distintas concentraciones para construir la curva de calibración del procedimiento, y de forma experimental obtener el ultimo valor posible de detectar.

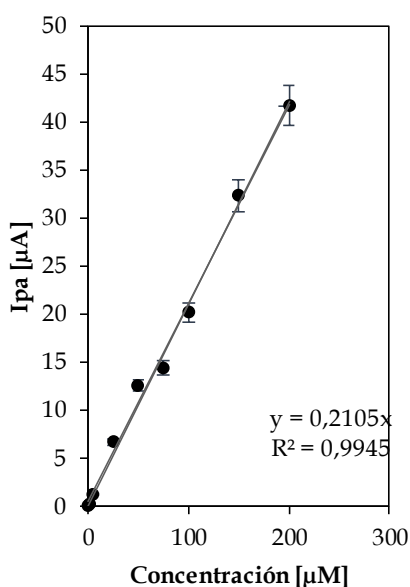


Figura 22. Rango lineal de la curva de calibración.

La relación entre la concentración (C) y la corriente pico (I) esta dada por la siguiente ecuación lineal ($R^2 = 0,9945$):

$$I = 0,2105C$$

Rango lineal

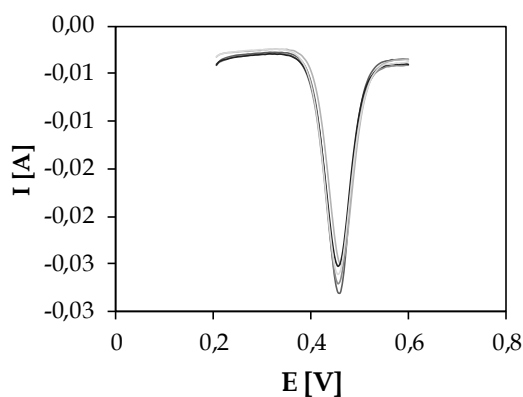
Se observó que el rango lineal de la curva de calibración se encuentra entre 0.25 μM y 200 μM, despues de 200 μM la relación se comienza a desviar de la linearidad.

Límite de detección

El límite de detección estimado para la medición de paracetamol con el electrodo de carbon de pila fue de 0.25 μM (S/N=3).

Reproducibilidad

Para estimar la reproducibilidad del método, se realizaron 5 repeticiones de la medición bajo las mismas condiciones. Las condiciones fueron una concentración de $100\ \mu\text{M}$ en una solución amortiguadora de acetato 0.1M pH 5 utilizando la técnica de voltametría diferencial de pulso con los mismos parametros ya mencionados.



Figuras 23. Curvas voltamétricas de las cinco repeticiones de paracetamol $100\mu\text{M}$.

El análisis de los datos se realizó utilizando el valor de corriente de pico anódica correspondiente a cada repetición.

Como resultado, se obtuvo una desviación estandar relativa de 5.39% en las mediciones realizadas al paracetamol, con un promedio en la intensidad de la señal de $23.04\ \mu\text{A}$.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE MEDICIÓN: CAFEÍNA

Curva de calibración

La curva de calibración se basó en la medición de la corriente de la cafeína a las concentraciones de 5, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 μM . A partir de estos resultados se observó también el rango lineal y la sensibilidad del método.

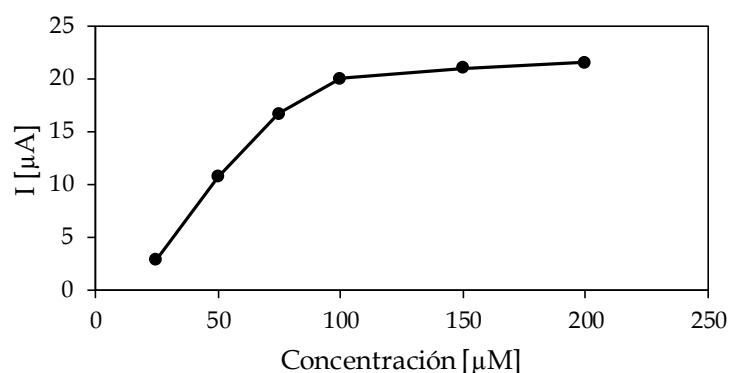


Figura 24. Curva de calibración de la cafeína en el rango de 25-200 μM .

Rango lineal

El rango lineal observado en la curva de calibración va de 25 a 100 μM . Se muestra en la siguiente figura

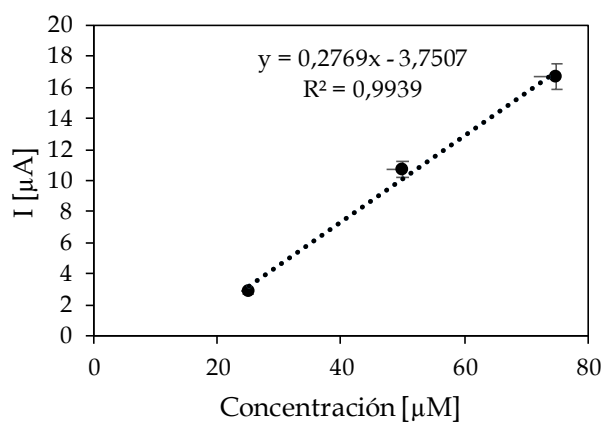


Figura 25. Rango lineal de la curva de calibración

La relación entre la concentración (C) y la corriente pico (I) está dada por la siguiente ecuación lineal ($R^2 = 0,9939$):

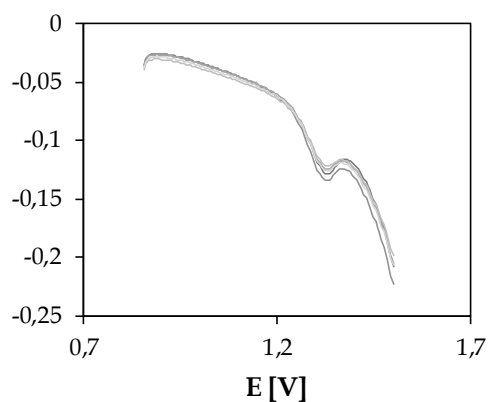
$$I = 0,2769 C - 3,7507$$

Límite de detección

El límite de detección de este método de medición se determinó a partir de un análisis de varianzas de los datos obtenidos a través de la construcción de una curva de calibración. El límite de detección estimado para la medición de cafeína según el análisis de varianza de los datos en el rango lineal fue de 7.315 μM .

Reproducibilidad

Para estimar la reproducibilidad también se realizó a través de la repetición de 5 mediciones de una concentración de 75 μM en la solución amortiguadora de acetato 0.1M pH 5 utilizando la técnica de voltametría diferencial de pulso con los mismos parametros ya mencionados.



Figuras 26. Curvas voltamétricas de las cinco repeticiones de cafeína de 75 μM bajo las mismas condiciones utilizando la técnica de diferencial de pulso.

La desviación estándar relativa o coeficiente RDS obtenido con los datos de la cafeína fue de 8.79%.

APLICACIÓN ANALÍTICA

Paracetamol

Para probar la aplicabilidad del método, se utilizó en la determinación de la concentración de muestras de paracetamol provenientes de formulas comerciales en comprimidos. Para esto se prepararon soluciones en base a 5 tabletas y 1 tableta a una concentración de 0.005 M, y se utilizó una solución estandar de paracetamol a la misma concentración. Se realizaron multiples experimentos, donde en unos se realizó el calculo de la concentración en base a la curva de calibración y en otros se utilizó el método de adición estandar.

De la aplicación analitica, se obtuvieron errores relativos arriba de 7% con cada uno de los métodos y soluciones con respecto a la cantidad especificada por el fabricante, que en este caso fueron 500 mg.

TABLA 1. Métodos similares de detección de paracetamol y sus resultados

Electrodo utilizado en la detección	LOD (mol L ⁻¹)	Rango lineal (mol L ⁻¹)	Trabajo citado
De óxido de estaño e indio modificado con nanooro	1.8x10 ⁻⁷	2,0x10 ⁻⁷ – 1,5x10 ⁻³	60
Electrodo compuesto de nanotubos de carbono de paredes múltiples y nanopartículas de ZnO	3.3x10 ⁻⁹	0,01x10 ⁻⁶ -0,3 x10 ⁻⁶	61
Electrodo de grafito de lápiz modificado con polipirrol impreso molecularmente electropolimerizado	7.9x10 ⁻⁷	5x10 ⁻⁶ - 0,50x10 ⁻³	62
Electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de carbono hidrófilo	1.5x10 ⁻⁸	1,0x10 ⁻⁷ –1,0x10 ⁻³	63
Electrodo en chip impreso en 3D	2,8x10 ⁻⁶	2,8x10 ⁻⁶ -1,48x10 ⁻⁴	64
Electrodo de carbono de pila	0,25x10 ⁻⁶	0,25x10 ⁻⁶ -200x10 ⁻⁶	Presente trabajo

En este trabajo se obtuvieron resultados de límite de detección y rango lineal comparables a otros trabajos mencionados en la literatura. Con la observación de que el límite de detección es un poco alto en comparación, sin embargo, es suficiente para poder

medir las concentraciones de paracetamol utilizadas en la industria farmacéutica. Además de presentar un amplio rango lineal, lo que permite ampliar el abanico de concentraciones a encontrar.

Cafeína

La aplicación analítica del método de medición se probó mediante la determinación de cafeína presente en capsulas de 200 mg. Se preparó una solución con una concentración de 0.005 M utilizando el polvo de 10 capsulas de cafeína.

Como resultado, a través de la medición electroquímica de la solución, utilizando el método de adición estándar, donde se obtuvo la medición de la corriente de 20 μL de la solución preparada con las capsulas en 5 mL del buffer acetato, y una segunda medición de corriente en donde se agregaron 20 μL de una solución estándar a la misma concentración, el error relativo fue de 2% en comparación con la cantidad brindada por el fabricante, lo que se considera dentro del rango aceptable.

TABLA 3. Métodos similares de detección de cafeína y sus resultados

Electrodo utilizado en la detección	LOD (mol L^{-1})	Rango lineal (mol L^{-1})	Trabajo citado
Electrodo de carbono-cerámica modificado con nanotubos de carbono de pared simple	1.20×10^{-7}	$5.0 \times 10^{-6} - 5.0 \times 10^{-3}$	65
Electrodo de corcho-grafito para la determinación voltamperométrica de cafeína.	2.94×10^{-6}	$2.9 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-3}$	66
Electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de sulfuro de cobre.	1.86×10^{-8}	$2.0 \times 10^{-6} - 1.2 \times 10^{-4}$	67
Electrodo modificado compuesto con MWCNTs-poli-4-vinilpiridina	4.42×10^{-9}	$2.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-4}$	68
Electrodo de lápiz de grafito modificado con nanopartículas de oro decorado con poli (l-metionina)	2.50×10^{-6}	$8.3 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-3}$	69
Electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono dopados con nitrógeno decorados con poli (L-cisteína)	2.00×10^{-8}	$0.4 \times 10^{-6} - 1.4 \times 10^{-4}$	70
Electrodo de carbono espectroscópicamente puro	7.32×10^{-6}	$2.5 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-4}$	Presente trabajo

En este trabajo se obtuvieron resultados de límite de detección y rango lineal comparables a otros trabajos mencionados en la literatura. Con la observación de que el límite de detección es un poco alto en comparación, sin embargo, es suficiente para poder medir las concentraciones de cafeína utilizadas en la industria farmacéutica.

ANÁLISIS SIMULTÁNEO DE PARACETAMOL Y CAFEÍNA

Curva de calibración de cafeína en presencia de una concentración constante de 200 μM de paracetamol

Las mediciones se realizaron utilizando un electrodo de grafito espectroscópicamente puro. Se varió la concentración de cafeína desde 20 μM hasta 150 μM .

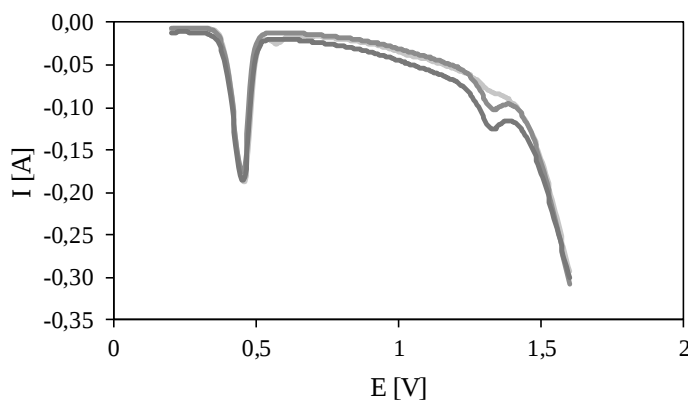


Figura 27. Voltamogramas de la curva de calibración de cafeína en presencia de paracetamol.

Del ejercicio, se observó que los datos de la curva de calibración siguen una tendencia logarítmica a lo largo del intervalo de concentración analizado, donde el rango lineal se encontró que va de 20 a 50 μM con $R^2 = 0,9918$. Por medio del método de regresión lineal, se encontró que el límite de detección de la cafeína en estas condiciones es de 7.775 μM .

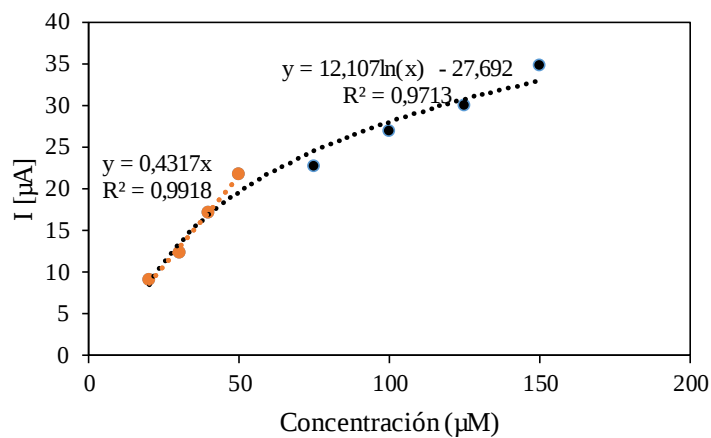


Figura 28. Curva de calibración de cafeína en presencia de paracetamol a 200 µM en el rango de 20 a 160 µM. Se observa una línea de tendencia general logarítmica y un rango lineal que va de 20 a 50 µM.

Curva de calibración de paracetamol en presencia de una concentración constante de 150 µM de cafeína

Para la elaboración de esta curva de calibración se utilizó el electrodo de carbono de pila. Se varió la concentración de paracetamol desde 20 a 200 µM manteniendo una concentración constante de cafeína de 150 µM.

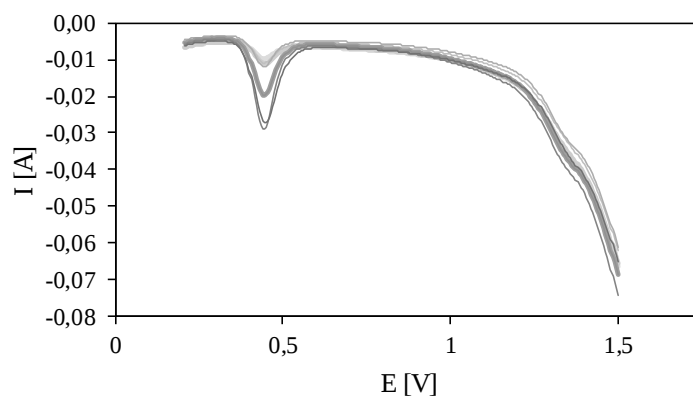


Figura 29. Voltamogramas de la curva de calibración del paracetamol manteniendo constante la concentración de cafeína

Como resultado, el paracetamol mostró una tendencia lineal en el rango de concentraciones de 20 a 150 µM en presencia de cafeína ($R^2 = 0,9916$). Por medio del

método de regresión lineal utilizando los datos obtenidos de la curva de calibración del paracetamol en presencia de cafeína se encontró un límite de detección de 10.155 μM .

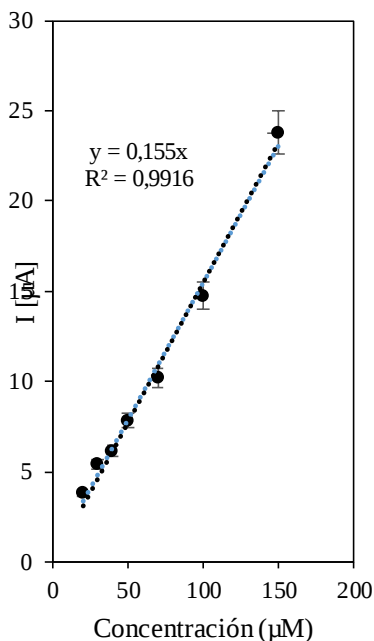


Figura 30. Curva de calibración del paracetamol en presencia de cafeína.

Discusión de los resultados obtenidos con cada electrodo de trabajo utilizado

Electrodo de grafito espectroscópicamente puro

La curva de calibración obtenida para la cafeína en presencia de paracetamol fue aceptable, y demostró que la presencia de paracetamol no representaba ninguna interferencia en la determinación analítica. Por lo tanto, es posible realizar mediciones de cafeína en presencia de paracetamol utilizando este electrodo, con un límite de detección y un rango lineal adecuados para la medición de productos farmacéuticos comerciales.

La tendencia logarítmica de los picos de corriente en las concentraciones analizadas indica que la corriente presenta un incremento mayor en el cambio de concentraciones pequeñas, que corresponde al rango lineal de 20 a 50 μM , y después de este rango, la corriente aumenta cada vez menos en respuesta al cambio de concentración.

Electrodo de carbono de pila

A través de las mediciones realizadas, se observó que se puede obtener la medición de cafeína por este método, pero se aprecia una detección de la corriente de oxidación muy baja a una concentración considerablemente alta, por lo que el límite de detección y la sensibilidad del análisis de cafeína con este electrodo pueden no ser adecuados para aplicaciones farmacéuticas. Esto puede ser, porque se ha reportado ⁷¹, por medio de la caracterización del carbono de pila a través de difracción de rayos X (XRD), espectroscopia FTIR y Raman, que el grafito de estas barras de carbono presenta desperfectos traducidos en la presencia de estructuras romboédricas coexistiendo con las estructuras comunes hexagonales, grupos funcionales, carbono con hibridación sp^3 , y un espacio entre sus capas ligeramente mayor a la orientación perfecta ⁷². Anteriormente, se encontró que el proceso de oxidación de la cafeína estaba limitado por la adsorción. Es posible que los desperfectos mencionados puedan interferir en este proceso.

Sin embargo, el electrodo de pila demostró que puede ser utilizado para las mediciones de paracetamol, con una precisión aceptable y sin que la presencia de cafeína en la solución pueda representar una interferencia en la determinación de la concentración analizada.

Mediciones simultaneas en productos farmacéuticos comerciales

Como resultado de cada una de las etapas, se obtuvieron los errores relativos de la concentración encontrada con el método de medición y la concentración reportada por el fabricante.

En el caso de la primera etapa, en donde se realizaron las mediciones utilizando el electrodo de carbono de pila, se analizó el error de la concentración de paracetamol. El resultado fue un error relativo de 5.94%.

En la segunda etapa, utilizando un electrodo de grafito espectroscópicamente puro, el error relativo de la concentración de cafeína medida y la reportada por el fabricante en la tableta fue de 5.74%

En la NOM-177-SSA1-2013 se mencionan los parámetros de validación para método de análisis de un medicamento. En ella, se indica que el error relativo no debe ser mayor del 3% ⁷³. En el caso de este método de medición, se obtuvieron resultados mayores al 5%, lo cual, tomando en cuenta el parámetro de la norma, esta fuera del límite establecido. Sin embargo, esto puede ser una acumulación del error del método de medición del fabricante y el error obtenido con este método de medición, y la acumulación del error de las soluciones preparadas para la implementación del método, y no deberse únicamente al error del método en cuestión o por la interferencia de algún excipiente del medicamento.

Entre los dos electrodos utilizados, el electrodo que presenta menor error relativo con respecto a la cantidad reportada por el fabricante fue el electrodo de grafito espectroscópicamente puro, utilizado para la medición, principalmente, de la cafeína. Pero, ambos errores son relativamente similares.

Conclusión

Se logró evaluar el comportamiento electroquímico del paracetamol utilizando un electrodo de carbono de pila; así como también se evaluó el comportamiento electroquímico de la cafeína utilizando el electrodo de grafito espectroscópicamente puro. Se determinó que ambos mostraron una buena respuesta electroquímica en su correspondiente electrodo, cuya reacción de oxidación para los dos está mediada por el proceso de adsorción.

Se optimizaron los parámetros de pH y tiempo de acumulación de método de medición para cada uno, siendo un paso importante debido a que estos factores tienen una fuerte repercusión en la medición debido al proceso de adsorción del método de redisolución. Se encontró que ambos analitos son compatibles para su medición simultánea, siendo el electrodo de grafito espectroscópicamente puro el más apto para esto.

Se evaluó el desempeño analítico del método, resultando que, en las pruebas de validación del método, para los fármacos paracetamol y cafeína, ambos electrodos presentaron resultados aceptables en cuanto a rango lineal, límite de detección, y sensibilidad, de acuerdo con lo establecido en la normatividad citada.

Se aplicó el método en la determinación de medicamentos comerciales. El método analítico para la determinación simultánea de cafeína y paracetamol en tabletas comerciales utilizando los electrodos de carbono de pila y grafito espectroscópicamente puro por voltametría diferencial de pulsos mostró un error relativo que puede encontrarse entre el 5 y el 6%.

Se puede concluir finalmente que el método de medición propuesto para la determinación de fármacos es asequible, sensible, que ofrece un amplio rango lineal de medición, y que no requiere de una gran cantidad de muestra. A pesar de que se debe prestar atención a los detalles de la superficie de los electrodos, es en general un método práctico de análisis, que no requiere de personal especializado para su implementación. Además, se demostró que es posible realizar la determinación al menos del paracetamol utilizando el electrodo de carbono de pila, lo cual ofrece una aplicación a un producto que es considerado generalmente de desecho.

Bibliografía

1. Uslu, B. & Ozkan, S. A. Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments. *Anal. Lett.* **44**, 2644–2702 (2011).
2. Organización Mundial de la Salud. Envejecimiento y salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health> (2022).
3. Dogan-Topal, B., Ozkan, S. A. & Uslu, B. The Analytical Applications of Square Wave Voltammetry on Pharmaceutical Analysis. *Open Chem. Biomed. Methods J.* **3**, (2010).
4. Siddiqui, M. R., AlOthman, Z. A. & Rahman, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arab. J. Chem.* **10**, S1409–S1421 (2017).
5. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 11th Edition - European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - EDQM. *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare* <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition>.
6. Basavaiah, K. & Prameela, H. C. Two simple methods for the estimation of albendazole and its dosage forms using chloramine-T. *Farm. Soc. Chim. Ital.* **1989** **58**, 527–534 (2003).
7. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Principios de Análisis Instrumental*. (CENGAGE Learning, 2018).
8. Gullit, D., Tene, T., Dongmo M, L., Zambou Jiokeng, S. L. & Tonleu Temgoua, R. Differential pulse and square-wave voltammetry as sensitive methods for electroanalysis applications. in (2022). doi:10.1016/B978-0-323-85669-0.00040-4.
9. Jalalvand, A. R., Karami, M. M., Arkan, E. & Sadeghi, E. A novel triple templates molecularly imprinted biosensor assisted by first derivatives of second-order hydrodynamic differential normal pulse voltametric data and multi-way calibration methods for simultaneous biosensing

- of penicillin, tetracycline and amoxicillin in dairy products: A novel multi-disciplinary study. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **235**, 104765 (2023).
10. Christian, G. D. *Química analítica*. (McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2009).
 11. Chavan, A. & Gandhimathi, R. MODERN ANALYTICAL TOOLS FOR THE DETERMINATION OF THE ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS: A REVIEW. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH* vol. 13 61–69 (2022).
 12. Ivanov, A., Smirnov, I., Murashko, T., Trusova, M. & Stepanova, E. NOVEL AND VALIDATED NON-AQUEOUS TITRIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF PERSPECTIVE POTASSIUM-SPARING DIURETIC DRUG CANDIDATE IN PURE FORM AND PHARMACEUTICAL FORMULATION. *Malays. J. Anal. Sci.* **25**, (2021).
 13. Abdulrahman, S. A. M., Algethami, F. K., Qarah, N. A. S., Basavaiah, K. & El-Maaiden, E. Development of non-aqueous titrimetric and spectrophotometric methods for the determination of valganciclovir hydrochloride in bulk drug and tablets. *Ann. Pharm. Fr.* **79**, 489–499 (2021).
 14. Seadahmed, M., Adam, M. & Elsaman, T. DEVELOPMENT OF ACID-BASE TITRIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF SILDENAFIL CITRATE IN BULK AND TABLETS FORMS. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **7**, (2018).
 15. Shuchi, J., Mohit, C., Chintaman, K., & BM College of Pharmaceutical Education and Research, Indore, Madhya Pradesh, India. Titrimetric Analysis of Acelofenec Sodium by using Mixed Solvency. *Int. J. Trend Sci. Res. Dev.* **Volume-3**, 746–748 (2019).
 16. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada & Ettre, L. S. Nomenclatura para cromatografía. (1993).
 17. D’Atri, V., Fekete, S., Clarke, A., Veuthey, J.-L. & Guillarme, D. Recent Advances in Chromatography for Pharmaceutical Analysis. *Anal. Chem.* **91**, 210–239 (2019).

18. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler & Stanley R. Crouch. *Fundamentos De Quimica Analitica*. (2014).
19. Levin, S. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the Pharmaceutical Analysis. in *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia* 1–34 (John Wiley & Sons, Ltd, 2010).
doi:10.1002/9780470571224.pse407.
20. Ahmed, S. *et al.* A Review Article on Pharmaceutical Analysis of Pharmaceutical Industry According to Pharmacopoeias. *Orient. J. Chem.* **36**, 1–10 (2020).
21. Niessen, W. M. A. State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **856**, 179–197 (1999).
22. Ascentis® Express C18 U/HPLC Columns. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/ascentis-express-c18-u-hplc-columns>.
23. Jindal, D., Patil, R. K. & Patil, H. C. A Brief Study About Analytical Techniques In Pharmaceutical Analysis (Chromatography & Spectroscopy):A Review Article. **7**, (2020).
24. Sethi, P. D. Identification Of Drugs In Pharmaceutical Formulations By Thin Layer Chromatography 2E (Hb 2014). *Default Store View* <https://www.cbspd.co.in/identification-of-drugs-in-pharmaceutical-formulations-by-thin-layer-chromatography-2e-hb-2014>.
25. Fried, B. & Sherma, J. *Practical Thin-Layer Chromatography: A Multidisciplinary Approach*. (CRC Press, 1996).
26. HPTLC | Merck. <https://www.merckmillipore.com/MX/es/analytcs-sample-preparation/learning-center-thin-layer-chromatography/hptlc/NGub.qB.fCoAAAFVPmJDx07N,nav>.

27. Fauzi, A., Hameed, I. & Kadhim, M. A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. *Int. J. Toxicol. Pharmacol. Res.* **9**, (2017).
28. Baghel, U. S. *et al.* Application of Mass Spectroscopy in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. in *Spectroscopic Analyses - Developments and Applications* (IntechOpen, 2017). doi:10.5772/intechopen.70655.
29. Sharma, S., Singh, N., Ankalgi, A. D., Rana, A. & Ashawat, M. S. Modern Trends in Analytical Techniques for Method Development and Validation of Pharmaceuticals: A Review. *J. Drug Deliv. Ther.* **11**, 121–130 (2021).
30. Lambert, J. B., Mazzola, E. P. & Ridge, C. D. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: An Introduction to Principles, Applications, and Experimental Methods*. (John Wiley & Sons, 2019).
31. Westermeier, R. Electrophoresis in Practice. Part Introduction. in *Electrophoresis in Practice* 1–7 (John Wiley & Sons, Ltd, 2004). doi:10.1002/3527603468.part1.
32. Elgrishi, N. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J. Chem. Educ.* **95**, 197–206 (2018).
33. Brett, C. M. A. & Brett, A. M. O. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*. (Oxford University Press, 1993).
34. Bard, A. J. & Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. (Wiley, 2000).
35. Gupta, V. K., Jain, R., Radhapyari, K., Jadon, N. & Agarwal, S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review. *Anal. Biochem.* **408**, 179–196 (2011).
36. Qian, L., Durairaj, S., Prins, S. & Chen, A. Nanomaterial-based electrochemical sensors and biosensors for the detection of pharmaceutical compounds. *Biosens. Bioelectron.* **175**, 112836 (2021).

37. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Revised and Expanded*. (CRC Press, 1996).
38. RDE-2 Rotating Disk Electrode. <https://www.basinc.com/products/ec/rde-2>.
39. Compton, R. G. & Banks, C. E. *Understanding Voltammetry*. (World Scientific, 2007).
40. Vanýsek, P. *Modern Techniques in Electroanalysis*. (Wiley, 1996).
41. Şentürk, Z., Özkan, S. A. & Özkan, Y. Electroanalytical study of nifedipine using activated glassy carbon electrode1Presented at the Fourth International Symposium on Pharmaceutical Science, June 1995, Ankara, Turkey.1. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**, 801–807 (1998).
42. Ali, A. M. M. Cathodic adsorptive stripping voltammetric determination of the anti-inflammatory drug indomethacin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18**, 1005–1012 (1999).
43. Arranz, A. *et al.* Voltammetric and spectrophotometric techniques for the determination of the antihypertensive drug Prazosin in urine and formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**, 797–807 (1999).
44. Aparicio, I., Callejón, M., Jiménez, J. C., Bello, M. A. & Guiraúm, A. Electrochemical oxidation at carbon paste electrode of tacrine and 1-hydroxytacrine and differential pulse voltammetric determination of tacrine in pharmaceuticals and human urine. *Analyst* **125**, 2016–2019 (2000).
45. Florou, A. B., Prodromidis, M. I., Tzouwara-Karayanni, S. M. & Karayannis, M. I. Fabrication and voltammetric study of lanthanum 2,6-dichlorophenolindophenol chemically modified screen printed electrodes.: Application for the determination of ascorbic acid. *Anal. Chim. Acta* **423**, 107–114 (2000).
46. REGLAMENTO DE INSUMOS PARA LA SALUD. *Diario Oficial de la Federación (DOF)* https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4864792&fecha=04/02/1998#gsc.tab=0.

47. NOM-059-SSA1-2015. *DOF - Diario Oficial de la Federación*
https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5424575.
48. NOM-073-SSA1-1993. *DOF - Diario Oficial de la Federación*
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4874799&fecha=08/03/1996#gsc.tab=0.
49. NOM-164-SSA1-2015. *DOF - Diario Oficial de la Federación*
https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/5910/salud2a11_C/salud2a11_C.html.
50. Forrest, J. A. H., Clements, J. A. & Prescott, L. F. Clinical Pharmacokinetics of Paracetamol. *Clin. Pharmacokinet.* **7**, 93–107 (1982).
51. Bateman, D. N. Paracetamol poisoning: beyond the nomogram. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **80**, 45–50 (2015).
52. Shankar, K. & Mehendale, H. M. Acetaminophen. in *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (ed. Wexler, P.) 26–29 (Academic Press, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00215-3.
53. Bateman, D. N. *et al.* Effect of the UK's revised paracetamol poisoning management guidelines on admissions, adverse reactions and costs of treatment. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **78**, 610–618 (2014).
54. Caffeine. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00201>.
55. Vu Dang, H., Truong Thi Thu, H., Dong Thi Ha, L. & Nguyen Mai, H. RP-HPLC and UV Spectrophotometric Analysis of Paracetamol, Ibuprofen, and Caffeine in Solid Pharmaceutical Dosage Forms by Derivative, Fourier, and Wavelet Transforms: A Comparison Study. *J. Anal. Methods Chem.* **2020**, 8107571 (2020).
56. Švorc, L. Determination of Caffeine: A Comprehensive Review on Electrochemical Methods. *Int J Electrochem Sci* **8**, (2013).

57. Laviron, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **101**, 19–28 (1979).
58. Miner, D. J., Rice, J. R., Riggan, R. M. & Kissinger, P. T. Voltammetry of acetaminophen and its metabolites. *ACS Publications* <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac00237a029> (2002) doi:10.1021/ac00237a029.
59. Hansen, Barbara H. & Dryhurst, G. Electrochemical oxidation of theobromine and caffeine at the pyrolytic graphite electrode. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **30**, 407–416 (1971).
60. Goyal, R. N., Gupta, V. K., Oyama, M. & Bachheti, N. Differential pulse voltammetric determination of paracetamol at nanogold modified indium tin oxide electrode. *Electrochem. Commun.* **7**, 803–807 (2005).
61. Patil, D. S., Shetti, N. P., Nayak, D. S. & Revankar, R. S. Fabrication of multi-walled carbon nanotubes and ZnO nanoparticles composite electrode as a sensor for paracetamol. *Mater. Today Proc.* **18**, 1124–1131 (2019).
62. Özcan, L. & Şahin, Y. Determination of paracetamol based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode. *Sens. Actuators B Chem.* **127**, 362–369 (2007).
63. Amiri, M., Rezapour, F. & Bezaatpour, A. Hydrophilic carbon nanoparticulates at the surface of carbon paste electrode improve determination of paracetamol, phenylephrine and dextromethorphan. *J. Electroanal. Chem.* **735**, 10–18 (2014).
64. Katseli, V., Economou, A. & Kokkinos, C. A novel all-3D-printed cell-on-a-chip device as a useful electroanalytical tool: Application to the simultaneous voltammetric determination of caffeine and paracetamol. *Talanta* **208**, 120388 (2020).

65. Habibi, B., Abazari, M. & Pournaghi-azar, M. H. A Carbon Nanotube Modified Electrode for Determination of Caffeine by Differential Pulse Voltammetry. *Chin. J. Catal.* **33**, 1783–1790 (2012).
66. Monteiro, M. K. S. *et al.* Novel cork-graphite electrochemical sensor for voltammetric determination of caffeine. *J. Electroanal. Chem.* **839**, 283–289 (2019).
67. Mahanthappa, M., Yellappa, S., Kottam, N. & Srinivasa Rao Vusa, C. Sensitive determination of caffeine by copper sulphide nanoparticles modified carbon paste electrode. *Sens. Actuators Phys.* **248**, 104–113 (2016).
68. Ghadimi, H. *et al.* Electrochemical determination of aspirin and caffeine at MWCNTs-poly-4-vinylpyridine composite modified electrode. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **65**, 101–109 (2016).
69. Eskiköy Bayraktepe, D., İnal, E. K. & Yazan, Z. Preparation and characterization of a pencil graphite electrode modified with gold nanoparticles decorated poly (l-methionine) and its use in the simultaneous sensitive electrochemical analysis of ascorbic acid, acetaminophen, chlorpheniramine maleate, and caffeine. *Microchem. J.* **171**, 106812 (2021).
70. Wang, Y., Ding, Y., Li, L. & Hu, P. Nitrogen-doped carbon nanotubes decorated poly (L-Cysteine) as a novel, ultrasensitive electrochemical sensor for simultaneous determination of theophylline and caffeine. *Talanta* **178**, 449–457 (2018).
71. Siqueira Santos, C., Gremisk Pawlak, V., Daiane de Oliveira, R., Toshio Fujiwara, S. & Andrade Pessôa, C. Carbon Graphite Obtained of Zinc-Carbon Exhausted Batteries Applied as Electrode in Electrochemical Sensors. *Rev. Virtual Quím.* **11**, 275–296 (2019).
72. Zhou, Z., Bouwman, W. G., Schut, H. & Pappas, C. Interpretation of X-ray diffraction patterns of (nuclear) graphite. *Carbon* **69**, 17–24 (2014).
73. NOM-177-SSA1-2013. *DOF - Diario Oficial de la Federación*
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#gsc.tab=0.

Anexos

DERECHO DE AUTOR PUBLICADO

Universidad Autónoma de Baja California

CONSTANCIA DE AUTORIZACIÓN DE TRÁMITE

No. 029/2022-1

Que se emite en correspondencia al art. 43 del *Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad Autónoma de Baja California*, como constancia de recepción y conformidad del Departamento de Propiedad Intelectual y Transferencia respecto del trámite solicitado por:

- Claudia Susana Meza Calvillo
- Margarita Stilianova Stoytcheva Zlateva,
- Roumen Koytchev Zlatev,
- Benjamín Valdez Salas

Del registro de la obra intitulada: **SENSORES ELECTROQUIMICOS PARA FARMACOS ANALGESICOS Y ANTIINFLAMATORIOS**, bajo la figura de: Base de datos, ante el Instituto Nacional del Derecho de Autor (INDAUTOR).

Entregando en tiempo y forma los documentos, así como el material que fueron requeridos para tal efecto, en el entendido de que se sujetarán al procedimiento y determinación establecido por el INDAUTOR.

Se emite la presente constancia para los fines que al(los) interesado(s) convenga.



Atentamente
"Por la realización plena del hombre"
Mexicali, Baja California a 16 de marzo de 2022

Aide Ginera Aparicio
Lic. Aide Ginera Aparicio
Jefa del Departamento



C.c. Archivo

Coordinación General de Investigación y Posgrado
Departamento de Propiedad Intelectual y Transferencia 1 de 1

CERTIFICADO

Registro Público del Derecho de Autor

Para los efectos de los artículos 13, 162, 163 fracción I, 164 fracción I, y demás relativos de la Ley Federal del Derecho de Autor, se hace constar que la **OBRA** cuyas especificaciones aparecen a continuación, ha quedado inscrita en el Registro Público del Derecho de Autor, con los siguientes datos:

AUTORES: KOYTCHEV ZLATEV ROUMEN
MEZA CALVILLO CLAUDIA SUSANA
STOYTCHIVA ZLATEVA MARGARITA STILIANOVA
VALDEZ SALAS BENJAMIN

TÍTULO: SENSORES ELECTROQUIMICOS PARA FARMACOS ANALGESICOS Y ANTIINFLAMATORIOS

RAMA: COMPILACION DE DATOS (BASE DE DATOS)

TITULAR: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA (CON FUNDAMENTO EN EL ARTICULO 83 DE LA L.F.D.A.)

Con fundamento en lo establecido por el artículo 107 de la Ley Federal del Derecho de Autor, las bases de datos o de otros materiales legibles por medio de máquinas o en otra forma, que por razones de selección y disposición de su contenido constituyan creaciones intelectuales, quedarán protegidas como compilaciones. Dicha protección no se extenderá a los datos y materiales en sí mismos.

Con fundamento en lo establecido por el artículo 168 de la Ley Federal del Derecho de Autor, las inscripciones en el registro establecen la presunción de ser ciertos los hechos y actos que en ellas consten, salvo prueba en contrario. Toda inscripción deja a salvo los derechos de terceros. Si surge controversia, los efectos de la inscripción quedarán suspendidos en tanto se pronuncie resolución firme por autoridad competente.

Con fundamento en los artículos 2, 208, 209 fracción III y 211 de la Ley Federal del Derecho de Autor; artículos 64, 103 fracción IV y 104 del Reglamento de la Ley Federal del Derecho de Autor; y artículos 1, 3 fracción I, 4, 8 fracción I y 9 del Reglamento Interior del Instituto Nacional del Derecho de Autor, se expide el presente certificado.

Número de Registro: 03-2022-012811593800-01

Ciudad de México, a 04 de febrero de 2022

EL DIRECTOR DEL REGISTRO PÚBLICO DEL DERECHO DE AUTOR

JESÚS PARETS GÓMEZ



SECRETARÍA DE CULTURA
INSTITUTO NACIONAL DEL
DERECHO DE AUTOR
DIRECCIÓN DE REGISTRO
PÚBLICO DEL DERECHO DE
AUTOR



CULTURA
SECRETARÍA DE CULTURA



INDAUTOR
INSTITUTO NACIONAL DEL DERECHO DE AUTOR

**SENSORES ELECTROQUIMICOS PARA FARMACOS
ANALGESICOS Y ANTIINFLAMATORIOS**

Claudia Susana Meza Calvillo
Margarita Stilianova Stoytcheva Zlateva
Roumen Koytchev Zlatev
Benjamin Valdez Salas

ÍNDICE

Introducción	3
Sensores electroquímicos para la determinación de paracetamol	3
Electrodo de pasta de grafito modificado con nanoarcilla	3
Electrodo de óxido de indio e estaño modificado con nano-oro	4
Electrodo de pasta de grafito compuesto	4
Electrodo de grafito lápiz modificado con polipirrol de impresión molecular	4
Sensores electroquímicos para la determinación de ibuprofeno	5
Electrodo de diamante dopado con boro	6
Electrodo de carbono serigrafiado modificado con nanofibras de carbono	6
Electrodo de pasta de grafito modificado con arcilla	6
Conclusión	7
Referencias	7

INTRODUCCIÓN

A medida que la industria farmacéutica se expande para seguir el ritmo del crecimiento de la población, el mercado mundial de la industria farmacéutica alcanzó los 1.25 billones de dólares en 2019 y se espera que alcance los 1.5 billones en 2023. Como resultado, apareció el problema del abuso de productos farmacéuticos. La sobredosis de drogas en muchos países se volvió más seria que nunca debido a regulaciones inadecuadas. Por ejemplo, el Centro Nacional de Estadísticas de Salud de EE. UU. reportó 69,029 casos de muerte por sobredosis de medicamentos antiinflamatorios no esteroides entre febrero de 2018 y febrero de 2019, lo que generó un aumento del 5.5% en 2017 a 2018. Por lo tanto, se desarrollaron sensores precisos, portátiles y de bajo costo tales como los electroquímicos para la vigilancia de las sobredosis de fármacos y para el control de la calidad de los productos farmacéuticos.

En este trabajo abordamos la aplicación de los sensores electroquímicos para el análisis de fármacos analgésicos y antiinflamatorios de gran trascendencia tomando en cuenta su uso y la mortalidad que provocan. Nos centramos en dos fármacos ampliamente disponibles para la población: el paracetamol y el ibuprofeno.

SENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PARACETAMOL

El paracetamol (N-(4-hydroxyphenyl)acetamide, acetaminofeno) es un fármaco de larga data y uno de los medicamentos "de venta libre" más utilizados en el mundo. Se prescribe para reducir la fiebre, la tos y el resfriado y el dolor leve a moderado, incluidos casos de cefalea tensional, migraña, dolores musculares, dolor crónico, neuralgia, dolor de espalda, dolor articular, dolor general y dolor de muelas. Cuando se usa en la dosis terapéutica adecuada, el paracetamol se metaboliza fácilmente. Las sobredosis de paracetamol producen una acumulación de metabolitos tóxicos que causan necrosis hepática aguda, induciendo morbilidad y mortalidad en humanos [1]. Se estima que entre 82,000 y 90,000 pacientes en el Reino Unido ingresan al hospital al año con una sobredosis de paracetamol y se producen entre 150 y 250 muertes por esta razón [2]. Estos hechos justifican la necesidad de determinación rápida y precisa de la concentración de este fármaco, utilizando sensores portátiles y de bajo costo. En este trabajo se describen algunos sensores electroquímicos típicos aplicados a la determinación del paracetamol.

Electrodo de pasta de grafito modificado con nanoarcilla [3]

Patila et al. desarrollaron un electrodo de pasta de grafito modificado con nanoarcilla de motmorillonita (MMT). Seleccionaron una nanoarcilla perteneciente al grupo de las esmectitas debido a sus propiedades químicas y físicas. Encontraron que la nanoarcilla MMT tiene el potencial de causar una amplificación de la señal analítica debido a su vasta área de superficie y relación superficie-volumen. Los autores también encontraron que, aunque anteriormente ya se había utilizado este material como modificador de superficie para la determinación de fármacos, no se había intentado usarlo para la detección de paracetamol. Reportaron que la preparación del electrodo de pasta de grafito sin modificar se realizó mediante la mezcla homogénea de polvo de grafito con aceite de parafina en proporciones 7:3. La pasta resultante se empaquetó firmemente en un tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) vacío y se alisó la superficie. Una vez completada la medición individual por voltamperometría, se desprendió la pasta insertada y se rellenó con una nueva pasta.

construida para la determinación de paracetamol mostro dos regiones lineales: de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 0.50 mmol L^{-1} y de 1.25 a 4.5 mmol L^{-1} . Se alcanzó un límite de detección de $7.9 \times 10^{-7} \text{ M}$. El electrodo de grafito de lápiz modificado con polipirrol de impresión molecular mostró una respuesta estable y reproducible sin ninguna influencia de los interferentes que existen comúnmente en las muestras farmacéuticas. Se encontró que el sensor químico de bajo costo propuesto puede encontrar una aplicación en la medición del nivel de paracetamol en muestras clínicas, así como en la industria farmacéutica.

SENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE IBUPROFENO

El ibuprofeno ((RS)-2-(4-(2-methylpropyl)phenyl)propanoic acid) es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y su formulación química deriva del ácido propiónico. Se usa principalmente para tratar dolor (dolor de cabeza, dolor dental, dolor articular), fiebre, inflamación, fibrosis quística, etc., es decir se utiliza como analgésico, antiinflamatorio y antipirético. También funciona como antidiurético, al promover la retención de sodio y controla síntomas articulares en pacientes con enfermedades reumáticas.

Fue desarrollado en 1960 con el objetivo de tener una alternativa más segura a la aspirina. Se convirtió en el primer AINE de venta libre disponible y actualmente es el más utilizado y recetado. Es además un fármaco que promete reducir la neurodegeneración al administrarse en bajas dosis continuamente en un largo tiempo y se ha utilizado como tratamiento para el cáncer de mama al descubrirse una disminución del 50% de este en un estudio.

Como se mencionó, es uno de los fármacos de venta libre más comunes y utilizados. Sin embargo, en dosis mayores a 99 mg kg^{-1} puede provocar una serie de síntomas como: dolor abdominal, náuseas, vómitos, letargo, vértigo, somnolencia, mareos e insomnio. Otros síntomas de sobredosis incluyen dolor de cabeza, pérdida del conocimiento, convulsiones y ataques. En casos más raros se observa la presencia de acidosis metabólica, función hepática anormal, hiperpotasemia, insuficiencia renal, disnea, depresión respiratoria, coma, insuficiencia renal aguda y apnea.

Para evitar la manifestación de estos síntomas en los consumidores de ibuprofeno es necesario controlar eficientemente la cantidad utilizada de ingrediente activo, por lo que se hace necesario su monitoreo. En la actualidad, existen varios métodos, protocolos e instrumentos para poder realizarlo. Algunos son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases, la electroforesis capilar y la espectrofotometría. Sin embargo, estos métodos suelen ser costosos, necesitan de personal altamente capacitado para implementarlos y/o el tiempo de análisis es largo, por lo que se ha trabajado en el desarrollo de procedimientos de cuantificación de ibuprofeno utilizando métodos electroquímicos, los cuales han reportado vencer las desventajas de los métodos mencionados anteriormente [7].

Los sensores electroquímicos que se utilizan actualmente para la determinación del ibuprofeno son electrodos a base de carbono, incluidos los electrodos de diamante dopados con boro (BDD) [8-16]. La señal analítica es la corriente de oxidación del ibuprofeno. Los electrodos BDD revelan la ventaja de permitir la determinación del ibuprofeno sin la interferencia de la reacción de desprendimiento de oxígeno debido a su amplia ventana de potencial en soluciones acuosas [10, 13, 15]. Llamam igualmente la atención los electrodos de pasta de grafito (GPE) por su sencilla técnica de preparación y sencillo procedimiento de renovación de la superficie, así como los electrodos de carbono

en peso. La cuantificación del ibuprofeno se efectuó por voltametría de pulso diferencial. Finalmente, no se reportaron interferencias significativas, el pico de oxidación disminuyó en comparación con el electrodo que no utilizó arcilla y se obtuvo un límite de detección de $8.35 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se presentaron los sensores electroquímicos corrientemente aplicados a la determinación de fármacos analgésicos y antiinflamatorios, tomando el paracetamol y el ibuprofeno como ejemplos típicos. El análisis de las características analíticas de los sensores propuestos demostró que con todos se pueden obtener mediciones reproducibles, sin interferencias potenciales y con límites de detección adecuados para una matriz como los productos farmacéuticos. Se destacan los electrodos de pasta de grafito por el sencillo procedimiento de renovación de la superficie, los electrodos serigrafiados desechables ya que permiten evitar los procesos de limpieza y los electrodos de diamante dopado con boro por la amplia ventana de potencial que favorece la oxidación de los fármacos sin la interferencia de la reacción de evolución de oxígeno.

REFERENCIAS

1. Dear J. & Bateman N. Paracetamol poisoning. *Medicine*, 2020, 208-210.
2. Bateman, N. et al. Effect of the UK's revised paracetamol poisoning management guidelines on admissions, adverse reactions and costs of treatment. *BJCP*, 2014, 78, 610-618.
3. Patila M., Shetti N., Malode J., Nayak DS., Chakklabbi TR. Electroanalysis of paracetamol at nanoclay modified graphite electrode. *Materials Today: Proceedings*, 2019, 18, 986-993.
4. Goyal R., Gupta, V., Oyama M., Bachheti N. Differential pulse voltammetric determination of paracetamol at nanogold modified indium tin oxide electrode. *Electrochem. Commun.*, 2005, 7, 803-807.
5. Patil D., Shetti N., Nayak D., Revankar, R. Fabrication of multi-walled carbon nanotubes and ZnO nanoparticles composite electrode as a sensor for paracetamol. *Materials Today, Proceedings*, 2019, 18, 1124-1131.
6. Ozcan L., Sahin Y. Determination of paracetamol based on electropolymerized-molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode. *Sensors and Actuators B*, 2007, 127, 362-369.
7. DS, W. y otros, 2017. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. [En línea] Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01050> [Último acceso: 15 11 2021].
8. Apetrei IM., Bejinaru AA., Boev M., Apetrei C., Buzia OD. Determination of ibuprofen based on screen-printed electrodes modified with carbon nanofibers. *Farmacia*, 2017, 65, 790-795.
9. Rivera-Hernández SI., Álvarez-Romero GA., Corona-Avendaño S., Páez-Hernández ME., Galán-Vidal CA., Romero-Romo M. Voltammetric determination of ibuprofen using a carbon paste-multiwalled carbon nanotube composite electrode. *Inst. Sci. Technol.*, 2016, 44, 483-494.
10. Lima AB., Torres LMC., Guimarães CFRC., Verly RM., da Silva LM., Carvalho Jr. AD., dos Santos WTP. Simultaneous determination of paracetamol and ibuprofen in pharmaceutical samples by differential pulse voltammetry using a boron-doped diamond electrode. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2014, 25, 478-483.

11. Sureshm E., Sundaram K., Kavitha B., Kumar ANS. Square wave voltammetry sensing of ibuprofen on glassy carbon electrode. *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, 2016, 9, 182-188.
12. Mekassa B., Tessema M., Chandravanshi BS., Tefera M. Square wave voltammetric determination of ibuprofen at poly(L-aspartic acid) modified glassy carbon electrode. *IEEE Sensors J.*, 2018, 18, 37-44.
13. Chaves SC., Aguiar PNC., Torres LMFC., Gil ES., Luz RCS., Damos F., Munoz RAA., Richter EM., dos Santos WTP. Simultaneous determination of caffeine, ibuprofen, and paracetamol by flow-injection analysis with multiple-pulse amperometric detection on boron-doped diamond electrode. *Electroanalysis*, 2015, 27:2785-2791.
14. Loudiki A., Hammani H., Boumya W., Lahrich S., Farahi A., Achak M., Bakasse M., El Mhammedi MA. Electrocatalytic effect of montmorillonite to oxidizing ibuprofen: analytical application in river water and commercial tablets. *Appl. Clay Sci.*, 2016, 123, 99-108.
15. Švorca L., Strežová L., Kianičková K., Stanković DM., Otfisal P., Samphao A. An advanced approach for electrochemical sensing of ibuprofen in pharmaceuticals and human urine samples using a bare boron-doped diamond electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 2018, 822, 144-152.
16. El Ouafy H., Hammani H., Farahi A., Lahrich S., Bakasse M., El Mhammedy MA. Determination of ibuprofen in tablets and human blood samples: effect of clay in minimizing overvoltage of ibuprofen oxidation. *ChemistrySelect*, 2019, 4, 11282-11287.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Electrochemical Science

journal homepage: www.journals.elsevier.com/ijoes

The validity of using bare graphite electrode for the voltammetric determination of paracetamol and caffeine



Margarita Stoytcheva^{a,*}, Roumen Zlatev^a, Zdravka Velkova^b, Velizar Gochev^c, Claudia Meza^a, Benjamin Valdez^a, Gergana Kirova^b, Yana Hristova^c, Lydia Toscano-Palomar^d

^a Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, México

^b Medical University of Plovdiv, Faculty of Pharmacy, Dep. Chemical Sciences, Plovdiv, Bulgaria

^c Plovdiv University "P. Hilendarski", Faculty of Biology, Dep. Biochemistry and Microbiology, Plovdiv, Bulgaria

^d Instituto Tecnológico de Mexicali, Tecnológico Nacional de México, Mexicali, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Paracetamol
Caffeine
Graphite electrode
Adsorptive stripping voltammetry

ABSTRACT

The validity of applying the readily available bare spectroscopic graphite electrode in the pharmaceutical analysis as a cost-effective, simple, and efficient alternative to the modified carbon-based electrodes was evaluated in this work using paracetamol and caffeine as test analytes. The cyclic voltammetry study on their electrochemical behavior revealed that paracetamol and caffeine display well-expressed oxidation peaks at potentials of typically 0.51 V and 1.36 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat}, correspondingly and that their oxidation is an adsorption-controlled process. Then the bare spectroscopic graphite electrode was applied for the separate and individual determination of the test analytes by differential pulse adsorptive stripping voltammetry. Under optimized experimental conditions (3 min accumulation time, pH 5.0) the electrode exhibited a linear response to paracetamol in the range from 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and to caffeine in the range from 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The detection limit achieved (0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for each of the analytes) was found to be sufficient to carry out paracetamol and/or caffeine analysis in drugs. The results were validated by separate and individual paracetamol and caffeine determinations in commercial tablets with satisfactory recovery values (98.90–101.85 %). The presence of common pharmaceutical excipients did not affect the paracetamol and/or caffeine voltammetric response.

1. Introduction

The strong public interest on drugs quality, safety and efficacy and the regulations introduced by the World Health Organization for pharmaceutical quality assurance [1] provoked the implementation of reliable analytical methods for pharmaceutical quality control, including mainly titrimetric, spectroscopic, chromatographic, and electrochemical techniques (Fig. 1) [2–7].

Among these analytical approaches, the electrochemical ones emerged as very efficient in the pharmaceutical analysis, because of their simplicity, sensitivity, selectivity, short analysis time, and low cost [8–14]. Excellent results in terms of sensitivity and specificity were obtained using modified carbon electrodes (glassy carbon, carbon paste, screen-printed carbon, pencil graphite, and boron-doped diamond) with enhanced analytical performances [12–14]. However, electrode modification frequently

involves laborious and time-consuming, sophisticated fabrication protocols. Moreover, it does not provide satisfactory surface reproducibility and stability. In this context, the application of bare carbon electrodes offers advantages, when high sensitivity is not required. It is noteworthy to mention that the carbon materials-based electrodes are widely used in the electroanalytical chemistry, because of their excellent electrical conductivity, wide potential range, low background current, high active surface, chemical and electrochemical inertness, stability, and low cost. [15–18]. Therefore, the validity of using in the pharmaceutical analysis of the readily available bare spectroscopic graphite electrode of high-purity, uniform uniformity, reproducibility, high mechanical strength, and a reasonable cost was demonstrated in this work. It was applied as working electrode for the voltammetric quantification of paracetamol and caffeine selected as model analytes, as a cost-effective, simple, and efficient alternative to the modified carbon-based electrodes.

* Corresponding author.

E-mail address: margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx (M. Stoytcheva).

<https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100120>

Received 27 January 2023; Received in revised form 12 March 2023; Accepted 20 March 2023

Available online 21 March 2023

1452-3981/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier B.V. on behalf of ESG. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

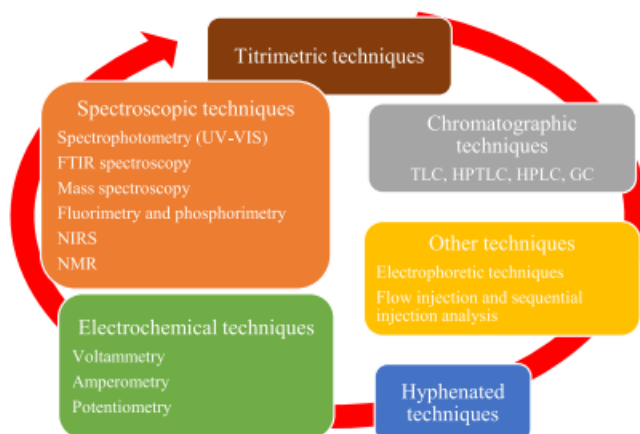


Fig. 1. Analytical techniques in pharmaceutical analysis. FTIR – Fourier transform infrared; NIRS – near infrared spectroscopy; GC – gas chromatography; HPLC – high performance liquid chromatography; HPTLC – high performance thin layer chromatography; NMR – nuclear magnetic resonance; TLC – thin layer chromatography.

Paracetamol is one of the most popular analgesic and antipyretic agents. It is sold "over-the-counter" in multiple drug dosage forms: tablets, capsules, suspensions, and suppositories. Caffeine stimulates the central nervous and the cardiovascular systems, the gastric acid secretion and the diuresis and induces the relaxation of the bronchial muscle. Low doses of caffeine are present as an adjuvant in combination with antidepressant, paracetamol and non-steroidal anti-inflammatory drugs.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Paracetamol (Par, British Pharmacopoeia Reference Standard), caffeine (Caf, British Pharmacopoeia Reference Standard), ethanol (C_2H_5OH), acetic acid (CH_3COOH), sodium acetate, (CH_3COONa), sodium hydroxide (NaOH), and potassium chloride (KCl) were acquired from Sigma and Spectrum Chemical. As the reagents used were of analytical reagent grade (purity $\geq 99\%$), they were not submitted to further purification. Paracetamol and caffeine were dissolved in ethanol to prepare the corresponding stock solutions, which were kept at $4^\circ C$ in the dark. Acetate buffer solutions (Ac 0.1 mol L^{-1}) with different pH values (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, and 6.0) were used as supporting electrolytes. The buffer solutions were obtained by combining suitable volumes of acetic acid and sodium acetate aqueous solutions. pH adjustment was performed by potentiometric titration using sodium hydroxide or acetic acid as titrants.

The drugs Paracetamol (500 mg Par/tablet), Caffeine (200 mg Caf/capsule), and Tempra Boost (mixture of 500 mg Par and 65 mg Caf/capsule) were purchased from the local pharmacies. The test samples were prepared by mixing the content of ten ground tablets or the content of ten capsules and dissolving the weight corresponding to one tablet or capsule in an appropriate amount of ethanol. The so prepared stock solutions were diluted with the supporting electrolyte to obtain the working solutions. The insoluble excipients were removed by filtration.

2.2. Instrumentation and procedures

The electrochemical analyzer model 440 A (CH Instruments Inc., USA) was employed to perform the electrochemical measurements by cyclic

voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). A potential increment of 0.005 V , amplitude of 0.05 V , pulse width of 0.05 s , sampling width of 0.0167 s , and pulse period of 0.5 s were applied to record the DPV voltammograms. The electrolysis cell used for all the electrochemical experiments was equipped with: a spectroscopic pure graphite bare disk electrode (Ringsdorf Werke, Germany, 6 mm in diameter, 13% porosity), acting as working electrode, a platinum wire counter electrode (BASi MW-1033), and a reference Ag, AgCl/KCl_{sat} electrode (BASi MF-2052). The disk surface of the working electrode was polished using a $0.05\text{ }\mu\text{m}$ alumina polishing abrasive (PACE Technologies, USA), degreased with alcohol, and ultrasonically cleaned.

3. Results and discussion

3.1. Paracetamol and caffeine electrochemical behavior

Cyclic voltammetry was applied to explore the electrochemical behavior of paracetamol and caffeine at bare graphite electrode. The cyclic voltammograms were registered in a large range of scan rates (20 mV s^{-1} - 200 mV s^{-1}) at optimized experimental conditions, i.e. in 0.1 mol L^{-1} acetate buffer solution at pH 5.0 and accumulation time of the separate analytes ($100\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) of 3 min at open circuit potential. The paracetamol cyclic voltammograms exhibited a pair of well-defined redox peaks, while the caffeine cyclic voltammograms demonstrated the presence of an oxidation peak only, which misses of respective reduction peak (Fig. 2). In both cases, the increase in scan rate led to a positive shift of the anodic peak potentials, which demonstrates the irreversible character of the electrochemical reactions. The relationships between the paracetamol anodic peak potential (E_{pa} , V) and the logarithm of the scan rate, as well as the relationship between the caffeine anodic peak potential (E_{caf} , V) and the logarithm of the scan rate were found to be linear:

$$E_{par} = 0.0216\ln v + 0.4153 \quad (R^2 = 0.9995)$$

$$E_{caf} = 0.0299\ln v + 1.229 \quad (R^2 = 0.9911),$$

(where v , mV s^{-1} is the scan rate). This is consistent with the Laviron's equation describing the irreversible processes [19]:

$$E_{pa} = E^\circ - \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln \frac{RTk_s}{(1-\alpha)nF} + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \ln v,$$

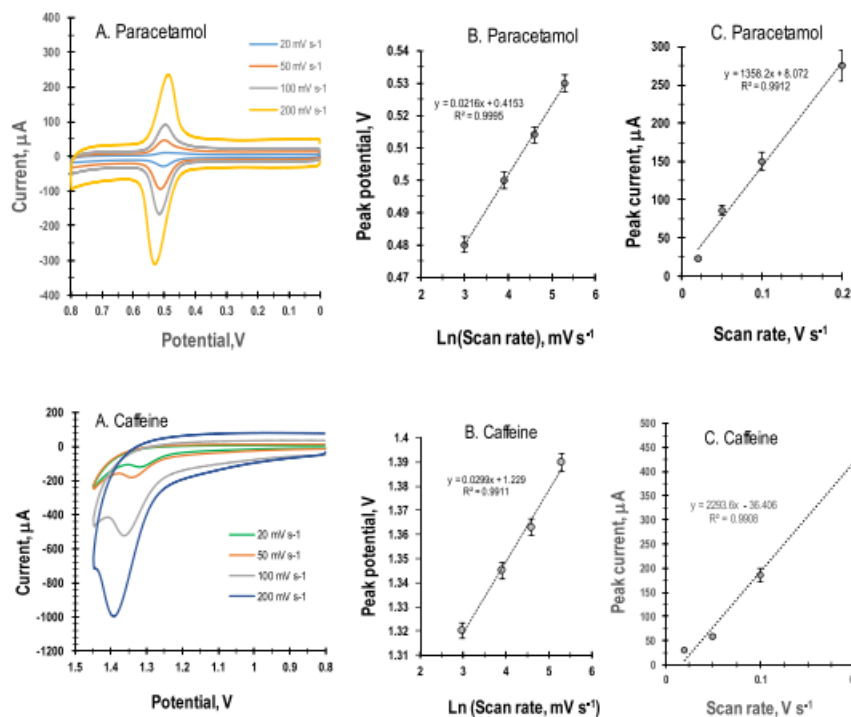
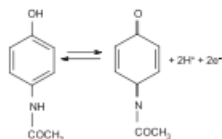
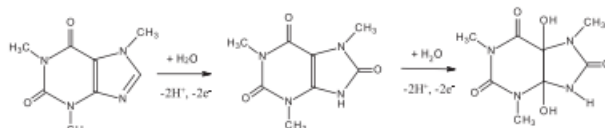


Fig. 2. (A) Cyclic voltammograms of paracetamol (100 μmol L⁻¹) and caffeine (100 μmol L⁻¹) at different scan rates; (B) Anodic peak potential change with the logarithm of the scan rate; (C) Anodic peak current change with the scan rate. At 0.1 mol L⁻¹ at pH 5.0; 3 min accumulation performed at open circuit potential.



Scheme 1. Proposed electrochemical oxidation reaction of paracetamol.

with: E_{pa} (V) - anodic peak potential, E^0 (V) - formal potential, α - electron transfer coefficient, k_s - standard heterogeneous rate constant of the reaction, n - charge transfer number, T - temperature (K), F - the Faraday constant (C mol⁻¹), and R - the gas constant (J mol⁻¹ K⁻¹).



Scheme 2. Proposed electrochemical oxidation reaction of caffeine.

The values of slope of the plots E_{pa} and E_{cat} vs. $\ln v$ (Fig. 2) allowed establishing the charge transfer numbers of the paracetamol and caffeine electrooxidation reactions. They were found to be 2.37 ($n = 2$) and 1.70 ($n = 2$) respectively, by assuming $\alpha = 0.5$. Therefore, paracetamol oxidation occurs, as first reported by Miner et al. [20] and later confirmed in other research works [21–25], in agreement with Scheme 1:

According to the mechanism suggested by Dryhurst and Hansen [26], caffeine is oxidized in two steps: slow 2H⁺, 2e⁻ oxidation of the C-8 - N-9 bond to give the substituted uric acid, followed by fast 2H⁺, 2e⁻ oxidation to the 4,5-diol analog of uric acid, which immediately fragments (Scheme 2). Thus, the rate of the reaction is limited by the first slow step.

On the other hand, as shown in Fig. 2, scan rate increase also produced a linear increase in peak currents, which implies that

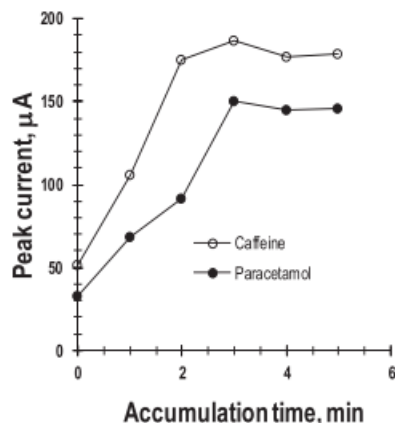


Fig. 3. Paracetamol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) and caffeine ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) peak current variation as a function of the accumulation time. Ac 0.1 mol L^{-1} at pH 5.0.

paracetamol and caffeine oxidation at bare graphite electrode are adsorption-controlled processes.

The surface coverage (the amount of the adsorbed on the electrode surface species) was assessed from the slope of the plot anodic peak current vs. scan rate (Fig. 2), following the equation [27]:

$$I_{pa} = \frac{n^2 F^2}{4RT} A \Gamma \nu$$

where I_{pa} (A) is the anodic peak current, ν (V s^{-1}) is the scan rate, A is the electrode geometric area (0.28 cm^2), and Γ (mol cm^{-2}) is the surface coverage. n , F , R and T have the above mentioned meaning.

The surface concentration of the adsorbed species was calculated as $1.28 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ and $2.16 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ for paracetamol and caffeine, respectively. Paracetamol and caffeine adsorption was attributed to the favorable π - π interactions between the aromatic rings of the analyte molecules and the graphite sheets of sp^2 -bonded carbon atoms.

3.2. Optimization of the experimental conditions

3.2.1. Accumulation time optimization

Paracetamol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$, Ac 0.1 mol L^{-1} at pH 5.0) and caffeine ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$, Ac 0.1 mol L^{-1} at pH 5.0) adsorption at the electrode surface was accomplished at open-circuit potential under stirring (700 rpm) for different time periods (0, 1, 2, 3, 4, and 5 min). The electrochemical response dependency of each of the analytes from the accumulation time was explored by cyclic voltammetry (data not shown). As expected, the peak current increased as the accumulation time increased to reach a maximum at the 3th minute (Fig. 3). Then it slightly declined, which was ascribed to the electrode surface saturation. Henceforward, the optimum time for paracetamol and/or caffeine accumulation was set at 3 min, thus attaining, in that order, approximately 4.5- and 3.5-fold enhancement in peak current. These facts allowed considering the bare graphite electrode as appropriate for paracetamol and/or caffeine quantification by adsorptive stripping voltammetry.

3.2.2. pH Optimization

The electrochemical responses of paracetamol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) and caffeine ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) at bare graphite electrode were optimized by carrying out CV measurements (data not shown) in acetate, phosphate, and Britton-Robinson buffer solutions. As the best signal was obtained in acetate buffer solution, it was selected as the most appropriate for the following experiments. It was observed an increase of the anodic peak current of paracetamol and the anodic peak current of caffeine with pH increase up to 5.0 (Fig. 4). Further pH rise provoked a peak current decrease. Hence, pH 5.0 was set as optimum for the sensitive paracetamol and/or caffeine determination in all the following experiments. As the pK_a value of paracetamol is 9.5 and that of caffeine is 10.4, both analytes are fully protonated within the studied pH range.

On the other hand, as shown in Fig. 4, pH increase led to a negative shift of the oxidation peak potential of paracetamol E_{par} (V) and the oxidation peak potential of caffeine E_{caf} (V). These relationships were found to be linear:

$$E_{par} = -0.066\text{pH} + 0.8364 \quad (R^2 = 0.9955)$$

$$E_{caf} = -0.062\text{pH} + 1.686 \quad (R^2 = 0.9889)$$

The values of the slope of the regression lines were found to be close to 0.059 V/pH . This indicates that an equal number of protons and electrons are involved in the processes of paracetamol and respectively caffeine oxidation.

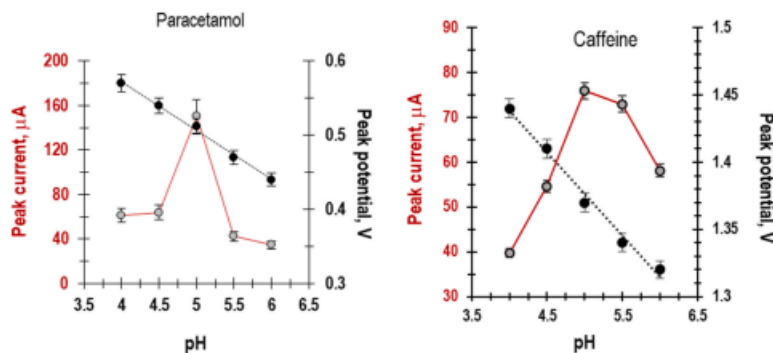


Fig. 4. Paracetamol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) and caffeine ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) anodic peak current and anodic peak potential variation as a function of pH. 3 min accumulation performed at open circuit potential; Ac 0.1 mol L^{-1} .

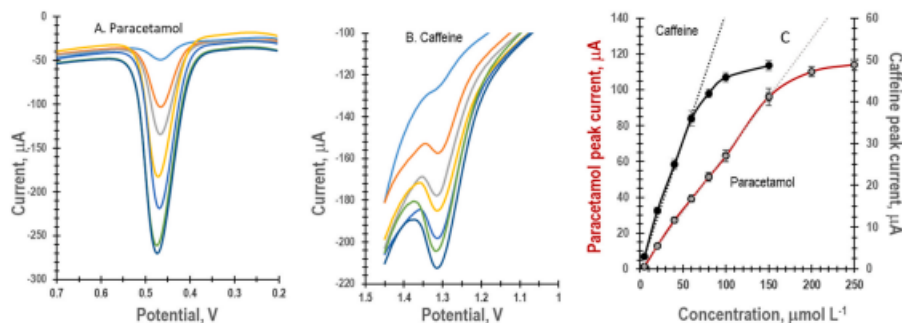


Fig. 5. (A) DPV response of paracetamol (5–250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and (B) DPV response of caffeine (5–150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) with increasing concentrations at bare graphite electrode and (C) the corresponding calibration plots. Ac 0.1 mol L^{-1} at pH 5.0; accumulation time of 3 min at open circuit potential.

3.3. Analytical performances evaluation

DPV was used to evaluate the analytical characteristics of the paracetamol and caffeine determination. The measurements were performed under optimized experimental conditions, i.e. in 0.1 mol L^{-1} acetate buffer solution of pH 5.0 and accumulation time of 3 min at open circuit potential. The DPV responses for the separate determination of various concentrations of paracetamol or caffeine and the corresponding calibration plots are shown in Fig. 5.

The linear dynamic ranges (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for paracetamol and 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for caffeine) were described as follows:

$$I_{\text{Par}} = 0.645x C_{\text{Par}} \quad (R^2 = 0.9973)$$

$$I_{\text{Caf}} = 0.6142x C_{\text{Caf}} \quad (R^2 = 0.9936)$$

where I_{Par} (μA) is the anodic peak current of paracetamol, I_{Caf} (μA) is the anodic peak current of caffeine, C_{Par} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) is the paracetamol concentration, and C_{Caf} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) is the caffeine concentration.

The sensitivities of the separate paracetamol and the separate caffeine determination at bare graphite electrode were found to be similar (0.6450 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ and 0.6142 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$, respectively). The limit of detection (LOD) achieved ($S/N = 3$) was 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for each of the analytes. The analytical performances of the determinations were compared with the latest reported in the literature (2019–2022), as shown in Tables 1 and 2.

It can be noted the large variation of the values of the linear range and the limit of detection for each of the analytes. The presented in this

work results obtained by using a simple and economical bare graphite electrode are comparable with some of the reported in the literature, attained by applying sophisticated and expensive modified electrodes. The limit of detection of 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ achieved is very satisfactory, taking into consideration the high content of paracetamol (200–500 mg) and caffeine (20–200 mg) in the commercially available pharmaceutical formulations. Hence, the analytical application of the bare graphite electrode for paracetamol or caffeine determination can be considered as advantageous. Although bare boron doped diamond (BDD) electrodes were also applied for paracetamol and caffeine quantifications [47–49], they are less appropriate for electroanalytical determinations. BDD is not considered as a typical electrode material and the BDD electrodes are not commercialized in a recognized format. In addition, the electrochemical properties of the BDD depend on the boron doping concentration, the levels of the sp^2 -bonded non-diamond carbon impurity, and the surface treatment [50,51]. The use of BDD electrodes is also restricted by the cost of the manufacturing process.

The DPV response of various concentrations of paracetamol (5–150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in the presence of caffeine (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$, kept constant) and the DPV response of various concentrations of caffeine (5–150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in the presence of paracetamol (150 $\mu\text{mol L}^{-1}$, kept constant) at the bare graphite electrode and the corresponding calibration plots are shown in Fig. 6.

The anodic peak current for paracetamol increased with the increase of its concentration, while the anodic peak current for caffeine remained fairly constant. Similarly, the anodic peak current for caffeine increased with the increase of its concentration, while the anodic peak current for paracetamol remained constant at a fixed paracetamol

Table 1
Comparison of the analytical performances of the paracetamol determination.

Electrode	Method	Linear range $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ref.
PGE/ poly(3-aminophenylboronic acid)-graphene	DPV	0.15–100	0.028	[28]
CPE/TiO ₂	CV	10–70	5.2	[29]
GCE/CNT/NiO	DPV	7.5–3000	0.23	[30]
GCE/AgNP-xGNP	SWV	4.98–33.8	0.0858	[31]
Carbon-loaded ABS	DPV	0–149	2.84	[32]
GPT/WPE	DPV	0.5–100	0.054	[33]
GCE/ZnO	DPV	0.4–24	0.0036	[34]
CPE/MgO	CV	10–100	6.2	[35]
CPE/SWCNT, Nd ₂ O ₃	SWV	0.1–9.5	0.05	[36]
Graphite electrode	DPV	5–150	0.20	This work

ABS - acrylonitrile butadiene styrene; CNT - carbon nanotubes; CPE - carbon paste electrode; GCE - glassy carbon electrode; GPT - graphite powder-nail polish ink; NP - nanoparticles; PGE - pencil graphite electrode; xGNP - exfoliated graphite nanoplatelets; WPE - waterproof paper electrode

Table 2
Comparison of the analytical performances of the caffeine determination.

Electrode	Method	Linear range $\mu\text{mol L}^{-1}$	LOD $\mu\text{mol L}^{-1}$	Ref.
GCE/poly(7AHN2SA)	DPV	10–500	0.23	[37]
GCE/Naf/MWCNT/Fullerene	DPV	10–1000	0.073	[38]
CPE/BuOx/SWCNT	At	0.005–500	0.001	[39]
GCE/BH-MnO ₂ -NF	DPV	0.01–320	0.001	[40]
aGCE	SWV	10–95	2.36	[41]
NCOMCP	DPV	5–600	0.016	[42]
GPE/cork	DPV	0–50	12.25	[43]
Cork-graphite	DPV	2.5–1000	2.94	[44]
Epoxy-graphite composite	SWV	5–150	1.3	[45]
CPE/CeO ₂	DPV	5–80	0.036	[46]
Graphite electrode	DPV	5–60	0.20	This work

aGCE – activated glassy carbon electrode; At – amperometry; CPE – carbon paste electrode; GCE – glassy carbon electrode; GPE – graphite paste electrode; MWCNT – multiwalled carbon nanotubes; Naf – nafion; NCOMCP – nano-cobalt (II, III) oxide modified carbon paste electrode; SWCNT – single walled carbon nanotubes; SWV – square wave voltammetry; 7AHN2SA – 7-amino-4-hydroxynaphthalene-2-sulfonic acid.

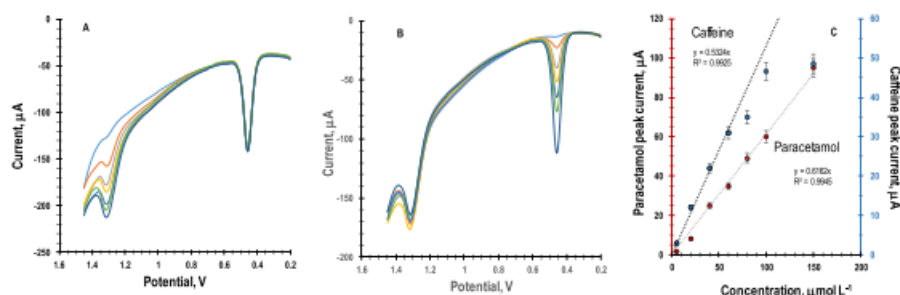


Fig. 6. DPV response of caffeine (5–150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in the presence of 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ paracetamol (A) and paracetamol (5–150 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in the presence of 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ caffeine (B) at bare graphite electrode and the corresponding calibration plots (C). Ac 0.1 mol L^{-1} at pH 5.0; 3 min accumulation at open circuit potential.

Table 3
Comparison of the analytical performances of the simultaneous paracetamol and caffeine determination.

Electrode	Method	Linear range $\mu\text{mol L}^{-1}$		LOD $\mu\text{mol L}^{-1}$		Ref.
		Paracetamol	Caffeine	Paracetamol	Caffeine	
GCE/poly(AHNSA)/SPCE	SWV	10–125	10–125	0.45	0.79	[52]
SPCE	DPV	1.8–22	1.8–22	0.20	0.50	[53]
SPCE	SWV	13.21–224.2	12.84–213.8	1.2	1.7	[54]
aGCE	SWV	10–180	10–95	2.55	2.36	[55]
cell-on-a-chip	DPV	0–148.6	0–115.9	2.84	2.01	[56]
Graphite electrode	DPV	5–150	5.60	0.20	0.20	This work

aGCE – activated glassy carbon electrode; AHNSA – 4-amino-3-hydroxynaphthalene sulfonic acid; SPCE – screen printed carbon electrode.

concentration. The calibration curves for the individual paracetamol and the individual caffeine determinations present a good linear response, described by the following equations:

$$I_{\text{Par}} = 0.6162x_{\text{C}_{\text{Par}}} \quad (R^2 = 0.9945)$$

$$I_{\text{Caf}} = 0.5324x_{\text{C}_{\text{Caf}}} \quad (R^2 = 0.9925)$$

As paracetamol and caffeine both adsorb onto the surface of the electrode, the competition for the adsorption provoked a slight decrease of the sensitivity of their determination (0.6162 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ for Par and 0.5324 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ for Caf) in comparison with the sensitivity of the separate quantification. However, the linear dynamic ranges and the limits of detection were not affected by the insignificant sensitivity decrease and remained acceptable for the individual determination of paracetamol and caffeine in the pharmaceutical preparations, containing both the components (200–500 mg paracetamol and 20–65 mg caffeine).

The selectivity of the paracetamol analysis was affected by the presence of ascorbic acid and that of caffeine – by the presence of ibuprofen, because of peaks overlapping. The commonly used pharmaceutical excipients such as cellulose, lactose, sucrose, starch, and magnesium stearate did not present interferences.

The reproducibility of the determinations was found to be satisfactory (RSD = 4.48 %).

Table 3 provides a comparison of the analytical performances for the simultaneous paracetamol and caffeine determination. The LOD are comparable of that of the modified electrodes.

3.4. Method validation

The validation of the data obtained using bare graphite electrode was achieved by applying the developed analytical protocol for the

Table 4

Real samples analysis (average of three determinations) by DPV at bare graphite electrode at optimum conditions.

Commercial sample	Compound	Amount		
		Label value, mg	Found, mg	% detected
Paracetamol	Paracetamol	500	502.5 ± 2	100.50
Caffeine	Caffeine	200	197.8 ± 2	98.90
Tempra Boost	Paracetamol	500	497.3 ± 2	99.46
	Caffeine	65	66.2 ± 2	101.85

separate and individual determination of paracetamol and/or caffeine in three commercially available pharmaceutical preparations. As data presented in Table 4 demonstrate, the paracetamol and caffeine amounts found are in accordance with the announced by the manufacturer. These results indicate that the suggested methodology and the suggested sensing platform are suitable for paracetamol and/or caffeine analysis in drugs. The results of the performed recovery tests, varying in the range of 98–102 %, confirmed the accuracy of the determination. The slight change of pH (5.0 ± 0.2) did not affect the results, which confirms the robustness of the method.

4. Conclusion

In this work was explored the potential of the bare spectroscopic graphite electrode as a sensing platform in the pharmaceutical analysis. The validity of using it was demonstrated by applying it for the voltammetric determination of paracetamol and caffeine, selected as model analytes. Advantages were taken of its efficiency, availability, and low cost, avoiding complex, time-consuming and expensive electrode modification procedures, as well as storage and long-term stability problems. The evaluation of its analytical performances confirmed, that it is suitable for the separate and individual determination of paracetamol and caffeine in a large linear dynamic range ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$ - $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ - $60 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively) with a LOD of $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ for each of them. The test analytes determinations in commercial tablets with satisfactory recovery values (98–102 %) proved its applicability for real samples analysis and allowed consider the bare graphite electrode as a viable alternative to the modified carbon-based electrodes in the electrochemical quantification of drugs.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] World Health Assembly, 24. (1971). Quality, safety and efficacy of drugs. World Health Organization. (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/91911>).
- [2] M.R. Siddiqui, Z.A. AlOthman, N. Rahman, Arab. J. Chem. 10 (2017) S1409.
- [3] S. Sharma, N. Singh, A.D. Ankalgil, A. Rana, M.S. Ashawat, J. Drug Deliv. Ther. 11 (2021) 121.
- [4] A. Chavon, R. Gandhimathi, Int. J. Pharm. Sci. Res. 13 (2022) 61.
- [5] S. Ahmed, Md.S. Islam, B. Ullah, S.K. Biswas, Md.A.S. Azad, Md.S. Hossain, Orient. J. Chem. 36 (2020) 01.
- [6] D. Jindal, Hardeep, Pallvi, R.K. Patil, H.C. Patil, IJRAR 7 (2020) 853.
- [7] B. Davani, Common Methods in Pharmaceutical Analysis, in: B. Davani (Ed.), Pharmaceutical Analysis for Small Molecules, 1st edition, John Wiley & Sons, Inc., 2017, pp. 37–57.
- [8] V.K. Gupta, R. Jain, K. Radhapyari, N. Jadon, S. Agarwal, Anal. Biochem. 408 (2011) 179.

- [9] B. Uslu, S.A. Ozkan, Anal. Lett. 44 (2011) 2644.
- [10] B. Dogan-Tiptal, S.A. Ozkan, B. Uslu, Open Chem. Biomed. Methods J. 3 (2010) 56.
- [11] E.T.G. Cavalcete, C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, O. Fatibello-Filho, Biosens. Rev. 4 (2012) 31.
- [12] A.A. Al-rasbdi, O.A. Farhaly, A.H. Naggat, J. Chem. Pharm. Res. 10 (2018) 21.
- [13] L. Qian, S. Durairaj, S. Prins, A. Chen, Biosens. Bioelectron. 175 (2021) 112836.
- [14] P.A. Pushpanjali, J.G. Manjunatha, N. Hareesha, J. Electrochem. Sci. Eng. 11 (2021) 161.
- [15] J. Wang, Analytical Electrochemistry, 2nd edition, Wiley-VCH, New York, USA, 2009.
- [16] G.C. Mello, E.M. Pinto, E.A. Porzio, F.S. Semaan, Sailing in a cost-effective electron sea, in: Q.C. Campbell (Ed.), 1st edition, Graphite: Properties, Occurrences and Uses, vol. 1, Nova Publisher, New York, 2013, pp. 189–214.
- [17] R.S. Oliveira, A.L.M. Azevedo, W.F. Pacheco, F.S. Semaan, E.A. Pontuo, Practical electroanalysis: overcoming drawbacks and going further, in: Yuki Saito, Takumi Kikuchi (Eds.), 1st edition, Voltammetry: Theory, Types and Applications, vol. 1, Novapublisher, New York, 2014, pp. 171–198.
- [18] S. Michalkiewicz, A. Skorska, M. Jakubczyk, Materials 14 (2021) 7630.
- [19] E. Laviron, J. Electroanal. Chem. 101 (1979) 19.
- [20] D.J. Miner, J.R. Rice, R.M. Riggins, P.T. Kissinger, Anal. Chem. 53 (1981) 2258e2263.
- [21] J.J. Van Benchtelen, J.V. Lewis, W.R. Heineman, D.A. Roston, P.T. Kissinger, J. Chem. Educ. 60 (1983) 772.
- [22] T. Luczak, N. J. Chem. 41 (2017) 5713.
- [23] N.T.A. Thu, H.V. Duc, N.H. Phong, N.D. Cuong, N.T.V. Hoan and D.Q. Khieu, J. Nanomaterials, (2018) Article ID 7619419.
- [24] Y. Li, S.M. Chen, Int. J. Electrochem. Sci. 7 (2012) 2375.
- [25] O. Koyun, S. Gurdur, M.B. Arvas, Y. Sahin, Russ. J. Electrochem. 54 (2018) 796.
- [26] G. Deyhust, B. Hansen, J. Electroanal. Chem. 30 (1971) 407.
- [27] A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001.
- [28] D.T. Burns, N. Tungkanamuruk, S. Kasemsunran, K. Tungkanamuruk, Kasetsart J. (Nat. Sci.) 38 (2004) 510.
- [29] K.G. Manjunatha, B.E. Kumara Swamy, H.D. Madhuchandra, K.A. Vishnumurthy, Chem. Data Collect. 31 (2021) 100604.
- [30] K. Annadurai, V. Sudha, G. Marudados, R. Thangamuthu, J. Alloy. Comp. 852 (2021) 156911.
- [31] F. Zamarchi, L.C. Vieira, J. Pharm. Biomed. Anal. 196 (2021) 113912.
- [32] V. Katseli, A. Economou, C. Kokkino, Talanta 20583 (2020) 1203878.
- [33] J.R. Camargo, I.A. Andreotti, C. Kalinke, J.M. Henrique, J.A. Bonacin, R.C. Janegitz, Talanta 208 (2020) 120458.
- [34] R.M. Hanabazari, S.M. Tuwar, S.T. Nandibewoor, J.I. Gowda, Chem. Data Collect. 30 (2020) 100540.
- [35] K.G. Manjunatha, B.E. Kumara Swamy, H.D. Madhuchandra, K.J. Gururaj, K.A. Vishnumurthy, Sens. Int. 2 (2021) 100127.
- [36] V. Arancibia, J. Penagos-Llanos, E. Nagles, O. García-Beltrán, J.J. Hurtado, J. Pharm. Anal. 9 (2019) 62.
- [37] A. Geto, C.M.A. Brett, Food Anal. Methods 14 (2021) 2386.
- [38] K.Y. Tajeri, L.M. Dongmo, L.K. Tonle, Am. J. Anal. Chem. 11 (2020) 114.
- [39] L.G. Shaidarova, I.A. Chelnokova, M.A. Il'ina, G.F. Makhmutova, F.F. Akhmatkhanova, H.C. Budnikov, J. Anal. Chem. 75 (2020) 743.
- [40] N.A. Nia, M.M. Ferooghi, S. Jahani, Talanta 222 (2021) 121563.
- [41] T.Y. Feyisa, S.A. Kite, D. Yenealem, G. Gebretsadik, Anal. Bioanal. Electrochem. 12 (2020) 93.
- [42] A.M. Fekrya, M. Shehata, S.M. Azab, A. Walcarus, Sens. Actuators: B. Chem. 302 (2020) 127172.
- [43] M.K.S. Monteiro, E.C.M.M. Santos, D.R. Silva, C.A. Martinez-Huile, E.V. dos Santos, J. Solid State Electrochem. 24 (2020) 1789.
- [44] M.K.S. Monteiro, S.S.M. Paiva, D.R. da Silva, V.J.P. Vilar, C.A. Martinez-Huile, E.V. dos Santos, J. Electroanal. Chem. 839 (2019) 283.
- [45] L.A. Furtado, M.C.O. Gonçalves, C.V.M. Inocencio, E.M. Pinto, D.I. Martins, F.S. Semaan, J. Anal. Methods Chem. (2019) Article ID 8596484, 11 pages.
- [46] N.R.M. Santhosh, S. Manjunatha, M. Shivakumar, M.S. Dharmaprakash, S. Manjappa, J. Electrochem. Soc. 167 (2020) 047503.
- [47] R.C. Lourenço, R.A. Medeiros, R.C. Rocha-Filho, L.H. Mazo, O. Fatibello-Filho, Talanta 78 (2008) 748.
- [48] A. Yijit, Y. Yardim, Z. Şentürk, IEEE Sens. J. 16 (2015) 1674.
- [49] P. Niedziałkowski, Z. Cebula, N. Malinowska, W. Białobrzaska, M. Sobaszek, M. Ficek, R. Bogdanowicz, J.S. Anand and T. Osowski, Biosens. Bioelectron., 126 (2019) 308–314.
- [50] K. Muzyka, J. Sun, T.H. Ferreira, Y. Luo, W. Zhang, G. Xu, Anal. Methods 11 (2019) 397.
- [51] M. Yence, A. Cetinkaya, G. Ozelcikay, S.I. Kaya, S.A. Ozkan, Crit. Rev. Anal. Chem. 52 (2022) 1122.
- [52] M. Tefera, A. Geto, M. Tessema, S. Admasie, Food Chem. 210 (2016) 156.
- [53] P. Clares, C. Pérez-Rodríguez, N. Serrano, J.M. Díaz-Cruz, Chemosensors 10 (2022) 95.
- [54] K. Cortes, J.J. Trivino, V. Arancibia, Electroanalysis 35 (2023) e202200484.
- [55] T.Y. Feyisa, S.A. Kite, D. Yenealem, G. Gebretsadik, Anal. Bioanal. Chem. 12 (2020) 93.
- [56] V. Katseli, A. Economou, C. Kokkino, Talanta 208 (2020) 120388.