

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ESTUDIO DEL EFECTO DEL TIPO DE LÍQUIDO IÓNICO EN EL
DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE ELECTRODOS
MODIFICADOS, CON FINES ANALÍTICOS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Química y Memoria para optar al Título de Químico
por:**

VIVIANA FRANCISCA MONCADA VARGAS

Director de Tesis: Dr. Alejandro Álvarez Lueje

Santiago-CHILE

Junio 2014

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

VIVIANA FRANCISCA MONCADA VARGAS

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química y Título de Químico, en el examen público rendido el día 4 de junio de 2014.

Director de Tesis:

Dr. Alejandro Álvarez Lueje

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Soledad Bollo

Prof. María Inés Toral

Dr. Ricardo Salazar

Esta Tesis fue financiada por el Proyecto Fondecyt N° 1110182

AGRADECIMIENTOS

Después de un largo y difícil trabajo, llega el necesario momento de agradecer, y hay una persona que sin lugar a dudas es la primera en que pienso, esa persona es mi Mamá (*María Margarita*), sin ella nada de esto sería posible, gracias por todo el esfuerzo y sacrificio, por brindarme tanto amor, comprensión y apoyo incondicional en cada momento de mi vida. Siempre me dices que todas mis penas también son tuyas, pero ahora yo te digo, que todos mis logros también son tuyos.

A mis hermanos a quienes de verdad admiro y amo, a Claudia, David y Gerardo por ayudarme siempre, no olvido cada una de las cosas que han hecho por mí. A mis sobrinos por alegrarme la vida y demostrarme siempre tanto cariño, a Francisca, Pamela, Benjamín, Gonzalo, Josefa, Amparo y Amanda. A mis cuñados que son también parte importante de mi vida, a Marcelo, Alejandra y Jeanette.

A mi director de Tesis, Alejandro Álvarez, por permitirme formar parte de este proyecto y brindarme siempre el apoyo, la dedicación y ayuda en el desarrollo de este trabajo, por ser tan cercano y hacernos sentir un equipo en el laboratorio.

A la comisión que se encargó de evaluar y perfeccionar esta Tesis, a Soledad Bollo, María Inés Toral y Ricardo Salazar, les agradezco enormemente todos sus aportes y comentarios, que siempre fueron constructivos y motivadores.

A mis amigas, a quienes conocí los primeros años de universidad, en la Facultad de Ciencias, personas maravillosas que llegaron a mi vida y que aun forman parte de ella, a Nataly, Patty, Priscilla, Yanina, Francisco, Fernanda y Karen, ustedes son de las

mejores cosas que gané en esta universidad y espero que nunca abandonemos nuestras juntas.

A mis compañeros del laboratorio de análisis de fármacos, Patricia, Magdalena, Claudio, Bárbara y Carla por los momentos de trabajo y diversión, sé que hemos formado importantes lazos que se mantendrán en el tiempo. Principalmente quiero agradecer a Magda y Claudio, gracias por darse el tiempo en sus ajetreadas vidas de escucharme, y compartir tanto problemas surgidos de este trabajo, como de la vida misma.

Al laboratorio de Bioelectroquímica, a Soledad Bollo, Claudia Yáñez, Paulina Cañete, Camila Gutiérrez y Daniela Báez, por los hermosos momentos vividos en congresos, cumpleaños, simposios, despedidas, etc. Especialmente a Paulina por su ayuda en las imágenes SECM y por su disposición y muy buena voluntad.

A mis tías favoritas, Yolanda y Amanda, porque han formado siempre parte importante de mi vida, por su apoyo y por regalarme tanto, las quiero mucho.

A Gabita por acompañarme en muchas noches de estudio sin moverse de mi lado y a Matilda por entregarme tanta energía y amor en todo momento.

Y por último, pero no menos importante, a Cristian Erices, por ayudarme en todas las matemáticas y físicas que tuve que pasar, sin importar el tiempo necesario para que mi cabecita entendiera tan agradables materias, por creer en mí y decirme siempre; tu puedes !!, por aguantarme en los momentos de extrema sensibilidad (principalmente en esta última etapa) y por ser mi compañero amado, ya por 10 años, casi de corrido.

*Una etapa se termina, muchos recuerdos me llevo,
para comenzar el resto de mi vida....Gracias y éxito a todos.*

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1 MATERIALES	13
2.1.1 Líquidos iónicos	13
2.1.2 Fármacos.....	14
2.1.3 Reactivos y disolventes	15
2.1.4 Disoluciones tampón	15
2.1.5 Material de vidrio	16
2.1.6 Instrumental de uso general y otros materiales.....	16
2.1.7 Equipos.....	16
2.2 MÉTODOS.....	17
2.2.1 Preparación de disoluciones.....	17
2.2.2 a. Preparación de las pastas de carbono	19
2.2.2 b. Preparación de las pastas de carbono modificadas con líquidos iónicos.....	19
2.2.3 Voltamperometría cíclica	20
2.2.4 Voltamperometría de pulso diferencial	22
2.2.5 Cronoculombiometría	24
2.2.6 Caracterización morfológica de los electrodos	26

2.2.7 Desarrollo de la metodología electroanalítica.....	27
2.2.8 Aplicación a formas farmacéuticas	28
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1 Selección y caracterización de las superficies modificadas con LI.....	30
3.2 Caracterización de las superficies	37
Capacitancia de los electrodos	37
Determinación del área electroactiva	39
Microscopía de barrido electrónico (SEM).....	40
Microscopia de barrido electroquímico (SECM)	43
3.3 Desarrollo de metodologías analíticas.....	45
Levodopa	45
Efecto del pH sobre la respuesta voltamperométrica de levodopa.....	47
Estudio de acumulación.....	49
Estudio de la fuerza iónica	50
Acetaminofeno.....	53
Efecto del pH sobre la respuesta voltamperométrica de acetaminofeno.....	56
Estudio de acumulación.....	56
Estudio de la fuerza iónica.....	57
Nitrendipino.....	61
Efecto del pH sobre la respuesta voltamperométrica de nitrendipino.....	63
Figura 36. Efecto del pH en el potencial de pico (A) y en la corriente (B) de la señal de nitrendipino 5×10^{-5} M en TBR (VPD).	64
Estudio de acumulación.....	64
Estudio de la fuerza iónica.....	65
3.4 Aplicación de las metodologías desarrolladas en formulaciones farmacéuticas	70
4. CONCLUSIONES	74
5. REFERENCIAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de LI más utilizados en la modificación de electrodos.....	6
Figura 2. Publicaciones de electrodos modificados con LI hasta abril del año 2014 (fuente: Web of Science).	7
Figura 3. Voltamperogramas para dobesilato de calcio (A) y rutina (B). A: VC con EPC (a) y EPC-LI (b). B: VC con EPC (a), rutina $5,0 \times 10^{-5}$ M, pH 2,5 (b) y EPC-LI en disolución tampón (c). Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1}	8
Figura 4. Estructuras químicas de ferroceno (A) y de ferrocenometanol (B).	30
Figura 5. Estructura química del ferricianuro de potasio.	31
Figura 6. Estructura química del hexamin rutenio III cloruro.	32
Figura 7. VC para ferricianuro de K (A), ferrocenometanol (B) y hexamin rutenio (C) con EPC-BmimBF4 y EPC 95/5.	34
Figura 8. VC para ferricianuro de K (A), ferrocenometanol (B) y hexamin rutenio (C) con EPC-PyrPF6 y EPC 95/5.	35
Figura 9. VC para ferricianuro de K (A), ferrocenometanol (B) y hexamin rutenio (C) con EPC-BmimBF4 y EPC 70/30.	36
Figura 10. VC para ferricianuro de K (A), ferrocenometanol (B) y hexamin rutenio (C) con EPC-PyrPF6 y EPC 70/30.	36
Figura 11. VC de TBR 0,1 M a pH 7,4 con EPC y EPC-BmimBF4 (A) y con EPC y EPC-PyrPF6 (B).	38
Figura 12. Carga vs tiempo para ferricianuro de potasio con EPC y EPC-BmimBF4 (A) y EPC-PyrPF6 (B).	40
Figura 13. Imágenes SEM de PC (A) y PC-BmimBF4 (B), aumento de 5000 X y PC (C), PC-BmimBF4 (D), aumento de 500 X.	41
Figura 14. Imágenes SEM de PC (A), PC-PyrPF6 (B), aumento de 10.000 X y PC (C), PC-PyrPF6 (D), aumento de 500 X.	42
Figura 15. SECM bidimensional y tridimensional para EPC.....	43

Figura 16. SECM bidimensional y tridimensional para EPC-BmimBF4.....	44
Figura 17. SECM bidimensional y tridimensional para EPC-PyrPF6.	44
Figura 18. Estructura química de la levodopa.	46
Figura 19. VPD levodopa 1×10^{-4} M con EPC, EPC-BmimBF4 y EPC-PyrPF6 a pH 2 y 2 min de acumulación.....	47
Figura 20. Efecto del pH en la señal de oxidación de levodopa (VPD).	48
Figura 21. Efecto del pH en el potencial de pico (A) y en la corriente de pico (B) de la señal de levodopa (VPD).....	48
Figura 22. (A) Influencia del tiempo de acumulación en la corriente de pico de levodopa, (B) VPD de levodopa a distintos tiempos de acumulación.	49
Figura 23. Influencia de la fuerza iónica del medio en la señal de levodopa 1×10^{-4} M.....	50
Figura 24. (A) VPD de levodopa 1×10^{-4} M con el electrodo modificado y sin modificar, 4 min de acumulación y TBR pH 4. (B) VDP de levodopa 1×10^{-4} M y el blanco (TBR 0,1 M) medidos con el electrodo modificado.	52
Figura 25. Curva de calibración de levodopa a pH 4,0 (TBR) y 4 min de acumulación.	52
Figura 26. Estructura química de acetaminofeno.	54
Figura 27. VPD de acetaminofeno 1×10^{-4} M a pH 7 (A) EPC, EPC-BmimBF4 y EPC-PyrPF6. (B) EPC y EPC-PyrPF6.	55
Figura 28. Efecto del pH en el potencial (A) y en la corriente pico (B) de la señal de oxidación de acetaminofeno (VPD).	56
Figura 29. Influencia del tiempo de acumulación en la corriente de pico de acetaminofeno.	57
Figura 30. VPD de acetaminofeno 1×10^{-4} M a distintas concentraciones de TBR pH 7,0 con 2 min de acumulación.	58
Figura 31. VPD de acetaminofeno 1×10^{-4} M medidos con el electrodo modificado y sin modificar, 2 min de acumulación y TBR pH 7.....	59
Figura 32. VPD de acetaminofeno 1×10^{-4} M y TBR 0,1 M pH 7 medidos con el electrodo modificado.	59

Figura 33. Curva de calibración de acetaminofeno.	60
Figura 34. Estructura química de nitrendipino.	62
Figura 35. Efecto del pH en la señal de nitrendipino 5×10^{-5} M (VPD).	63
Figura 36. Efecto del pH en el potencial de pico (A) y en la corriente (B) de la señal de nitrendipino 5×10^{-5} M en TBR (VPD).	64
Figura 37. Influencia del tiempo de acumulación en la corriente de pico de nitrendipino a distintos tiempos.	64
Figura 38. VPD de nitrendipino 5×10^{-5} mol/L con 5 min de acumulación previa a distintas concentraciones de TBR a pH 1,56.	65
Figura 39. (A) VPD nitrendipino 5×10^{-5} M a pH 1,56 con EPC y EPC-BmimBF ₄ . (B) VPD nitrendipino 5×10^{-5} M y TBR 0,1 M (pH 1,56) medido con EPC-BmimBF ₄	66
Figura 40. Curva de calibración de nitrendipino.	67
Figura 41. (A) VDP de levodopa en el producto Prolopa [®] HBS, (B) VDP de levodopa en el producto Prolopa [®] HBS y benserazida a la concentración encontrada en la muestra estudiada.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de operación para VC.....	21
Tabla 2. Condiciones de operación para VPD.....	22
Tabla 3. Formulaciones farmacéuticas utilizadas en las valoraciones.....	29
Tabla 4. Corrientes de pico determinadas con los EPC A y EPC B.....	32
Tabla 5. Corrientes de pico determinadas para los mediadores redox.....	33
Tabla 6. Valores de capacitancia para las superficies modificadas y sin modificar.....	39
Tabla 7. Valores de área electroactiva para las superficies modificadas y sin modificar.....	40
Tabla 8. Parámetros de eficiencia analítica para el método desarrollado por VPD para la determinación de levodopa.....	53
Tabla 9. Parámetros de eficiencia analítica para el método desarrollado por VPD para la determinación de acetaminofeno.....	61
Tabla 10. Parámetros de eficiencia analítica para nitrendipino.....	68
Tabla 11. Comparación de LDs encontrados con otras técnicas.....	69

RESUMEN

En esta Tesis se desarrollaron electrodos de pasta de carbono (PC) modificados con líquidos iónicos (LI): dos de tipo imidazolio (1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato y hexafluorofosfato) y dos de tipo piridinio (1-butil-4-metilpiridinio tetrafluoroborato y hexafluorofosfato), para su empleo con fines analíticos. Las superficies de PC modificadas se caracterizaron por voltamperometría cíclica (con mediadores redox clásicos como ferrocenometanol), microscopía de barrido electrónico y de barrido electroquímico.

Con los electrodos modificados seleccionados se realizaron estudios del comportamiento electroquímico de tres fármacos de amplio uso y de reconocida actividad redox: levodopa, acetaminofeno y nitrendipino. En todos los casos, el comportamiento anódico o catódico de cada fármaco en los electrodos modificados fue similar al de los electrodos no modificados, en lo que a reversibilidad y dependencia de potenciales de pico vs pH se refiere, cuando fueron estudiados empleando voltamperometría cíclica (VC) y de pulso diferencial (VPD). La principal diferencia entre el uso de electrodos modificados vs no modificados, fue la mayor respuesta en corriente. Para levodopa el incremento fue de más del doble, y para acetaminofeno y nitrendipino en 20 y 17 veces, respectivamente.

De acuerdo al comportamiento electroquímico de cada fármaco, se desarrollaron metodologías analíticas empleando VPD. En términos generales las reproducibilidades presentaron coeficientes de variación $< 5,4 \%$ y con límites de detección de $0,63 \mu\text{g/mL}$, 51 ng/mL y 25 ng/mL para levodopa, acetaminofeno y nitrendipino, respectivamente. Las metodologías analíticas desarrolladas se aplicaron en la cuantificación de cada fármaco en su forma farmacéutica, sin interferencias de los excipientes de las formulaciones y con porcentajes encontrados acordes con lo declarado por los fabricantes.

SUMMARY

In this thesis, carbon paste (CP) electrodes modified with ionic liquids (IL) were developed: two IL of imidazolium type (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and hexafluoro phosphate) and two of pyridinium type (1-butyl-4-methylpyridinium tetrafluoro borate and hexafluorophosphate), to their use for analytical purposes. The modified CP surfaces were characterized by cyclic voltammetry (with classical redox mediators as ferrocenemethanol), scanning electron and scanning electrochemical microscopy.

With the selected modified electrodes, were performed studies of the electrochemical behaviour of three drugs widely used and of recognized redox activity: levodopa, acetaminophen and nitrendipine. In all cases, the anodic or cathodic behaviour of each drug in the modified electrodes was similar to that of non-modified electrodes, in which reversibility and dependence on the peak potential vs. pH refers when they were studied using cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). The main difference between the uses of modified vs. unmodified electrodes was a higher response in peak current. The response was increased more than twice, 20 and 17 times for levodopa, acetaminophen and nitrendipine, respectively.

Based on the electrochemical behaviour of each drug, DPV analytical methodologies were developed, finding in general terms reproducibilities with coefficient of variations < 5.4% and detection limits of 0.63 µg/mL, 51 ng/mL and 25 ng/mL for levodopa, acetaminophen and nitrendipine, respectively. Finally, the developed analytical methods were tested in the quantification of each drug in pharmaceutical form, finding on the one hand that the excipients of the formulations do not interfere in the determination of each drug and on the other hand, values consistent with the percentages found declared by the manufacturer.

1. INTRODUCCIÓN

Los métodos de análisis voltamperométricos se basan en la medición de la dependencia de la corriente sobre el potencial de un electrodo, donde el potencial se relaciona con las propiedades cualitativas y la corriente con las cuantitativas; por tanto los compuestos pueden ser selectivamente detectados y cuantificados por estos métodos. La principal ventaja de las técnicas voltamperométricas es su precisión, sensibilidad y amplio intervalo dinámico.

En electroquímica de estado sólido, el interés se centra en los materiales sólidos depositados sobre (o formados) en el electrodo, en contacto con un líquido o, eventualmente, de un electrolito sólido. En las técnicas voltamperométricas se utilizan diferentes electrodos sólidos como electrodos de trabajo, como carbono (carbón vítreo, pasta de carbono o fibra de carbono) y electrodos metálicos (oro, cobre, etc.). La selección de la superficie depende de la aplicación, siendo los más utilizados los de carbón vítreo¹ y pasta de carbono (PC)^{2,3}. Los electrodos de pasta de carbono (EPC) tienen una larga data, teniendo un líquido hidrofóbico como uno de sus componentes, son utilizados desde hace más de cincuenta años y corresponden a una herramienta muy extendida en electroanálisis^{4,5}. Como se mencionó anteriormente, una parte significativa de la electroquímica de estado sólido se concentra en la unión de materiales sólidos a la superficie de un electrodo inerte: este proceso se llama modificación de electrodos^{2,4}. En el campo de aplicación de diversas técnicas voltamperométricas, se puede conseguir una disminución de los límites de detección, principalmente mediante el uso de electrodos modificados. La modificación de superficies utilizadas como electrodos proporcionan

cierto tipo de control, sobre cómo el electrodo interactúa con su entorno. Dado que es posible modificar electrodos, el rendimiento de éste no se limita al material o el potencial aplicado.

La PC también se puede modificar con dos o incluso más componentes, lo cual es el caso de la PC empleada en biosensores³ que contienen una enzima (o su soporte), junto con un mediador adecuado. La cantidad de modificador en la pasta por lo general varía entre 10 a 30 % (p/p), en función de la naturaleza del agente modificador y su capacidad de formar suficientes sitios activos en la pasta modificada (por ejemplo grupos funcionales inmovilizados en la superficie del electrodo o moléculas de extractante). La PC definitivamente representa uno de los materiales más adecuados para la preparación de electrodos modificados. A diferencia de las modificaciones bastante complejas de los sustratos sólidos, la preparación de electrodos químicamente modificados de PC es sencilla, normalmente por diversos procedimientos alternativos. El modificador puede ser disuelto directamente en el aglutinante o mezclado mecánicamente con la pasta durante su homogeneización. También es posible sumergir las partículas de grafito con una disolución de un modificador y después de evaporar el disolvente. El polvo de carbono impregnado se utiliza para preparar el electrodo. Por último, las pastas ya preparadas pueden ser modificadas *in situ*.

La modificación química ha proporcionado una forma de gran eficacia para ajustar el rendimiento de las superficies utilizadas como electrodos. Esto ha sido particularmente importante en la química electroanalítica, cuya adaptación ha proporcionado vías de mejoramiento de la selectividad, resistencia al envenenamiento del electrodo, concentración de especies, mejora de las propiedades electrocatalíticas y además, limitando el acceso de interferentes en muestras complejas. En general, la razón principal

para modificar un electrodo es obtener nuevos sensores con propiedades deseadas, con frecuencia predefinidas. Por lo tanto, la sensibilidad y la selectividad de análisis electroquímico se pueden mejorar considerablemente utilizando estos electrodos.

Entre los modificadores más novedosas se encuentran los líquidos iónicos (LI), que incluyen una amplia clase de sales que se funden, a/o por debajo de 100 °C. Los LI a temperatura ambiente, corresponden con una división de LI que se encuentran en este estado a temperatura ambiente. Las propiedades características de estos líquidos, son el resultado directo de que están compuestas totalmente de iones. En consecuencia, el LI puede actuar de manera muy diferente a los líquidos moleculares comunes, cuando se usan como disolventes^{4,6}.

Las propiedades de los LI incluyen: amplio intervalo líquido, bajas volatilidades, buena estabilidad térmica, conductividad electrolítica, amplia gama de viscosidades, reutilización y no inflamabilidad^{3,7-9}. En la Figura 1 se muestran algunas de las estructuras químicas de los LI empleados en electroquímica como modificadores de electrodos¹⁰⁻¹³, siendo uno de los más utilizados el 1-butil-3-metilimidazol hexafluorofosfato (BmimPF₆)^{14,15}.

Además, los LI tienen propiedades electroquímicas tales como elevada conductividad iónica, baja volatilidad y una amplia ventana de potencial electroquímico; ésta es considerada una de las características más importante de los LI en cuanto a su papel como disolvente¹⁶⁻¹⁸. Sin embargo, sus aplicaciones en electroanálisis se han expandido rápidamente sólo en los últimos años, y existen pocos reportes acerca de las aplicaciones farmacéuticas.

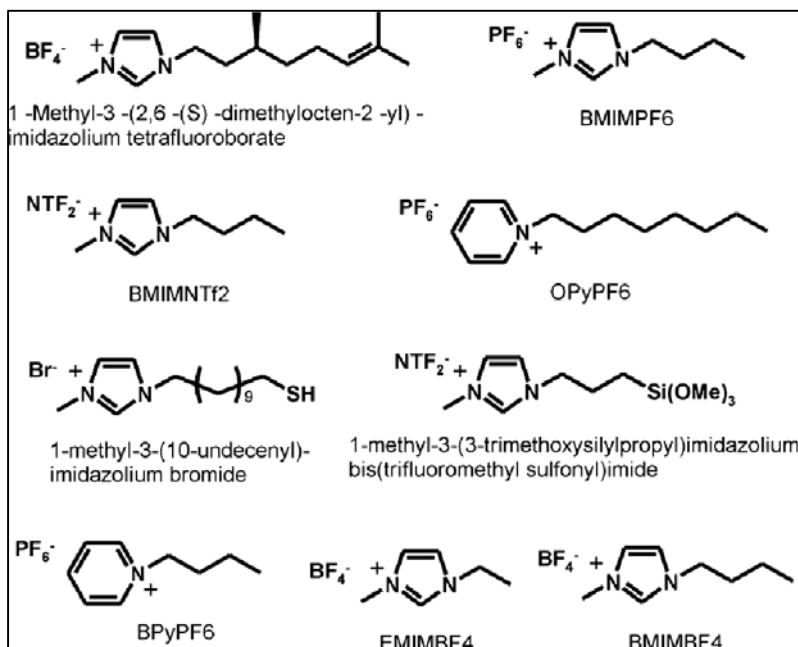


Figura 1. Ejemplos de LI más utilizados en la modificación de electrodos.

Contrariamente a los disolventes orgánicos típicos, los LI se caracterizan por no ser inflamables y poseer una baja presión de vapor, por lo tanto, son seguros y fáciles de trabajar inmersos en una disolución acuosa electrolítica.

La elevada viscosidad de los LI se emplea para su aplicación en electrodos de pasta de carbono. En la mayoría de los casos, estos electrodos modificados se comparan contra los electrodos clásicos de pasta de carbono. Típicamente, tanto los electrodos desnudos como los modificados se preparan por mezcla o molienda de partículas de grafito con el LI¹⁹ y colocando la mezcla en una cavidad de polímero o tubo de vidrio. Tras el pulido, el electrodo está listo para usar. La relación de LI/partículas de grafito tiene que ser optimizada desde el punto de vista no sólo de la estabilidad mecánica, sino también de la corriente capacitiva y la resistencia.

A principios del siglo veintiuno, existían sólo algunas publicaciones de electrodos modificados con LI, pero a partir del año 2007 se observa un incremento en el empleo de los LI, haciéndose cada vez más reconocidos, producto de las ventajas de su utilización (Figura 2). De esta forma, la aplicación de los LI se ha incrementado enormemente en el último tiempo, pudiéndose encontrar un sinnúmero de artículos de sus aplicaciones como modificadores de electrodos o teniendo al LI como uno de sus componentes modificadores²⁰⁻²².

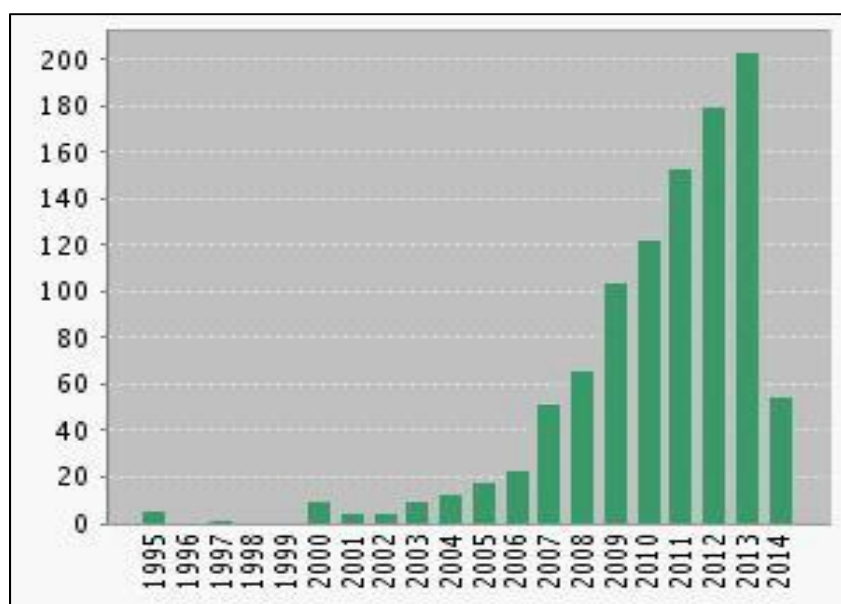


Figura 2. Publicaciones de electrodos modificados con LI hasta abril del año 2014 (fuente: Web of Science²³).

El 1-etil-3-metilimidazol tetrafluoroborato [EmimBF₄] es un LI hidrofílico que se ha utilizado en la modificación de EPC, para la determinación electroquímica de metol², un compuesto de carácter tóxico utilizado en fotografía como un agente revelador. Con la incorporación del LI, los límites de detección y cuantificación disminuyeron significativamente en comparación al electrodo sin modificar.

J. Zheng y cols.¹⁹ utilizaron el 1-pentil-3-metilimidazol hexafluorofosfato [PmimPF6] como modificador de EPC, y estudiaron la respuesta electroquímica de este electrodo en comparación al electrodo sin modificar en la determinación de dobesilato de calcio, comprobando la superioridad del electrodo modificado, obteniendo una mejor sensibilidad, una rápida transferencia electrónica y una mejor reversibilidad, llegando a límites de detección de $4,0 \times 10^{-7}$ M (Figura 3A).

Para la determinación de rutina, un compuesto de origen natural usado en un amplio rango de problemas circulatorios, se utilizan EPC-LI, modificados con un LI de tipo piridinio, dando como resultado un gran efecto electrocatalítico en la oxidación de este compuesto. Además, el electrodo modificado presenta una buena estabilidad y reproducibilidad sin la influencia de sustancias coexistentes (Figura 3B).

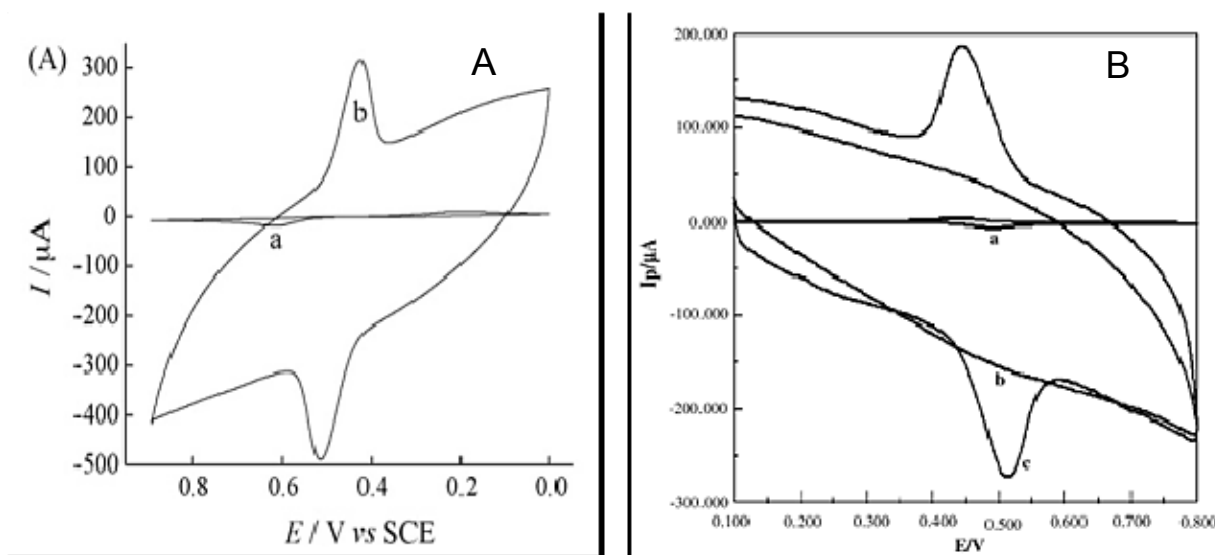


Figura 3. Voltamperogramas para dobesilato de calcio (A) y rutina (B). A: VC con EPC (a) y EPC-LI (b). B: VC con EPC (a), rutina $5,0 \times 10^{-5}$ M, pH 2,5 (b) y EPC-LI en disolución tampón (c). Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} .

Otra de las aplicaciones más recientes corresponde a la fusión de pasta de carbono, LI y nanotubos de carbono, para la construcción de electrodos súper selectivos. En el reporte de H. Khani y cols.⁹ se explica la fabricación de este tipo de electrodos utilizando BmimBF₄ más un ionóforo. Este electrodo se utiliza en el seguimiento potenciométrico del mercurio II, exhibiendo una excelente sensibilidad, selectividad y estabilidad en su aplicación en muestras reales. El método desarrollado presenta límites de detección del orden de 10⁻⁹ M.

En base a lo anteriormente expuesto, la presente propuesta pretende tomar ventaja de la versatilidad de los LI para diseñar y caracterizar electrodos modificados, a través de la incorporación de LI a electrodos de pasta de carbono, con el objetivo de ser empleados en la cuantificación de fármacos, generando de esta forma métodos voltamperométricos con una mayor sensibilidad que con los electrodos convencionales. Clásicamente, todas las pastas son mezclas binarias de carbono, preparados a partir de polvo de carbono y líquido orgánico de carácter no electrolítico. Tales mezclas se clasifican como “pastas de carbono desnudas” o sin modificar. Durante mucho tiempo la elección de los constituyentes principales de las pastas de carbono era bastante monótona y, de hecho, no había ninguna razón para buscar nuevos materiales alternativos. Las propiedades de las mezclas de pasta convencionales de grafitos espectroscópicos y aceites de parafina, se han encontrado satisfactorias para la mayoría de las aplicaciones, incluyendo modificaciones muy populares.

Los LIs que serán utilizados en esta Tesis corresponden a dos de tipo imidazolio: el 1-butyl-3-metilimidazolio tetrafluoroborato (BmimBF₄) y el 1-butyl-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (BmimPF₆), y dos de tipo piridinio: el 1-butyl-4-metilpiridinio tetrafluoroborato (PyrBF₄) y el 1-butyl-4-metilpiridinio hexafluorofosfato (PyrPF₆), en

ambos casos se tiene el mismo catión (imidazolio y piridinio) y se diferencian en el anión. Esta característica permitirá obtener mayor información de la interacción existente, ya que $-\text{PF}_6$ o $-\text{BF}_4$ proporcionan características distintas al LI en términos de hidrofobicidad y carga.

HIPÓTESIS

El estudio del comportamiento de diferentes tipos de líquidos iónicos como modificadores de superficies electródicas, hará posible seleccionar los componentes adecuados para desarrollar metodologías electroanalíticas con una mayor sensibilidad.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar nuevos electrodos modificados, en base a pasta de carbono y líquidos iónicos, para mejorar la sensibilidad de los electrodos desnudos, con vistas a desarrollar métodos electroquímicos para la determinación de fármacos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar electrodos de pasta de carbono modificados, utilizando diferentes líquidos iónicos.
2. Evaluar la superficie y los procesos de transferencia de electrones en los nuevos electrodos modificados.
3. Determinar el rol del líquido iónico en la electroactividad y la morfología de los electrodos resultantes.
4. Desarrollar metodologías analíticas, utilizando como analito distintos fármacos de reconocida actividad redox.
5. Aplicar los métodos analíticos desarrollados para determinar los fármacos en diferentes matrices.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

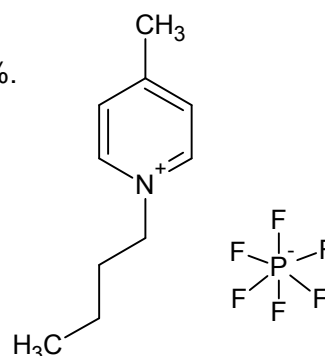
2.1.1 Líquidos iónicos

(a) 1-butil-4-metilpiridinio hexafluorofosfato (Aldrich®) $\geq 97,0$ %.

Fórmula empírica: $C_{10}H_{16}F_6NP$

Masa molar: 295,20 g/mol

Punto de fusión: -45 °C



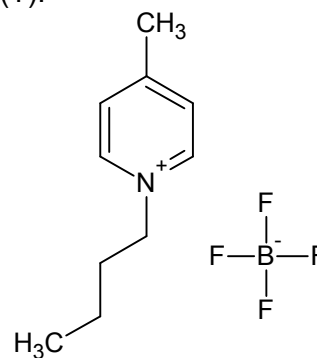
Estructura química

(b) 1-butil-4-metilpiridinio tetrafluoroborato (Aldrich®) $\geq 97,0$ % (T).

Fórmula empírica: $C_{10}H_{16}BF_4N$

Masa molar: 237,05 g/mol

Densidad: $1,20$ g/cm³



Estructura química

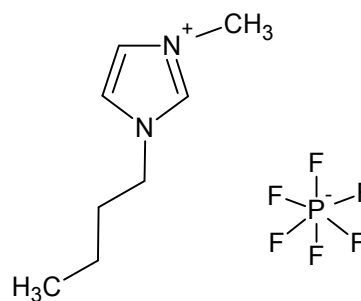
(c) 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (Aldrich®)

Para catálisis, $\geq 98,5$ % (T)

Fórmula empírica: $C_8H_{15}F_6N_2P$

Masa molar: 284,18 g/mol

Densidad: $1,38$ g/mL (20 °C)



Estructura química

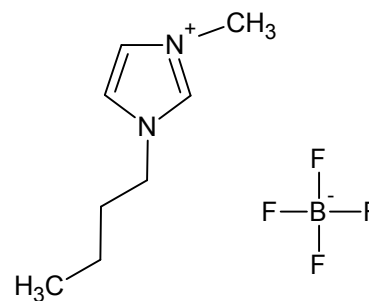
(D) 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato (Aldrich®)

Para catálisis, $\geq 98,5\%$ (HPLC)

Fórmula empírica: $C_8H_{15}BF_4N$

Masa molar: 226,02 g/mol

Densidad: 1,21 g/mL



Estructura química

2.1.2 Fármacos

Levodopa

Nombre IUPAC: ácido (2S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxi-fenil) propanoico

Fórmula empírica: $C_9H_{11}NO_4$

Masa Molar: 197,19 g/mol

Acetaminofeno

Nombre IUPAC: N-(4-hidroxi-fenil)acetamida

Fórmula empírica: $C_8H_9NO_2$

Masa Molar: 151,16 g/mol

Nitrendipino

Nombre IUPAC: 5-O-etil 3-O-metil 2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato

Fórmula empírica: $C_{18}H_{20}N_2O_6$

Masa Molar: 360,36 g/mol.

2.1.3 Reactivos y disolventes

Aceite mineral para espectroscopía IR, Sigma-Aldrich.

Ácido acético glacial (100,0 %) p.a., Merck.

Ácido bórico p.a., Merck.

Ácido clorhídrico (36,5 %) p.a., Equilab.

Ácido ortofosfórico (85,0 %) p.a., Merck.

Agua calidad HPLC (Milli-Q).

Cloruro de potasio p.a., Merck.

Etanol absoluto (99,8 %) p.a., Merck.

Ferricianuro de potasio 99 %, Merck.

Ferrocenometanol 97 %, Merck.

Hexamin rutenio III cloruro 99,9 %, Sigma Aldrich.

Grafito Fisher ChemAlert[®]

Hidróxido de sodio (NaOH) (pellets) p.a., Merck.

Nitrógeno extra puro Linde[®].

2.1.4 Disoluciones tampón

Tampón calibrador pH-metro, 4,00 Hanna Instruments.

Tampón calibrador pH-metro, 7,00 Hanna Instruments.

Tampón calibrador pH-metro, 10,00 Hanna Instruments.

Tampón Britton-Robinson 0,1 M.

Tampón Britton-Robinson 0,05 M.

Tampón Britton-Robinson 0,2 M.

2.1.5 Material de vidrio

Todo el material de vidrio utilizado fue clase A.

2.1.6 Instrumental de uso general y otros materiales

Micro pipetas automáticas, Brand de volumen variable 2-1000 μL .

Mortero de ágata.

2.1.7 Equipos

a) Sistema voltamperométrico

Analizador voltamperométrico CH Instruments 1030B.

Celda electroquímica de 10 mL.

Electrodo de trabajo : electrodo de pasta de carbono.

Electrodo auxiliar : platino.

Electrodo de referencia : Ag/AgCl CHI.

b) Equipos de uso general

Agitador magnético HotplateStirrer.

Balanza analítica de precisión Radwad®.

Baño de ultrasonido, SVWR “*ultrasonic cleaner*”, modelo 97043-934.

Estufa Dryin Oven, modelo DGH-9053A.

Medidor de pH, WTW.

Sistema purificador de agua, Milli-Q Ultra-PureWaterSystem.

VortexThermolyne.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparación de disoluciones

a) Tampón Britton-Robinson 0,1 M

Se disolvieron 6,20 g de ácido bórico en agua Milli-Q, con ayuda de ultrasonido, en un matraz aforado de 1000 mL. Se agregó 6,8 mL de ácido ortofosfórico, 5,8 mL de ácido acético y se completó el volumen con agua Milli-Q. Se varió el volumen final de agua para la preparación de tampón Britton-Robinson 0,05 y 0,2 M.

b) Disoluciones de trabajo

Ferrocenometanol

Se pesó 2,16 mg de ferrocenometanol y se disolvió en tampón Britton-Robinson pH 7,4 con ayuda de ultrasonido, al interior de un matraz aforado de 10 mL. Finalmente se completó a volumen con el mismo tampón, obteniéndose una disolución 1×10^{-3} M.

Ferricianuro de potasio

Se pesó 32,93 mg de ferricianuro de potasio y se disolvió en tampón Britton-Robinson pH 7,4 con ayuda de ultrasonido, al interior de un matraz aforado de 10 mL. Finalmente se enrasó con el mismo tampón, obteniéndose una disolución 1×10^{-3} M.

Hexamin rutenio III cloruro

Se pesó 30,96 mg de hexamin rutenio III cloruro y se disolvió en tampón Britton-Robinson pH 7,4 con ayuda de ultrasonido, al interior de un matraz aforado de 10 mL. Finalmente se enrasó con el mismo tampón, obteniéndose una disolución 1×10^{-3} M.

c) Disoluciones stock de fármacos

Levodopa

Se pesó 49,3 mg de levodopa y se disolvió con ayuda de sonicación (5 min) en tampón Britton-Robinson pH 4, en un matraz aforado de 25 mL. Finalmente se enrasó con el mismo tampón, obteniéndose una disolución 1×10^{-2} M.

Acetaminofeno

Se pesó 37,8 mg de acetaminofeno y se disolvió, con ayuda de ultrasonido, en tampón Britton-Robinson pH 7, al interior de un matraz aforado de 25 mL. Finalmente se enrasó con el mismo tampón, obteniéndose una disolución 1×10^{-2} M.

Nitrendipino

Se pesó 90,1 mg de nitrendipino y se disolvió en etanol p.a., al interior de un matraz aforado de 25 mL. Finalmente se enrasó con etanol p.a., obteniéndose una disolución 1×10^{-2} M.

2.2.2 a. Preparación de las pastas de carbono

Pasta A: pasta de carbono sin modificar 95/5 p/p

Se agregan 50 mg de aceite mineral y 950 mg de polvo de grafito en un mortero de ágata, se homogeniza por 30 min, obteniéndose una pasta uniforme al 5/95 p/p.

Pasta B: pasta de carbono sin modificar 70/30p/p

Se agregan 300 mg de aceite mineral y 700 mg de polvo de grafito en un mortero de ágata, se homogeniza por 30 min, obteniéndose una pasta uniforme al 30/70 p/p.

2.2.2 b. Preparación de las pastas de carbono modificadas con líquidos iónicos

Pasta 1.A

Se agregan 5 mg de LI y 95 mg de *pasta A* en un mortero de ágata, se homogeniza por 30 min, obteniéndose una pasta uniforme al 5 % en el LI.

Pasta 2.A

Se agregan 10 mg de LI y 90 mg de *pasta A* en un mortero de ágata, se homogeniza por 30 min, obteniéndose una pasta uniforme al 10 % en el LI.

Pasta 3.A

Se agregan 15 mg de LI y 85 mg de *pasta A* en un mortero de ágata, se homogeniza por 30 min, obteniéndose una pasta uniforme al 15 % en el LI.

Pasta 1.B

Se agregan 5 mg de LI y 95 mg de *pasta B* en un mortero de ágata, se homogeniza por 30 min, obteniéndose una pasta uniforme al 5 % en el LI.

Pasta 2.B

Se agregan 10 mg de LI y 90 mg de *pasta B* en un mortero de ágata, se homogeniza por 30 min, obteniéndose una pasta uniforme al 10 % en el LI.

Pasta 3.B

Se agregan 15 mg de LI y 85 mg de *pasta B* en un mortero de ágata, se homogeniza por 30 min, obteniéndose una pasta uniforme al 15 % en el LI.

Cada electrodo se llenó con las pastas de carbono anteriormente descritas, con la ayuda de una espátula y se pulió sobre un papel en forma circular, hasta lograr que la superficie del electrodo quedara plana y uniforme.

2.2.3 Voltamperometría cíclica

a) Condiciones experimentales

Los electrodos utilizados fueron:

Electrodos de trabajo : Electrodo de pasta de carbono y electrodo de pasta de carbono modificado.

Electrodo Auxiliar : Electrodo de platino.

Electrodo de referencia : Electrodo de Ag/AgCl.

Las condiciones de operación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de operación para VC.

Condiciones de operación	Ferricianuro de K	Ferrocenometanol	Hexamin rutenio
E inicial (V)	0,6	-0,4	-0,6
E máximo (V)	0,6	0,8	0,2
E mínimo (V)	-0,2	-0,4	-0,6
Velocidad de barrido (V/s)	0,1	0,1	0,1
Intervalo de muestreo (V)	0,001	0,001	0,001
Sensibilidad (A/V)	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}

b) Estudio con mediadores redox

En una celda electroquímica se introdujo 5 mL del mediador de concentración 1×10^{-3} M y se registró el voltamperograma cíclico correspondiente. El procedimiento fue efectuado con la disolución de ferrocenometanol 1×10^{-3} M y de ferricianuro de potasio 1×10^{-3} M.

Para el estudio con hexamin rutenio III cloruro se realizó el mismo procedimiento, con la diferencia de que se debe burbujear la disolución con nitrógeno 5 min antes de ser medida.

c) Estudio de las capacitancias de los electrodos modificados

En la celda electroquímica se introdujo 5 mL de tampón Britton-Robinson, en dicha disolución se sumergen los electrodos conectados al sistema CHI 1030B. Los parámetros son constantes, excepto la velocidad que fluctúa desde 90 hasta 180 mV/s (parámetros propuestos para este estudio).

Las mediciones se hicieron por duplicado. Se registraron los valores de corrientes de cada voltamperograma a un potencial de $\sim 0,2$ V y se calculó la diferencia de corriente entre cada segmento, obteniendo un valor de corriente promedio. Se graficaron los valores de

corriente promedio *versus* velocidad de barrido obteniendo una recta, cuyo valor de la pendiente corresponde al de capacitancia.

2.2.4 Voltamperometría de pulso diferencial

a) Condiciones experimentales

Los electrodos utilizados fueron:

Electrodos de trabajo : Electrodo de pasta de carbono y pasta de carbono modificado.

Electrodo Auxiliar : Electrodo de platino.

Electrodo de referencia : Electrodo de Ag/AgCl.

Las condiciones de operación se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de operación para VPD.

Condiciones de operación	Levodopa	Acetaminofeno	Nitrendipino
Potencial inicial (V)	0	0	0
Potencial Final (V)	1	1	-1
Incremento (V)	0,004	0,004	0,004
Amplitud (s)	0,05	0,05	0,05
Amplitud de pulso (s)	0,2	0,2	0,2
Amplitud de muestreo (s)	0,02	0,02	0,02
Periodo de pulso (s)	0,5	0,5	0,5
Tiempo de reposo (s)	2	2	2
Sensibilidad (A/V)	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}

b) Estudio de concentración

Para los fármacos en estudio se determinó el efecto de la concentración en el comportamiento electroquímico, en los siguientes intervalos de concentración para cada fármaco:

Concentraciones de levodopa: desde 2,3 hasta 16,7 $\mu\text{g/mL}$

Concentraciones de acetaminofeno: desde 0,61 hasta 27,8 $\mu\text{g/mL}$

Concentraciones para nitrendipino: desde 0,4 hasta 5,4 $\mu\text{g/mL}$

Para ello se transfirió una cantidad de volumen adecuado de disolución stock del fármaco correspondiente a un matraz aforado de 5 mL, enrasando con tampón Britton-Robinson 0,1 M ajustado al pH de trabajo seleccionado para cada analito. Las mediciones correspondientes a cada concentración se realizaron registrando cada voltamperograma por triplicado.

c) Estudio de pH

A la disolución de trabajo de levodopa, acetaminofeno y nitrendipino, se le varió el pH con una disolución de NaOH o HCl concentrada, en un intervalo de pH de 1,6 a 12 (dependiendo del fármaco). Dicho estudio fue efectuado con los distintos fármacos indicados anteriormente, empleando como electrodo de trabajo, el modificado con el líquido iónico correspondiente.

d) Tiempo de acumulación

Para el estudio del efecto del tiempo de acumulación para cada fármaco, se procedió a agitar una disolución (por medio de un agitador magnético), por un tiempo de 1 min, posteriormente se detuvo la agitación y se registró el voltamperograma correspondiente

(voltamperometría de pulso diferencial). Después de cada medición, el electrodo de trabajo se rellenó y pulió. El mismo procedimiento se repitió luego de cada minuto de acumulación, hasta 5 min. En cada caso se registraron los voltamperogramas y se midieron los potenciales y corrientes de pico para cada tiempo de acumulación.

e) Estudio de fuerza iónica

En este estudio se midió la señal de cada analito cambiando la concentración del tampón Britton-Robinson (0,05, 0,1 y 0,2 M), manteniendo para la medición las condiciones de pH y tiempo de acumulación seleccionados previamente para cada fármaco. Este estudio se realizó por duplicado. En ambos casos se registraron los voltamperogramas y se midieron los potenciales y corrientes de pico para cada concentración.

2.2.5 Cronoculombimetría

a) Condiciones experimentales

Los electrodos utilizados fueron:

Electrodos de trabajo : Electrodo de pasta de carbono y pasta de carbono modificado.

Electrodo Auxiliar : Electrodo de platino.

Electrodo de referencia : Electrodo de Ag/AgCl.

Potencial inicial : 0 V

Potencial final : 0,6 V

Amplitud de pulso : 250 ms

Intervalo de muestreo : $2,5 \times 10^{-4}$ s

Tiempo de reposo : 2 s

Sensibilidad : 0,001 A/V

b) Determinación de las áreas electroactivas

En una celda electroquímica de 5 mL se introdujo una disolución de ferricianuro de potasio 1×10^{-3} M a pH 7,4, y se registró el voltamperograma correspondiente. Posteriormente en el sistema CHI1030B, en la opción gráficos, se modificó el dato carga y tiempo, obteniendo un nuevo voltamperograma, el cual entregó el valor de la pendiente, con ella se calculó el área de cada electrodo. A continuación se muestra la fórmula utilizada:

$$Q_t = \left[\frac{(2nFACD_0 t^{\frac{1}{2}})}{\pi^{\frac{1}{2}}} \right] + Q_{dl} + NFA\Gamma_0$$

De esta ecuación despejamos el área, obteniendo:

$$A = \left[\frac{(SL_p \pi^{\frac{1}{2}})}{(2nFCD_0^{\frac{1}{2}})} \right]$$

Donde:

n = equivalentes mol^{-1}

F = 96485,309 Coulomb/equivalente

A = área, cm^2

D = $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$

C = concentración de la disolución, mol cm^{-3}

SLP= Pendiente del gráfico de Anson (Q vs $t^{1/2}$)

2.2.6 Caracterización morfológica de los electrodos

Microscopía de barrido electrónico (SEM)

Obtención de imágenes por microscopía electrónica de barrido:

Voltaje de aceleración de electrones (EHT): 10.00 kV

Distancia de trabajo (WD): [7.25 - 7.5] mm

Spot size: 220

Magnificación: 100.000X - 50.000X - 25.000X - 10.000X - 500X

Corriente de la muestra: 5 pA

Microscopía de barrido electroquímico (SECM)

Electrodos de trabajo: Consta de dos electrodos de trabajo, uno es un microelectrodo que realiza un barrido en la superficie de un segundo electrodo de trabajo (EPC y EPC-BmimBF₄ y EPC-PyrPF₆).

Electrodo Auxiliar : Electrodo de platino.

Electrodo de referencia : Electrodo de Ag/AgCl.

Se utiliza una disolución de ferrocenometanol 0,05 mM y el equipo utilizado es un bipotenciostato que entrega un potencial fijo a cada electrodo de trabajo.

2.2.7 Desarrollo de la metodología electroanalítica

A. Voltamperometría de pulso diferencial

a) Curva de calibración

Las disoluciones preparadas fueron medidas por voltamperometría de pulso diferencial.

Concentraciones de levodopa: desde 2,3 hasta 16,7 $\mu\text{g/mL}$

Concentraciones de acetaminofeno: desde 0,61 hasta 18,8 $\mu\text{g/mL}$

Concentraciones para nitrendipino: desde 0,4 hasta 4,7 $\mu\text{g/mL}$

Para ello se transfirió una cantidad de volumen adecuado de disolución stock del fármaco correspondiente a un matraz aforado de 5 mL, enrasando con tampón Britton-Robinson 0,1 M ajustado al pH de trabajo seleccionado para cada analito. Las mediciones correspondientes a cada concentración se realizaron registrando cada voltamperograma por triplicado.

b) Estudio de repetibilidad

Se midieron 10 veces consecutivas, por la técnica de voltamperometría de pulso diferencial, 5 mL de las disoluciones de trabajo de cada fármaco en tampón Britton-Robinson al pH seleccionado para cada analito. Como parámetro estadístico se consideró el coeficiente de variación de la corriente de pico de la señal obtenida.

c) Estudio de reproducibilidad

Se midieron 10 veces consecutivas, por la técnica de voltamperometría de pulso diferencial, 5 mL de las disoluciones de trabajo cada fármaco en tampón Britton-Robinson

al pH seleccionado para cada analito. Como parámetro estadístico se consideró el coeficiente de variación de la corriente de pico de la señal obtenida en distintos días.

d) Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se calcularon según las siguientes ecuaciones:

Donde:

$$LD = \left[\frac{(Y_b + 3 \cdot S_b)}{m} \right] \quad LC = \left[\frac{(Y_b + 10 \cdot S_b)}{m} \right]$$

m = Pendiente de curva de calibración

Y_b = Respuesta estimada del blanco

S_b = Desviación estándar estimada del blanco

2.2.8 Aplicación a formas farmacéuticas

Se aplicó la metodología desarrollada para cada analito en formulaciones farmacéuticas comercializadas actualmente (Tabla 3).

En este procedimiento se realizó la valoración, tomándose 5 comprimidos o cápsulas de cada fármaco, los cuales en el caso de comprimidos se trituraron y homogeneizaron en un mortero de ágata, posteriormente se pesó una cantidad determinada con el fin de obtener disoluciones de lectura finales de 10,5 µg/mL para levodopa, 12,0 µg/mL para acetaminofeno y 4,3 µg/mL para nitrendipino, por medio de diluciones en TBR al pH seleccionado para cada analito. Las señales se midieron por VPD, cada una por triplicado.

Tabla 3. Formulaciones farmacéuticas utilizadas en las valoraciones.

Fármaco	Marca comercial	Cantidad del fármaco por comprimido o cápsula (mg)
Levodopa	Prolopa [®] HBS Roche	100 (cápsula)
Acetaminofeno	Acetaminofeno Laboratorio Chile	500 (comprimido)
Nitrendipino	Nitrendipino Laboratorio Andrómaco	20 (comprimido)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección y caracterización de las superficies modificadas con LI

Se estudiaron cuatro LI distintos, dos de tipo imidazolio (BmimBF₄ y BmimPF₆) y dos de tipo piridinio (PyrBF₄ y PyrPF₆). Estos se caracterizaron en primera instancia con tres mediadores redox ampliamente utilizados, como el ferroceno, ferricianuro de potasio y hexamin rutenio III cloruro.

El ferroceno corresponde a un compuesto organometálico de tipo sándwich, que lo hace ser muy estable; sus aplicaciones más importantes son en catálisis homogénea, sales de transferencia de carga y polímeros. Parte de la estabilidad es consecuencia de la aromaticidad de los seis electrones π de cada anillo ciclopentadienilo (Figura 4). Es soluble en disolventes orgánicos como el benceno, pero no en agua. Por este motivo, en esta Tesis se empleó un derivado del ferroceno soluble en agua, el ferrocenometanol.

Respecto a sus propiedades electroquímicas, se oxida a bajos potenciales para generar ferricinio²⁴ (su catión) de color verde-azul en disoluciones diluidas o rojo-sangre en disoluciones concentradas. Las sales de ferricinio son muy utilizadas como agentes oxidantes suaves.

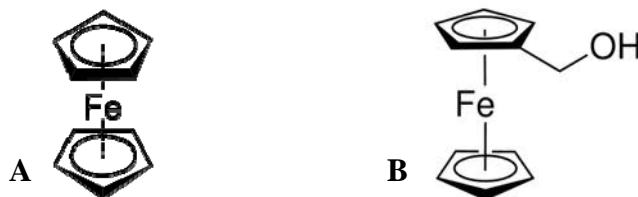


Figura 4. Estructuras químicas de ferroceno (A) y de ferrocenometanol (B).

El ferricianuro de potasio es el compuesto químico con fórmula $K_3Fe(CN)_6$ (Figura 5). Esta sal de color rojo brillante corresponde al compuesto de coordinación $[Fe(CN)_6]^{3-}$. Es soluble en agua y en disolución presenta fluorescencias de color verde amarillo²⁵. Respecto del comportamiento electroquímico del ferricianuro, genera un par redox mono electrónico cuasi reversible, por esto que el par $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ ha sido empleado como un estándar de elección para demostrar reacciones por voltamperometría cíclica.

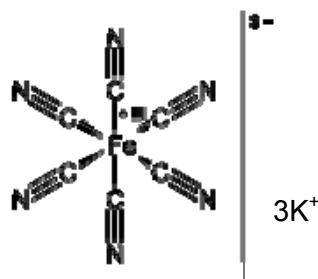


Figura 5. Estructura química del ferricianuro de potasio.

Por otra parte, el hexamin rutenio III cloruro (Figura 6) es el compuesto químico con la fórmula $RuCl_3$. "Rutenio (III) cloruro" más comúnmente se refiere al hidrato $RuCl_3 \times H_2O$. Tanto el anhidro y especies hidratadas son sólidos de color marrón oscuro o negro. El hidrato, con una proporción variable de agua de cristalización, a menudo se aproxima a un trihidrato. Con respecto a sus propiedades redox^{26,27}, este complejo de rutenio experimenta la reducción de un electrón^{28, 29}, desde $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ a $[Ru(NH_3)_6]^{2+}$. Este compuesto se utilizó en este trabajo con el fin de obtener mayor información sobre el efecto de la carga del mediador en relación a la carga del analito y la superficie del electrodo, con vistas a tener luces respecto del tipo de interacción entre ellos.

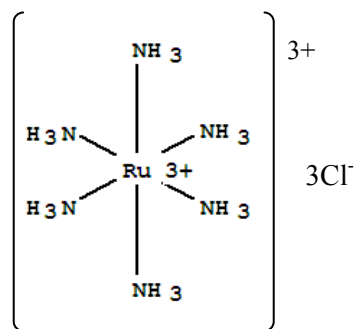


Figura 6. Estructura química del hexamin rutenio III cloruro.

Con el fin de seleccionar el o los LIs y el porcentaje de éste en la modificación de un electrodo de pasta de carbono (PC), se realizó una gran cantidad de experimentos modificando dos pastas de carbono distintas, la primera con un 5 % de aceite mineral (PC A) y la segunda con un 30 % de aceite mineral (PC B). Cada PC se modificó con tres porcentajes distintos de cada LI estudiado (5 %, 10 % y 15 %), es decir con los dos de tipo piridinio y los dos de tipo imidazolio. El criterio utilizado para seleccionar las mejores respuestas se basaron en el incremento de la respuesta en corriente a través de VC, en comparación a la señal medida con el EPC sin modificar. Los resultados de estos experimentos se presentan en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Corrientes de pico determinadas con los EPC A y EPC B.

EPC	Ferrocenometanol	Ferricianuro de K	Hexamin rutenio
	i_a (μA)	i_c (μA)	i_c (μA)
EPC A (95/5)	59,6	n.i.	28,1
EPC B (70/30)	27,7	n.i.	22,7

n.i.: señal no integrable.

En la Tabla 4 se observa que se obtiene una mayor corriente con el EPC A, que corresponde al que tiene en su composición una menor cantidad de aceite mineral, en el caso de ferricianuro de K, el equipo no entrega un valor de corriente pero sí se observa la cupla de este mediador.

Tabla 5. Corrientes de pico determinadas para los mediadores redox.

Líquido iónico		PC A (95/5)			PC B (70/30)		
		i_a (μA)	i_c (μA)		i_a (μA)	i_c (μA)	
		Ferroc.	Ferric.	Rutenio	Ferroc.	Ferric.	Rutenio
BmimBF ₄	5 %	142,2	n.i.	12,7	n.i.	n.i.	n.i.
	10 %	131,8	n.i.	n.i.	25,59	12,79	23,80
	15 %	120,9	n.i.	n.i.	22,93	27,59	16,64
BmimPF ₆	5 %	78,63	52,60	26,71	25,93	22,00	17,78
	10 %	101,8	51,61	n.i.	24,20	22,18	14,54
	15 %	78,75	42,69	n.i.	26,94	21,37	23,79
PyrBF ₄	5 %	n.i.	n.i.	n.i.	26,61	25,09	23,64
	10 %	99,64	n.i.	n.i.	28,31	24,75	21,82
	15 %	n.i.	n.i.	n.i.	27,27	25,01	27,34
PyrPF ₆	5 %	59,57	44,16	40,67	25,03	26,53	28,23
	10 %	64,46	52,10	26,11	34,68	21,60	21,79
	15 %	82,80	48,92	n.i.	30,46	23,61	20,23

n.i.: señal no integrable.

i_a : Corriente anódica.

i_c : Corriente catódica.

En la Tabla 5 se exhiben los resultados de corriente obtenidos con todos los electrodos ensayados, para los cuatro LIs en combinación con las dos pastas de carbono (PC A y PC B), en los que se observa un mayor incremento es para

BmimBF₄ preparado con EPC A y un 5% de este LI, el otro LI seleccionado es PyrPF₆ preparado con EPC A y un 15% de este LI. En general los mayores incrementos se obtuvieron con el EPC A el cual contiene una menor cantidad de aceite mineral, en cambio, para los observados con el EPC B, la respuesta obtenida con los electrodos modificados no experimento un incremento significativo.

Se ensayó también remplazando el aceite mineral por los líquidos iónicos seleccionados en los primeros ensayos, pero no se obtuvo un buen resultado ya que la pasta no se aglutinó y al poner en contacto el electrodo con la disolución se salía de la cavidad.

En las Figuras 7 y 8 se muestran las señales de los líquidos iónicos seleccionados (BmimBF₄ y PyrPF₆), ya que con estos se obtuvieron las mejores respuestas en comparación a la señal del mediador redox, analizada con el electrodo de pasta de carbono sin modificar. En ambos casos fue con la PC A (la que posee un 5 % de aceite mineral), esto producto de que el aceite mineral al ser un líquido no conductor disminuye la respuesta de corriente.

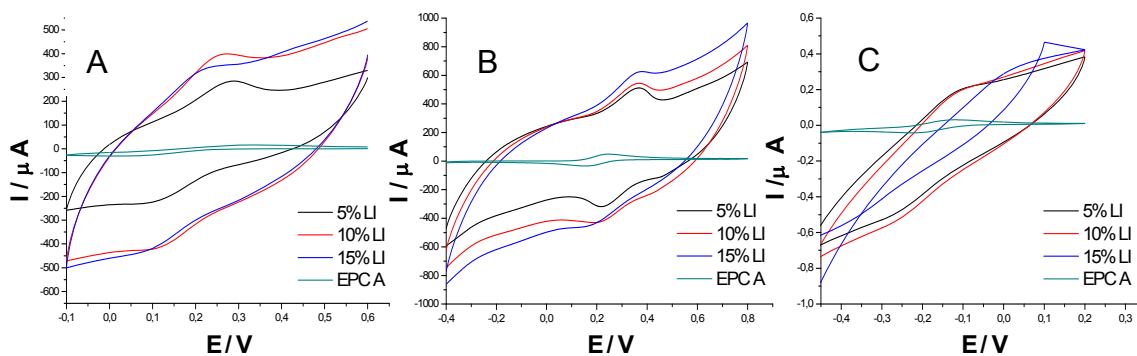


Figura 7. VC para ferricianuro de K (A), ferrocenometanol (B) y hexamin rutenio (C) con EPC-BmimBF₄ y EPC 95/5.

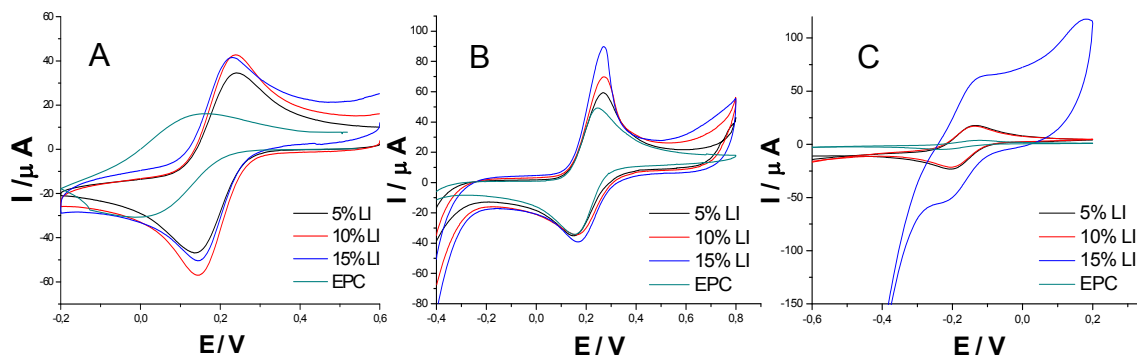


Figura 8. VC para ferricianuro de K (A), ferrocenometanol (B) y hexamin rutenio (C) con EPC-PyrPF6 y EPC 95/5.

En el caso de la PC A (5 % de aceite mineral), el efecto electrocatalítico del líquido iónico es apreciable. A bajos porcentajes de líquido iónico, independiente del contraión, hay un aumento en las corrientes. La respuesta redox de los mediadores ensayados pareciera estar influenciada por interacciones de tipo π - π entre el analito (ferrocenometanol) y el líquido iónico, más que por un efecto de carga entre ambos, pues no se observan grandes diferencias en la respuesta del hexamin rutenio (carga positiva) y ferricianuro (carga negativa) con los líquidos iónicos ensayados, salvo que para ferricianuro de K se observa una mejora en la reversibilidad de la reacción ($\Delta E_{pa} - E_{pc_{electrodo\ modificado}} < \Delta E_{pa} - E_{pc_{EPC}}$) (Figura 8A).

De acuerdo a las respuestas obtenidas al realizar el análisis con la PC B (70/30), se puede indicar que independiente del LI (imidazolio o piridinio y sus diferentes contraiones), los tres mediadores redox estudiados son capaces de acceder al electrodo y generar una respuesta reversible, pero, en general, la presencia del líquido iónico no aumenta la respuesta en corriente (Figuras 9 y 10). En relación a lo anterior se podría decir que el efecto de la PC en proporción 70/30 es equivalente a la respuesta obtenida con cualquiera de las pastas modificadas, esto se

debe a la mayor presencia de aceite mineral en la PC B. Para graficar este efecto, se observa en las Figuras 9 y 10 los mismos LIs seleccionados en las Figuras 7 y 8, donde la única diferencia en la pasta modificada es la cantidad del aglutinante (aceite mineral), que en este caso es de un 30 %.

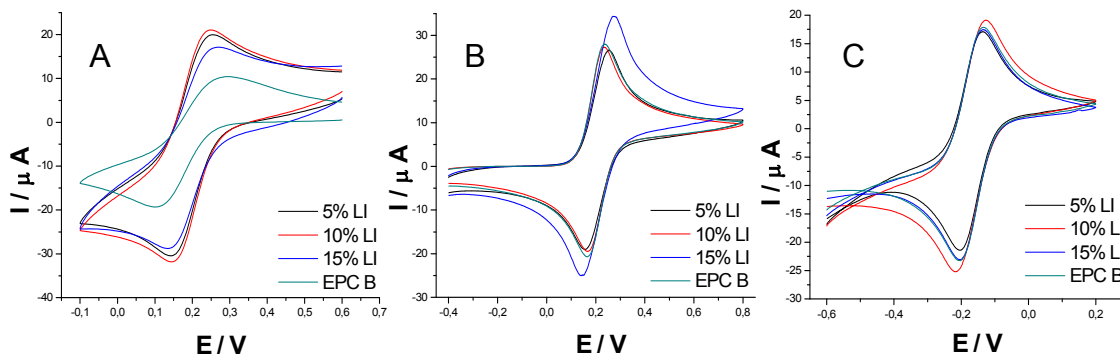


Figura 9. VC para ferricianuro de K (A), ferrocenometanol (B) y hexamin rutenio (C) con EPC-BmimBF₄ y EPC 70/30.

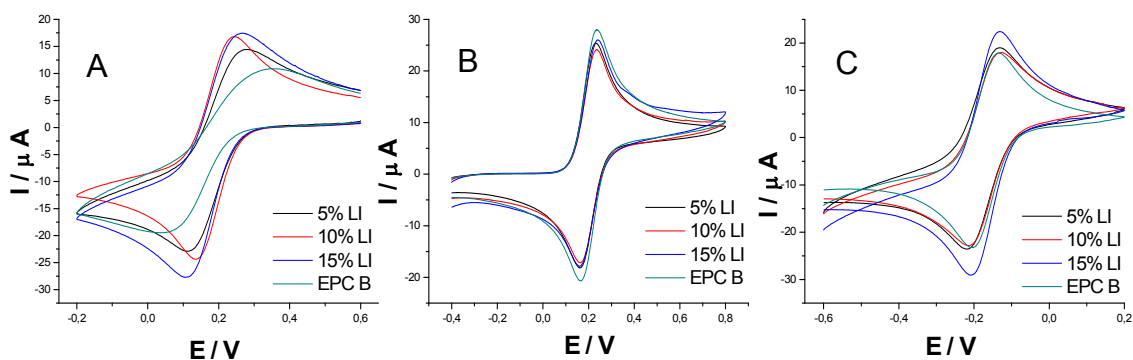


Figura 10. VC para ferricianuro de K (A), ferrocenometanol (B) y hexamin rutenio (C) con EPC-PyrPF₆ y EPC 70/30.

Esta concentración de aglutinante (aceite mineral en PC B), inhibe en general para los tres mediadores y con ambos LI, el incremento de corriente observado al fabricar el electrodo con PC A. Lo que si se observa es un una mejora en la

reversibilidad para ferricianuro de potasio al medirlo con el electrodo modificado en comparación al EPC B ($\Delta E_{pa} - E_{pc_{electrodo\ modificado}} < \Delta E_{pa} - E_{pc_{EPC\ B}}$) y también, un leve incremento en la corriente (Figuras 9A y 10A).

De ahora en adelante cuando se hable de EPC se referirá a la PC con un 5 % de aceite mineral.

Luego de seleccionados los LIs con los que se modificara el EPC, se continuó con la caracterización de estas nuevas superficies.

3.2 Caracterización de las superficies

Capacitancia de los electrodos

La capacidad de almacenar carga es la propiedad característica de un condensador eléctrico, por esto, se puede discutir la capacitancia de una interfase electrizada de forma semejante a como estudia un condensador la cual viene dada por³⁰:

$$C = Q/V$$

Donde C es la capacitancia (Faradios), Q es la carga eléctrica almacenada (Coulomb) y V es la diferencia de potencial medida en Volts.

En una interfase electrizada la capacitancia puede no ser constante, por lo tanto, es mejor definir una capacitancia diferencial:

$$C = \partial Q / \partial V$$

Donde ∂Q corresponde a la corriente y ∂V a la velocidad de barrido (V_b), por lo tanto, se puede reordenar de la siguiente manera:

$$I = C \times V_b$$

Por lo tanto en una gráfica de corriente vs V_b , la pendiente obtenida corresponde a la capacitancia existente en la superficie, en este caso, del electrodo.

Por medio de mediciones de VC de una disolución de TBR 0,1 M a pH 7,4, se evaluó de manera cualitativa el área de los electrodos ensayados (EPC, EPC-BmimBF₄ y EPC-PyrPF₆), por medio de la corriente de fondo. En la Figura 11 se presentan los voltamperogramas típicos, observándose que en la superficie de los electrodos modificados se obtiene la mayor corriente de fondo, lo cual podría dar cuenta de un aumento en el área del electrodo modificado.

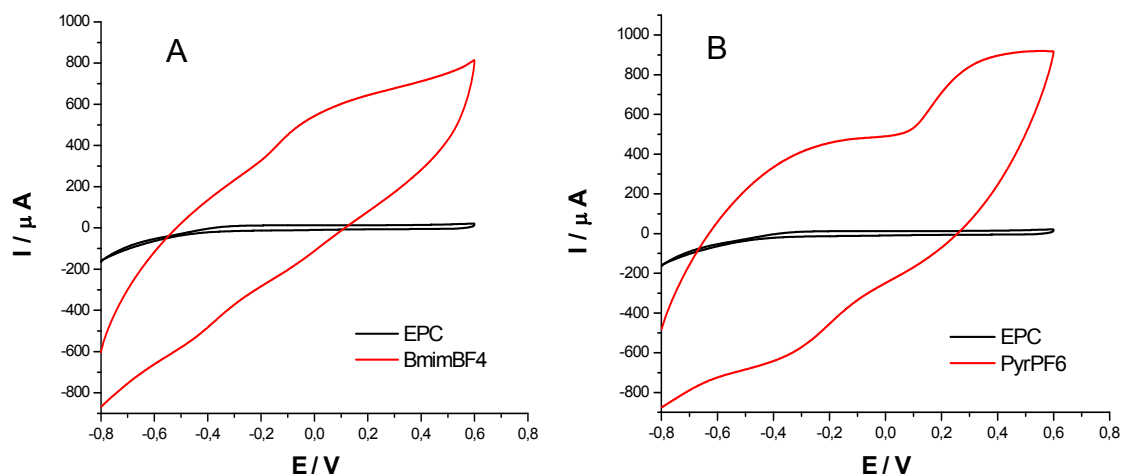


Figura 11. VC de TBR 0,1 M a pH 7,4 con EPC y EPC-BmimBF₄ (A) y con EPC y EPC-PyrPF₆ (B).

En la Tabla 6 se muestran las diferencias entre las capacitancias de los electrodos modificados con los LI, comparadas con el electrodo sin modificar, donde se observa que hay un aumento de ~ 13 veces en la capacitancia al realizar la VC con EPC-BmimBF4 y un incremento de ~ 30 veces con EPC-PyrPF6. Por lo tanto se comprueba que hay un cambio en la superficie debido a la presencia del LI.

Tabla 6. Valores de capacitancia para las superficies modificadas y sin modificar.

	EPC	EPC-BmimBF4	EPC-PyrPF6
Capacitancia (μF)	0,124	1,67	4,24

Determinación del área electroactiva

La cronocoulombimetría es la técnica comúnmente empleada para la determinación del área electroactiva, la cual se basa en la medida de la carga en función del tiempo como respuesta de un potencial aplicado. En la Figuras 12A y B se presentan las gráficas de carga-tiempo para los electrodos ensayados, en una disolución de ferricianuro de potasio a pH 7,4; observándose en ambos casos un aumento de la carga. Por otro lado, por medio de la ecuación de Anson se obtuvieron los valores del área electroactiva de ambos electrodos, observándose un aumento en área en ambos electrodos modificados pero con mayor notoriedad en EPC-BmimBF4, con un incremento de 6,8 veces para EPC-BmimBF4 y 3 veces para EPC-PyrPF6, comparado con el EPC sin modificar (Tabla 7).

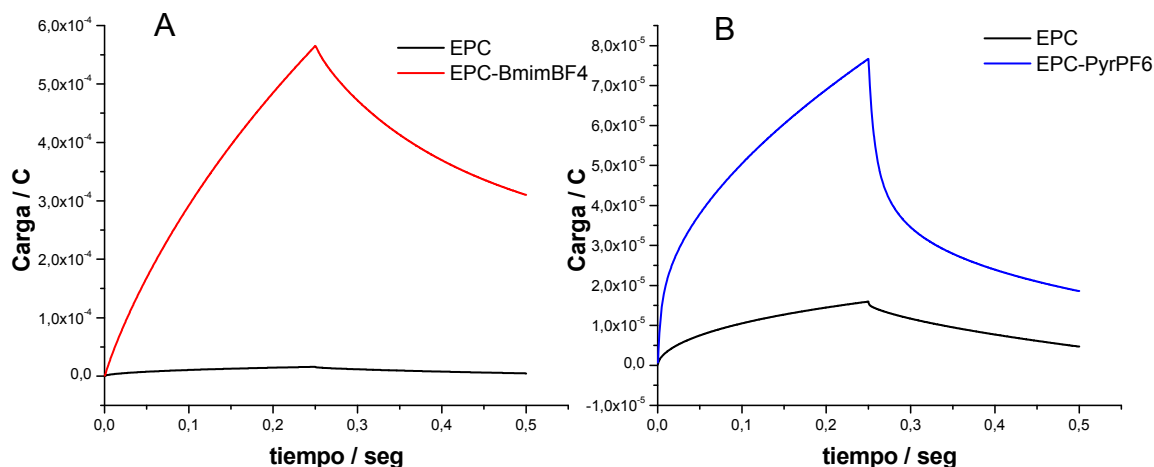


Figura 12. Carga vs tiempo para ferricianuro de potasio con EPC y EPC-BmimBF4 (A) y EPC-PyrPF6 (B).

Tabla 7. Valores de área electroactiva para las superficies modificadas y sin modificar.

	EPC	EPC-BmimBF4	EPC-PyrPF6
Área electroactiva (cm ²)	0,04	0,27	0,12

Microscopía de barrido electrónico (SEM)

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. Es por ello que a través de microscopía electrónica de barrido fue posible caracterizar y comparar la morfología de las tres superficies.

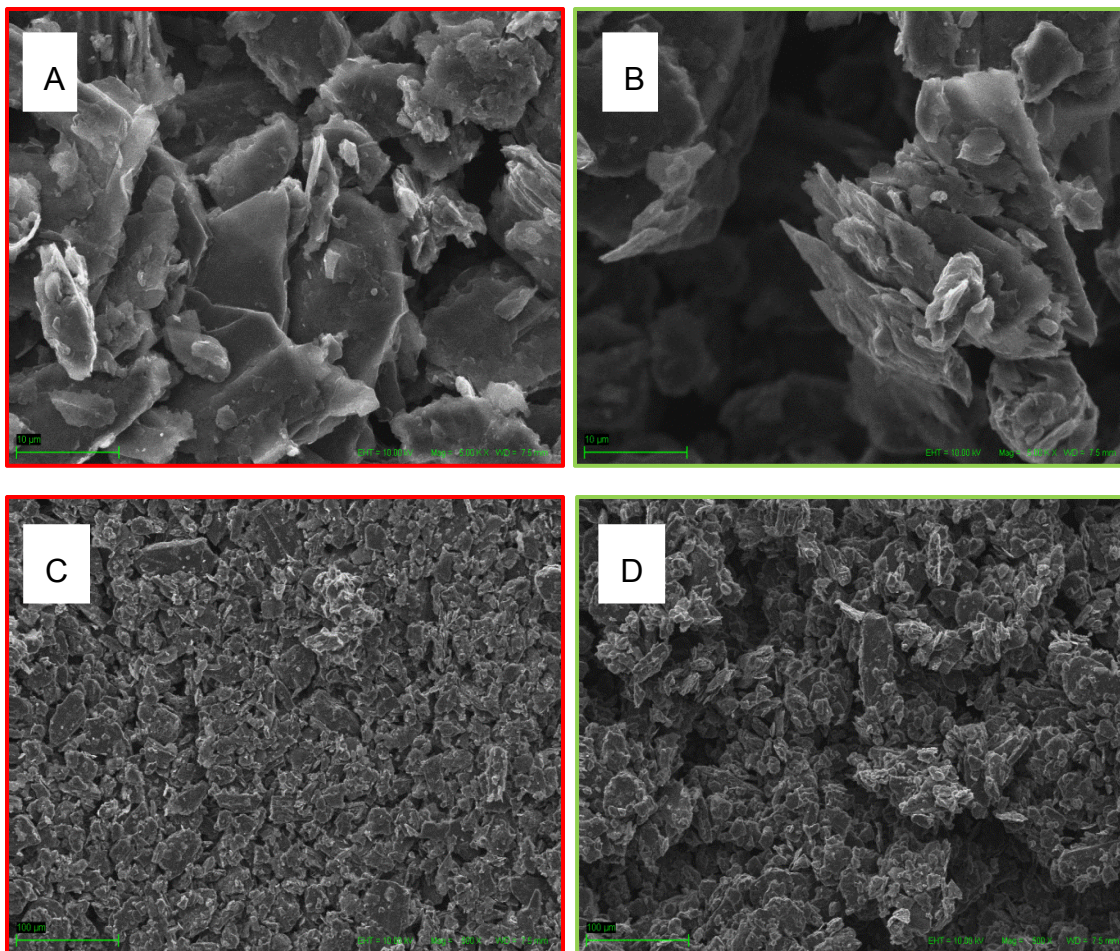


Figura 13. Imágenes SEM de PC (A) y PC-BmimBF4 (B), aumento de 5000 X y PC (C), PC-BmimBF4 (D), aumento de 500 X.

Para la PC-BmimBF4 se observan en ambos aumentos (Figuras 13B y 13D) que hay un cambio en la morfología, con lo que pareciera ser una estructura menos laminar y con más espacios intersticiales, lo cual podría ser indicativo de un incremento en el área de la superficie modificada en comparación a la PC sin modificar (Figuras 13A y 13C).

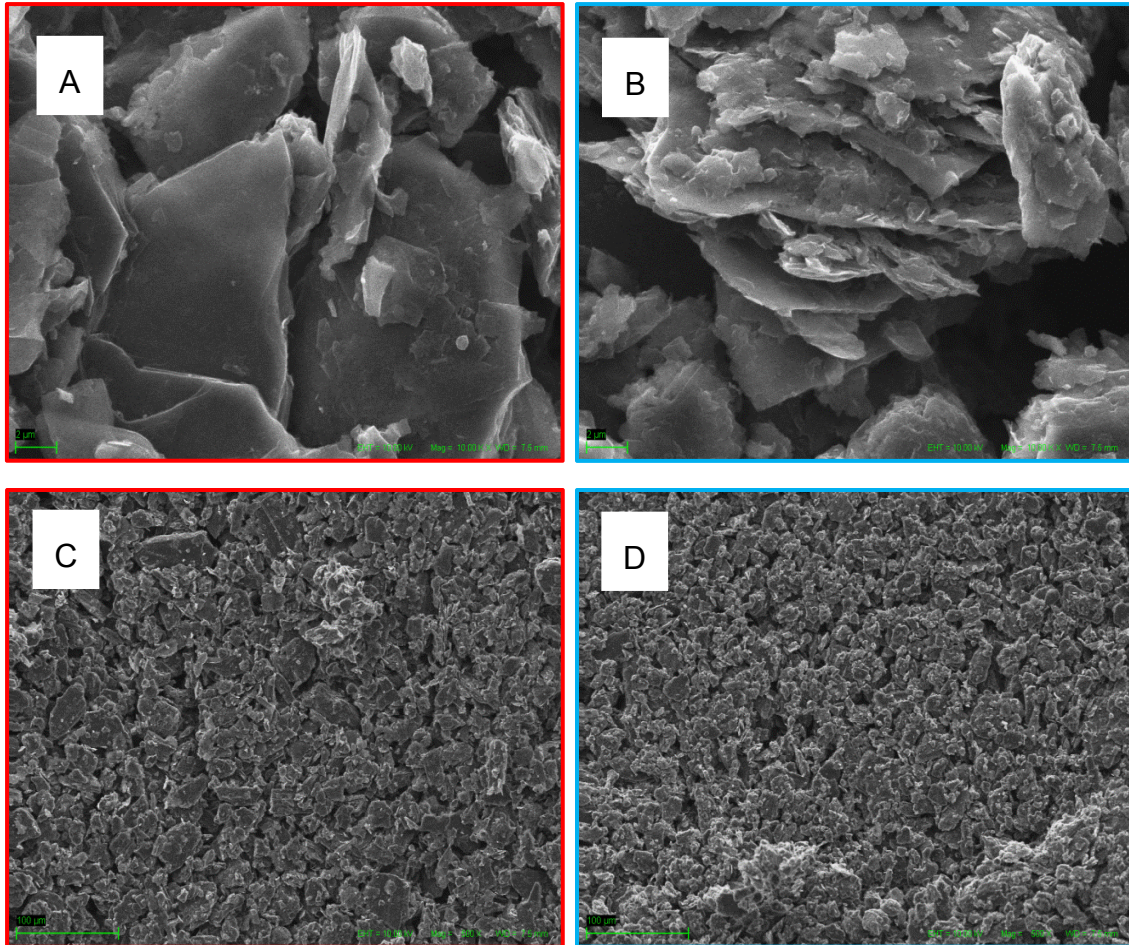


Figura 14. Imágenes SEM de PC (A), PC-PyrPF6 (B), aumento de 10.000 X y PC (C), PC-PyrPF6 (D), aumento de 500 X.

En el caso de PC-PyrPF6 no es tan evidente la diferencia entre la PC y la PC modificada, no obstante se puede apreciar un leve incremento en la rugosidad y en la aglomeración en partículas de menor tamaño (Figuras 14C y 14D), respecto a la PC sin modificar (Figuras 14A y 14C).

Microscopia de barrido electroquímico (SECM)

Esta técnica es ampliamente utilizada en electroquímica, ya que proporciona información de la homogeneidad y de la carga existente en la superficie de un electrodo. Los fundamentos de esta técnica se basan en la medición de la corriente en la superficie, a través de su análisis con un microelectrodo. Este se manipula computacionalmente para que realice un barrido en una determinada área a escala micrométrica. Entrega información bidimensional y tridimensional de la corriente presente. En la Figura 15 se presentan las imágenes obtenidas para las tres superficies:

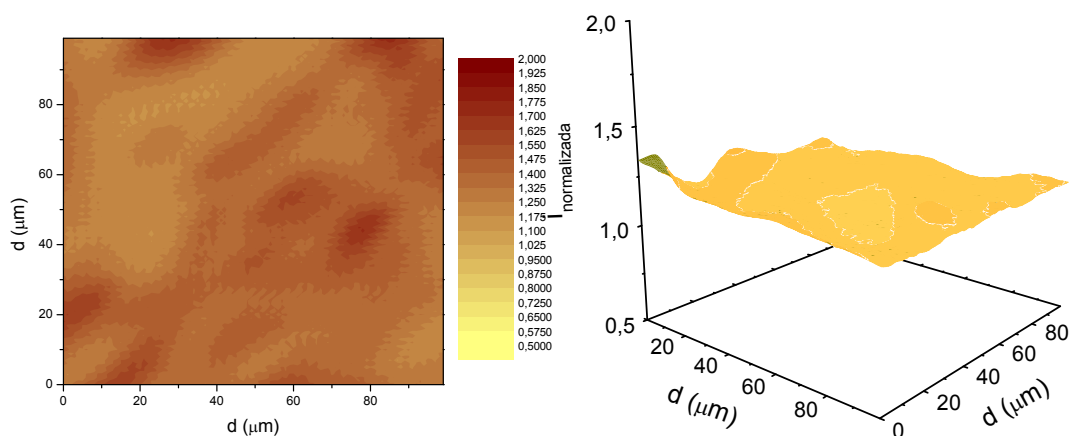


Figura 15. SECM bidimensional y tridimensional para EPC.

Para la SECM del EPC se observa una superficie bastante homogénea, sin variaciones significativas de corriente, en tanto que para la superficie correspondiente a EPC-BmimBF₄ (Figura 16), se observa una mayor irregularidad en la superficie y un incremento en la corriente, con respecto al electrodo sin modificar

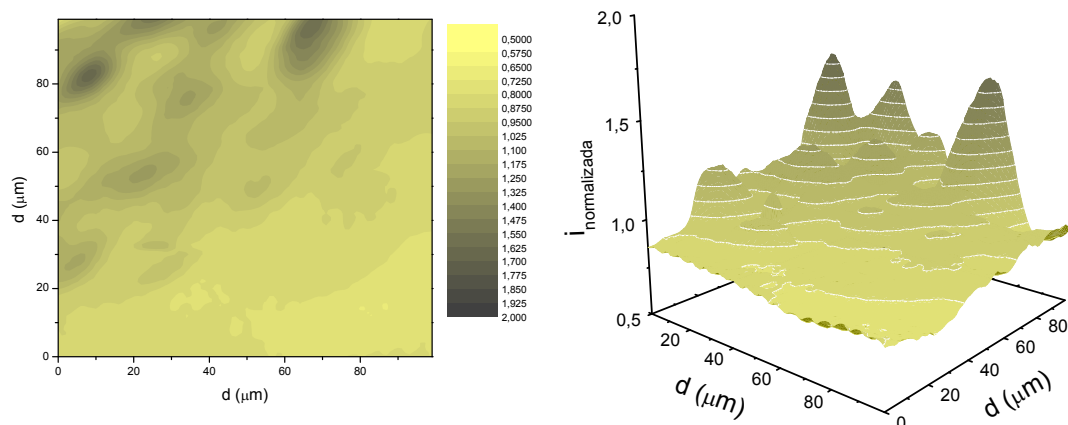


Figura 16. SECM bidimensional y tridimensional para EPC-BmimBF4.

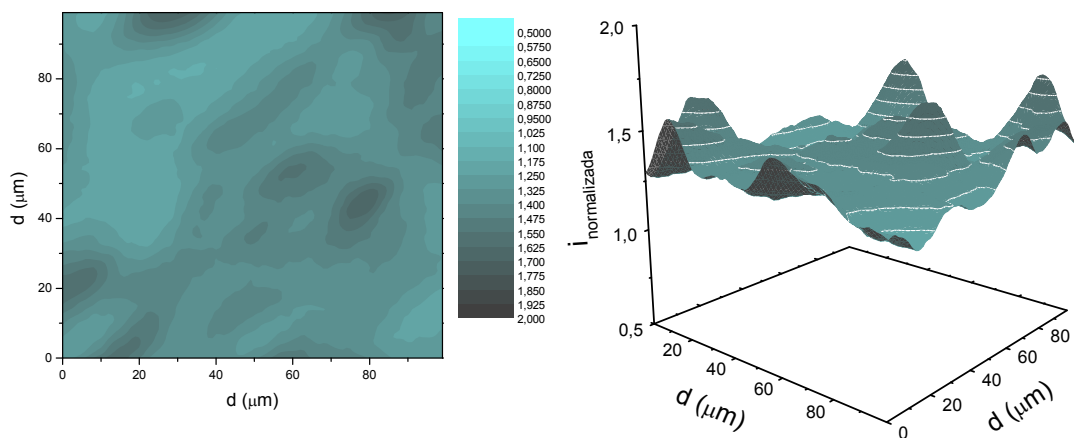


Figura 17. SECM bidimensional y tridimensional para EPC-PyrPF6.

Para EPC-PyrPF6 (Figura 17) se observa, al igual que para EPC-BmimPF6, una pérdida de la homogeneidad y un leve aumento de la corriente capacitiva.

3.3 Desarrollo de metodologías analíticas

Teniendo las superficies de los electrodos ya caracterizadas, se procedió a la utilización de éstos para el estudio del comportamiento voltamperométrico de levodopa, acetaminofeno y nitrendipino en los electrodos con las superficies modificadas. La selección del LI óptimo para cada fármaco se realizó de acuerdo a la mejor respuesta obtenida por la técnica VPD, es decir, la mejor relación entre aumento de la corriente de pico y la reproducibilidad de la señal.

En primer lugar se presenta el estudio y desarrollo de una metodología para levodopa, para continuar con acetaminofeno y finalizar con nitrendipino, todos corresponden a fármacos muy utilizados pero con distintas características redox.

Levodopa

Levodopa (ácido (2S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil) propanoico) corresponde a un fármaco utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, el cual actualmente sigue siendo el más efectivo para el alivio sintomático de la enfermedad, este precursor de la dopamina continua siendo impresionante al revertir casi todas las características de la enfermedad ³¹.

De acuerdo a sus características electroquímicas tiene la capacidad de oxidarse debido a que en su estructura posee un grupo catecol ^{1,32-37} (Figura 18).

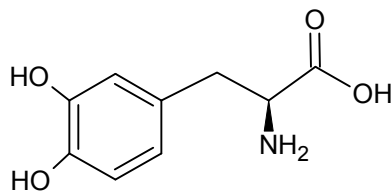
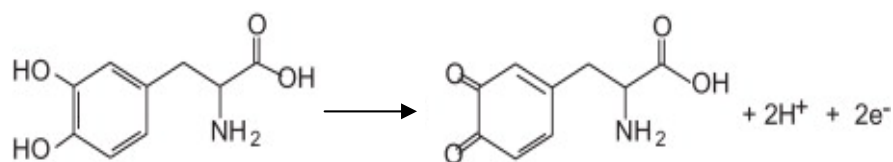


Figura 18. Estructura química de la levodopa.

A continuación se muestra la ecuación de oxidación de levodopa, para generar el derivado benzoquinona, en un proceso que involucra $2 e^-$ y $2 H^+$:



Se ensayó este fármaco con ambos LI, la mejor respuesta se obtuvo con el LI PyrPF6 ya que se observa una señal definida (Figura 19) y se favorece el proceso de oxidación de este analito, ya que el potencial de pico de la señal de levodopa medida con el EPC se presenta alrededor de los 0,460 V, en cambio con el EPC-PyrPF6 se presenta a 0,412 V. Con el EPC-BmimBF4 la señal no logra ser definida y la oxidación de la especie se dificulta, ya que su potencial de pico aparece alrededor de los 0,6 V.

Además se observa nuevamente que el LI de tipo piridinio, a diferencia del de tipo imidazolio, no aumenta significativamente la respuesta de fondo, lo que permite obtener señales definidas y sin problemas de solapamientos.

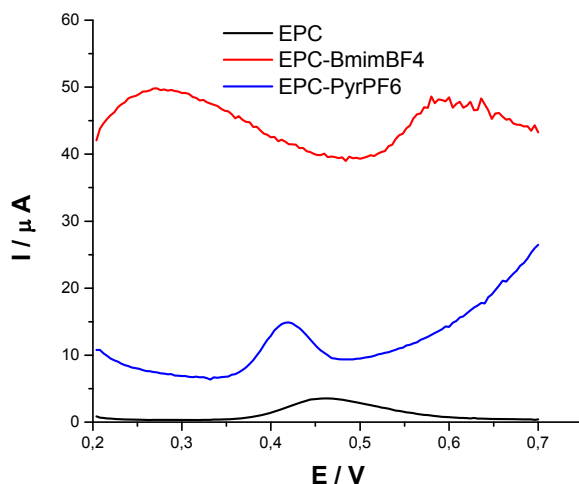


Figura 19. VPD levodopa 1×10^{-4} M con EPC, EPC-BmimBF4 y EPC-PyrPF6 a pH 2 y 2 min de acumulación.

Efecto del pH sobre la respuesta voltamperométrica de levodopa

Levodopa exhibe una respuesta anódica bien definida sobre el EPC-PyrPF6 (Figura 20). Esta respuesta es pH dependiente, desplazándose hacia potenciales menos anódicos a medida que el pH se incrementa, es decir, facilitando su proceso de oxidación, a razón de 58 mV/pH (pendiente del gráfico E_p vs pH, Figura 21A).

Levodopa presenta las mayores corrientes a pHs fuertemente ácidos (pH 2), pero no fue posible generar una respuesta reproducible, ya que el coeficiente de variación que se obtuvo superó ampliamente el 5 %, llegando incluso a un 20 %. Se ensayó variando la forma de preparación de la pasta modificada, ya que se pensó que el problema podría ser la mezcla de la PC y el LI, puesto que este LI a temperatura ambiente se encuentra en estado sólido. En primer lugar se ensayó calentando la pasta mientras se homogenizaba, lo cual no hizo que mejorara la reproducibilidad, también se intentó diluyendo previamente el LI en algún disolvente orgánico como acetona, pero el coeficiente de variación no mejoró sustancialmente.

El problema se superó finalmente, sacrificando un poco de sensibilidad en aras de la repetibilidad de la medida, midiendo la señal a pH 4, como se observa en la Figura 21 B.

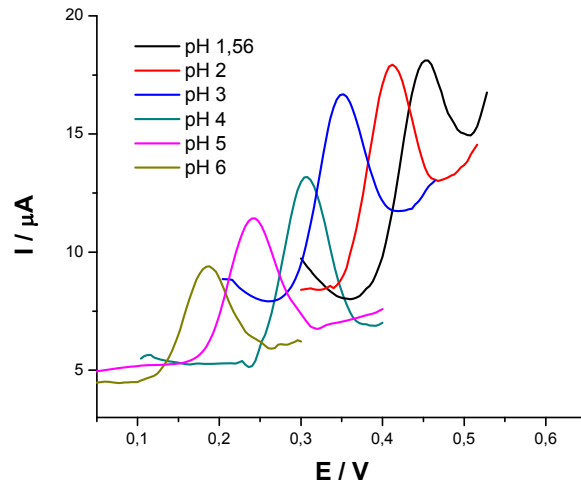


Figura 20. Efecto del pH en la señal de oxidación de levodopa (VPD).

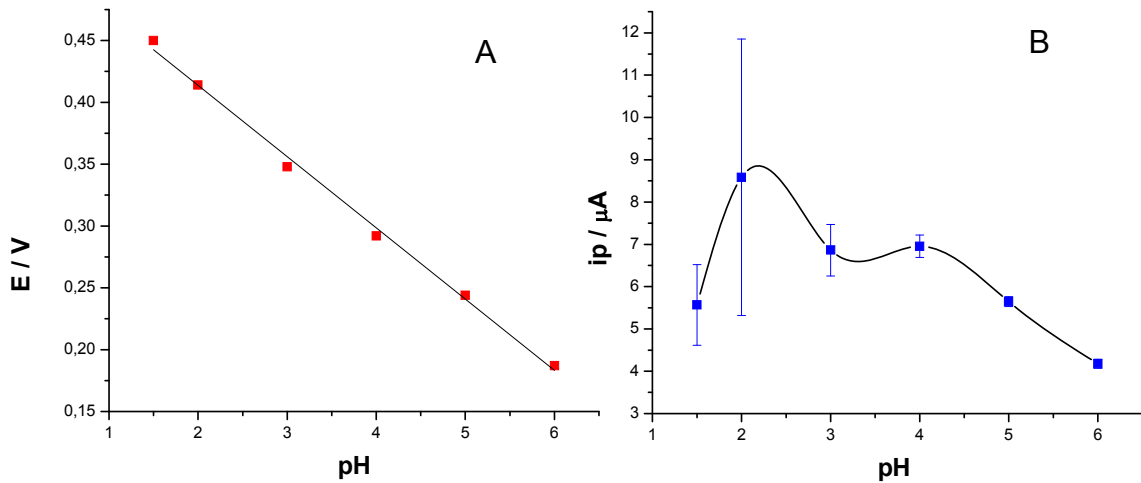


Figura 21. Efecto del pH en el potencial de pico (A) y en la corriente de pico (B) de la señal de levodopa (VPD).

Estudio de acumulación

La agitación del medio, con el fin de hacer llegar una mayor cantidad de especie electroactiva a la superficie del electrodo, se utiliza ampliamente y es una herramienta importante para aumentar la respuesta de corriente del analito, sin embargo esto es dependiente de cada especie. En el caso de levodopa, la señal voltamperométrica es demasiado ruidosa si no se aplica un tiempo de acumulación previo. En la Figura 22 se presenta la evolución en la respuesta del fármaco con el tiempo de agitación. De acuerdo a estos gráficos se observa en primer lugar, que a mayor tiempo de agitación mayor es la respuesta y menor es el ruido, llegando a un *plateau* a los 4 minutos.

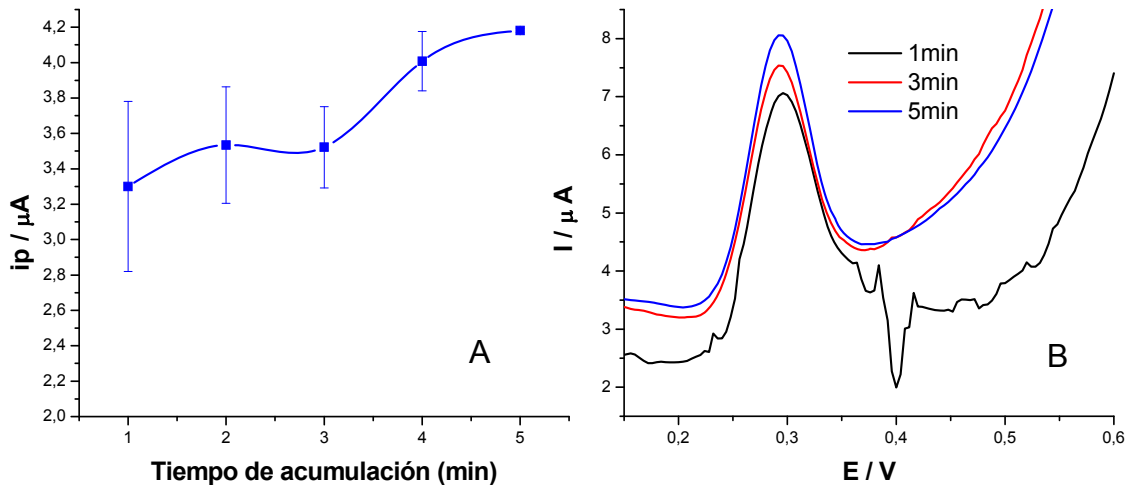


Figura 22. (A) Influencia del tiempo de acumulación en la corriente de pico de levodopa, (B) VPD de levodopa a distintos tiempos de acumulación.

Estudio de la fuerza iónica

La cantidad de electrolitos presentes en disolución puede facilitar el acceso a la superficie del electrodo, por lo tanto la concentración del buffer es importante ya que puede generar corrimientos en el potencial, también incrementos o disminución de la corriente. En este análisis se varió la concentración del TBR usada hasta ahora de 0,1 M, aumentándola al doble (0,2 M), y disminuyéndola a la mitad (0,05 M).

Las respuestas observadas (Figura 23) demuestran que no hay un cambio en el potencial de pico, ni un incremento o disminución importante en la respuesta de corriente, por lo tanto, se continua el estudio para este fármaco con TBR 0,1 M.

De acuerdo a los estudios de pH, tiempo de acumulación y fuerza iónica del medio, se seleccionan como condiciones óptimas para la determinación de levodopa con el EPC-PyrPF6, TBR 0,1 M a pH 4 y 4 min de acumulación con agitación.

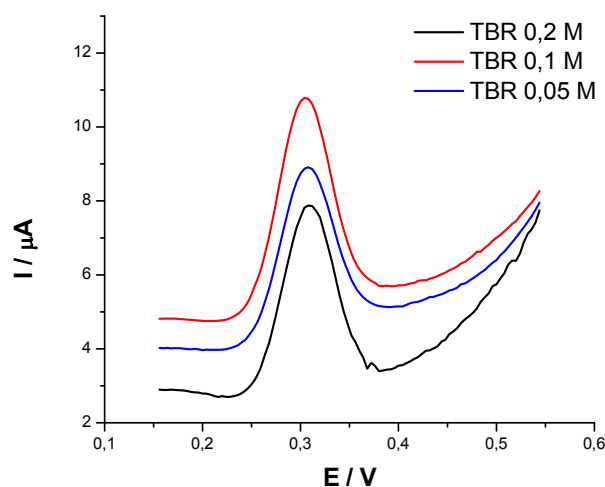


Figura 23. Influencia de la fuerza iónica del medio en la señal de levodopa 1×10^{-4} M.

Las respuestas observadas (Figura 23) demuestran que no hay un cambio en el potencial de pico, ni un incremento o disminución importante en la respuesta de corriente, por lo tanto se continuó el estudio para este fármaco con TBR 0,1 M.

De acuerdo a los estudios de pH, tiempo de acumulación y fuerza iónica del medio, se seleccionan como condiciones óptimas para la determinación de levodopa con el EPC-PyrPF6, TBR 0,1 M a pH 4 y 4 min de acumulación con agitación.

En la Figura 24 A se presentan los VPD para levodopa medida en las condiciones seleccionadas anteriormente. En dicha Figura se puede apreciar que hay claro aumento en la señal de ~ 2 veces y una clara definición de la misma, respecto al EPC. Además otro efecto observado es el efecto catalítico del electrodo modificado, ya que permite que este analito se oxide de manera más fácil, desde 0,332 V potencial al que aparece la señal de levodopa con EPC, a 0,296 V, que corresponde al potencial de la señal anódica de levodopa medido con EPC-PyrPF6.

En la Figura 24B se presenta el voltamperograma de pulso diferencial correspondiente al TBR 0,1 M medido con el EPC-PyrPF6, donde no se aprecia ninguna señal aparente, y en consecuencia no afecta en la medición de la señal anódica de levodopa.

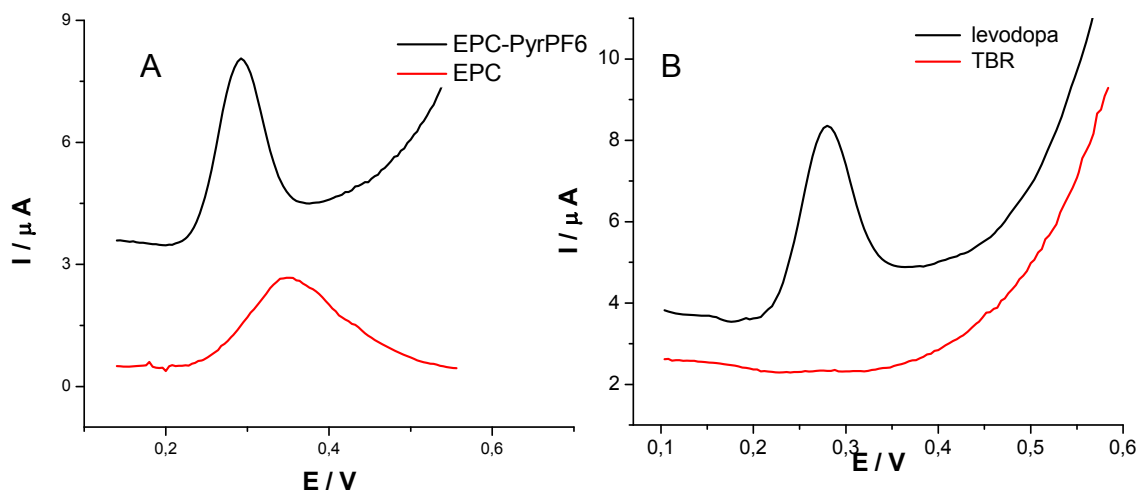


Figura 24. (A) VPD de levodopa 1×10^{-4} M con el electrodo modificado y sin modificar, 4 min de acumulación y TBR pH 4. (B) VDP de levodopa 1×10^{-4} M y el blanco (TBR 0,1 M) medidos con el electrodo modificado.

Con el fin de obtener los parámetros de eficiencia analítica asociados al método de analítico para la levodopa, se realizó una curva de calibrado (Figura 25), donde se observa una respuesta lineal entre la concentración del fármaco y la respuesta en corriente del pico de oxidación de levodopa, entre 2,4 a 16,6 μ g/mL de concentración.

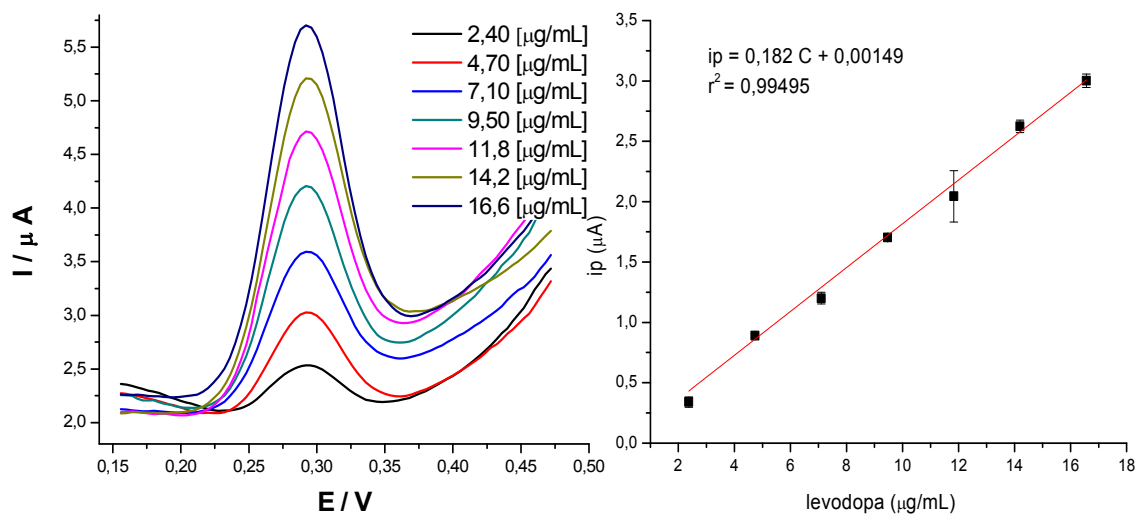


Figura 25. Curva de calibración de levodopa a pH 4,0 (TBR) y 4 min de acumulación.

En la Tabla 8 se presentan los parámetros de eficiencia analítica para el método desarrollado, donde se informan la repetibilidad (3,54 %) y reproducibilidad (5,4 %) asociada. Estos valores son bastante aceptables ya que estamos refiriéndonos a un electrodo modificado, el cual podría incurrir en un porcentaje de error mayor, ya que tiene una variable más que al hablar de un electrodo sin modificar.

Tabla 8. Parámetros de eficiencia analítica para al método desarrollado por VPD para la determinación de levodopa.

Parámetro	EPC-PyrPF6 15%
LD ($\mu\text{g/mL}$)	0,63
LC ($\mu\text{g/mL}$)	1,4
Repetibilidad (CV, %)	3,54
Reproducibilidad (CV, %)	5,4

Acetaminofeno

Este fármaco (Figura 26) habitualmente conocido como paracetamol, corresponde a un fármaco con una amplia aplicación por su acción analgésica y antipirética³⁸. En su estructura posee un hidroxilo fenólico, el cual puede ser oxidado electroquímicamente³⁹. Es un ácido débil con pK_a de 9,5; se absorbe rápidamente y se distribuye por vía oral y se excreta fácilmente por la orina. Generalmente no presenta efectos secundarios nocivos. Sin embargo, hipersensibilidad o sobredosis

de acetaminofeno conduce a la formación de metabolitos nefrotóxicos. Por otra parte, el producto de degradación hidrolítica de acetaminofeno es 4-aminofenol que puede causar efectos teratogénicos y nefrotoxicidad. Esta especie se puede encontrar en preparaciones farmacéuticas como un producto de degradación o como un intermedio sintético⁴⁰. Por lo tanto, el desarrollo de métodos analíticos simples, sensibles y precisos para la determinación de acetaminofeno en preparaciones farmacéuticas y plasma humano es de gran importancia. Hasta la fecha, las técnicas electroquímicas han sido ampliamente exploradas para la detección del acetaminofeno, que tiene las ventajas de alta sensibilidad, menos los costos que consumen mucho tiempo y bajos con respecto a otros métodos analíticos.

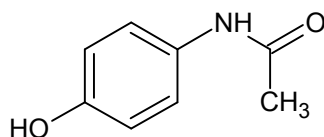
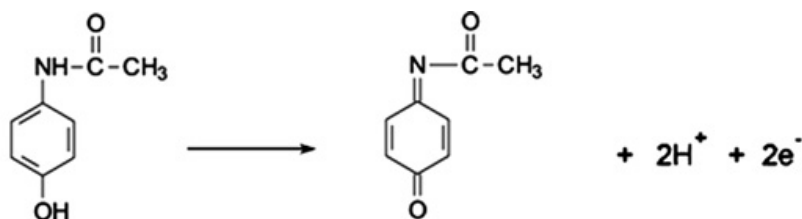


Figura 26. Estructura química de acetaminofeno.

A continuación se muestra la ecuación de oxidación de acetaminofeno para generar N-acetilbenzoquinona imina, en un proceso que involucra $2 e^-$ y $2 H^+$:



Para este fármaco se realizó un estudio similar al de levodopa para elegir el LI con el cual será cuantificado, por lo tanto se ensayó en primera instancia con EPC-BmimBF₄ y con EPC-PyrPF₆. La mejor respuesta para este analito se obtuvo con el

LI de tipo imidazolio BmimBF₄, como se observa en la Figura 27A, ya que la señal obtenida con este LI es significativamente mayor y con menos ruido que la observada con PyrPF₆ (Figura 27B), donde la respuesta incluso llega a ser menor que con el electrodo sin modificar.

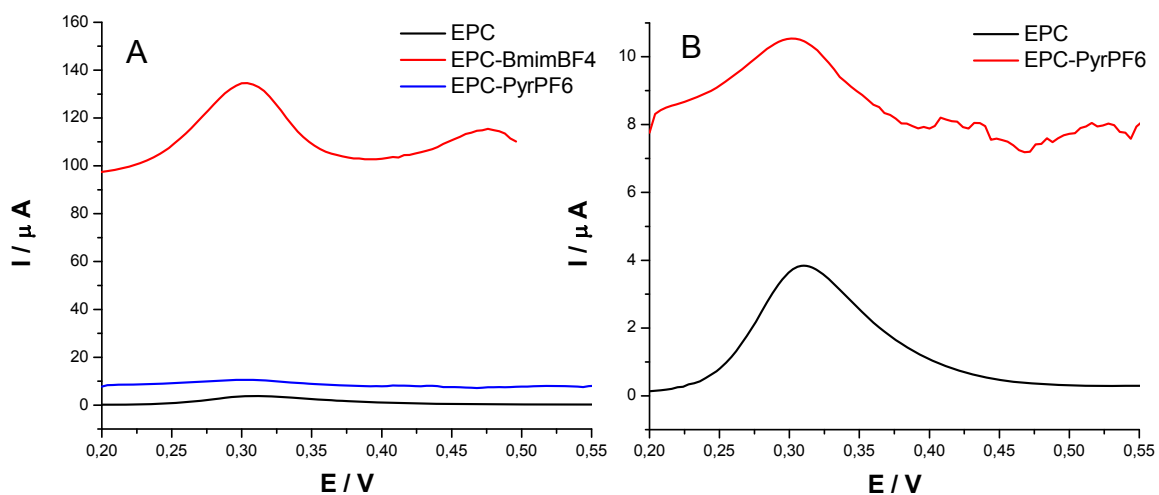


Figura 27. VPD de acetaminofeno 1×10^{-4} M a pH 7 (A) EPC, EPC-BmimBF₄ y EPC-PyrPF₆. (B) EPC y EPC-PyrPF₆.

También se observa que si bien BmimBF₄ conlleva un importante crecimiento en la respuesta de fondo, en este primer análisis no afecta la resolución de la señal anódica, observándose una señal definida y adecuada para continuar con la optimización y desarrollo de la metodología analítica.

Efecto del pH sobre la respuesta voltamperométrica de acetaminofeno

Las señales con mayores intensidades de corriente anódica para este fármaco se encontraron a pHs neutros, particularmente a pH 7 (Figura 28B). La señal de esta especie va desplazándose a potenciales cercanos a cero a medida que se incrementa el pH del medio, esto implica que el proceso de oxidación se facilita a razón de 61,5 mV/pH (pendiente obtenida del gráfico E_p vs pH, (Figura 28A)).

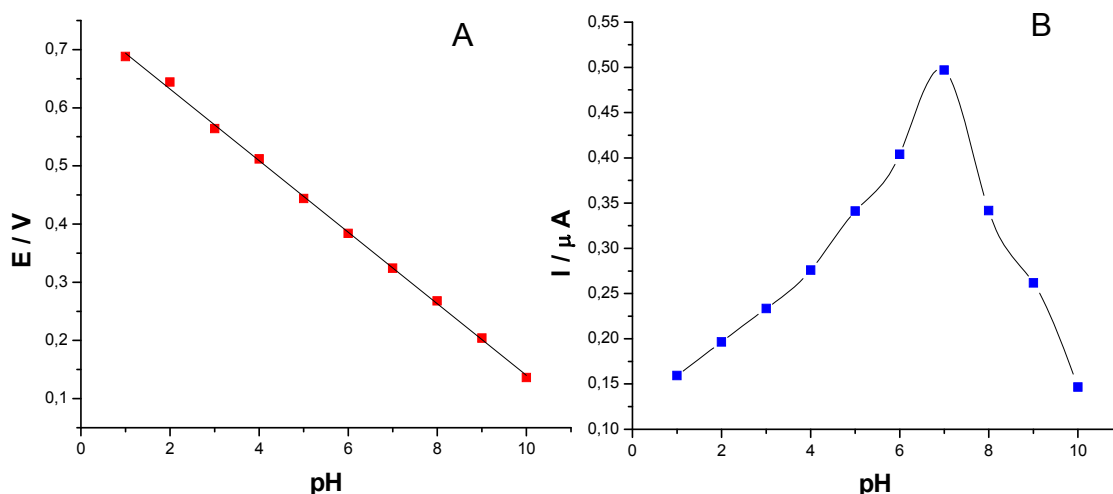


Figura 28. Efecto del pH en el potencial (A) y en la corriente pico (B) de la señal de oxidación de acetaminofeno (VPD).

Estudio de acumulación

Con el fin de seleccionar las condiciones óptimas para determinar acetaminofeno, se realizó la medición de este analito a distintos tiempos de acumulación, con el fin de seleccionar el tiempo al cual se observe la mayor respuesta en corriente. El estudio se llevó a cabo desde 1 minuto hasta 4 minutos de

acumulación previa, como se observa en la Figura 29, el tiempo óptimo de medida es a los 2 minutos de acumulación, posterior a este tiempo la señal decae notoriamente.

Para este analito las señales observadas sin acumular previamente en la superficie del electrodo modificado presentan algo de ruido, el cual desaparece al acumular desde 1 minuto en adelante.

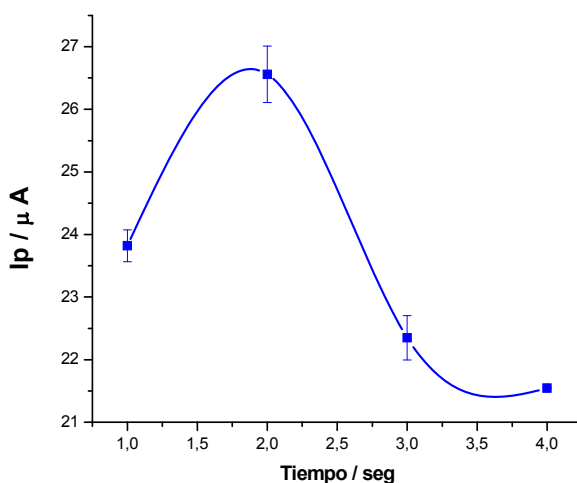


Figura 29. Influencia del tiempo de acumulación en la corriente de pico de acetaminofeno.

Estudio de la fuerza iónica

Al igual que en el caso anterior para levodopa, se estudió el comportamiento de la señal anódica de acetaminofeno en presencia de una mayor concentración de electrolitos presentes en la disolución, es decir, al doble de concentración TBR y a la mitad de la concentración de TBR utilizada hasta ahora.

En las mediciones realizadas con el EPC-BmimBF₄ se observa una señal producida por el TBR alrededor de los 0,510 V en TBR 0,1 M, señal que se desplaza

hacia potenciales más positivos a medida que se incrementa la fuerza iónica (Figura 30). Cabe hacer notar que esta señal no se observa cuando se trabaja con el EPC-PyrPF6.

Por otra parte, como se observa en la Figura 30, no hay una diferencia significativa entre la señal de oxidación del acetaminofeno obtenida en TBR 0,05 M a la obtenida con TBR 0,1 M, pero sí se aprecia a simple vista que al doblar la concentración del tampón la respuesta en corriente es menor, y la señal del fármaco comienza a solaparse con la del tampón. Por lo tanto, se decidió en beneficio del método y de los resultados anteriores de acumulación y pH, continuar con TBR 0,1 M a pH 7 y 2 min de acumulación con agitación.

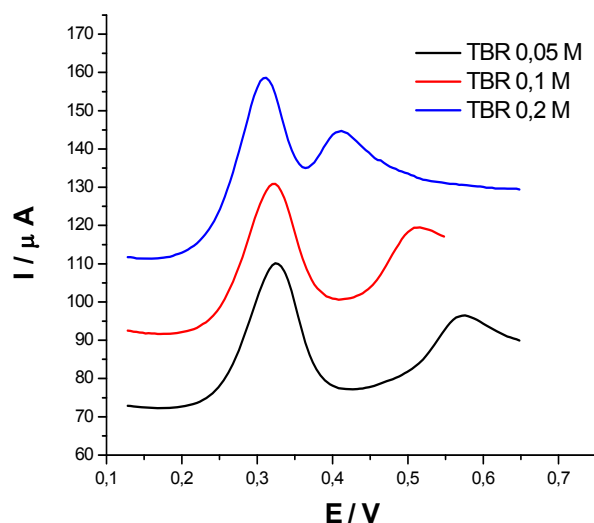


Figura 30. VPD de acetaminofeno 1×10^{-4} M a distintas concentraciones de TBR pH 7,0 con 2 min de acumulación.

En la Figura 31 se presenta el VPD de acetaminofeno medido en las condiciones óptimas seleccionadas, empleando el EPC y el EPC-BmimBF₄. En esta figura se puede observar que la oxidación de acetaminofeno se ve dificultada en el

electrodo modificado, ya que con el electrodo desnudo la señal anódica aparece a los 0,200 V, en cambio con el electrodo modificado aparece a los 0,312 V. Por otro lado, se observa un aumento significativo en la intensidad de corriente de la señal del fármaco, en aproximadamente 20 veces en comparación al obtenido con el EPC.

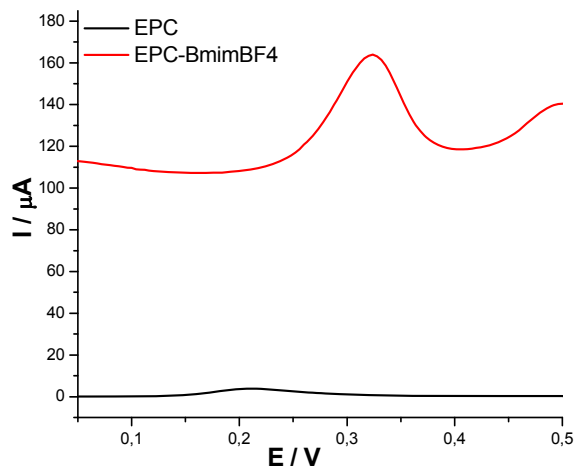


Figura 31. VPD de acetaminofeno 1×10^{-4} M medidos con el electrodo modificado y sin modificar, 2 min de acumulación y TBR pH 7.

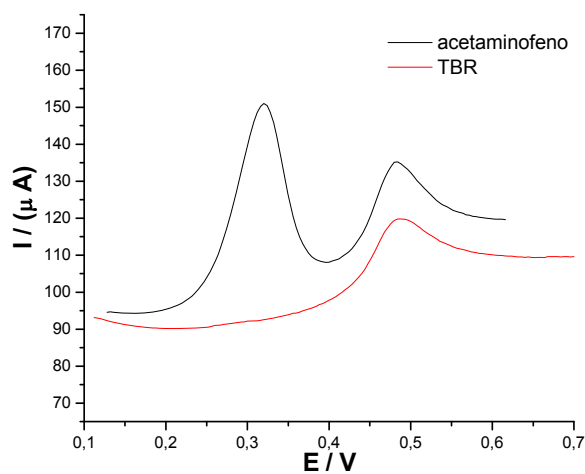


Figura 32. VPD de acetaminofeno 1×10^{-4} M y TBR 0,1 M pH 7 medidos con el electrodo modificado.

En la Figura 32 se presentan los VPD de acetaminofeno y del TBR 0,1 M, ambos medidos con el electrodo modificado. Se observa una señal cercana a los 0,5 V, aparentemente debida al tampón utilizado, y que no afecta la medición de acetaminofeno a través de la metodología desarrollada.

Finalmente se realizó una curva de calibración, donde se observa un comportamiento lineal entre la corriente de pico la concentración de acetaminofeno, manteniendo el mismo potencial de pico de la señal correspondiente a 0,312 V. En la Tabla 9 se presentan los parámetros de eficiencia analítica asociados al método desarrollado.

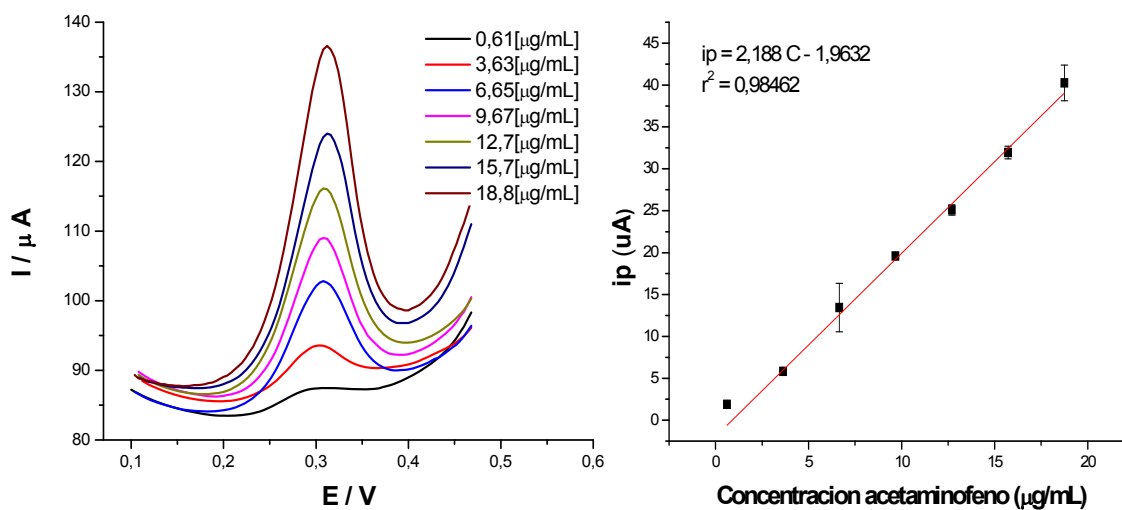


Figura 33. Curva de calibración de acetaminofeno.

Tabla 9. Parámetros de eficiencia analítica para el método desarrollado por VPD para la determinación de acetaminofeno.

Parámetro	EPC-BmimBF4 (5 %)
LD (ng/mL)	51
LC (ng/mL)	67
Repetibilidad (CV, %)	4,2
Reproducibilidad (CV, %)	4,6

Nitrendipino

Nitrendipino, 5-O-etil 3-O-metil 2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato (Figura 34), es un agente antihipertensivo arterial potente y fiable, corresponde a un bloqueador de canales de calcio con acción vasodilatadora ⁴¹, pertenece a la serie de antagonistas del calcio, este medicamento es indicado en el tratamiento básico de la hipertensión arterial y es ampliamente utilizado en todo el mundo.

Con respecto a sus características redox, tiene posibilidades de oxidarse (anillo dihidropiridínico) y de reducirse (grupo nitroaromático) ^{42,43}. Este fármaco presentó mejores respuestas en reducción, ya que al realizar la comparación de la señal anódica de nitrendipino entre el EPC y EPC-BmimBF4, no se obtuvo un incremento en la corriente al emplear el electrodo modificado.

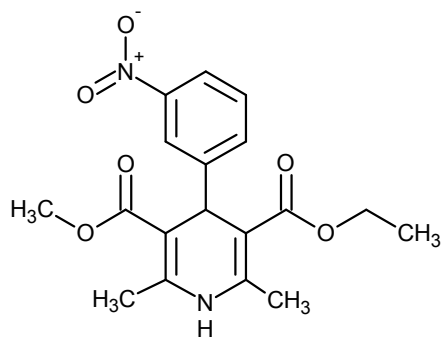
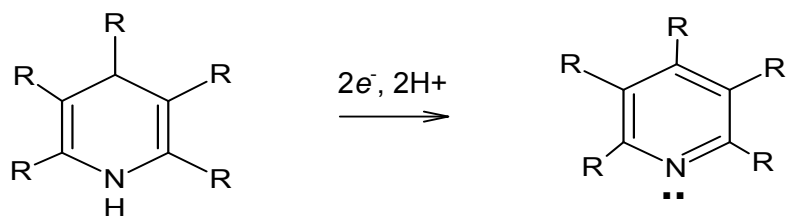
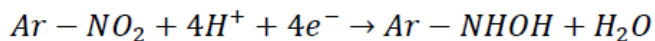


Figura 34. Estructura química de nitrendipino.

A continuación se muestra la ecuación de oxidación para nitrendipino, para generar el correspondiente derivado piridínico, en un proceso que involucra $2 e^-$ y $2 H^+$:



y su ecuación de reducción, desde el grupo nitroaromático al derivado hidroxilamina correspondiente, en un proceso que involucra $4 e^-$ y $4 H^+$:



Para este fármaco se utilizó el LI de tipo imidazolio BmimBF₄, ya que al intentar realizar varias mediciones de nitrendipino con PyrPF₆, la superficie del electrodo se desprendía producto de que la solución stock de nitrendipino se prepara en etanol y el porcentaje de etanol que queda al preparar la disolución de medida,

hace que esta pasta se salga de la cavidad del electrodo, debido probablemente a que el anión BF_4 es más hidrofílico.

Efecto del pH sobre la respuesta voltamperométrica de nitrendipino

Nitrendipino exhibió una respuesta catódica bien definida en el electrodo modificado, pero en un intervalo de pH estrecho (Figura 35). A medida que se incrementa el pH del medio, la señal del fármaco va disminuyendo y solapándose con la señal del TBR, como puede observarse a pH 6 y pH 7, es por esto que el estudio se realizó hasta estos valores de acidez. Nitrendipino presentó las respuestas de corriente catódicas más elevadas a pHs ácidos (Figura 36). La señal de nitrendipino experimenta su proceso de reducción a razón de 43,0 mV/pH (pendiente del gráfico E_p vs pH).

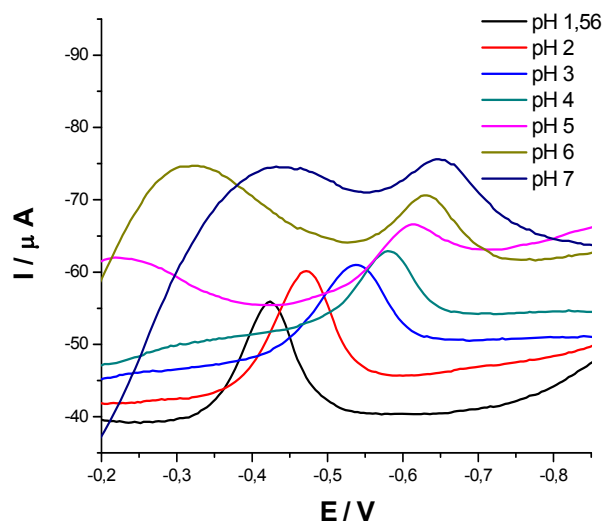


Figura 35. Efecto del pH en la señal de nitrendipino 5×10^{-5} M (VPD).

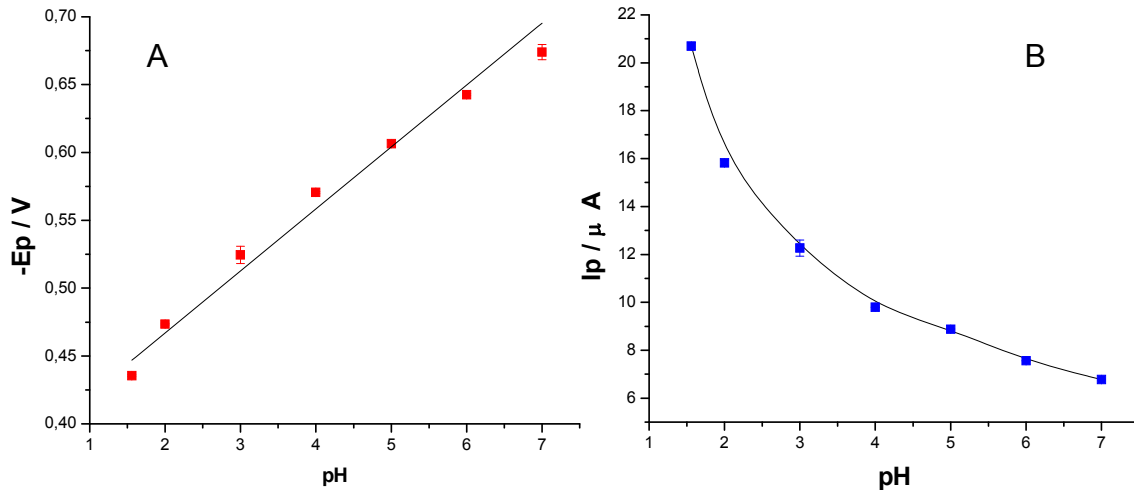


Figura 36. Efecto del pH en el potencial de pico (A) y en la corriente (B) de la señal de nitrendipino 5×10^{-5} M en TBR (VPD).

Estudio de acumulación

Con respecto a este análisis se observa claramente que la superficie permite acumular analito hasta un tiempo límite de 5 minutos y posteriormente a este tiempo la respuesta obtenida comienza a decrecer en corriente, por lo tanto, se seleccionó 5 minutos como el tiempo óptimo de acumulación previa (Figura 37).

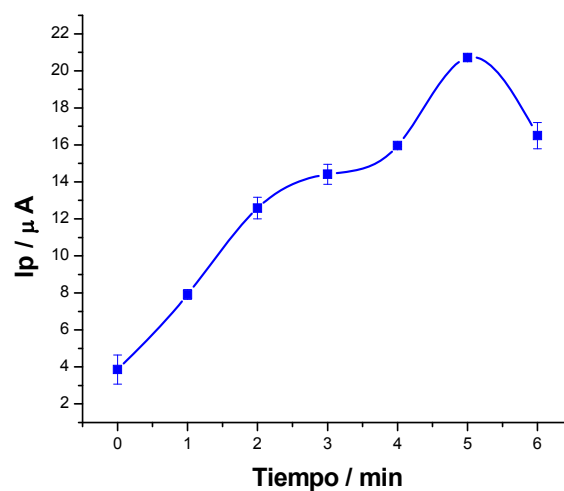


Figura 37. Influencia del tiempo de acumulación en la corriente de pico de nitrendipino a distintos tiempos.

Estudio de la fuerza iónica

Al igual que para los anteriores fármacos se varió la concentración del TBR con el fin de observar su influencia en la respuesta de nitrendipino. En este caso se observa que al doblar la concentración del tampón disminuye la respuesta en corriente para este analito, además de dificultarse el proceso de transferencia electrónica, ya que la señal aparece alrededor de los -0,690 V, en cambio cuando se mide con TBR 0,1 M aparece a -0,426 V. En el caso de TBR 0,05 mol/L si bien el proceso se ve favorecido, la señal en corriente no aumenta como se muestra en la Figura 38.

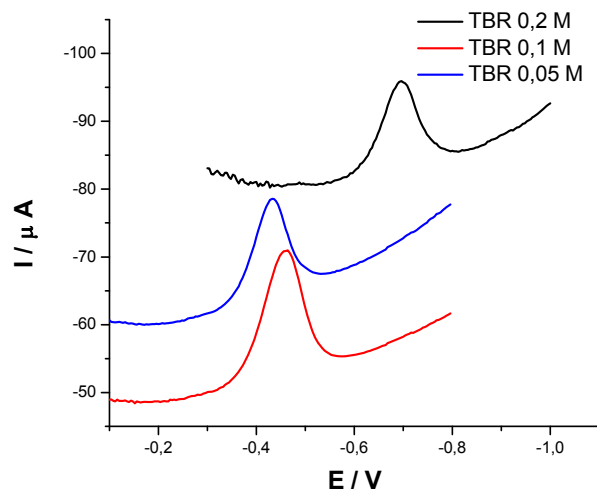


Figura 38. VPD de nitrendipino 5×10^{-5} mol/L con 5 min de acumulación previa a distintas concentraciones de TBR a pH 1,56.

Las condiciones óptimas para la medición de nitrendipino de acuerdo a la metodología desarrollada, son 5 min como tiempo de acumulación y TBR 0,1 M pH 1,56.

A continuación se presenta la señal de nitrendipino medida en las condiciones óptimas seleccionadas para el EPC-BmimBF₄ comparado con el EPC, donde se observa en primer lugar que hay un incremento en la respuesta de corriente catódica en 17 veces comparado con el electrodo sin modificar y también se observa que no hay un corrimiento en el potencial de pico de la señal de reducción de nitrendipino (Figura 39A). Además se puede observar que no hay interferencias del tampón en la medición de la señal de reducción de nitrendipino por medio de la metodología desarrollada (Figura 39B).

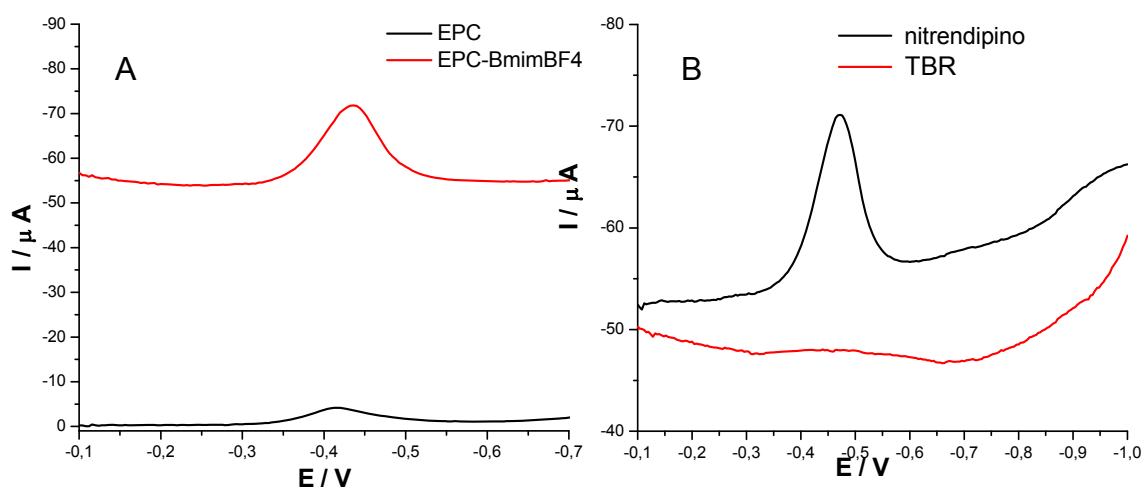


Figura 39. (A) VPD nitrendipino 5×10^{-5} M a pH 1,56 con EPC y EPC-BmimBF₄. (B) VPD nitrendipino 5×10^{-5} M y TBR 0,1 M (pH 1,56) medido con EPC-BmimBF₄.

En el estudio de concentración realizado para nitrendipino se observa un comportamiento lineal en la señal de reducción (Figura 40), a medida que se aumenta la concentración del fármaco. La curva se realizó con ocho puntos cada punto por triplicado, la ecuación obtenida se muestra en la Figura 40.

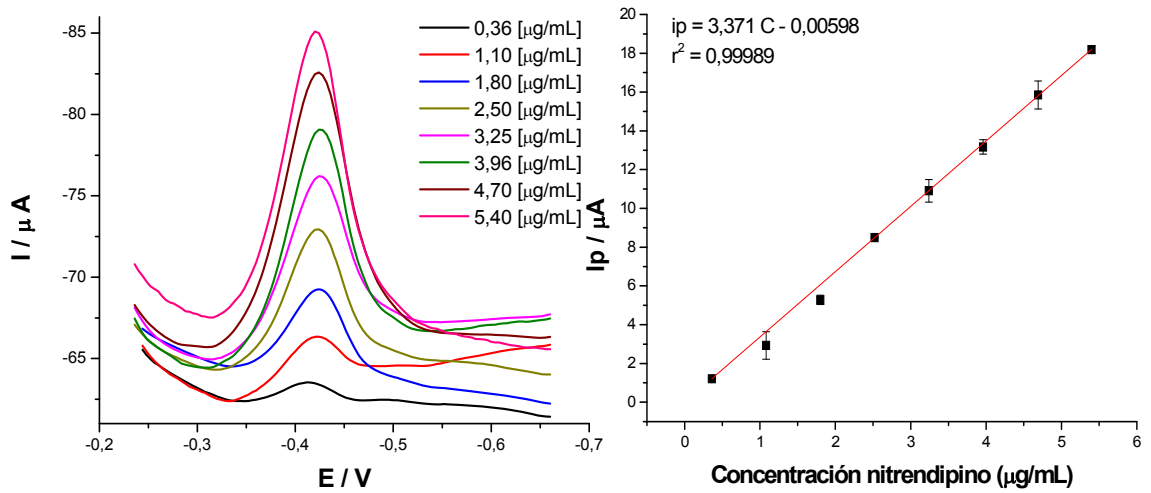


Figura 40. Curva de calibración de nitrendipino.

En la Tabla 10 se exhiben los parámetros de eficiencia analítica asociados a la metodología desarrollada, donde se observa una reproducibilidad de un 4,62 %, valor aceptable ya que se trata de un electrodo modificado.

Con respecto a los límites de detección y cuantificación, representan valores bastante pequeños, por lo tanto, le otorgan una gran sensibilidad al método desarrollado.

Tabla 10. Parámetros de eficiencia analítica para nitrendipino.

Parámetro	EPC-BmimBF4 (5 %)
LD (ng/mL)	25
LC (ng/mL)	81
Repetibilidad (CV, %)	3,95
Reproducibilidad (CV, %)	4,62

Otra variable observada en el desarrollo de las metodologías descritas anteriormente, fue la estabilidad que presentaron las pastas modificadas con el correr de los días, demostrando ambas pastas una buena estabilidad (PC-PyrPF6 con un 15% de LI y PC-BmimBF4 con un 5% de e LI), ya que podían utilizarse en la medición de los distintos fármacos, hasta un tiempo límite de 2 semanas desde su preparación, teniendo el cuidado de ser guardadas después de su utilización en un ambiente seco (desecadora).

En la Tabla 11 se comparan los LDs obtenidos en la presente tesis, para levodopa, acetaminofeno y nitrendipino, con los LDs informados en la literatura para otras técnicas. Se puede apreciar un valor de LD para levodopa similar al obtenido por Amperometría empleando un electrodo impreso de oro, en tanto que para acetaminofeno y nitrendipino se obtuvieron LDs menores al ser comparados con otros

electrodos modificados (SWCNT/CCE y GCE-NTC-BMINPF6-quitosano). Las metodologías desarrolladas en este trabajo en general demuestran ser sensibles y sencillas ya que no se necesita tratamiento previo a las muestras.

Tabla 11. Comparación de LDs encontrados con otras técnicas.

Fármaco	LD EPC-LI (esta Tesis)	LD Otras técnicas	Técnica	Referencia
Levodopa	0,63 µg/mL	0,2 µg/mL	Amperometría (electrodo impreso de oro)	[37]
Acetaminofeno	51 ng/mL	18 µg/mL	SWCNT/CCE	[44]
Nitrendipino	25 ng/mL	0,5 ng/mL	HPLC-SPE	[45]
		36 ng/mL	Voltamperometría de barrido lineal (GCE- NTC-BMINPF6- quitosano)	[46]

SWCNT/CCE: Electrodo de carbono-cerámica modificado con nanotubos de carbono de pared simple.

HPLC-SPE: Cromatografía líquida de alta eficiencia con extracción en fase sólida en línea.

GCE-NTC-BMINPF6-quitosano: electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono, BMINPF6 y quitosano.

En la siguiente sección se procedió a la aplicación de las metodologías desarrolladas anteriormente en muestras comercializadas actualmente de cada fármaco.

3.4 Aplicación de las metodologías desarrolladas en formulaciones farmacéuticas

Los métodos desarrollados se aplicaron en formulaciones farmacéuticas que se comercializan actualmente, con el fin de estudiar la real aplicabilidad del método, ya que estos fármacos se encuentran mezclados con excipientes y en el caso de Prolopa[®] HBS contiene dos principios activos (levodopa y benserazida).

En este estudio se realizó la valoración (Materiales y Métodos sección 2.2.8) de los tres fármacos en la formulaciones Prolopa[®] HBS (Roche), Acetaminofeno LCh[®] (Laboratorio Chile) y Nitrendipino (Andrómaco), cada muestra se realizó por triplicado.

Aplicación en Prolopa[®] HBS (Roche)

Cada cápsula declara un contenido nominal de 100 mg de levodopa y 25 mg de benserazida como clorhidrato y excipientes. En la valoración de levodopa, el porcentaje encontrado sobre lo declarado fue de 93,8 % \pm 1,95 % (promedio de tres muestras independientes). Al respecto, en primer lugar se puede decir que el método desarrollado es adecuado para su aplicación en la cuantificación de levodopa en el producto Prolopa[®]HBS, los potenciales de la señal de oxidación son coherentes con el observado en los estudios anteriores, donde levodopa aparece a un potencial de 0,292 V.

Otra importante observación en esta aplicación es que Prolopa[®]HBS contiene dos principios activos (levodopa y benserazida) y como se observa en la Figura 41A, la señal está bien definida y ni benserazida ni los excipientes presentes interfieren en la medición (Figura 41B), por lo tanto, el método es selectivo. Cabe destacar por otra parte, que la benserazida (2-amino-3-hidroxi-2'-(2,3,4-trihidroxibencil) propionohidrazida) contiene tres grupos hidroxilos aromáticos que son susceptibles de oxidar electroquímicamente, pero que en las condiciones analíticas ensayadas, la señal de oxidación de benserazida no se detecta en el ensayo de valoración de levodopa.

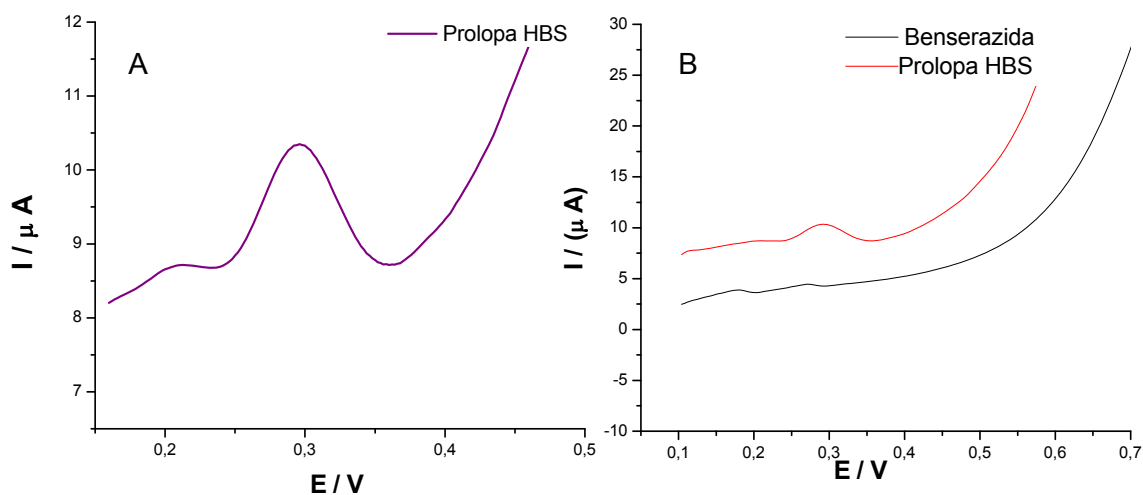


Figura 41. (A) VDP de levodopa en el producto Prolopa[®]HBS, (B) VDP de levodopa en el producto Prolopa[®]HBS y benserazida a la concentración encontrada en la muestra estudiada.

Aplicación en Paracetamol LCh[®] (Laboratorio Chile)

El método desarrollado para determinar acetaminofeno se aplicó en una muestra de Paracetamol LCh[®], que declara por cada comprimido 500 mg de acetaminofeno como principio activo y excipientes.

Las señales obtenidas de Paracetamol LCh[®] son bien definidas y no se observa la interferencia de ninguna otra especie. Como se observa en la Figura 42, no experimentan tampoco ningún corrimiento significativo del potencial de pico de acetaminofeno, el cual en los experimentos anteriores fue de 0,312 V. Con respecto al ensayo de valoración, el porcentaje encontrado fue mayor a lo declarado, con un $110,8 \% \pm 0,8 \%$, como promedio de tres muestras independientes. Tomando en cuenta que los excipientes clásicos empleados en formulaciones farmacéuticas sólidas no suelen interferir en las determinaciones voltamperométricas, es posible especular que la formulación efectivamente tiene un 110 % sobre lo declarado en el envase y que el resultado no se debe a una falta de selectividad del método desarrollado.

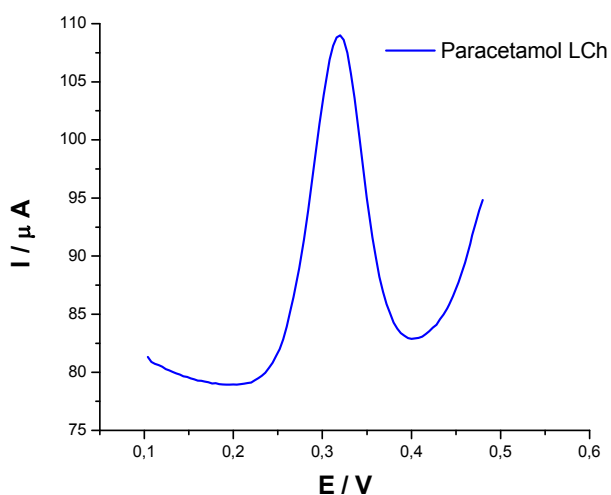


Figura 42. VDP de acetaminofeno en el producto Paracetamol LCh[®].

Aplicación en Nitrendipino (Andrómaco)

Por último, se pone a prueba el método desarrollado para determinar nitrendipino, para esto se adquirió una caja de comprimidos de nitrendipino de 20 mg

fabricado por laboratorios Andrómaco. Además del principio activo, este fármaco al igual que los dos anteriores contiene una serie de excipientes.

El método desarrollado demuestra ser efectivo para la muestra analizada, ya que se obtiene la señal característica de reducción para nitrendipino (Figura 43), a un potencial de aproximadamente $-0,420$ V, sin observar interferencias de la matriz. En la valoración de nitrendipino, el porcentaje encontrado sobre lo declarado fue de $95,1\% \pm 0,6\%$ (promedio den tres muestras independientes).

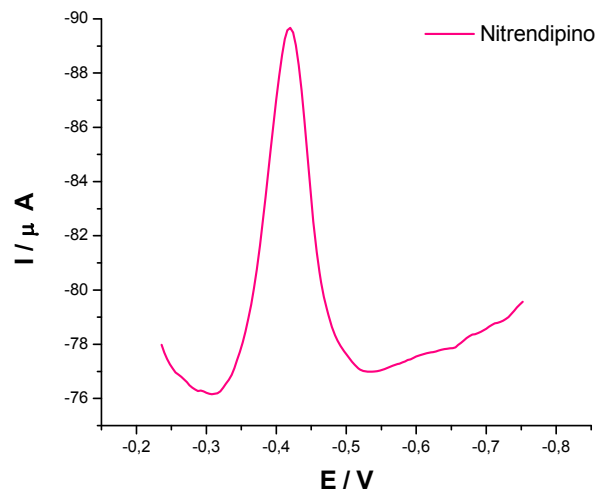


Figura 43. VDP de nitrendipino.

4. CONCLUSIONES

- Se logró preparar electrodos modificados a base de pasta de carbono, utilizando cuatro LIs distintos (dos de tipo imidazolio y dos de tipo piridinio), seleccionando finalmente dos de estos electrodos para el desarrollo de las metodologías analíticas (EPC-BmimBF₄ y EPC-PyrPF₆).
- Se caracterizó la superficie de los electrodos seleccionados tanto morfológica (SEM y SECM), como electroquímicamente (cronocoulombimetría). En ambos casos se observaron mejores características con los electrodos modificados al ser comparados con el EPC.
- Se desarrollaron métodos analíticos empleando VPD, para la determinación de tres fármacos con actividad redox reconocida; levodopa con el EPC-PyrPF₆, acetaminofeno y nitrendipino con el EPC-BmimBF₄.
- Se optimizaron las variables de pH de trabajo, fuerza iónica del medio y el tiempo de acumulación con agitación, con el fin de incrementar la respuesta de cada analito al ser comparado con el EPC.
- Las metodologías analíticas desarrolladas se aplicaron con éxito en la valoración de los tres fármacos estudiados en formulaciones farmacéuticas, obteniendo en todos los casos porcentajes de recuperación por sobre el 90 %.
- En base a los resultados obtenidos, específicamente en cuanto a los límites de detección y cuantificación alcanzados con el uso de los electrodos modificados,

se deja planteado como futuras proyecciones a esta Tesis, la aplicación de las metodologías desarrolladas para nitrendipino, levodopa y acetaminofeno en matrices en que exista una menor cantidad de estos fármacos, como por ejemplo, fluidos biológicos (orina o sangre), así como la aplicación en ensayos de disolución.

5. REFERENCIAS

- [1] C. Zapata, M. Pérez, M. Bravo, A.C. Olivieri, A. Álvarez-Lueje, *Talanta* 82 (2010) 962-968.
- [2] W. Sun, Q. Jiang, Y. Wang, K. Jiao, *Sensors and actuators B* 136 (2009) 419-424.
- [3] S. Wang, H. Yu Xiong, Q.Xiang Zeng, *Electrochemistry Communications* 9 (2007) 807-810.
- [4] M. Opallo, A. Lesniewski, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 656 (2011) 2-16.
- [5] I. Svancara, K. Vytras, K. Kalcher, A. Walcarius, J. Wang, *Electroanalysis* 21 (2009) 7-28.
- [6] I. Svancara, K. Vytras, K. Kalcher, A. Walcarius, J. Wang, *International Journal of Electrochemical Science* 7 (2009) 598-656.
- [7] M. Galinski, A. Lewandowski, I. Stepniak, *Electrochemical Acta* 51 (2006) 5567-5580.
- [8] T. Tavana, M. A. Khalilzadeh, H. Karimi-Maleh, A. A. Ensafi, *Journal of Molecular Liquids* 168 (2012) 69-74
- [9] H. Khani, M. K. Rofouei, P. Arab, V. KumarGupta, Z. Vafaei, *Journal of Hazardous Materials* 183 (2010) 402-409.
- [10] C. Ding, F. Zhaob, R. Renb, Jin-Ming Lin, *Talanta* 78 (2009) 1148-1154.
- [11] G. Shul, J. Sirieix-Plenet, L. Gaillon, M. Opallo, *Electrochemistry Communications* 8 (2006) 1111-1114.

-
- [12] I. Svancara, K. Vytras, J. Barek, J. Zima, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31 (2001) 311-345.
- [13] P. Sun, D. W. Armstrong, *Analytica Chimica Acta* 661 (2010) 1-16.
- [14] S. Wei, W. Dandan, G. Ruifang, J. Kui, *Electrochemistry Communications* 9 (2007) 1159-1164.
- [15] X. Liu, L. Li, X. Zhao, X. Lu, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81 (2010) 344-349.
- [16] Z. Samec, J. Langmaier, T. Kakiuchi, *Pure Application Chemistry* 81 (2009) 1473-1488.
- [17] M.C. Buzzeo, R.G. Evans, R.G. Compton. *Chemical Physics and Physical Chemistry* 5 (2004) 1106-1120.
- [18] D. Wei, A. Ivaska. *Analytica Chimica Acta* 607 (2008) 126-135.
- [19] J. Zheng, Y. Zhang, P. Yang. *Talanta* 73 (2007) 920-925.
- [20] H. Liu, P. He, Z. Li, C. Sun, L. Shi, Y. Liu, G. Zhu, J. Li. *Electrochemical Communications* 7 (2005) 1357-1363.
- [21] W. Sun, M. Yang, Y. Li, Q. Jiang, S. Liu, K. Jiao. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 1326-1331.
- [22] Y. Zhang, J. Bin, *Electrochimica Acta* 25 (2007) 7210-7216.
- [23] <http://apps.webofknowledge.com> (20/04/2014)
- [24] E.I. Rogers, D. Silvester, D. Poole, L. Aldous, C. Hardacre, R.G. Compton, *The Journal of Physical Chemistry* 112 (2008) 2729-2735.
- [25] E. Niranjana, B. Swamy, R. Naik, B. Sherigara, H. Jayadevappa. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 631 (2009) 1-9.

- [26] P. Kryszynski, M. Brzostowska-Smolka, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 424 (1997) 61-67.
- [27] A. Andreu, J. Merkert, L. Lecaros, B. Broglin, J. Brazell, M. El-Kouedi, *Sensors and Actuators B* 114 (2006) 1116-1120
- [28] S. Ounnunkada, A. Minetti, M. Imisides, N. Duffy, B. Fleming, C. Lee, A. Bond, G. Wallace, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 652 (2011) 52-59.
- [29] A. Mahoa, F. Kanoufic, C. Combellasc, J. Delhalle, Z. Mekhalifa, *Electrochimica Acta* 116 (2014) 78-88.
- [30] John O'M. Bockris, Amulya K.N. Reddy, *Electroquímica moderna, Vol. 2*, 743-745.
- [31] P. A. LeWitt, *Parkinsonism & Related Disorders* 15 (2009) S31-S34.
- [32] X. Liu, Z. Zhang, G. Cheng, S. Dong, *Electroanalysis* 15 (2003) 103-107.
- [33] M. Teixeira, M. Bergamini, C. Marques, N. Bocchi, *Talanta* 63 (2004) 1083-1088.
- [34] A. Sivanesan, S.A. John, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2007) 708-713.
- [35] S. Viswanathan, W. Liao, C. Huang, W. Hsu, A. Ja-an, *Talanta* 74 (2007) 229-234.
- [36] Y. Tu, Q. Xu, Q. Zou, Z. Yin, Y. Sun, Y. Zhao, *International Journal of Electrochemical Science* 23 (2007) 1321-1324.
- [37] M. Bergamini, A. Santos, N. Stradiotto, M. Zanoni, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 54-59.
- [38] S. Garnayak S. Patel, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52 (2013) 13645-13653.
- [39] Y. Fan, J. Liu, H. Lu, Q. Zhang, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85 (2011) 289-292
- [40] A. Yesilada, H. Erdogan, M. Ertan, *Analytical Letters* 24 (1991) 129-138.

- [41] X. Shi, H. Liu, Q. Wang, W. Liu, D. Cao, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 5 (2011) 1101-1105.
- [42] A. Álvarez-Lueje, J. Sturm, L.J. Núñez-Vergara, J.A. Squella. *Electroanalysis* 18 (2001) 1485-1490.
- [43] C. Yáñez, L.J. Núñez-Vergara, J.A. Squella, *Electroanalysis* 14 (2002) 7-8.
- [44] B. Habibi, M. Jahanbakhshi, M. Pournaghi-Azar, *Analytical Biochemistry* 411 (2011) 167–175.
- [45] D. Shang, X. Wang, X. Zhao, F. Huang, G. Tian, W. Lu, T. Zhou, *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 3459-3464.
- [46] Y.L. Wei, L. Zhang, L.P. Zhang, C. Shao, C. Li, *Journal of Analytical Chemistry*, 66 (2011) 969-973