

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ESTUDIO DE ELECTRODOS MODIFICADOS CON
NANOMATERIALES PARA EVALUAR LA
EQUIVALENCIA TERAPÉUTICA IN VITRO***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Doctor en Ciencias Farmacéuticas por:

***SEBASTIÁN ANDRÉS CUMSILLE
ESCANDAR***

Directores de Tesis

Dr. Alejandro Álvarez Lueje

Dra. Claudia Yáñez Soto

Santiago – CHILE

MARZO 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

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

SEBASTIÁN ANDRÉS CUMSILLE ESCANDAR

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, en el examen público rendido el día _____

Directores de Tesis:

Dr. Alejandro Álvarez Lueje

Dra. Claudia Yáñez Soto

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Soledad Bollo Dragnic

Dr. Guillermo González Moraga

Dr. Javier Morales Valenzuela

Dr. Ricardo Salazar González

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me han acompañado durante esta ardua etapa. Sin su apoyo no podría haber sido posible.

Primero a mi madre, quien no alcanzó a ver el final del proceso, pero que me impulsó a no rendirme. A Jansie Monsalve quien me inspiró a embarcarme en el doctorado y creyó en mí aun cuando yo tenía mis dudas.

A mis amigos los ElectroWows: Martín, Seba Wow, Tania, Alex, Karen, Xime, Javier y Andrés, con quienes compartimos el día a día e hicieron más fácil el camino.

A la profe Vero y a Juan José por estar en el laboratorio conmigo en el laboratorio, ayudarme y enseñarme.

A Raúl por siempre estar dispuesto a ayudarme y a resolver mis dudas. A Ximena y Josué por sus palabras de aliento.

A Nicolás e Isabel, mis compañeros de pregrado que me apoyaron y me motivaron.

A Consuelo Soto por ayudarme y darme ánimos en la etapa final.

A mis directores, el profesor Dr. Alejandro Álvarez y la profesora Dra. Claudia Yáñez que resolvieron mis dudas y de alguna u otra forma me enseñaron.

A los profesores de la comisión, Dra. Soledad Bollo, Dr. Guillermo González, Dr. Javier Morales y Dr. Ricardo Salazar por tomarse el tiempo de revisar mis escritos y contribuir con su visión única y experta.

A ANID por su beca N 21181736 y al proyecto FONDECYT regular N 1200592.

A todos los que se me quedaron en el tintero pero que de alguna manera contribuyeron a terminar este proceso.

RESUMEN

A través de estudios de bioequivalencia es posible garantizar a la población el acceso a medicamentos seguros, eficaces y económicos. Para un grupo de fármacos, los estudios *in vivo* se pueden reemplazar por estudios *in vitro* y, de esta forma, ahorrar tiempo y recursos. Sin embargo, estos últimos contemplan una serie de pasos que merman su eficiencia, como por ejemplo el muestreo, filtrado, almacenamiento en caso de no ser analizados inmediatamente, entre otros. Ante este escenario, el análisis directo en el equipo disolutor permitiría evitar pasos intermedios y así ahorrar tiempo y recursos.

En este contexto, el objetivo de esta tesis fue obtener un electrodo de carbono vítreo (GCE) modificado con nanotubos de carbono multipared (MWCNT) y nanopartículas de oro (AuNPs), que permitan desarrollar metodologías electroanalíticas sensibles y selectivas para evaluar la equivalencia terapéutica *in vitro* de paracetamol de forma directa en el aparato disolutor.

Para la preparación del GCE se trabajó con diferentes metodologías para la modificación de electrodos con ambos nanomateriales. Las metodologías consideraron en una primera etapa, la modificación de la superficie GCE con MWCNT mediante *drop casting* y luego la incorporación de nanopartículas de oro, que se realizó mediante electrodeposición por medio de voltamperometría cíclica.

Los resultados obtenidos permiten concluir que se obtuvo la modificación con la presencia de ambos nanomateriales. En vista de que los resultados electroquímicos no mostraron la sinergia esperada en la respuesta hacia el analito, se ensayaron y compararon otras metodologías reportadas en literatura. Independiente de la metodología de modificación, no se observó que la presencia de éstos permitiera obtener una sensibilidad mayor que con los nanomateriales por separado.

La segunda parte de esta tesis comprendió la aplicación del electrodo modificado en el desarrollo de las técnicas electroanalíticas para la cuantificación del principio activo. Se estudiaron dos formulaciones de paracetamol de diferentes laboratorios, las cuales fueron sometidas a un ensayo de liberación/disolución y fueron cuantificadas mediante las metodologías desarrolladas empleando voltamperometría de pulso diferencial (VPD) y amperometría directa en el equipo disolutor y comparando los resultados obtenidos con cromatografía líquida de alta eficiencia con detector UV.

Se cuantificó el principio activo mediante estos 3 métodos y se construyeron los perfiles de liberación/disolución, lo que permitió establecer la equivalencia terapéutica *in vitro*, demostrando que las técnicas electroquímicas pueden ser empleadas en el análisis de muestras de forma directa como es la amperometría e indirecta como es la VPD.

STUDY OF NANOMATERIAL-MODIFIED ELECTRODES FOR THE ASSESMENT OF IN VITRO THERAPEUTIC EQUIVALENCE

SUMMARY

Bioequivalence studies allow us to guarantee access to effective, safe, and low-cost drugs to population. For a group of drugs, *in vivo* studies can be done instead of *in vitro* studies, thereby saving time and resources. Nevertheless *in vitro* studies involve a series of steps that undermine their efficiency such as sampling, filtering and storage of samples if not immediately analyzed, and so on. Given this scenario, direct analysis on dissolution apparatus would allow us to avoid intermediate steps, thus, saving time and resources.

Accordingly, the aim of this work is to obtain a glassy carbon electrode (GCE) modified with multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) and gold nanoparticles (AuNPs) for the development of electroanalytical methodologies to directly assess *in vitro* therapeutic equivalence of paracetamol.

The first part consisted in the modification of the electrode, which involved working with different methodologies for the modification of electrodes with both nanomaterials. Firstly, the GCE surface was modified with MWCNT by drop casting. Secondly, the addition of AuNPs was carried out by electrodeposition via cyclic voltammetry.

Results showed that the electrode surface was modified with both nanomaterials. Since synergy between both nanomaterials was not observed, other reported methodologies of modification were tested. Regardless of the applied methodology, better sensitivity with both nanomaterials was not observed.

The second part of this dissertation focuses on the application of the modified electrode in the development of electro-analytical techniques for the quantification of the active pharmaceutical ingredient (API). Two tablet formulations from different companies were studied. They were subjected to a dissolution test and analyzed by differential pulse voltammetry (DPV) and amperometry developed methodologies. Results were compared against HPLC-UV official USP methodology.

Evidence showed that it was possible to quantify the API by these 3 methods which allowed us to build the dissolution profile. *In vitro* therapeutic equivalence was established, thereby demonstrating that electrochemical techniques can be employed in direct (amperometry) and indirect (DPV) analysis of samples.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	21
BIOEQUIVALENCIA	21
NANOMATERIALES	33
Síntesis de nanomateriales	37
Nanopartículas metálicas	40
Síntesis de nanopartículas de oro	42
Nanopartículas de oro en la construcción de sensores electroquímicos	43
Nanotubos de carbono	45
Tipos de los nanotubos de carbono	47
Síntesis de nanotubos de carbono	50
Descarga de arco (<i>arc discharge</i>):	50
Ablación láser (<i>laser ablation</i>):	51
Deposición química de vapor (<i>chemical vapor deposition</i> o <i>CVD</i>):	52
Nanotubos de carbono en la construcción de sensores electroquímicos	53
HIPÓTESIS	55
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	56
Equipamiento y materiales	56
Reactivos/solventes	56
Equipo de análisis de superficie	57
Metodología	58
Preparación del electrodo de carbono vítreo	58
Preparación del electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono	58
Preparación del electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro	58
Caracterización de la superficie modificada	59
Medios de disolución/electrolitos de soporte	60
Solución de paracetamol	60
Condiciones de la prueba de disolución	61
Obtención y tratamiento de muestras	62
Comparación de los perfiles de disolución	64
Obtención de datos desde el aparato disolutor	65
Condiciones cromatográficas	70
Condiciones electroanalíticas	71
Voltamperometría de pulso diferencial	71
Amperometría	72
Análisis de interferentes	72
Evaluación de la linealidad, exactitud y precisión	72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
Modificación del electrodo de carbono vítreo con nanomateriales	75
Modificación con nanotubos de carbono	75

Caracterización de la superficie _____	75
Imágenes por microscopía electrónica _____	79
Caracterización electroquímica de paracetamol _____	81
Estudio en medio HCl pH 1,2 _____	84
Estudio en medio acetato pH 4,5 _____	90
Estudio en medio fosfato pH 6,8. _____	92
Modificación con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro _____	95
Caracterización de la superficie _____	95
Optimización de número de ciclos de electrodeposición _____	103
Electrodeposición en presencia de citrato _____	104
Modificación con nanopartículas de oro mediante <i>drop casting</i> _____	107
Aplicación del electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono multipared _____	115
Acumulación de paracetamol por convección en GCE/MWCNT _____	115
Dependencia de la corriente con la concentración de paracetamol sobre GCE/MWCNT _____	116
Construcción de curvas de calibrado por amperometría _____	120
Análisis de interferentes _____	123
Efecto de la temperatura y agitación sobre los electrodos GCE/MWCNT (prueba de estrés de electrodos) _____	127
Efecto del uso de extensiones de cables _____	128
Saturación del electrodo _____	129
Análisis de muestras _____	131
CONCLUSIONES _____	137
ANEXO 1 _____	139
Evaluación de desempeño del equipo disolutor: metodología _____	139
Calibración del equipo disolutor _____	139
Calibración mecánica _____	139
Calibración química _____	140
Evaluación de desempeño del equipo disolutor: resultados _____	142
Calibración mecánica _____	142
Calibración química _____	149
Cromatografía líquida _____	151
Construcción de curvas de calibrado _____	151
Análisis de muestras obtenidas desde el equipo disolutor _____	155
ANEXO 2 _____	158
Análisis de costos _____	158
REFERENCIAS _____	160

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de clasificación biofarmacéutico.	28
Tabla 2. Condiciones ensayo de disolución comprimidos de paracetamol.....	61
Tabla 3. Identificación comprimidos.	61
Tabla 4. Condiciones cromatográficas.	70
Tabla 5. Parámetros VPD.....	71
Tabla 6. Parámetros amperometría.....	72
Tabla 7. I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_{pc}$ vs $\log v$. GCE y GCE/MWCNT.....	77
Tabla 8. Ecuaciones de la recta I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$ sobre GCE y GCE/MWCNT en HCl pH 1,2.	86
Tabla 9. Ecuaciones de la recta I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$ sobre GCE y GCE/MWCNT en acetato pH 4,5.	91
Tabla 10. Ecuaciones de la recta I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$ sobre GCE y GCE/MWCNT en fosfato pH 6,8.	93
Tabla 11. Distribución de tamaño AuNPs.....	96
Tabla 12. Áreas electroactivas estimadas.	102
Tabla 13. Electroodos con variaciones en la modificación.	109
Tabla 14. Trabajos con nanotubos y nanopartículas de oro.	112
Tabla 15. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante VPD en medio HCl pH 1,2.....	118
Tabla 16. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante VPD en medio acetato pH 4,5.....	118
Tabla 17. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante VPD en medio fosfato pH 6,8.....	118
Tabla 18. Evaluación de la recuperación mediante VPD.....	119
Tabla 19. Evaluación de la precisión mediante VPD.	119
Tabla 20. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante amperometría en medio HCl pH 1,2.....	121
Tabla 21. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante amperometría en medio acetato pH 4,5.....	121

Tabla 22. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante amperometría en medio fosfato pH 6,8.	121
Tabla 23. Valores de límites de detección y cuantificación de varios autores.	122
Tabla 24. Excipientes estudiados.	125
Tabla 25. Resultados prueba de estrés de electrodos.	127
Tabla 26. Resultados prueba con extensión de cables.	128
Tabla 27. Resultados ensayo disolución comprimidos paracetamol LCh y Geniol® cuantificados por VPD.	132
Tabla 28. Resultados ensayo disolución comprimidos paracetamol LCh y Geniol® cuantificados por amperometría.	132
Tabla 29. Promedio I_{p_a} comprimidos paracetamol LCh cuantificadas por VPD.	133
Tabla 30. Promedio I_{p_a} comprimidos Geniol® cuantificadas por VPD.	134
Tabla 31. Promedio Intensidad de corriente comprimidos paracetamol LCh cuantificadas por amperometría.	134
Tabla 32. Promedio Intensidad de corriente comprimidos Geniol® cuantificadas por amperometría.	135
Tabla 33. Comparación áreas bajo la curva de perfiles de liberación/disolución de comprimidos estudiados.	136

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación gráfica de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos. ABC: Área bajo la curva. C_{max} : Concentración máxima. C_{ME} : Concentración mínima efectiva. C_{MT} : Concentración mínima tóxica. T_{max} : Tiempo máximo..... 24
- Figura 2.** Representación gráfica de la comparación de perfiles Concentración plasmática-Tiempo entre una formulación de referencia (R) y una en estudio (E)..... 24
- Figura 3.** Copa de Licurgo iluminada por fuera (izq.) y por dentro (der.). El color rojo se debe a las nanopartículas de oro incorporadas en el vidrio³⁵. 33
- Figura 4.** Efecto del cociente entre superficie/volumen al reducir el tamaño de partícula³⁹ 35
- Figura 5.** Representación esquemática de un diagrama de niveles de energía para nanomateriales y materiales macroscópicos³⁹. E_g : Banda prohibida o *Energy Gap*. 36
- Figura 6.** Densidad de estados electrónicos para materiales 3D, 2D, 1D y 0D. En los insertos se muestra un esquema del confinamiento espacial⁴¹. 37
- Figura 7.** Representación esquemática de las diferentes técnicas de síntesis de nanomateriales (A). Enfoques Top Down y Bottom Up para la síntesis de nanomateriales (B)³⁹. 39
- Figura 8.** Artículos sobre nanopartículas metálicas durante el período 2000 – 2023. Palabras clave M^{n+} nanoparticles (A). Palabras clave M^{n+} nanoparticles detection (B). Donde M^{n+} corresponde al respectivo metal. 41
- Figura 9.** VCs (A) y VOCs (B) de una mezcla binaria de DA (50 μ M) y AA (50 μ M) en PBS pH 7,2 sobre electrodos sólidos de oro (a) y electrodos sólidos de oro modificados con AuNPs (b). Vel. Barrido 100 mV/s⁵². 44
- Figura 10.** Esquema de construcción de biosensor de glucosa basado en AuNPS, grafeno y ferrocenil hexanotiol sobre GCE⁵³. 44

Figura 11. Representación de nanotubos de carbono de pared simple (izq.) y multipared (der.) ⁶¹	46
Figura 12. Representación esquemática de los 3 tipos de nanotubos de carbono ⁶³	47
Figura 13. Representación esquemática de la notación de Hamada (A). HAMADA 1992 Diagrama esquemático de cómo se enrolla la lámina de grafeno para formar el nanotubo (B) ⁶⁵	48
Figura 14. Representación esquemática de la sección transversal de los 3 subtipos de MWCNT ⁶⁷	49
Figura 15. Ilustración esquemática del método de descarga de arco ⁷¹	50
Figura 16. Ilustración esquemática del método de ablación láser ⁷²	51
Figura 17. Ilustración esquemática del método de deposición química de vapor ⁶²	52
Figura 18. Fotografía del sensor de glucosa flexible ⁷³	53
Figura 19. Sistema de muestreo en paralelo.....	62
Figura 20. Sistema de análisis electroquímico en paralelo.	66
Figura 21. Sistema de análisis electroquímico en paralelo.	67
Figura 22. Vista general del sistema de análisis electroquímico en paralelo. En el inserto se muestra un ejemplo de respuesta en paralelo.	68
Figura 23. VCs de $K_3Fe(CN)_6$ 1 mM sobre GCE y GCE/MWCNT en KCl 0,1 M. Vel. Barrido 100 mV/s.	75
Figura 24. VCs de $K_3Fe(CN)_6$ 1 mM sobre GCE (A) y GCE/MWCNT (B) a velocidades de barrido crecientes en KCl 0,1 M.	76
Figura 25. I_{p_c} vs $v^{1/2}$ de $K_3Fe(CN)_6$ 1 mM sobre GCE y GCE/MWCNT en KCl 0,1 M. En inserto $\log I_{p_c}$ vs $\log v$. Vel. Barrido desde 50 mV/s hasta 500 mV/s.	77
Figura 26. Imágenes SEM de la superficie de discos modificados con nanotubos de carbono multipared a diferentes magnificaciones: 50.000× (A), 100.000× (B), 200.000× (C) y 300.000× (D).	79

Figura 27. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWCNT (B) en HCl pH 1,2 (negro), tampón acetato pH 4,5 (rojo) y tampón fosfato pH 6,8 (azul). Vel. Barrido 0,1 V/s.	82
Figura 28. VCs de paracetamol 40 μM (línea roja) sobre GCE (A) y GCE/MWCNT (B) en HCl pH 1,2 (línea negra). Velocidad de barrido 0,1 V/s.....	84
Figura 29. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWCT (B). Desde 0,05 hasta 0,5 V/s en HCl pH 1,2. En los insertos se presentan las curvas I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$	85
Figura 30. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE/MWCNT en HCl pH 1,2 a vel. Barrido de 50 mV/s (A), 100 mV/s (B) y 150 mV/s (C).	87
Figura 31. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE/MWCNT a velocidad de barrido de 10 mV/s (A) y 1 mV/s (B) en HCl pH 1,2.	87
Figura 32. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWNT (B) en acetato pH 4,5. Vel. Barrido 0,1 V/s.	90
Figura 33. VCs paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWNT (B) en acetato pH 4,5. Desde 0,05 hasta 0,5 V/s. En los insertos se presentan las curvas I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$	91
Figura 34. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWNT (B) en fosfato pH 6,8. Vel. Barrido 0,1 V/s.	92
Figura 35. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWNT (B) en fosfato pH 6,8. Desde 0,05 hasta 0,5 V/s. En los insertos se presentan las curvas I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$	93
Figura 36. Distribución de tamaño de nanopartículas de oro sobre GCE/MWCNT electrodepositadas con 1 ciclo de VC (A), 2 ciclos (B) y 3 ciclos (C).	96
Figura 37. Imágenes SEM de GCE/MWCNT/AuNP 1 cED metodología <i>Zhao & Liu</i> a diferentes magnificaciones. 15.000 \times (A), 50.000 \times (B), 100.000 \times (C), 200.000 \times (D).	97
Figura 38. Imágenes SEM de GCE/MWCNT/AuNP 2 cED metodología <i>Zhao & Liu</i> a diferentes magnificaciones. 15.000 \times (A), 50.000 \times (B), 100.000 \times (C), 200.000 \times (D).	98

Figura 39. Imágenes SEM de GCE/MWCNT/AuNP 3 cED metodología <i>Zhao & Liu</i> a diferentes magnificaciones. 15.000× (A), 50.000× (B), 100.000× (C), 200.000× (D).	99
Figura 40. Análisis EDX de superficie GCE/MWCNT/AuNP 2 cED. Electro depósito por metodología <i>Zhao & Liu</i>	100
Figura 41. VCs de electrodos GCE/MWCNT y GCE/MWCNT/AuNP 2 cED por metodología <i>Zhao & Liu</i> en medio HCl pH 1,2 (A), acetato pH 4,5 (B) y fosfato pH 6,8 (C). Vel. Barrido 0,1 V/s.	101
Figura 42. Respuesta en corriente (A) y densidad de corriente (B) anódicas de paracetamol 40 μM sobre distintas superficies y a diferentes tiempos de acumulado en acetato pH 4,5.	103
Figura 43. Corriente y densidad de corrientes anódicas de paracetamol 40 μM sobre distintas superficies y a diferentes tiempos de acumulado en fosfato pH 6,8.....	104
Figura 44. Imágenes SEM de GCE/MWCNT/AuNP 1 cED metodología <i>Zhao & Liu</i> en presencia de citrato a diferentes magnificaciones. 15.000× (A), 50.000× (B), 100.000× (C), 200.000× (D).	105
Figura 45. Distribución de tamaño AuNPs mediante electro depósito en presencia de citrato.....	106
Figura 46. Intensidad de corriente pico anódica de paracetamol 40 μM en medio HCl pH 1,2 (A), acetato pH 4,5 (B) y fosfato pH 6,8 (C) sobre electrodos GCE/MWCNT/AuNP 1cED con y sin citrato.....	106
Figura 47. Imágenes SEM de GCE/MWCNT/AuNPs Turkevich a diferentes magnificaciones. 50.000× (A), 100.000× (B), 200.000× (C). Distribución de tamaño (D).....	108
Figura 48. Comparación de corrientes pico anódicas de paracetamol 40 μM en electrodos GCE/MWCNT con diferentes modificaciones en acetato pH 4,5. Tiempo de acumulado 4 minutos.	109
Figura 49. Efecto del tiempo de acumulación en la corriente anódica de paracetamol 40 μM sobre GCE/MWCNT en los 3 medios. Velocidad de barrido 0,1 V/s.....	115

- Figura 50.** Dependencia de la corriente con la concentración de paracetamol en HCl pH 1,2 (A), tampón acetato pH 4,5 (B) y tampón fosfato pH 6,8 (C). Curvas de calibrado de paracetamol sobre GCE/MWCNT en HCl pH 1,2 (D), tampón acetato pH 4,5 (E) y tampón fosfato pH 6,8 (F). Voltamperogramas de pulso diferencial en HCl pH 1,2 (G). a – g: 0.176; 0.573; 0.926; 1.279; 1.675; 1.852; 2.205 μ M. T_{ac} : 5 min, tampón acetato pH 4,5 (H), T_{ac} : 4 min. y tampón fosfato pH 6,8 (I), T_{ac} : 7 min. h – n: 0.0882; 0.2204; 0.3527; 0.5291; 0.6614; 0.7495; 0.8818 μ M. 117
- Figura 51.** Respuesta amperométrica de GCE/MWCNT a adiciones sucesivas de alícuotas de 5 mL de paracetamol 0,1 M cada 40 s en HCl pH 1,2, tampón acetato pH 4,5 y tampón fosfato pH 6,8. En el inserto se aprecian las curvas de calibrado. Estabilización de corriente por 100 s. Volumen de la celda 900 mL. $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. $E_{pH\ 1,2} = 800\text{ mV}$. $E_{pH\ 4,5} = 600\text{ mV}$. $E_{pH\ 6,8} = 450\text{ mV}$ 120
- Figura 52.** Intensidad de corriente pico mediante VPD a diferentes concentraciones de paracetamol en presencia y ausencia de excipientes en medio HCl pH 1,2 con 5 min t_{acum} (A), acetato pH 4,5 con 4 min t_{acum} (B) y fosfato pH 6,8 con 7 min t_{acum} (C). 124
- Figura 53.** Análisis amperométrico de interferentes. Vol. Alícuota 10 μ L paracetamol 0,1 M (flechas rojas). Vol alícuota 10 μ L excipientes (flechas negras). 1 Talco; 2 Lactosa; 3 Celulosa microcristalina; 4 PVP; 5 Fosfato tricálcico; 6 Almidón; 7 Estearato de magnesio. Volumen celda 10 mL. Estabilización de corriente por 100 s. Vel. Agitación 500 rpm. 126
- Figura 54.** Liberación/disolución de comprimido de paracetamol (rojo) vs blanco acetato pH 4,5 (negro). Alícuotas de 5 mL de paracetamol 0,1 M a los 32, 34, 36 y 38 min. Vol. Celda 900 mL. Agitación a 75 rpm. 100 s de estabilización de corriente. $E_{pH\ 4,5} = 600\text{ mV}$ 129
- Figura 55.** Comparación de perfiles de disolución entre paracetamol LCh (cuadrados negros) y Geniol[®] (círculos rojos) cuantificados por VPD

(A, B y C) y por amperometría (D, E y F) en los 3 medios. Línea punteada marca los 85 % disueltos. 131

Figura 56. Comparación entre la respuesta amperométrica de paracetamol LCh (línea negra) y Geniol[®] (línea roja) in HCl pH 1,2 (A), tampón acetato pH 4,5 (B) tampón fosfato pH 6,8 (C) por amperometría directa. Estabilización de la corriente por 100 s. Volumen de la celda 900 mL. $E_{\text{pH } 1,2} = 800 \text{ mV}$. $E_{\text{pH } 4,5} = 600 \text{ mV}$. $E_{\text{pH } 6,8} = 450 \text{ mV}$. $T^{\circ} = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$... 135

ÍNDICE DE TABLAS ANEXOS

Tabla A1. Parámetros calibración mecánica del equipo disolutor.	139
Tabla A2. Condiciones disolución comprimidos de prednisona.....	140
Tabla A3. Verticalidad 8 paletas.....	145
Tabla A4. Distancia eje-vaso.....	146
Tabla A5. Velocidad de rotación.....	147
Tabla A6. Temperaturas de los vasos.....	148
Tabla A7. Porcentaje disuelto prednisona para calibración química.	150
Tabla A8. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante HPLC-UV/DAD en medio HCl pH 1,2.	151
Tabla A9. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante HPLC-UV/DAD en medio acetato pH 4,5.....	152
Tabla A10. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante HPLC-UV/DAD en medio fosfato pH 6,8.....	153
Tabla A11. Evaluación de la recuperación de HPLC-UV/DAD.	154
Tabla A12. Evaluación de precisión mediante HPLC-UV/DAD.	154
Tabla A13. Promedio AUC comprimidos paracetamol LCh cuantificados por HPLC-UV/DAD.....	155
Tabla A14. Promedio AUC comprimidos Geniol ® cuantificados por HPLC-UV/DAD.	155
Tabla A15. Resultados ensayo disolución comprimidos paracetamol LCh y Geniol ® cuantificados por HPLC-UV/DAD.....	157
Tabla A16. Comparación de costos.	158
Tabla A17. Gasto de tiempo y solventes.....	159

ÍNDICE DE FIGURAS ANEXOS

Figura A1. Vaso equipo disolutor limpio y sin rayones. Capacidad 1 L.....	142
Figura A2. Nivel digital sobre mesa en donde se poya el equipo disolutor. Lectura de 0,2 ° de desnivel.....	143
Figura A3. Nivel digital en la base de los vasos de equipo disolutor. A lo ancho con una lectura de 0,1 ° de desnivel (izquierda), y a lo largo de 0,3 ° (derecha).....	144
Figura A4. Nivel digital sobre eje de paleta de equipo disolutor. Lectura de 89,7 ° de verticalidad.....	145
Figura A5. Distancia entre eje de paleta y vaso de equipo disolutor. Lectura de 40,1 mm.	146
Figura A6. Tacómetro sobre eje de paleta de equipo disolutor. Lectura de 50,0 rpm y 99,7 rpm.	147
Figura A7. Termómetro digital en vaso de equipo disolutor. Lectura de 36,8 °C.	148
Figura A8. Cromatograma de paracetamol en HCl pH 1,2 a diferentes concentraciones. Curva de calibrado en el inserto. Tr = 2,16 min. λ = 243 nm.	151
Figura A9. Cromatograma de paracetamol en Acetato pH 4,5 a diferentes concentraciones. Curva de calibrado en el inserto. Tr = 2,16 min. λ = 243 nm.	152
Figura A10. Cromatograma de paracetamol en Fosfato pH 6,8 a diferentes concentraciones. Curva de calibrado en el inserto. Tr = 2,18 min. λ = 243 nm.	153
Figura A11. Comparación de perfiles de disolución de paracetamol LCh vs Geniol [®] en medio HCl pH 1,2 (A), acetato pH 4,5 (B) y fosfato pH 6,8 (C) cuantificados mediante HPLC-UV/DAD.	156

INTRODUCCIÓN

BIOEQUIVALENCIA

A contar desde el año 2004, en Chile se cuenta con una “Política Nacional de Medicamentos”, cuyo propósito es “asegurar la disponibilidad y acceso a toda la población a los medicamentos indispensables contenidos en el Formulario Nacional, de eficacia y calidad garantizada, seguros, de costo asequible y cuyo uso racional lleve a conseguir los máximos beneficios en la salud de las personas como en el control del gasto que ellos representan”¹. Dentro de las directrices políticas y líneas de acción se encuentra “el acceso a los medicamentos por parte de los usuarios se facilita al disponer de productos genéricos equivalentes al producto farmacéutico de referencia”¹.

Hoy en día esta política se percibe, ya que, en febrero del 2023, el Servicio Nacional del Consumidor (SERNAC), publicó un estudio en el cual se evidenciaron diferencias de un 2.191 % respecto de los precios de medicamentos bioequivalentes *versus* el medicamento referente², entre otros. El medicamento en cuestión se trata del antihipertensivo losartán, el cual en su versión genérico bioequivalente registró un valor de \$ 1.170, a diferencia de su contraparte el referente, Cozaar[®], cuyo valor asciende a la suma de \$ 26.799. Esto significa que un paciente en tratamiento puede ahorrar aproximadamente \$ 25.000 mensuales y conseguir un medicamento que es tan seguro, eficaz y de calidad como el medicamento referente.

Esta diferencia de precio radica, entre otras cosas, en que una compañía farmacéutica debe invertir una cantidad importante de dinero en estudiar potenciales moléculas que eventualmente terminarán siendo un medicamento. En 2020, Wouters *et al*³ publicaron un estudio en el cual analizan los costos asociados al desarrollo de 63 medicamentos producidos por 47 compañías farmacéuticas entre los años 2009 y 2018. En promedio, para lanzar al mercado un nuevo producto se gasta un monto aproximado de 1,56 billones de dólares. Por supuesto, esta inversión se ve compensada con el hecho de que una patente para un nuevo medicamento tiene una vigencia de 20 años, lo que le otorga a la compañía farmacéutica un período de exclusividad en cuanto a ventas. Sin embargo, solamente 12 de esos 20 años consisten en el desarrollo del producto, quedando un margen de tan solo 8 años para recuperar la inversión por concepto de ventas⁴. Una vez expirada la patente, el medicamento puede ser manufacturado por otras compañías farmacéuticas, lo que disminuye significativamente su cuota en el mercado, llegando incluso a perder hasta un 90 % de ventas ante los genéricos⁵.

Respecto a estos últimos, si contienen idénticas cantidades del mismo principio activo (sales y/o ésteres) en idéntica forma farmacéutica (comprimido, cápsula, etc.), se administran por la misma vía, pero no necesariamente contienen los mismos excipientes, entonces se habla de equivalentes farmacéuticos (respecto del original). No obstante, pueden no ser equivalentes terapéuticos. Solamente se considerarán bioequivalentes o equivalentes terapéuticos a aquellos que bajo procesos de manufactura validados sean

equivalentes farmacéuticos, y presenten estudios científicos como son los de biodisponibilidad comparativa, clínicos, farmacodinámicos o estudios de bioexención y que por lo tanto posean la misma seguridad, eficacia y calidad que el producto comparador. Dicho de otra forma, la bioequivalencia implica la igualdad de efectos biológicos de dos medicamentos, sin modificación de sus efectos terapéuticos y adversos. Esta condición permite la intercambiabilidad⁶⁻⁸.

La bioequivalencia se puede demostrar mediante estudios científicos *in vivo* o *in vitro*. Dentro de los estudios *in vivo* se encuentran los ensayos de biodisponibilidad comparativa, farmacodinámicos y clínicos. Mientras que en los estudios *in vitro* está el ensayo de disolución^{6,9,10}.

La biodisponibilidad se define como la cantidad de un principio activo proveniente de una forma farmacéutica que llega a la circulación sistémica y la velocidad con que esto ocurre. Por ende, los ensayos de biodisponibilidad comparativa se basan en la cuantificación del principio activo (o su fracción activa) desde matrices como el suero o la orina para la determinación de parámetros farmacocinéticos, tales como el área bajo la curva (ABC), la concentración (C_{max}) y el tiempo máximo (T_{max}) (**figura 1**).

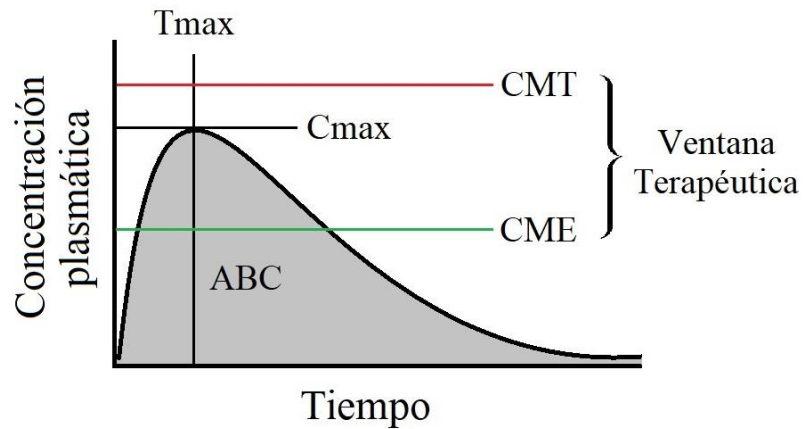


Figura 1. Representación gráfica de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos. ABC: Área bajo la curva. C_{max}: Concentración máxima. C_{ME}: Concentración mínima efectiva. C_{MT}: Concentración mínima tóxica. T_{max}: Tiempo máximo.

Mientras que el área bajo la curva permite evaluar del grado de exposición sistémica, la concentración y tiempo máximo dan cuenta de la tasa de absorción sistémica.

En los estudios de biodisponibilidad comparativa, una formulación en estudio se compara contra una de referencia (**figura 2**).

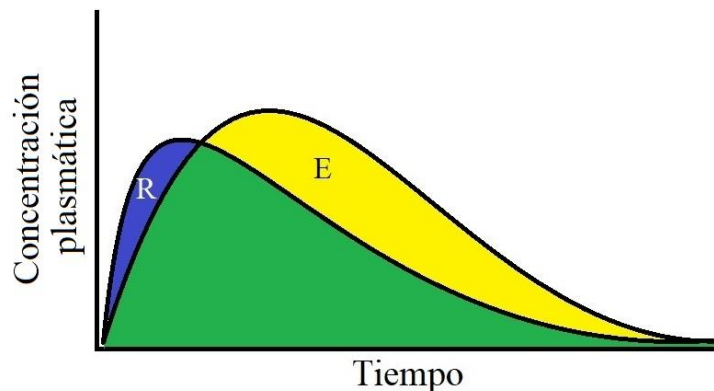


Figura 2. Representación gráfica de la comparación de perfiles Concentración plasmática-Tiempo entre una formulación de referencia (R) y una en estudio (E).

Y para establecer la bioequivalencia, se deben cumplir los siguientes parámetros:

1. El parámetro ABC debe estar en una razón entre el 80 y 125 % al comparar ambos perfiles para medicamentos con ventanas terapéuticas amplias, no así para aquellos con ventana terapéutica estrecha en los que la razón debe estar entre el 90 y 111 %.

2. El parámetro C_{max} debe estar en una razón entre el 80 y 125 %.

3. El parámetro T_{max} no se considera y su evaluación se efectúa cuando sea clínicamente relevante, como por ejemplo que una muy rápida liberación/disolución provoque efectos adversos.

Este tipo de estudio es el más recomendado debido a que es el más preciso, sensible y reproducible.

Por otra parte, un estudio farmacodinámico también puede ser utilizado para demostrar bioequivalencia en caso de que no se puedan obtener muestras de algún fluido biológico de interés a los cuales se les pueda determinar una concentración de principio activo. En este tipo de estudio se mide un efecto farmacológico agudo y se relaciona con la dosis administrada.

Por ejemplo, en un trabajo publicado por Mallol *et al*¹¹ se buscó establecer equivalencia terapéutica entre 3 inhaladores de salbutamol, el cual es un broncodilatador utilizado en períodos de crisis en pacientes asmáticos. En dicho trabajo comparan un efecto farmacológico como es la broncodilatación al

administrar las mismas dosis del inhalador de referencia (GlaxoSmithKline) *versus* 2 inhaladores del Laboratorio Chile.

La broncodilatación la cuantifican como el volumen espirado forzado en 1 segundo, VEF1. El valor VEF1 se ve reducido en pacientes con enfermedades obstructivas como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y corresponde al volumen de aire que puede espirarse en el primer segundo de una espiración máxima forzada¹². Este indicador se normaliza o mejora al administrar broncodilatadores. Los autores concluyen que los 3 inhaladores protegen a los pacientes contra la broncoconstricción inducida y que la magnitud del efecto protector de estos es similar. Debido a que los broncodilatadores tienen un efecto tópico a nivel del tejido pulmonar y no sistémico, no es posible cuantificar un principio activo en la circulación y por ende no es posible utilizar un estudio de biodisponibilidad comparativa.

Con respecto a los estudios clínicos *in vivo* para establecer bioequivalencia, no se recomienda su uso como primera elección si es que se pueden utilizar estudios de biodisponibilidad comparativa o farmacodinámicos. Debido a que esa circunstancia es poco probable, este tipo de estudios son infrecuentes.

En cuanto a los ensayos para establecer equivalencia terapéutica *in vitro*, se requiere de estudios cinéticos de disolución, lo que se define como pruebas que, mediante condiciones experimentales científicamente definidas, permiten establecer el perfil cinético de disolución de un principio activo desde una forma farmacéutica sólida.

Para que un producto farmacéutico pueda ser sometido a un estudio comparativo *in vitro*, conocido como bioexención, debe cumplir con dos requisitos, siempre y cuando estén fabricados conforme a las Buenas Prácticas de Manufactura¹³:

1. Formulado en forma farmacéutica sólida, oral y con patrones de rápida liberación-disolución.

2. Formulado con principios activos que cumplan los criterios establecidos por el sistema de clasificación biofarmacéutico.

Se entienden como productos farmacéuticos de rápida liberación/disolución, aquellos que presentan una cantidad mayor o igual al 85 % de principio activo respecto de lo declarado disuelto a los 30 minutos, utilizando el aparato de paletas (aparato 2 USP) a 75 rpm, o el aparato de canastillo (aparato 1 USP) a 100 rpm, en un volumen de 900 mL o menos, en cada uno de los siguientes tres tipos de medios¹³:

i. Solución pH 1,2: ácido clorhídrico 0,1 N o fluido gástrico simulado USP sin enzimas.

ii. Solución amortiguadora pH 4,5: tampón acetato.

iii. Solución amortiguadora pH 6,8: tampón fosfato o fluido intestinal simulado USP sin enzimas.

Si el principio activo presenta una cantidad mayor o igual al 85 % respecto de lo declarado, disuelto a los 15 minutos, se habla de muy rápida liberación/disolución.

De acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutico (SCB), representado en la **tabla 1**, los fármacos candidatos a bioexención son aquellos que contienen principios activos de la clase I y III, aunque estos últimos deben ser de muy rápida liberación/disolución. El SCB es un marco científico utilizado para clasificar los principios activos en base a su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal¹³.

Para ser clasificado un principio activo como altamente soluble, la mayor dosis posológica disponible debe disolverse en un volumen menor o igual a 250 mL de medio acuoso en toda la gama de pH entre 1,2 y 6,8.

Tabla 1. Sistema de clasificación biofarmacéutico.

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Es importante notar que la norma chilena excluye a los fármacos clase II y IV debido a su baja solubilidad, sin embargo los sistemas de liberación/entrega de fármacos basados en lípidos han ganado interés, ya que permiten mejorar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles¹⁴.

Existen situaciones en las que un estudio *in vitro* no puede aplicarse, estas son:

1) Productos con ventanas terapéuticas estrechas: aquellos que contienen principios activos sujetos a monitoreo terapéutico (control de la

concentración) o monitoreo farmacodinámico. Ejemplos son: digoxina, warfarina, acenocumarol, entre otros.

2) Productos diseñados para ser absorbidos en la cavidad oral: En comprimidos sublinguales o bucales no es apropiada una solicitud de bioexención de estudios *in vivo*.

Además, la guía chilena no aborda el concepto de medicamentos con más de un principio activo, no así la guía para la industria emitida por la *FDA* en donde se aclara que se pueden realizar estudios *in vitro* en formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata con más de un principio activo siempre y cuando pertenezcan a clase I, clase III o una combinación de estos y siempre que no existan interacciones farmacocinéticas entre principios activos y entre principio activo/excipientes. Incluso, excluyen a aquellos en que existan combinaciones entre clase I y/o clase III con clase II y/o IV¹⁵.

Para cuantificar el fármaco, el método analítico que se utilice debe estar debidamente validado y cumplir con los requisitos de linealidad, exactitud, precisión, estabilidad, selectividad e intervalo de concentración.

Generalmente se emplea la espectrofotometría UV/Vis para el análisis de las muestras extraídas de los estudios de liberación/disolución, ya que es una técnica sencilla y con mínimo uso de solventes. La otra técnica de elección es la cromatografía líquida de alta eficiencia con detector UV/Vis (HPLC-UV/Vis), cuyas principales ventajas son que permite detectar la presencia de interferentes y poseer una mejor sensibilidad^{6,13}. Por ejemplo, en el estudio publicado por Cheng *et al*¹⁶, se demostró equivalencia terapéutica de una formulación de

liberación inmediata del antidiabético metformina (clase III del SCB), en donde se compararon los perfiles de liberación/disolución del producto en estudio (Glucofit®) *versus* el producto de referencia (Glucophage®). Se utilizó el aparato N° 1 de la USP (canastillas) a 100 rpm, 37 °C y 1.000 mL de las 3 soluciones tampones, y para cuantificar el principio activo de las muestras se empleó la espectrofotometría UV a una longitud de onda de 233 nm.

Si bien la norma chilena sugiere 2 técnicas de análisis, estas no son obligatorias, dejando abierta la posibilidad a otras técnicas como la electroquímica. Sin embargo, para poder utilizar esta técnica, el principio activo a analizar debe ser electroquímicamente activo a valores de pH entre 1,2 y 6,8. Esta condición reduce el espectro de fármacos que pueden ser analizados por esta técnica. Un ejemplo es el principio activo paracetamol, el cual, además de ser electroquímicamente activo a los valores de pH necesarios para los estudios de disolución¹⁷, pertenece a la clase III del SCB.

El 2017, el Instituto de Salud Pública (ISP), alertó sobre el peligro del consumo en exceso de paracetamol, debido a que este registró un aumento sostenido en sus ventas entre el 2013 y 2016¹⁸. El 2021, SERNAC reportó que este medicamento fue el número uno en ventas¹⁹, además en 2023, el ISP publicó que paracetamol junto con zopiclona encabezan la lista de los medicamentos más comercializados de forma ilegal²⁰.

Numerosos métodos han sido utilizados para la cuantificación de paracetamol tanto en formas farmacéuticas así como en fluidos biológicos,

incluidos la espectrofotometría UV/Vis²¹, fluorimetría²² y HPLC con diversos detectores^{23,24}.

Mientras que en la espectrofotometría la materia interacciona con la luz, en la electroquímica el evento de interés es la transferencia de carga entre las interfases, específicamente desde un conductor electrónico (electrodo) a uno iónico (electrolito)²⁵. Las técnicas electroquímicas de análisis tienen la ventaja sobre otras técnicas debido a su simplicidad instrumental, portabilidad y ser costo-efectivas y hoy en día tienen muchas aplicaciones en electroanálisis como: monitoreo ambiental, control de calidad industrial y análisis biomédico²⁶. Si bien la química electroanalítica se enfoca en el desarrollo de nuevos métodos y electrodos modificados para el análisis cuantitativo, también es utilizada para el tratamiento y remediación de aguas residuales²⁷. Por ejemplo, aguas contaminadas con antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas, en donde se generan radicales hidroxilo en el medio de reacción, los que oxidan la materia orgánica²⁸. Este proceso de tratamiento se conoce como electrooxidación. A su vez, existen otros métodos como la electrocoagulación, en la cual un ánodo de sacrificio se “disuelve” en la solución mientras que en el cátodo el agua se hidroliza generando iones hidroxilos. La combinación de los iones en solución, sumado a la desestabilización de cargas de los desechos en el agua generan flóculos, que luego pueden ser removidos físicamente. Asimismo, encontramos la electrodiálisis y la reducción electroquímica²⁹.

Como se mencionó, el evento clave es la transferencia de carga y la superficie en donde ocurre este intercambio electrónico y puede estar constituida

de diversos materiales, como por ejemplo algunos metales nobles (oro o platino), mercurio, o carbono²⁶. En electroanálisis se recurre a la modificación de estas superficies electródicas, denominadas como electrodos de trabajo, con el fin de desarrollar métodos con mejores límites de detección y cuantificación además de mayor selectividad frente a un analito siempre y cuando estas modificaciones sean prácticas en cuanto a su aplicación³⁰.

Por ejemplo existen modificaciones de electrodos con materiales naturales como el corcho^{31,32}, elementos de reconocimientos como β -ciclo-dextrinas³³ y electrodos modificados con nanomateriales como nanobarras de óxido de zinc/nanopartículas de níquel/grafeno³⁴, por mencionar algunos. En donde este último grupo, los nanomateriales, serán descritos en la siguiente sección.

NANOMATERIALES

Cuando se mencionan los nanomateriales, se pudiera pensar que se habla de materiales de última tecnología, sin embargo, esta tecnología data de la época romana (753 A.C. – 476 D.C.) con el famoso ejemplo de la Copa de Licurgo³⁵ (**Figura 3**), la cual fue construida aproximadamente en el 400 D.C. e incorpora oro y plata a escala nanométrica (50 – 70 nm) en una matriz de vidrio³⁶.



Figura 3. Copa de Licurgo iluminada por fuera (izq.) y por dentro (der.). El color rojo se debe a las nanopartículas de oro incorporadas en el vidrio³⁵.

Significa esto que ¿los romanos tenían conocimientos en nanomateriales? Probablemente no, pero este es un claro ejemplo de las diferentes propiedades que exhiben los nanomateriales respecto al material macroscópico del cual provienen. Es por esto que la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (*FDA*) describe a los nanomateriales como materiales que tienen al

menos una de sus caras (largo, ancho o alto) en la escala entre 1 a 100 nm y exhiben fenómenos dependientes de la dimensión³⁷.

De acuerdo con su dimensión, los nanomateriales se pueden clasificar en materiales de cero-dimensión (*0D*), una-dimensión (*1D*), dos-dimensiones (*2D*) y tres-dimensiones (*3D*). Los materiales *0D* corresponden a aquellos en que las dimensiones de sus 3 caras se encuentran por debajo de los 100 nm, como por ejemplo las nanopartículas y los *quantum dots*. Aquellos con una de sus dimensiones por sobre los 100 nm se pueden clasificar en la categoría *1D*, ejemplos son los nanoalambres y los nanotubos. Si 2 de sus dimensiones se encuentran por sobre los 100 nm, entonces corresponden a la categoría *2D*, como por ejemplo las nanopelículas o el grafeno. Ahora, si las 3 dimensiones se encuentran por sobre los 100 nm se habla de materiales *3D* y corresponden al material macroscópico³⁸. En esta escala nanométrica, el movimiento de los electrones se encuentra restringido; es así como para los materiales *0D*, el movimiento electrónico se encuentra restringido en las 3 dimensiones, mientras que para materiales *1D* el movimiento de electrones se encuentra restringido en 2 dimensiones y así sucesivamente.

Los materiales en escala nanométrica presentan propiedades interesantes como efectos superficiales (*surface effects*) y efectos de confinamiento cuántico (*quantum confinement effect*).

El efecto superficial consiste en una relación área/volumen mayor en los nanomateriales que en los materiales macroscópicos. Tal como se muestra en la **figura 4**, al disminuir el tamaño de partícula, más y más superficie queda

expuesta por unidad de volumen. Este incremento en el cociente entre átomos superficiales y átomos interiores es responsable del cambio físico y de las propiedades de este tipo de materiales. Además, permite a los nanomateriales interactuar más efectivamente con su entorno^{39,40}.

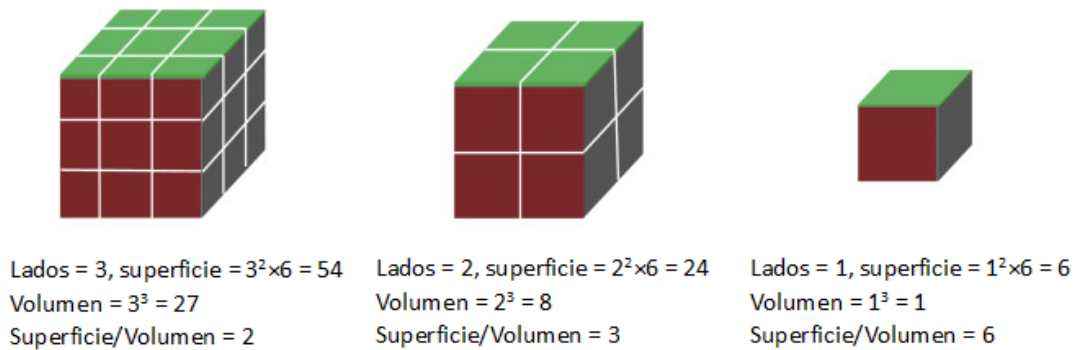


Figura 4. Efecto del cociente entre superficie/volumen al reducir el tamaño de partícula³⁹.

Los átomos interiores de cualquier material están sometidos a fuerzas simétricas y se encuentran coordinados debido a que están rodeados y enlazados a otros átomos. En otras palabras, se encuentran estabilizados, a diferencia de los átomos superficiales en donde hay menos estabilización de los enlaces por parte de otros átomos. Esto altera propiedades como la solubilidad o la temperatura de transición de fases e incluso vuelve a las superficies más reactivas⁴⁰.

Por otra parte, el efecto de confinamiento cuántico se encuentra relacionado con la restricción del movimiento electrónico. El radio característico de un electrón se define como el radio de excitón de Bohr. Cuando el tamaño de

partícula disminuye hasta ser comparable con el radio de excitón de Bohr, la movilidad del electrón se encuentra confinada. Los electrones que en el material macroscópico tienen un movimiento más libre, en los nanomateriales, este movimiento electrónico se restringe a niveles de energías específicos (niveles discretos), lo que lleva a un aumento en la banda prohibida (**figura 5**)^{39,40}.

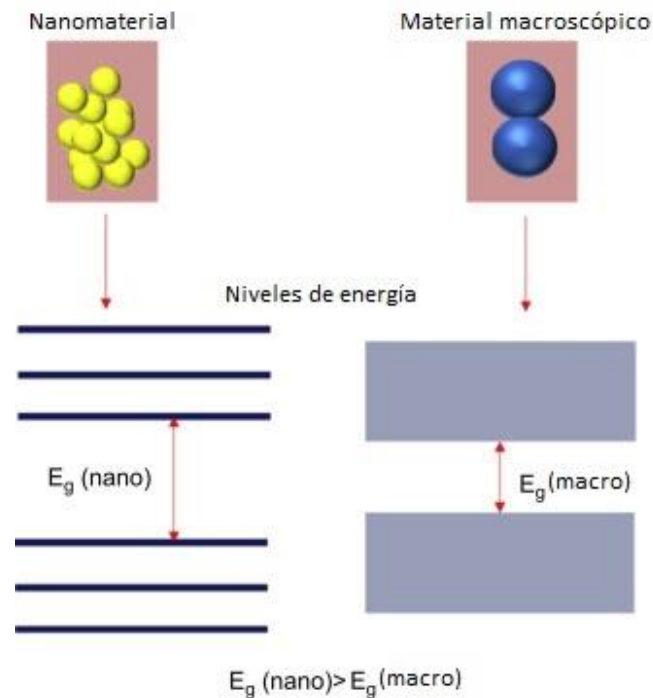


Figura 5. Representación esquemática de un diagrama de niveles de energía para nanomateriales y materiales macroscópicos³⁹. E_g : Banda prohibida o *Energy Gap*.

Al reducir el tamaño de partícula, mayor es la separación entre los niveles de energía. El efecto de confinamiento cuántico genera una diferencia en la organización de los niveles electrónicos y en la densidad de los estados electrónicos. En la **figura 6** se esquematiza esta diferencia, en donde al disminuir el tamaño de partícula, la dependencia de la densidad de estado con la energía pasa desde una función continua a una función discontinua o discreta. Esto

modifica las propiedades químicas, eléctricas y ópticas del nanomaterial con respecto al material macroscópico⁴¹. Sin embargo, hoy en día se le está empezando a dar importancia a la forma del nanomaterial y no sólo a su tamaño, como responsable del cambio en sus propiedades⁴⁰.

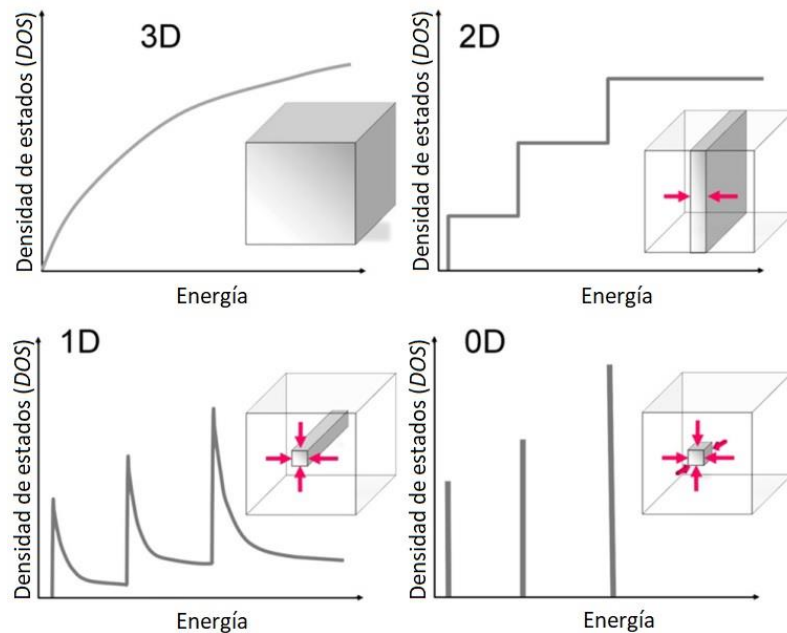


Figura 6. Densidad de estados electrónicos para materiales 3D, 2D, 1D y 0D. En los insertos se muestra un esquema del confinamiento espacial⁴¹.

Síntesis de nanomateriales

Los materiales nanoestructurados pueden ser obtenidos a través de técnicas físicas, químicas, biológicas e híbridas (**figura 7A**). Los 2 principales enfoques son el *Bottom Up* y el *Top Down*³⁹ (**figura 7B**).

Bottom up: O de abajo hacia arriba, consiste en ensamblar el nanomaterial utilizando átomos/moléculas como “bloques” de construcción hasta alcanzar el tamaño y forma deseado. Esta metodología produce nanomateriales con menos

defectos y más homogéneos en composición química. Un ejemplo del *bottom-up* son los métodos de deposición en vapor, ya sean químicos o físicos.

Top Down: O de arriba hacia abajo, consiste en someter al material macroscópico a través de procesos graduales que reduzcan su tamaño. La principal desventaja de este método es la presencia de imperfecciones en la superficie. Un ejemplo de esta técnica es la molienda de un material macroscópico en partículas cada vez más y más finas.

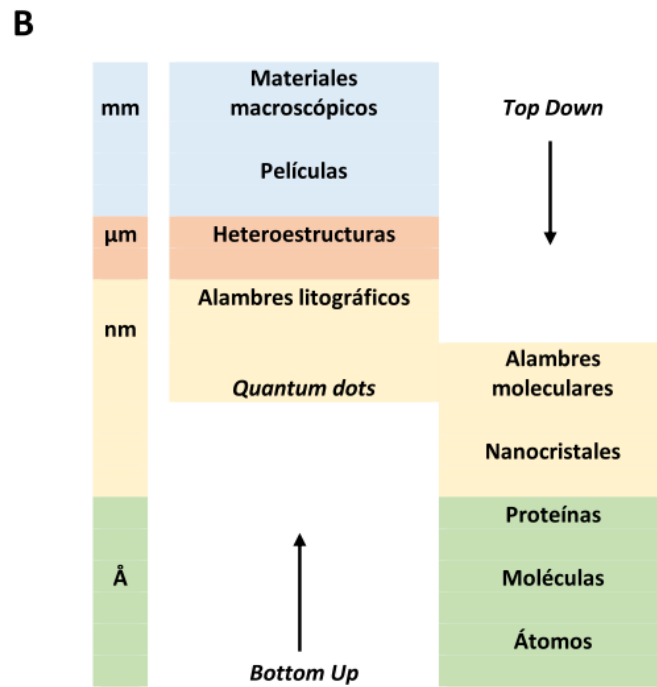
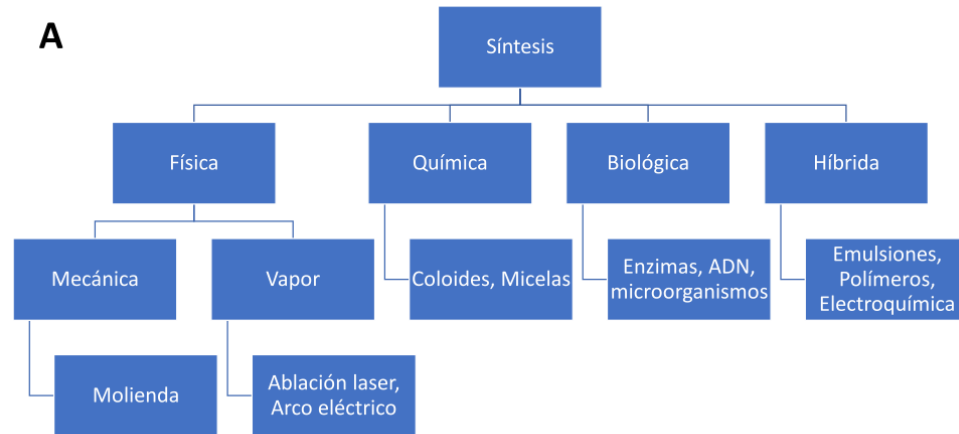


Figura 7. Representación esquemática de las diferentes técnicas de síntesis de nanomateriales (A). Enfoques Top Down y Bottom Up para la síntesis de nanomateriales (B)³⁹.

Nanopartículas metálicas

Correspondientes a nanomateriales *OD*, las nanopartículas metálicas se componen de elementos como Au, Ag, Pt, Cu, Fe y se pueden obtener a través de métodos químicos, físicos y biológicos^{42,43}. Debido a su elevada área superficial y efectos cuánticos, las nanopartículas metálicas tienen excelentes propiedades eléctricas, catalíticas y térmicas, entre otras. Este tipo de nanomaterial es versátil, y se ha reportado su uso en el ámbito del tratamiento del cáncer⁴⁴, por su efecto antibacteriano⁴⁵ y para la construcción de sensores electroquímicos⁴⁶, por nombrar algunos. Dentro de este grupo, se destaca el uso de las nanopartículas de oro (AuNPs) y de plata (AgNPs), las cuales lideran los trabajos en investigación con este tipo de nanomateriales (**figura A**). Sin embargo, las AuNPs son más utilizadas en la detección de sustancias (**figura B**) por su alta estabilidad física y química, su fácil funcionalización con moléculas biológicamente activas y moléculas orgánicas, además de su excelente biocompatibilidad⁴⁷.

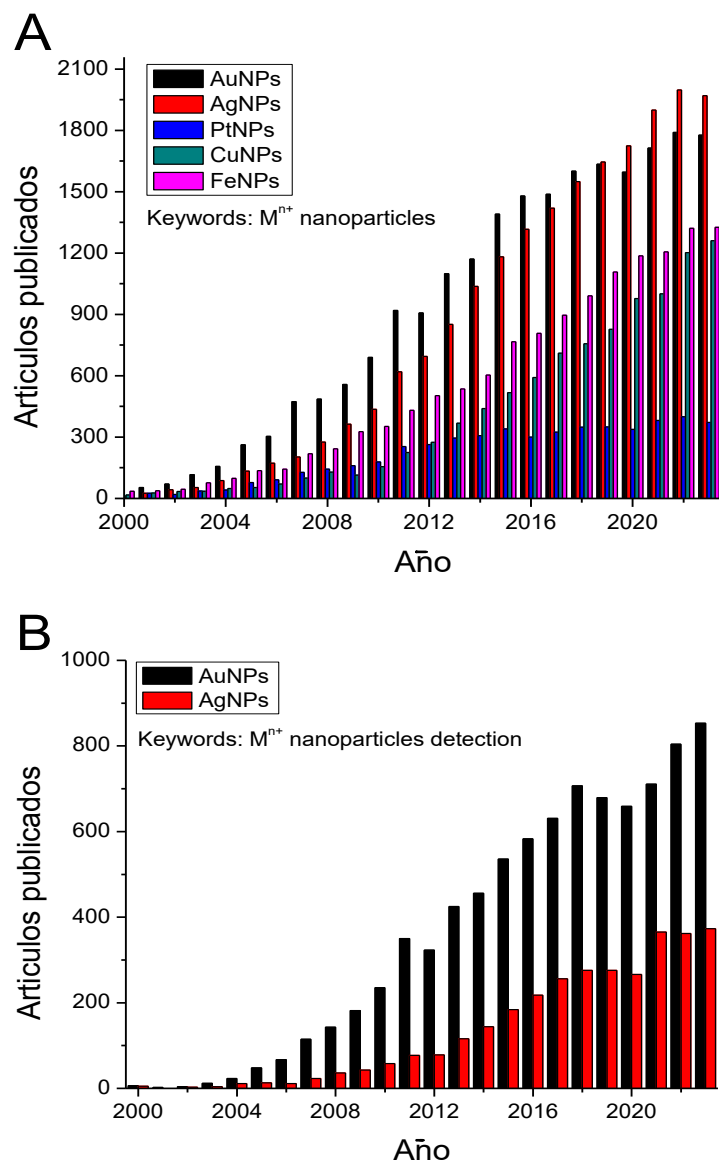


Figura 8. Artículos sobre nanopartículas metálicas durante el período 2000 – 2023. Palabras clave M^{n+} nanoparticles (A). Palabras clave M^{n+} nanoparticles detection (B). Donde M^{n+} corresponde al respectivo metal.

Síntesis de nanopartículas de oro

Como se adelantó, la síntesis de AuNPs puede ser categorizada en 2 tipos de acuerdo con su metodología, el *Top Down* y el *Bottom Up*.

Un ejemplo de obtención de AuNPs con la metodología de arriba hacia abajo o *Top Down*, es la ablación láser. Mafuné *et al*⁴⁸, lograron sintetizar AuNPs haciendo incidir un láser sobre una lámina de oro sumergida en una solución de dodecil sulfato de sodio (*SDS*). Al variar las condiciones experimentales como la concentración del *SDS* y la intensidad del láser, diferentes tamaños de nanopartículas pueden ser alcanzados.

Respecto a la metodología de abajo hacia arriba o *Bottom Up*, encontramos el método de la reducción de ácido cloroáurico mediante citrato conocido como el método Turkevich⁴⁹. Esta metodología consiste en hacer reaccionar una solución de ácido cloroáurico con una solución de citrato, en donde el citrato actúa como agente reductor, pero además como estabilizante de las nanopartículas obtenidas. Cabe destacar que el tamaño de las nanopartículas se ve influenciado por la proporción de los reactivos. Es más, en el trabajo de Sau y Murphy⁵⁰ se hace mención de la obtención de nanoestructuras de oro con diferente morfología. Al utilizar cloruro de cetil trimetil amonio (CTAB) y ácido ascórbico (AA) en diferentes proporciones, se pueden obtener nanopartículas de oro en forma de barras, hexágonos, estrellas, cubos y triángulos.

Por otra parte, Yu *et al*⁵¹, obtuvieron nanobarras de oro en solución mediante un método electroquímico. En su trabajo, utilizaron una celda de 2 electrodos y el uso del surfactante CTAB fue crucial debido a que además de

servir como agente estabilizante de las nanopartículas, sirve como electrolito de soporte.

Nanopartículas de oro en la construcción de sensores electroquímicos

Para construir electrodos con nanopartículas, algunos métodos empleados son la deposición directamente en la superficie mediante alícuotas de una suspensión del nanomaterial (*Drop Casting*) o generarlas *in situ* a través de una electrodeposición.

La modificación de electrodos se realiza con el fin de mejorar la selectividad y sensibilidad de un método frente a un analito, siempre teniendo en cuenta que esta modificación no sea muy compleja ni delicada y que por ende sea poco práctica³⁰. Considerando las propiedades únicas que presentan las nanopartículas, estos materiales se emplean en la construcción de sensores y biosensores como agentes modificantes. Por ejemplo, las AuNPs se han utilizado por su rol catalítico en reacciones de transferencia electrónica o por su capacidad de inmovilizar biomoléculas como enzimas. Ohsaka *et al*⁵² modificaron electrodos sólidos de oro con AuNPs para la determinación de dopamina (DA) en presencia de ácido ascórbico (AA). La adición de nanopartículas permite la discriminación entre ambos compuestos en solución ya que el E_{p_a} de AA se desplazó hacia menores valores de potencial; además de mejorar la reversibilidad para la reacción de oxidación de dopamina ya que se disminuye el ΔE_p de esta (**figura 9**).

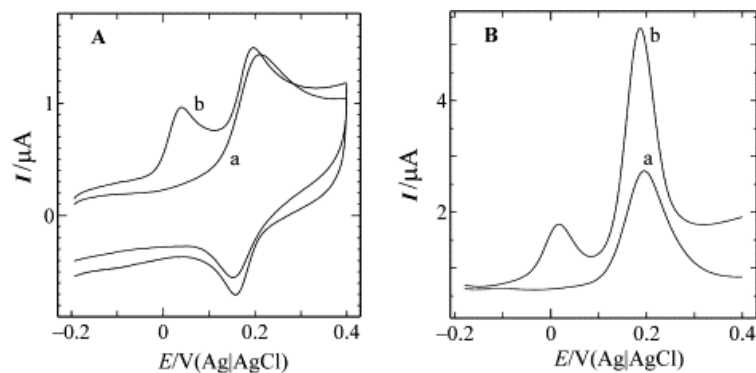


Figura 9. VCs (A) y VOCs (B) de una mezcla binaria de DA (50 μM) y AA (50 μM) en PBS pH 7,2 sobre electrodos sólidos de oro (a) y electrodos sólidos de oro modificados con AuNPs (b). Vel. Barrido 100 mV/s⁵².

Por otra parte, Wang *et al*⁵³ fabricaron un biosensor para la determinación de glucosa inmovilizando a la enzima glucosa oxidasa (GOD), mediante enlace covalente, sobre la superficie de un GCE con grafeno de capa simple (SLG) decorado con AuNPs (**figura 10**). Este biosensor alcanzó un límite de detección de 0,1 nM y fue aplicado efectivamente en muestras de sudor.

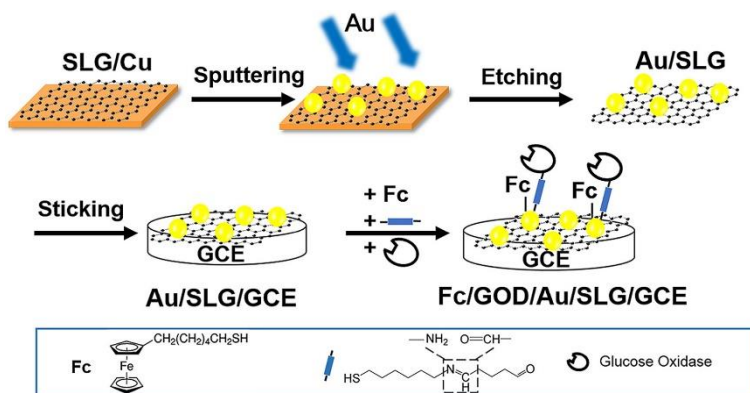


Figura 10. Esquema de construcción de biosensor de glucosa basado en AuNPs, grafeno y ferrocenil hexanotiol sobre GCE⁵³.

Estos ejemplos demuestran las interesantes propiedades que exhiben las AuNPs y que las hacen atractivas para la modificación de superficies para la construcción de sensores y biosensores.

Nanotubos de carbono

Dentro de los nanomateriales, existen aquellos basados en carbono. Ejemplos son el fullereno, los nanotubos de carbono, el grafeno, entre otros. Desde su descubrimiento en 1991 por Iijima⁵⁴, los nanotubos de carbono han atraído mucha atención debido a sus excelentes propiedades eléctricas y mecánicas. Por ejemplo, los nanotubos de carbono de pared simple pueden acarrear una densidad de corriente eléctrica 3 órdenes de magnitud mayor que el cobre⁵⁵. Además, la conductividad eléctrica de los nanotubos de carbono es de 100 MS/m mientras que la del cobre es de 59,6 MS/m⁵⁶. Respecto a las propiedades mecánicas, la resistencia a la tracción^a de los nanotubos de carbono es 60 veces más que para el acero, mientras que el módulo de Young^b es 5 veces más⁵⁷.

La estructura química de los nanotubos tiene relación directa con su amplio rango de aplicaciones. Por ejemplo, el diamante es aislante ya que cada átomo de carbono en configuración sp^3 , con geometría tetraédrica, está enlazado covalentemente a otros 4 átomos de carbono mediante enlaces tipo sigma (σ); no existen electrones deslocalizados tipo pi (π)⁵⁸. En cambio, en el grafeno, los

^a Esfuerzo de tracción máximo que puede soportar un material antes de que se produzca una deformación permanente o una fractura.

^b Parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico. Cuanto más rígido es el material, mayor es el valor.

átomos de carbono en configuración sp^2 con geometría planar, están enlazados a otros 3 átomos de carbono mediante enlaces covalentes σ creando una red hexagonal y dejando electrones π (fuera del plano) “libres”, los que luego se hibridan para formar la banda π responsable de las propiedades eléctricas de este material^{58,59}. Esquemáticamente, los nanotubos se pueden representar como una lámina de grafeno enrollada en forma de tubo. Esta forma tubular del nanomaterial tiene una curvatura que distorsiona la geometría de los enlaces σ causando que queden fuera del plano, lo que además tiene un impacto en la deslocalización de los orbitales π , y que contribuye en las propiedades mecánicas, eléctricas y de conductividad térmica^{58,60}.

Los nanotubos se pueden clasificar en 2 grupos de acuerdo con la cantidad de paredes que poseen, ya sea los nanotubos de pared simple (*SWCNT* – *Single Walled Carbon Nanotube*) o de pared múltiple (*MWCNT* – *Multi Walled Carbon Nanotube*) tal como se muestra en la **figura 11**.

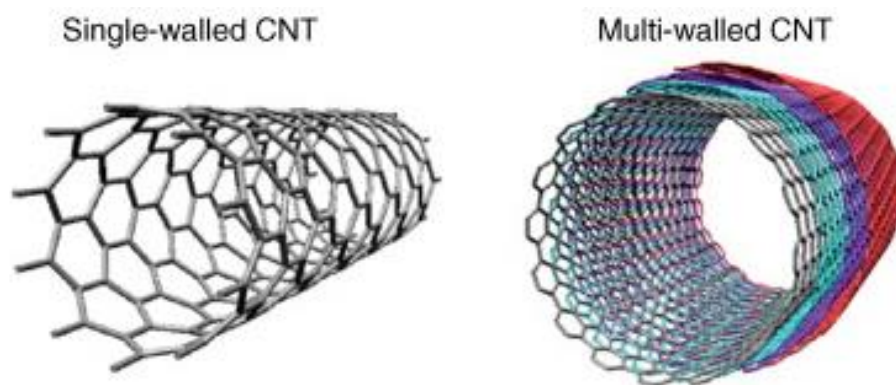


Figura 11. Representación de nanotubos de carbono de pared simple (izq.) y multipared (der.)⁶¹.

Los *SWCNT* tienen un diámetro que varía entre los 0,4 y 2,5 nm. Mientras que los *MWCNT*, consisten en múltiples láminas de grafeno enrolladas con diámetros hasta los 100 nm⁶¹.

Tipos de los nanotubos de carbono

Dependiendo de la forma en que la lámina de grafeno se “enrolle”, podemos encontrar diferentes estructuras de nanotubos de acuerdo con el patrón de su sección transversal. Más aun, tanto la estructura electrónica así como el diámetro de los nanotubos dependen de esto⁶². Existen 3 formas de enrollar la lámina lo que proporciona 3 tipos de nanotubos que se conocen como *Armchair*, *Chiral* y *Zigzag*⁶³ (figura 12).

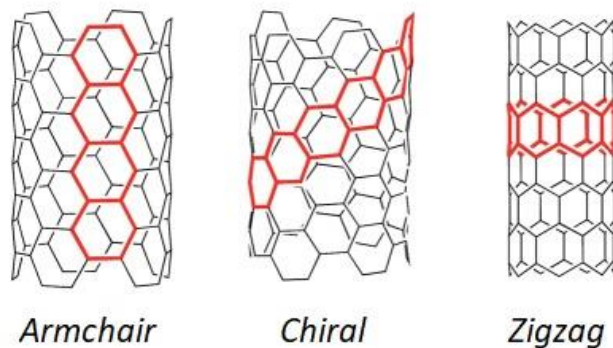


Figura 12. Representación esquemática de los 3 tipos de nanotubos de carbono⁶³.

Para describir a los 3 tipos de nanotubos es conveniente definir el vector quiral, \vec{C}_h , y el ángulo quiral, θ . El vector quiral determina la estructura atómica y viene dado por la siguiente ecuación:

$$\vec{C}_h = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2$$

en donde n y m son números enteros que representan la “posición” del hexágono respecto de un origen $(0, 0)^{64}$ (**figura 13A**). Mientras que a_1 y a_2 corresponden a los vectores unitarios en la red hexagonal, el ángulo quiral θ es el ángulo entre \vec{C}_h y a_1 e indica la cantidad de torsión en el nanotubo⁶⁵ (**figura 13B**).

Los nanotubos tipo *Armchair* exhiben comportamiento metálico y se forman cuando $n = m$ y θ es 30° . Los nanotubos tipo *Zigzag* se forman cuando n o m es 0 y θ es 0° . Todas las estructuras comprendidas entre estas 2 son del tipo *Chiral*. Tanto los tipo *Zigzag* como *Chiral* presentan comportamiento de semiconductor⁶⁶.

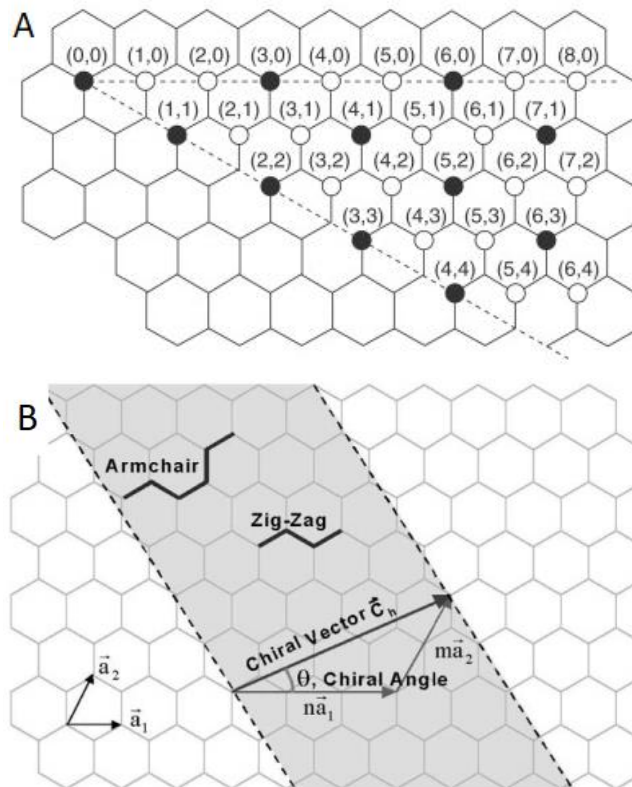


Figura 13. Representación esquemática de la notación de Hamada (A). HAMADA 1992 Diagrama esquemático de cómo se enrolla la lámina de grafeno para formar el nanotubo (B)⁶⁵.

Así como existen 3 subtipos de nanotubos de pared simple, encontramos también 3 subtipos de nanotubos de pared múltiple. Estos son los nanotubos tipo *Hollow*, *Bamboo-like* y *Herringbone*⁶⁷ (**figura 14**). Los nanotubos tipo *Hollow* corresponden a múltiples láminas de SWCNT enrolladas sobre un eje en común. Los nanotubos *Bamboo-like* se caracterizan por compartimentos segmentados, similar al bambú⁶⁸. Finalmente, la estructura tipo *Herringbone* puede describirse como láminas de grafeno (paredes de los nanotubos) formando ángulos sobre un eje central⁶⁹. La principal diferencia entre estas estructuras radica en que los nanotubos del tipo *Bamboo-like* y *Herringbone* contienen más sitios del borde (*Edge sites*), que corresponden a los bordes de la lámina de grafeno.

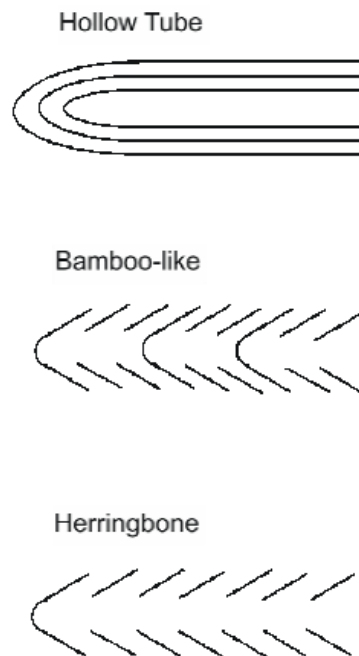


Figura 14. Representación esquemática de la sección transversal de los 3 subtipos de MWCNT⁶⁷.

Síntesis de nanotubos de carbono

La síntesis de nanotubos de carbono se realiza principalmente mediante 3 métodos: la descarga de arco (*arc discharge*), la ablación láser (*laser ablation*) y la deposición química de vapor (*chemical vapor deposition* o *CVD*). Cada método tiene su ventaja y desventaja que añade diferentes propiedades a los nanotubos⁷⁰.

Descarga de arco (*arc discharge*):

Este método consiste en aplicar una diferencia de potencial en corriente directa sobre electrodos de carbono, tanto ánodo como cátodo, en un ambiente inerte (Ar o He). El método por arco es simple y provee de la temperatura necesaria para vaporizar los átomos de carbono en plasma ($> 3.000\text{ }^{\circ}\text{C}$). Los nanotubos crecen sobre el cátodo. Para la síntesis de MWCNT no se necesitan catalizadores, en cambio para la síntesis de los SWCNT se utilizan metales de transición como Co, Fe y Ni y tierras raras como Y y Gd. Las condiciones de síntesis determinan el diámetro y la quiralidad de los nanotubos, sin embargo, el diámetro promedio es menor a $1,5\text{ nm}$ y el largo del nanotubo es usualmente $1\text{ }\mu\text{m}$ ⁷¹. Una ilustración esquemática se puede ver en la **figura 15**.

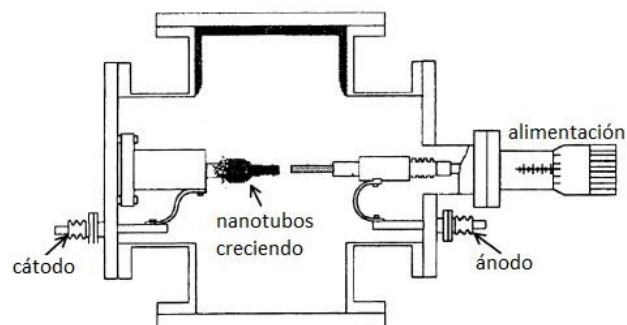


Figura 15. Ilustración esquemática del método de descarga de arco⁷¹.

Ablación láser (*laser ablation*):

El método de ablación láser consiste en impactar un objetivo de grafito con un láser de granate de neodimio-ytrio-aluminio (Nd-YAG)⁷² (**figura 16**). El proceso es muy eficiente, con tasas de recuperación de SWCNT de entre 70 y 90 %. El objetivo impactado por los pulsos láser se mantiene a 1.200 °C y contiene grafito mezclado con pequeñas cantidades de metales de transición. El gas argón utilizado para mantener un ambiente inerte, también sirve para desplazar los nanotubos formados hacia el colector de cobre. El diámetro promedio obtenido es de 1,4 nm con largos de hasta 100 µm. Alterando la composición de los elementos catalizadores, así como la temperatura, se pueden obtener diferentes diámetros⁷¹.

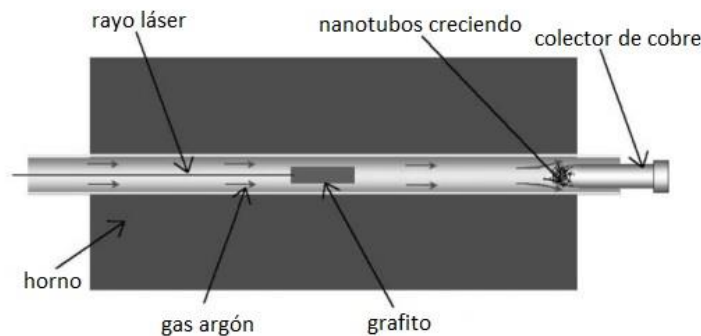


Figura 16. Ilustración esquemática del método de ablación láser⁷².

Deposición química de vapor (*chemical vapor deposition* o *CVD*):

En este método, los nanotubos de carbono se forman sobre la superficie de un sustrato a través de reacciones químicas de precursores carbonáceos en forma de vapor (**figura 17**). Las ventajas de este método son las bajas temperaturas utilizadas (700 – 1.100 °C) en comparación con los otros métodos. Además, que se puede alimentar de forma continua, lo que hace a este método indicado para la producción de grandes cantidades de nanotubos a escalas industriales. El sustrato utilizado generalmente es Si mientras que los catalizadores son metales como el Fe, Co y Ni. Variando estas condiciones se pueden obtener diferentes diámetros y tipos de nanotubos de carbono^{62,71}.

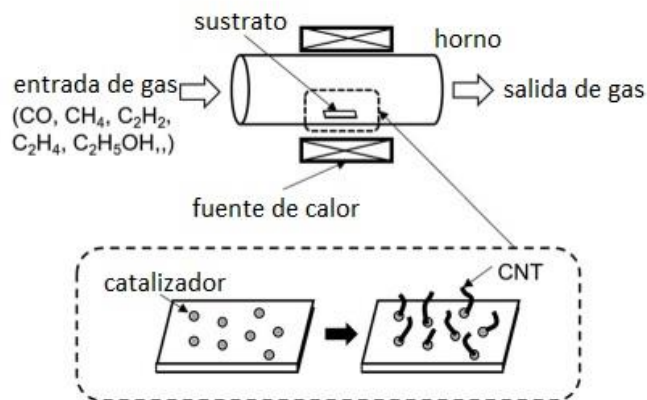


Figura 17. Ilustración esquemática del método de deposición química de vapor⁶².

Nanotubos de carbono en la construcción de sensores electroquímicos

Debido a las excelentes propiedades que los nanotubos de carbono exhiben, su utilización en la fabricación de sensores es casi consecencial. Numerosos trabajos han reportado la versatilidad de este nanomaterial. Por ejemplo Chen *et al*⁷³ fabricaron un biosensor de glucosa utilizando una tela de seda recubierta con *MWCNTs*, microesferas de platino y enzima glucosa oxidasa (GOx) (**figura 18**). La incorporación de los nanotubos en la tela permite la conductividad y flexibilidad del sensor, llegando incluso a resistir pruebas de estrés mecánicos, en la cual el sensor fue sometido a un régimen de “doblado” de hasta 150 ° sobre un eje de 2 mm de diámetro y hasta por 1.000 veces. Se demostró que la variación de la resistencia eléctrica sufrió una variación menor al 5 %.



Figura 18. Fotografía del sensor de glucosa flexible⁷³.

Otros biosensores que incorporan nanotubos de carbono se han desarrollado para la detección de moléculas de interés biológico, como el colesterol⁷⁴, dopamina⁷⁵ y ADN⁷⁶.

La funcionalización de los nanotubos de carbono se puede realizar mediante métodos químicos como la oxidación con ácidos fuertes y reflujo para añadir grupos hidrofílicos, la unión covalente con enzimas, la unión no covalente mediante interacciones hidrofóbicas e interacciones π o métodos físicos, como tratamientos de microondas⁷⁷.

En esta tesis se busca desarrollar una metodología electroanalítica, basada en GCE/MWCNT/AuNPs, que permita cuantificar principios activos directamente desde el aparato disolutor para así establecer la bioequivalencia *in vitro*.

HIPÓTESIS

La modificación de electrodos de carbono vítreo con nanomateriales permitirá desarrollar una metodología electroanalítica selectiva y sensible, para cuantificar principios activos directamente en los ensayos de liberación-disolución.

OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

Desarrollar métodos electroanalíticos usando electrodos de carbono vítreo modificados con nanomateriales, los cuales permitirán lograr métodos con elevada sensibilidad, para evaluar la equivalencia terapéutica *in vitro*.

Para lograr este objetivo general son necesarios los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener electrodos modificados basados en carbono vítreo usando nanopartículas de oro y nanotubos de carbono.
2. Establecer el rol del nanomaterial en la electroactividad y morfología del electrodo.
3. Desarrollar metodologías electroanalíticas, utilizando como analito al paracetamol, un fármaco clase III del SCB.
4. Cuantificar el principio activo en muestras reales obtenidas desde el aparato N° 2 de la USP.
5. Establecer equivalencia terapéutica *in vitro* con la metodología propuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipamiento y materiales

- Agitador magnético SCILOGEX MS-H280-Pro.
- Balanza analítica RADWAG AS 60/220/C/2.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia de inyección manual Jasco equipado con bomba PU-2089S, termostato de columna CO-2060, detector UV-VIS-DAD MD-2018, detector de fluorescencia FP-2020, columna C-18 Waters Symmetry 5 μm , 3,9 \times 150 mm.
- Electrodo de carbono vítreo de 3 mm de diámetro CHI104.
- Electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3molL⁻¹).
- Equipo de agua ultrapura ADRONA SIA modelo Onsite+.
- Equipo de limpieza con ultrasonido VWR Symphony.
- Equipo disolutor Varian VK-7010 con termorregulador VK-750D.
- Espectrofotómetro DLab SP-UV 1100 con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- Ph-metro JENCO VisionPlus pH6175.
- Potenciostato multicanal CHI1030A controlado por computadora con software CHI 1030B. Contra electrodo de alambre de platino y Electrodo de referencia de Ag/AgCl.

Reactivos/solventes

- Acetato de sodio anhidro (CH₃COONa) 99 % p.a – Merck
- Ácido acético (CH₃COOH) 100 % anhidro p.a – Merck
- Ácido cloroáurico trihidrato (HAuCl₄ \times 3 H₂O) 99 % p.a – Merck
- Ácido clorhídrico (HCl) 37 % p.a – Merck
- Cloruro de potasio (KCl) p.a – Merck
- Etanol (CH₃CH₂OH) 99 % p.a – Merck
- Fosfato di ácido de sodio mono hidrato (NaH₂PO₄ \times H₂O) p.a – Merck

- Fosfato mono ácido de sodio anhidro (Na_2HPO_4) p.a – Merck
- Hexacianoferrato (III) de potasio 99 % Sigma Aldrich.
- Metanol (CH_3OH) grado cromatografía líquida LiChrosolv® – Merck
- Nanotubos de carbono multipared – Dropsens (1,5 μm largo \times 10 nm diámetro)
- Paracetamol estándar de referencia USP – Sigma Aldrich
- Prednisona estándar de referencia USP – Sigma Aldrich
- Prednisona comprimidos estándar de referencia USP – Sigma Aldrich
- 1,3-Dioxolano 99 % para síntesis – Merck

Equipo de análisis de superficie

- FE-SEM High Resolution Scanning Electron Microscope. Modelo INSPECT-F50. Thermo Fisher Scientific (FEI, Holanda).

Metodología

Preparación del electrodo de carbono vítreo

Previo a la modificación, la superficie del electrodo de carbono vítreo (GCE), fue pulida con alúmina de 0,3 y 0,05 micrómetros y se enjuagó con agua desionizada ultrapura.

Preparación del electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono

La modificación de los electrodos de carbono vítreo con nanotubos de carbono multipared (GCE/MWCNT), se realizó mediante el depósito por gota (*drop casting*) de una alícuota de 5 μ L de una dispersión 3 mg/mL de nanotubos de carbono en 1,3 – dioxolano, preparada de acuerdo con el trabajo de Moscoso *et al*⁷⁸. En esta tesis se modificó el procedimiento: los nanotubos de carbono fueron pasados por un mortero antes de ser dispersados con el propósito de separar “algunos aglomerados” y conseguir una mejor dispersión. Antes de realizar las mediciones, el electrodo se sumergió en etanol y luego se enjuagó con agua desionizada ultrapura.

Preparación del electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro

La modificación del GCE/MWCNT con nanopartículas de oro (GCE/MWCNT/AuNP) se realizó mediante dos metodologías: el electro depósito y el *drop casting*.

Para el electro depósito se siguió el protocolo de Zhao & Liu⁷⁹, para lo cual se preparó una solución de ácido cloroáurico (HAuCl_4) compuesta de KCl 0,1 M, HCl 2,0 M y $\text{HAuCl}_4 \times 3 \times \text{H}_2\text{O}$ 250 mg/L⁸⁰. La solución de ácido cloroáurico se purgó con nitrógeno por 60 minutos, luego se introdujo el electrodo GCE/MWCNT y se realizó un electro depósito por voltamperometría cíclica (VC), en un rango de potencial entre -1,4 y 0,6 V a una velocidad de barrido de 50 mV/s, obteniendo así el GCE/MWCNT/AuNP.

La modificación con nanopartículas de oro mediante *drop casting* se realizó depositando una alícuota de la suspensión de nanopartículas de oro sobre la superficie del electrodo y dejando secar a temperatura ambiente. Las nanopartículas en suspensión fueron sintetizadas mediante el método Turkevich⁴⁹ y fueron una donación del grupo de trabajo del profesor Dr. Marcelo Kogan. Estas nanopartículas tienen una cantidad de oro de 5,409 mg/L, determinado por absorción atómica.

Caracterización de la superficie modificada

La caracterización de la superficie se llevó a cabo mediante voltamperometría cíclica, utilizando ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) como mediador redox conocido y por microscopía electrónica de barrido.

Los cálculos de estimación del área electroactiva se hicieron con una solución de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mM en KCl 0,1 M, a velocidades de barrido entre 50 y 500 mV/s con intervalos de 50 mV/s⁸¹.

Medios de disolución/electrolitos de soporte

Para preparar 0,25 L de los tres medios de disolución:

Ácido clorhídrico (HCl) pH 1,2

Especie	Masa / g	Concentración / M
KCl	1,863	0,1
HCl	0,574	0,063

Tampón acético/acetato ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$) 0,1 M pH 4,5

Especie	Masa / g	Concentración / M
CH_3COONa	0,923	0,045
CH_3COOH	0,826	0,055

Tampón fosfato di ácido/fosfato mono ácido ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) 0,1 M pH 6,8

Especie	Masa / g	Concentración / M
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,761	0,051
Na_2HPO_4	1,738	0,049

El pH final se ajustó con soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio concentrados antes de llevar a un volumen determinado.

Solución de paracetamol

Para la solución *stock* se pesó una cantidad para preparar 25 mL de paracetamol 0,01 M, luego se transfirió a un matraz aforado y se agregó 1 mL de metanol, se agitó manualmente hasta disolución del principio activo y se llevó a un volumen determinado con agua desionizada ultrapura. A partir de esta disolución se hicieron las diluciones correspondientes.

Condiciones de la prueba de disolución

Las condiciones de la prueba de disolución sobre los comprimidos de paracetamol son las siguientes (**tabla 2**):

Tabla 2. Condiciones ensayo de disolución comprimidos de paracetamol.

Parámetro	Condición
Medio	900 mL de medio desgasificado
Temperatura	37 °C
Velocidad de agitación	75 rpm
Tiempo de agitación	30 minutos
N° de comprimidos	12

Se analizaron comprimidos de paracetamol de 2 laboratorios diferentes (**tabla 5**), los cuales ya son bioequivalentes y fueron utilizados para probar los métodos desarrollados.

Tabla 3. Identificación comprimidos.

Laboratorio	Laboratorio Chile	Mintlab
Nombre comercial	Paracetamol	Geniol®
Principio activo	Paracetamol	
Dosis	500 mg	
Lote	DTBL	I221399
Fecha de vencimiento	07/25	09/25

Se utilizaron 900 mL por cada vaso y se analizan 12 comprimidos por medio, es decir, en total se analizaron 36 comprimidos de cada laboratorio. Las muestras se obtuvieron a los 5, 10, 15, 20 y 30 minutos, ya que un experimento previo sobre 3 comprimidos de paracetamol del Laboratorio Chile se demostró que a los 15 minutos se encuentra más del 85 % del principio activo disuelto.

Obtención y tratamiento de muestras

El volumen muestreado fue de 5 mL en cada marca de tiempo. Se obtuvieron desde el aparato disolutor mediante jeringas adaptadas a un soporte de diseño propio, que permite un muestreo en paralelo (**figura 19**). El muestreo en paralelo se realiza con un adaptador capaz de retraer los émbolos de las jeringas al mismo tiempo (no mostrado en la **figura 19**).

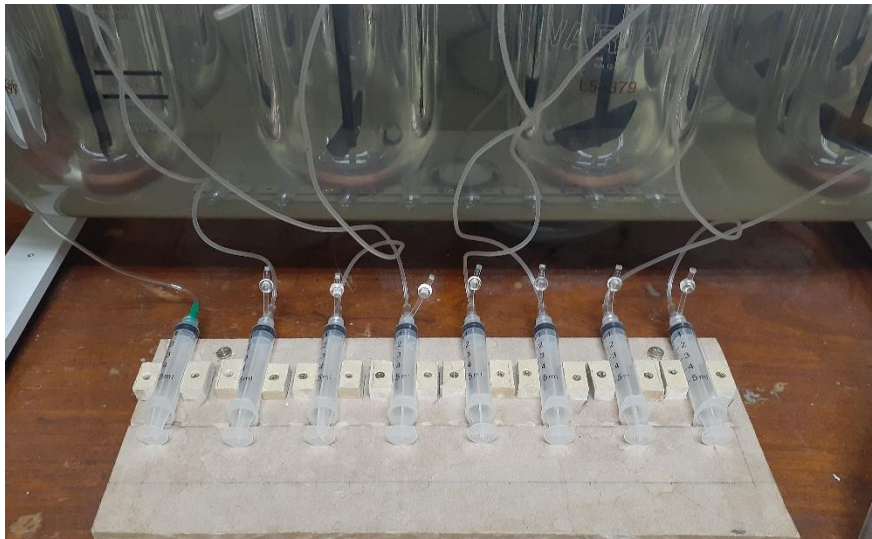
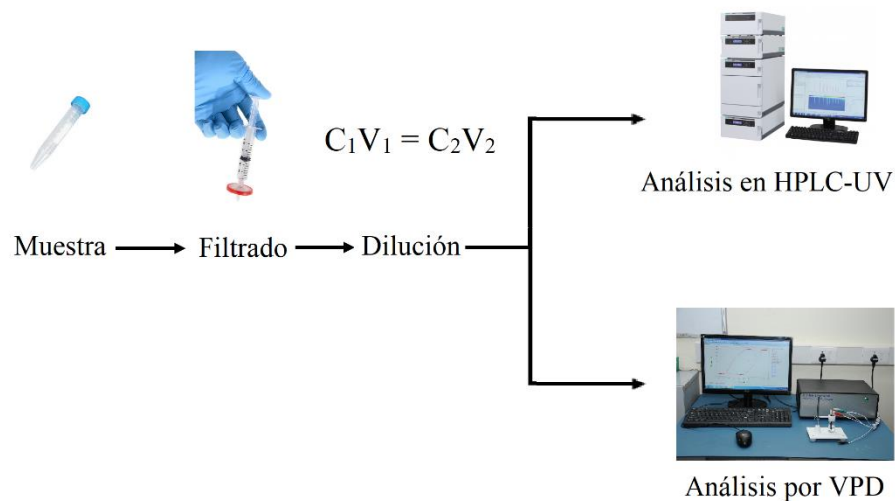


Figura 19. Sistema de muestreo en paralelo.

Las muestras se colocan en tubos de centrifuga tipo falcon y se almacenan entre 2 y 8 °C hasta su análisis. Previo al análisis las muestras deben ser tratadas según el **esquema 1**.



Esquema 1. Tratamiento de las muestras obtenidas desde el equipo disolutor.

El filtro utilizado es de 0,22 μm y el factor de dilución es 1/50 para el análisis por HPLC-UV-DAD; 1/2.500 para el análisis por voltamperometría de pulso diferencial en medio HCl pH 1,2 y 1/5.000 para el análisis por voltamperometría de pulso diferencial en medio acetato pH 4,5 y fosfato pH 6,8.

El porcentaje disuelto a un tiempo t , $\% Dis_t$, se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% Dis_t = \frac{\left(\frac{y - n}{m} \times \frac{1}{F_{Dilución}}\right) \times V_{Vaso} \times M.M_{P.A}}{m_{declarada}} \times 100$$

En donde:

y : señal del instrumento/equipo

n : intercepto de la curva de calibrado

m : pendiente de la curva de calibrado

$F_{Dilución}$: factor de dilución

V_{Vaso} : volumen vaso (0,9 L)

$M.M_{P.A}$: masa molar del principio activo (g/mol)

$m_{declarada}$: masa declarada en el estuche (g)

Comparación de los perfiles de disolución

La comparación de los perfiles de disolución se realiza mediante un método estadístico conocido como factor de similitud o f_2 .

El factor de similitud es una medición de la similitud en porcentaje de disolución entre las 2 curvas.

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \times \sum_{t=1}^n (R_t - E_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

En donde:

n = número de tiempos de muestra.

R_t = porcentaje promedio de lo disuelto del producto de referencia a tiempo t .

E_t = porcentaje promedio de lo disuelto del producto en estudio a tiempo t .

Los 2 perfiles se consideran similares o equivalentes cuando el valor de f_2 es mayor o igual a 50. Sin embargo, algunas consideraciones deben ser tomadas en cuenta antes de utilizar este método:

1. El coeficiente de variación de los primeros puntos temporales del perfil de disolución no debe ser mayor a 20 % (hasta los 10 minutos).
2. El coeficiente de variación de los demás puntos temporales no debe ser mayor al 10 %.
3. Para el cálculo de f_2 se requiere un mínimo de 3 puntos (excluyendo el cero).

Si tanto el producto de referencia como el producto en estudio poseen perfiles de muy rápida liberación/disolución, es decir, 85 % del principio activo disuelto en 15 minutos o menos, entonces no es necesario el cálculo del factor f_2 y se consideran equivalentes terapéuticos⁸².

Obtención de datos desde el aparato disolutor

Para lograr un sistema en línea, en el cual los comprimidos puedan ser analizados directamente y en forma paralela en el aparato disolutor, los electrodos deben ser adecuados al equipo. Para esto, se diseñó y adaptó un soporte de 3 electrodos por vaso, tal como se muestra en la **figura 20**.

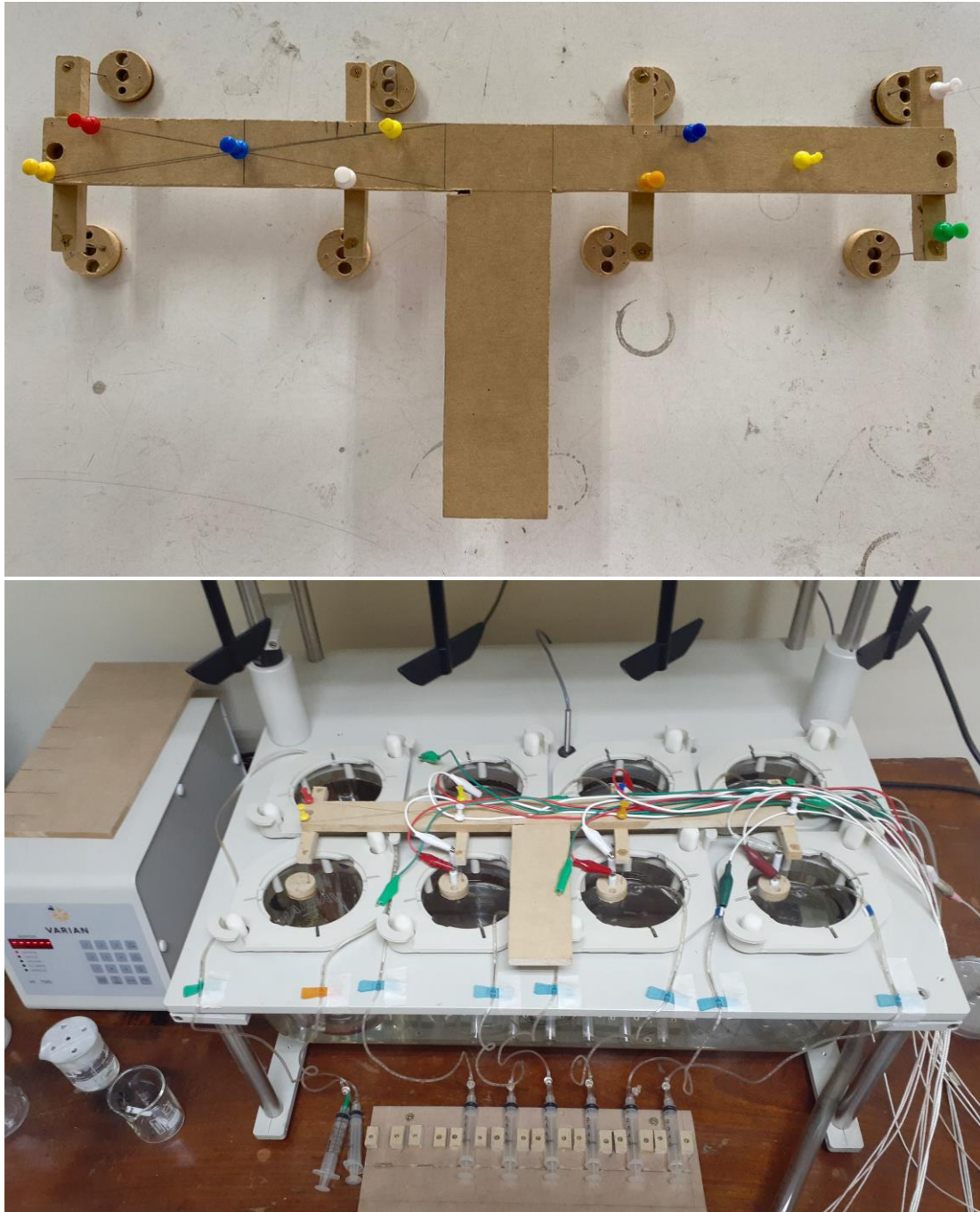


Figura 20. Sistema de análisis electroquímico en paralelo.

En la **figura 21** se aprecia una vista más cercana de los electrodos sumergidos en el vaso del equipo disolutor mediante el sistema de análisis electroquímico en paralelo.

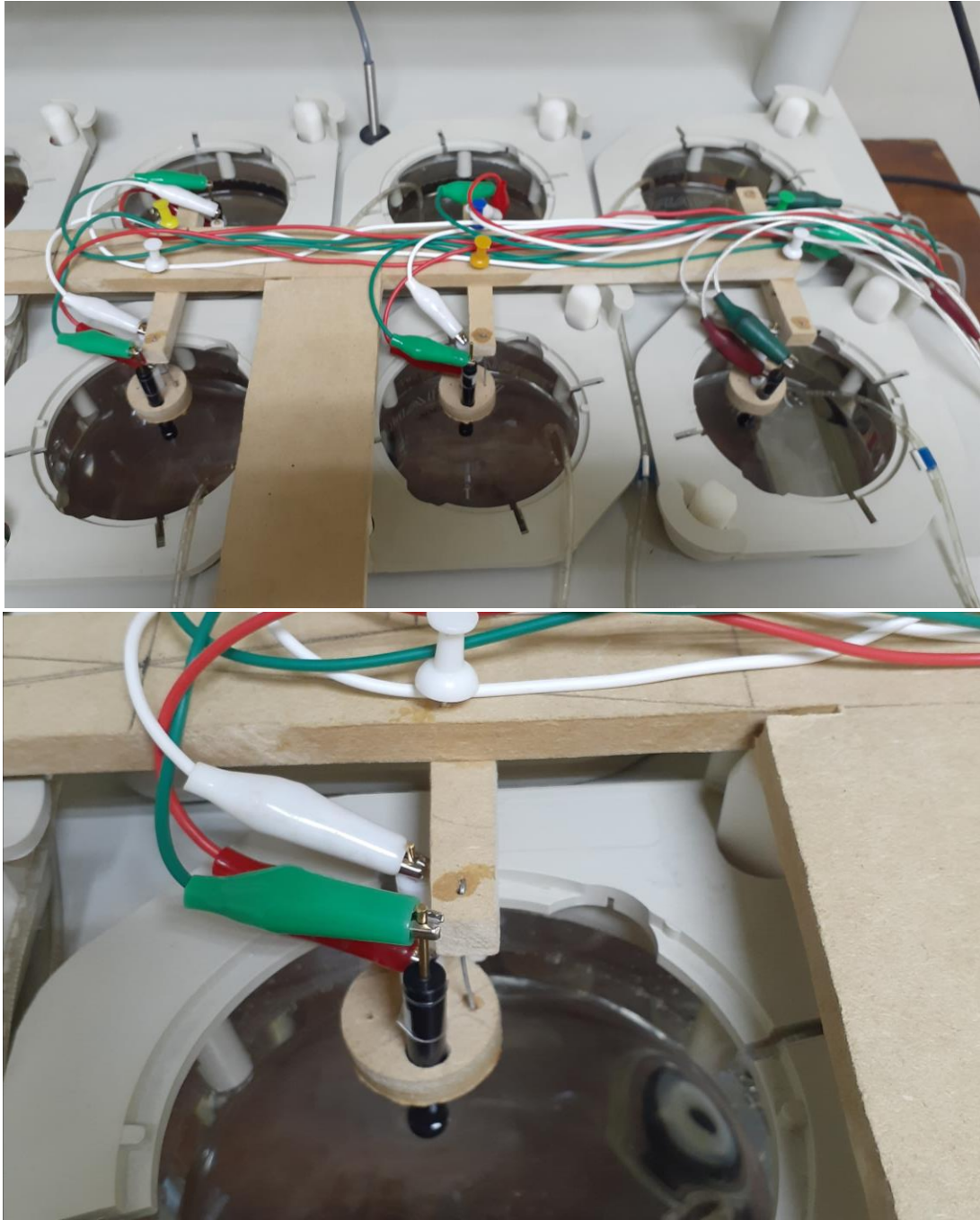


Figura 21. Sistema de análisis electroquímico en paralelo.

Una vista general del equipo disolutor junto con el potenciostato se presenta en la **figura 22**.

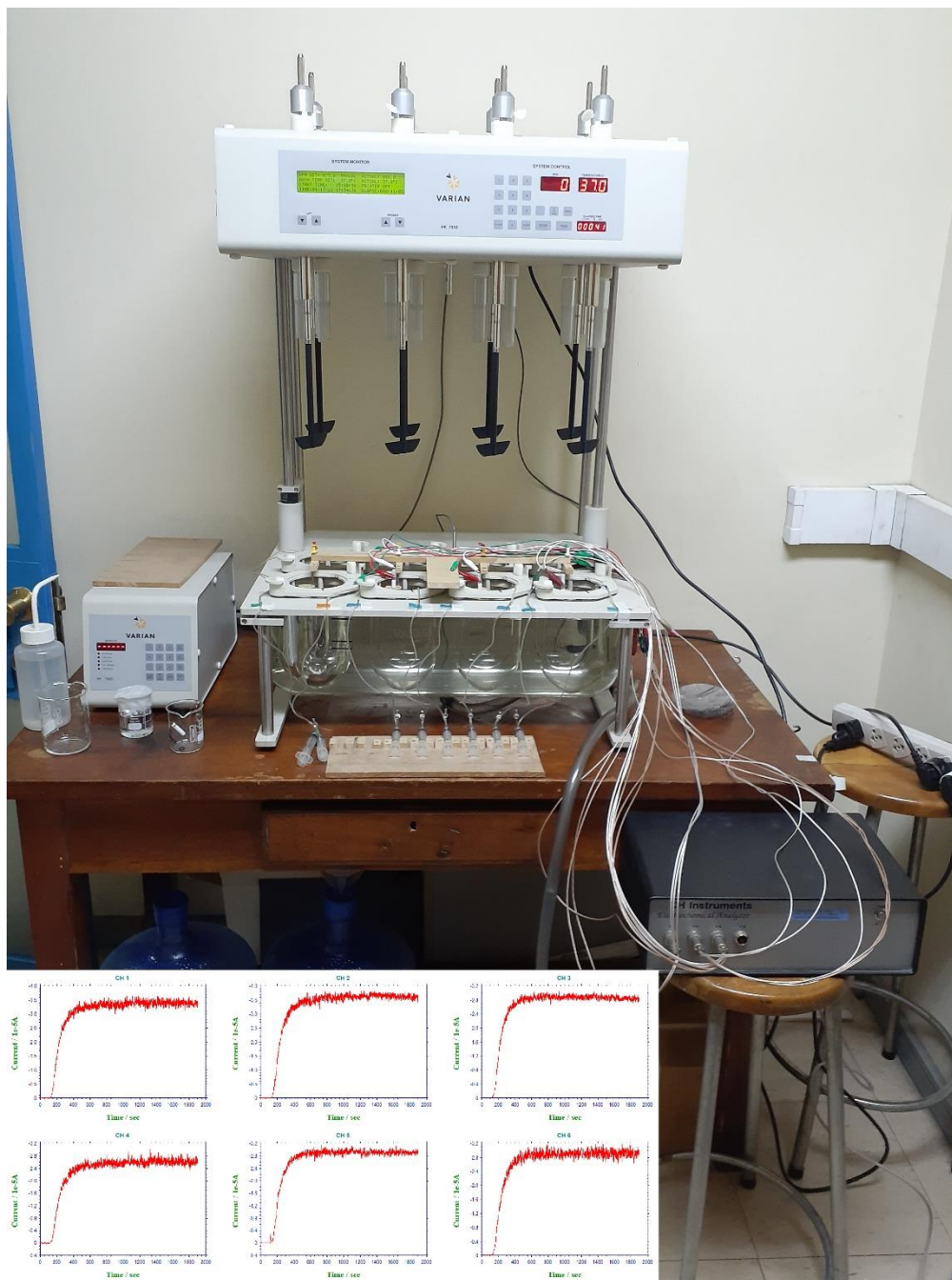


Figura 22. Vista general del sistema de análisis electroquímico en paralelo. En el inserto se muestra un ejemplo de respuesta en paralelo.

Debido a que el largo de los cables del potencióstato no era suficiente para montar el sistema en línea, se utilizaron extensiones de cables de 50 cm de largo. Se estudió su posible interferencia mediante la sonda electroquímica ferricianuro de potasio, en donde se comparó su respuesta ciclovoltamperométrica.

Además, como los electrodos estarán sumergidos a una temperatura y a agitación constante por 30 minutos, se estudió el efecto de estos factores (temperatura y agitación) sobre los electrodos modificados.

El porcentaje disuelto a un tiempo t , $\% Dis_t$, para el análisis en paralelo por amperometría se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% Dis_t = \frac{\left(\frac{y - n}{m}\right) \times V_{Vaso} \times M.M_{P.A}}{m_{declarada}} \times 100$$

En donde:

y : señal del instrumento/equipo

n : intercepto de la curva de calibrado

m : pendiente de la curva de calibrado

V_{Vaso} : volumen vaso (0,9 L)

$M.M_{P.A}$: masa molar del principio activo (g/mol)

$m_{declarada}$: masa declarada en el estuche (g)

Condiciones cromatográficas

Para cuantificar al paracetamol mediante cromatografía líquida, se adaptó la metodología de la USP 39 para la valoración de “paracetamol tabletas”. Las condiciones se resumen en la **tabla 4**.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas.

Columna	C-18 5 μm , 3,9 x 150 mm
Detector	UV con arreglo de diodos
Longitud de onda	243 nm
Flujo	1 mL/min
Fase móvil	Metanol:agua 1:3
Temperatura de la columna	25 °C
Volumen de inyección	20 μL

Debido a que la dosis del medicamento es 500 mg y será evaluada en 900 mL, es decir, 0,555 mg/mL, se hizo un ensayo preliminar con estándares a esta concentración en los tres medios y se inyectaron directamente. Se evidenció una saturación del detector. Para adecuarse a la metodología USP en la que se utiliza una solución estándar de paracetamol 0,01 mg/mL, entonces, se utiliza un factor de dilución 1/50.

Se construyó una curva de calibrado equivalente al 10 – 120 % del fármaco disuelto, en donde el 100 % corresponde a 0,0111 mg/mL.

Para ello, se pesó una cantidad de paracetamol para preparar una solución 0,555 mg/mL en fase móvil; a partir de ésta, se hicieron las diluciones correspondientes y se construyeron curvas de calibrado en los 3 medios.

La curva de calibrado considera 3 réplicas, no así las muestras obtenidas desde el equipo disolutor que se analizaron una vez.

Condiciones electroanalíticas

Voltamperometría de pulso diferencial

Los parámetros de la voltamperometría se resumen en la **tabla 5**.

Tabla 5. Parámetros VPD.

Parámetro	Valor
Incremento	0,004 V
Amplitud	0,05 V
Ancho del pulso	0,2 s
Ancho del muestreo	0,01 s
Tiempo de pulso	0,5 s
Tiempo de reposo	2 s
Agitación	250 rpm

La curva de calibrado considera 3 réplicas, no así las muestras obtenidas desde el equipo disolutor que se analizaron una vez. Para construir la curva, se utilizó el mismo principio que para la técnica cromatográfica, es decir, se construyeron curvas entre los 10 – 120 % del fármaco disuelto. El límite de detección y cuantificación se calculó como $[(3 \times SD)/\text{pendiente}]$ y $[(10 \times SD)/\text{pendiente}]$, en donde SD es la desviación estándar de la respuesta del blanco⁸³.

Amperometría

Los parámetros utilizados en la celda se exponen en la **tabla 6**. La curva de calibrado considera 3 réplicas.

Tabla 6. Parámetros amperometría.

Parámetro	Valor	
Volumen celda	10 mL	900 mL
Intervalo de muestreo	0,1 s	0,1 s
Tiempo de reposo	0 s	0 s
Agitación	500 rpm	75 rpm
Temperatura	Ambiente	37 °C

Análisis de interferentes

Mediante las técnicas de voltamperometría de pulso diferencial y amperometría, se investigó si los excipientes interfieren con la señal electroquímica de paracetamol. Para esto, se prepararon suspensiones de 7 excipientes que luego se añadieron a la celda electroquímica. A través de la técnica VPD se estudia la pasivación de la superficie, mientras que con la técnica amperométrica se examina si los excipientes producen o no una señal electroquímica.

Evaluación de la linealidad, exactitud y precisión

La linealidad se estudia mediante el coeficiente de relación r , el coeficiente de determinación r^2 , el coeficiente de variación del factor respuesta y con un análisis estadístico en el cual se calcula un valor de t experimental y se compara

con el valor de t tabulado. El t experimental se calcula con la siguiente ecuación^{84,85}:

$$t_{exp} = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

- El coeficiente de correlación, r , no debe ser menor a 0,999
- El coeficiente de determinación, r^2 , no debe ser menor a 0,98
- t_{exp} debe ser mayor a t_{tabla} para $n-2$ grados de libertad y $p = 0,05$ y dos colas
- Intercepto debe ser significativamente igual o cercano a 0. Se puede comprobar con factor respuesta $< 5 \%$

La evaluación de la exactitud se estudió mediante la recuperación con una solución de paracetamol y con una solución de comprimidos de paracetamol.

Para la solución de paracetamol se pesó exactamente 37,90 mg y se llevó a un volumen de 25 mL en agua. Posteriormente, se hizo una dilución en cada uno de los 3 medios hasta una concentración de 50 μM .

Para la solución de comprimidos se procedió según la metodología de la USP 39, para la valoración de "paracetamol en tabletas". Brevemente, se pesaron 20 tabletas y fueron reducidas a polvo fino, luego se transfirió una cantidad correspondiente a 100 mg de paracetamol a un matraz volumétrico de 200 mL, se agregan 100 mL de solución metanol/agua 1:3 y se agitó mecánicamente por 10 minutos, luego por 5 minutos en ultrasonido y finalmente se llevó a volumen. A partir de esta solución se diluyó en los 3 medios hasta una concentración de nominal de 50 μM .

- El valor obtenido de recuperación debe estar dentro del 95 – 105 %.

La precisión se evaluó mediante el coeficiente de variación de 6 réplicas a una concentración del 100 % del fármaco.

- El coeficiente de variación debe ser menor al 2 %

La evaluación de estos parámetros se realizó con las técnicas de cromatografía líquida y voltamperometría de pulso diferencial. Para la técnica amperométrica sólo se evaluó la linealidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modificación del electrodo de carbono vítreo con nanomateriales

Modificación con nanotubos de carbono

Caracterización de la superficie

La respuesta de la sonda ferricianuro de potasio reveló cambios en los parámetros de potencial pico y corriente pico de los VCs. En la **figura 23** se presenta el voltamperograma cíclico del mediador redox en las superficies GCE y GCE/MWCNT.

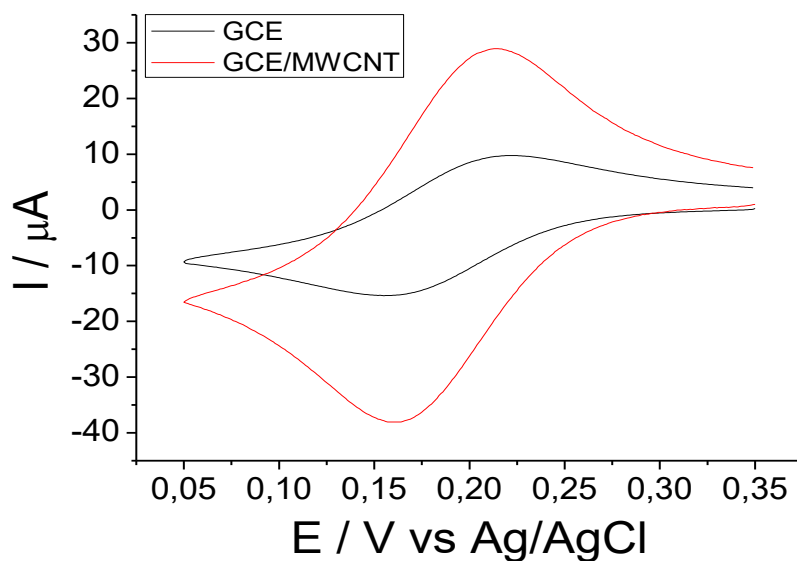


Figura 23. VCs de $K_3Fe(CN)_6$ 1 mM sobre GCE y GCE/MWCNT en KCl 0,1 M. Vel. Barrido 100 mV/s.

El valor de ΔE_p de ferricianuro sobre GCE es de 68 mV, mientras que sobre GCE/MWCNT es de 55 mV. Para procesos monoelectrónicos y electroquímicamente reversibles de especies redox que difunden libremente, el valor teórico de ΔE_p es de 59 mV²⁶. Esto puede significar que la reacción electroquímica se hace “más” reversible, o que hay involucrados fenómenos de adsorción en el electrodo GCE/MWCNT. La ecuación de Randles-Sevcik, describe cómo la corriente pico (I_p) aumenta linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$).

En la **figura 24** se aprecian los voltamperogramas cíclicos a velocidades de barrido crecientes para ambas superficies.

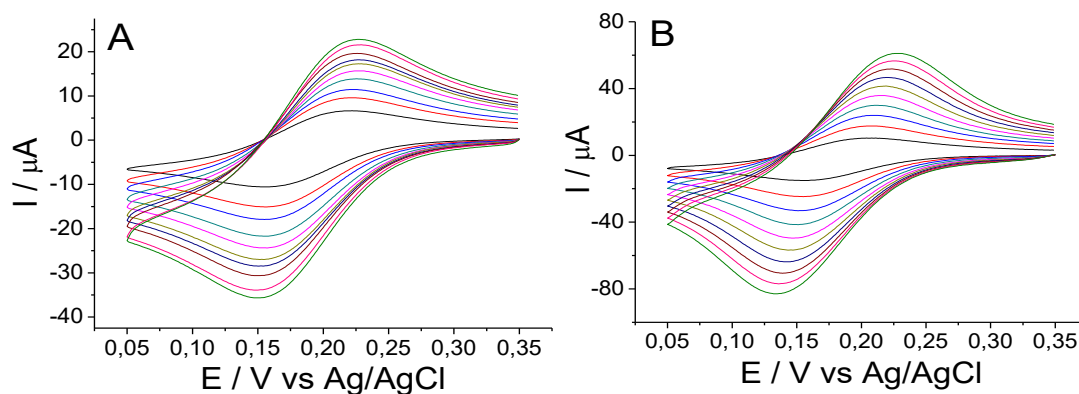


Figura 24. VCs de $K_3Fe(CN)_6$ 1 mM sobre GCE (A) y GCE/MWCNT (B) a velocidades de barrido crecientes en KCl 0,1 M.

Se observa que los potenciales pico de reducción y oxidación de ferricianuro sobre GCE/MWCNT se desplazan a medida que aumenta la velocidad de barrido, lo que lleva a un aumento en el ΔE_p . Mientras que en la **figura 25** se presenta la dependencia de la corriente con la velocidad de barrido para GCE y GCE/MWCNT, en la **tabla 9** se resumen las ecuaciones extraídas.

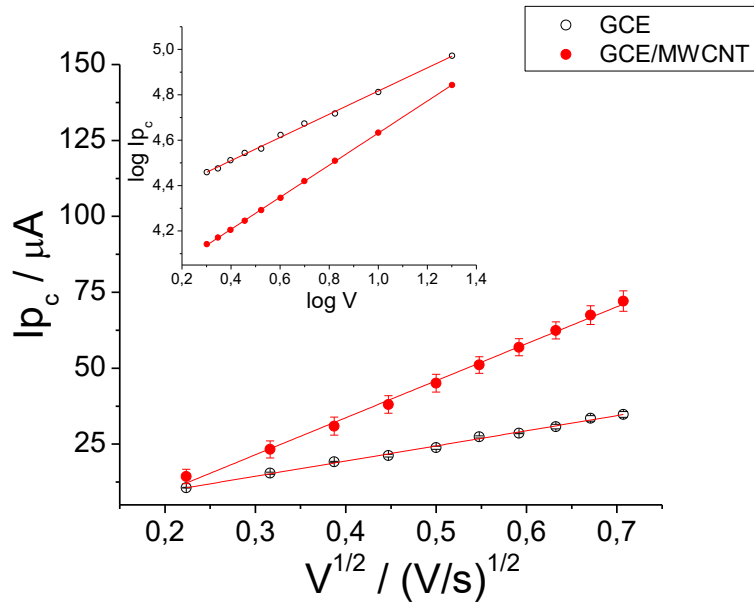


Figura 25. I_{p_c} vs $v^{1/2}$ de $K_3Fe(CN)_6$ 1 mM sobre GCE y GCE/MWCNT en KCl 0,1 M. En inserto $\log I_{p_c}$ vs $\log v$. Vel. Barrido desde 50 mV/s hasta 500 mV/s.

Tabla 7. I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_{p_c}$ vs $\log v$. GCE y GCE/MWCNT.

Superficie	I_p vs $v^{1/2}$	r^2	$\log I_{p_c}$ vs $\log v$	r^2
GCE	$Y = 4,86 \times 10^{-5} X - 5,78 \times 10^{-8}$	0,998	$Y = 0,511 X + 4,31$	0,998
GCE/MWCNT	$Y = 1,22 \times 10^{-4} X - 1,51 \times 10^{-5}$	0,996	$Y = 0,706 X + 3,93$	0,999

Si bien los coeficientes de determinación de las ecuaciones I_p vs $v^{1/2}$ son cercanos a 1, lo que sugiere procesos difusivos, se aprecia que la pendiente de la ecuación $\log I_{p_c}$ vs $\log v$ son diferentes. Para el electrodo GCE/MWCNT es 0,706; lo que indica que el proceso de reducción de ferricianuro es del tipo mixto, es decir, hay presentes fenómenos de difusión y adsorción atribuibles al entorno poroso de los nanotubos de carbono⁸⁶. Debido a que la superficie modificada ya no es plana, sino que tiene una estructura tridimensional, la corriente catódica de ferricianuro viene dada por una difusión semi infinita y por un fenómeno de difusión de capa fina (*Thin Layer Diffusion*). En otras palabras, el mediador redox

queda “atrapado” en la red de nanotubos⁸⁷. Contrario a lo que ocurre usando el electrodo GCE, en donde la pendiente de 0,511 indica que hay un control difusivo⁸⁸.

A partir de la pendiente de las curvas I_p vs $v^{1/2}$ se puede estimar el área electroactiva. Para la superficie GCE el área calculada fue de 0,066 cm²; valor muy cercano a su área geométrica la cual es de 0,071 cm². Por su parte, el área electroactiva para la superficie modificada con los nanotubos de carbono es de 0,164 cm². Es decir, el incremento fue de aproximadamente 2,5 veces.

Imágenes por microscopía electrónica

A través de la microscopía electrónica de barrido (*SEM*) se obtiene información sobre la topografía de la superficie. En la **figura 11** se muestran imágenes *SEM* de electrodos de disco de carbono vítreo modificados con MWCNT a distintas magnificaciones. Se observa que los nanotubos de carbono están uniformemente distribuidos y en forma aleatoria sobre la superficie, similar a lo reportado por Moscoso *et al*⁷⁸.

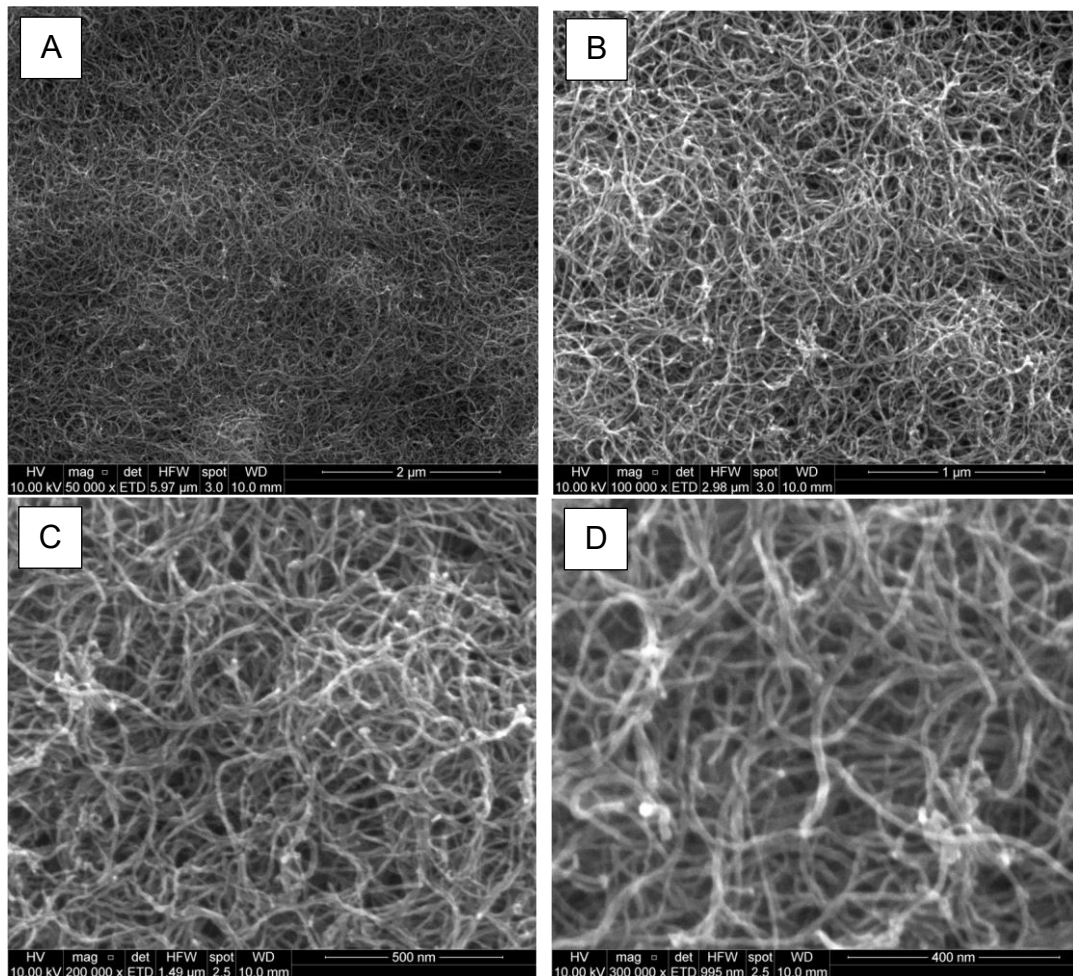
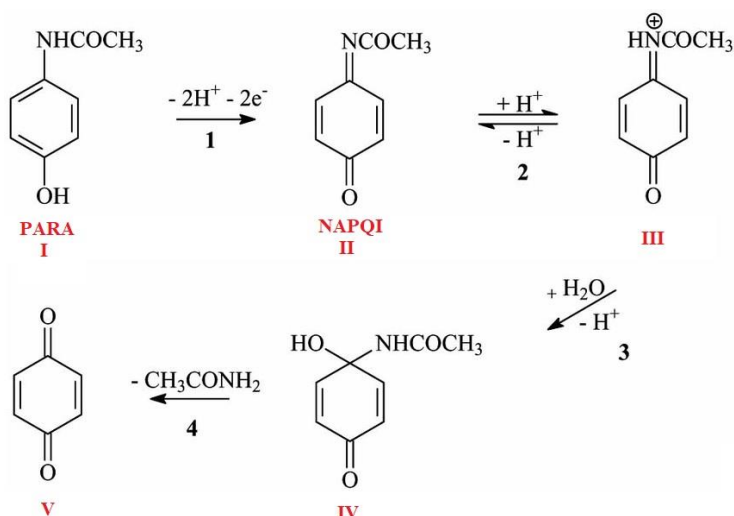


Figura 26. Imágenes SEM de la superficie de discos modificados con nanotubos de carbono multipared a diferentes magnificaciones: 50.000× (A), 100.000× (B), 200.000× (C) y 300.000× (D).

De acuerdo con la evidencia de las imágenes y la respuesta del mediador redox, se concluye que se logra modificar el electrodo de carbono vítreo con nanotubos de carbono multipared.

Caracterización electroquímica de paracetamol

El mecanismo de la oxidación electroquímica de paracetamol sobre pasta de carbón y carbono vítreo ha sido estudiado previamente^{89,90} (**esquema 2**); en donde se concluye que es un proceso dependiente del pH y que involucra la pérdida de 2 electrones y 2 protones obteniendo como producto la N-acetil-*p*-benzoquinonimina (NAPQI). La ocurrencia de una reacción química por parte de NAPQI es dependiente del pH y de la velocidad de barrido. A valores de pH ácidos (menores a 2,2) NAPQI se protona, generando una especie electroactiva inestable (**III**) que inmediatamente se hidrata (**IV**), es decir, luego de la etapa electroquímica ocurre una etapa química, lo que se clasificaría como mecanismo EC, previniendo así que la especie se reduzca y por ende no generando corrientes catódicas. En condiciones muy ácidas se convierte en benzoquinona (**V**), la cual es electroquímicamente activa⁹¹.



Esquema 2. Oxidación electroquímica de paracetamol^{89,90}.

En las **figuras 27A** y **27B** se muestran los voltamperogramas cíclicos de paracetamol sobre GCE y GCE/MWCNT, respectivamente, en los tres electrolitos de soporte. Lo primero que se evidencia es que la respuesta voltamperométrica tanto en GCE como en GCE/MWCNT es dependiente del pH, en donde a mayores valores de pH se requieren menores valores de potencial para oxidar al fármaco, es decir, a valores mayores de pH, la oxidación electroquímica de paracetamol se ve favorecida.

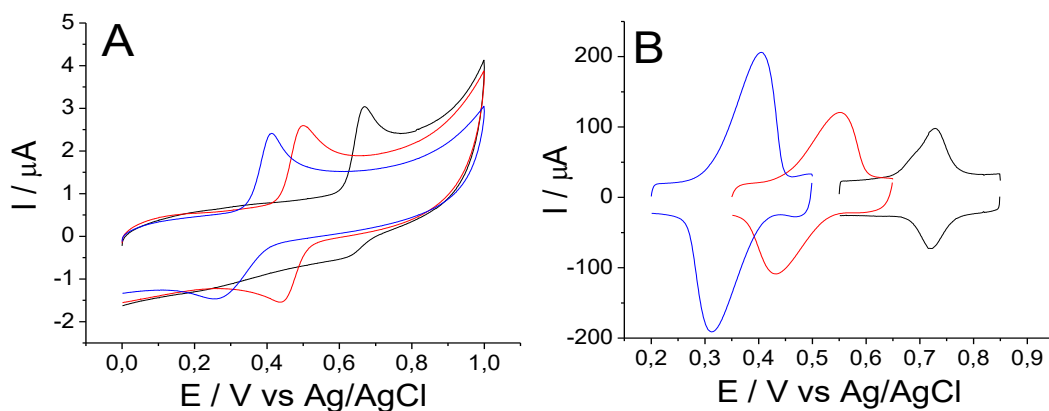


Figura 27. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWCNT (B) en HCl pH 1,2 (negro), tampón acetato pH 4,5 (rojo) y tampón fosfato pH 6,8 (azul). Vel. Barrido 0,1 V/s.

Esto es consistente con la literatura reportada, en donde incluso se utilizaron diferentes superficies como nanopartículas de zinc, nanocompositos de nanotubos de carbono con grafeno y nanopartículas de oro con arcillas aniónicas⁹²⁻⁹⁵. Esto indica que a medida que aumenta el pH, la oxidación electroquímica del fármaco es más fácil, concordante con lo descrito experimentalmente en este trabajo.

Un estudio publicado por Nematollahi⁹⁶, reporta una variación lineal del potencial pico de oxidación con el pH en un rango entre pH 1 y pH 13 sobre GCE, con una pendiente negativa de 51 mV/pH, similar al valor teórico de 59 mV, lo cual se atribuye a que en la oxidación de paracetamol participan igual número de protones que de electrones.

Lo segundo que se evidencia es que la adición de los nanotubos de carbono aumenta el potencial requerido para oxidar a paracetamol. La literatura reporta que la adición de nanotubos de carbono sobre la superficie del electrodo de carbono vítreo tiene efectos catalíticos⁹⁷, que son atribuidos al aumento en el área superficial y a las excelentes propiedades de conducción eléctrica que posee este nanomaterial. Los resultados muestran un aumento significativo en la corriente, pero un mayor valor de potencial de oxidación de paracetamol en los tres valores de pHs estudiados.

Estudio en medio HCl pH 1,2

En la **figura 28** se aprecian los voltamperogramas cíclicos de paracetamol en medio ácido clorhídrico pH 1,2. Sobre GCE (**figura 28A**) se observa una señal anódica a los 671 mV; no se observa una señal catódica, por lo que este proceso se considera irreversible. A este valor de pH ocurre una etapa química después de la etapa electroquímica, que es la protonación de NAPQI (**esquema 2, III**), la cual es una molécula inestable que al hidratarse forma el compuesto **IV** del **esquema 2**. De esta forma, al no haber NAPQI en la superficie, éste no se puede reducir para volver a formar paracetamol.

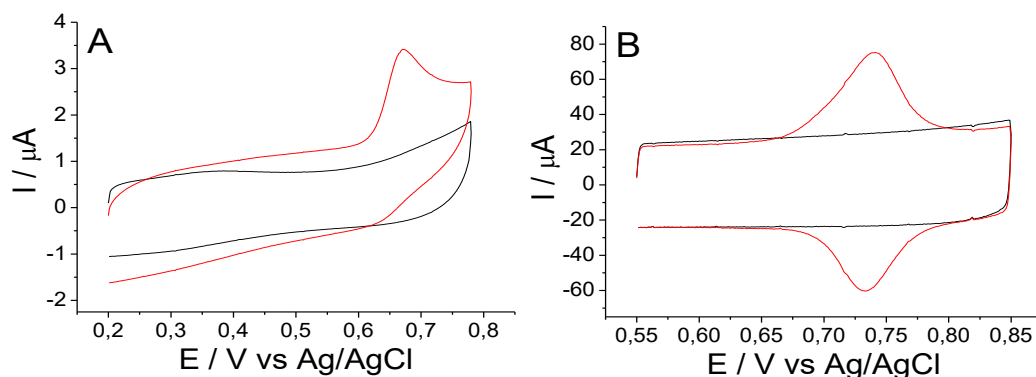


Figura 28. VCs de paracetamol 40 μM (línea roja) sobre GCE (A) y GCE/MWCNT (B) en HCl pH 1,2 (línea negra). Velocidad de barrido 0,1 V/s.

Sobre la superficie GCE/MWCNT (**figura 28B**), se observa una señal anódica a los 736 mV, es decir, existe un desplazamiento hacia valores más positivos respecto al electrodo GCE; así como una señal anódica a los 730 mV. La forma del voltamperograma sobre la superficie modificada con los nanotubos, así como un ΔE_p de 6 mV, indican que la especie electroactiva se adsorbe²⁶.

Debido a esta adsorción, la especie oxidada queda disponible para volver a ser reducida. Además de esto, con la adición de nanotubos de carbono, la corriente anódica aumentó aproximadamente 23 veces.

En la **figura 29** se aprecian los voltamperogramas de paracetamol en HCl pH 1,2 a velocidades de barrido crecientes en ambas superficies. Los insertos corresponden a las curvas de dependencia de la corriente en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y las curvas $\log I_p$ vs $\log v$.

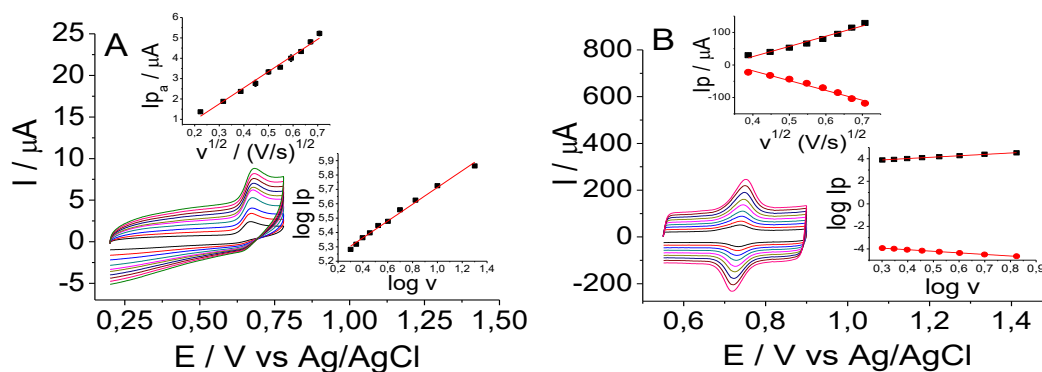


Figura 29. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWCT (B). Desde 0,05 hasta 0,5 V/s en HCl pH 1,2. En los insertos se presentan las curvas I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$.

Las ecuaciones de la recta I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$ de paracetamol sobre GCE y GCE/MWCNT en HCl pH 1,2 se detallan en la **tabla 8**.

Tabla 8. Ecuaciones de la recta I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$ sobre GCE y GCE/MWCNT en HCl pH 1,2.

Superficie	Proceso	I_p vs $v^{1/2}$	r^2	$\log I_p$ vs $\log v$	r^2
GCE	Anódico	$Y = 7,46 \times 10^{-6} X - 4,49 \times 10^{-7}$	0,986	$Y = 0,585 X + 5,13$	0,992
	Catódico	-	-	-	-
GCE/ MWCNT	Anódico	$Y = 3,14 \times 10^{-4} X - 9,98 \times 10^{-5}$	0,969	$Y = 1,23 X + 3,53$	0,997
	Catódico	$Y = -3,01 \times 10^{-4} X - 1,03 \times 10^{-4}$	0,966	$Y = 1,40 X + 3,51$	0,999

Debido a que la pendiente del gráfico $\log I_p$ vs $\log v$ es cercana a 0,5 sobre el GCE, se puede concluir que el proceso de oxidación del paracetamol en medio HCl pH 1,2 es del tipo difusivo. Por otra parte, el proceso es adsorptivo sobre GCE/MWCNT considerando la forma del voltamperograma y que la pendiente es cercana a la unidad. Además, como en el electrodo desnudo no se observa señal catódica se concluye que es irreversible, mientras que sobre la superficie modificada con nanotubos es reversible.

Adicionalmente, se realizó un análisis a velocidades de barrido por debajo de los 150 mV/s, ya que a una velocidad de barrido de 50 mV/s se observa un pico cercano a los 700 mV además de un hombro los 730 mV, aproximadamente (**figura 30A**). Un examen más detenido revela que se obtiene una señal que no se repite al hacer la medida en cuadruplicado en el mismo electrodo. Por otra parte, en la **figura 30B** y **30C** se aprecian los voltamperogramas de paracetamol a velocidad de barrido de 100 y 150 mV/s, respectivamente, en donde ya no aparece la señal.

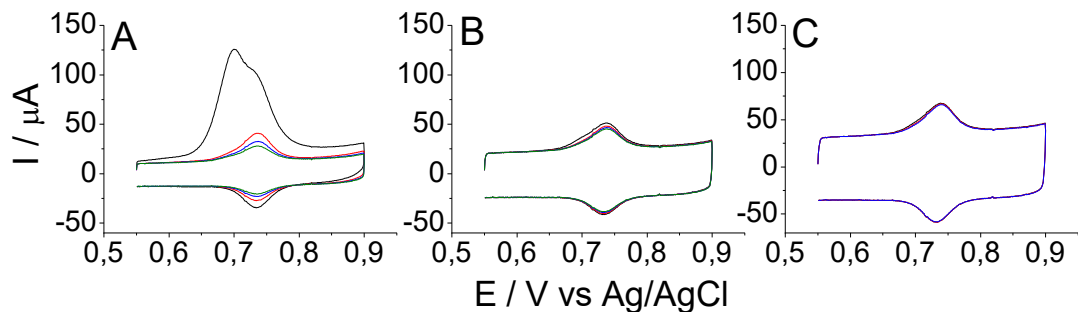


Figura 30. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE/MWCNT en HCl pH 1,2 a vel. Barrido de 50 mV/s (A), 100 mV/s (B) y 150 mV/s (C).

En la **figura 16A** y **16B** se muestran los voltamperogramas cíclicos a velocidades de barrido de 10 y 1 mV/s, respectivamente.

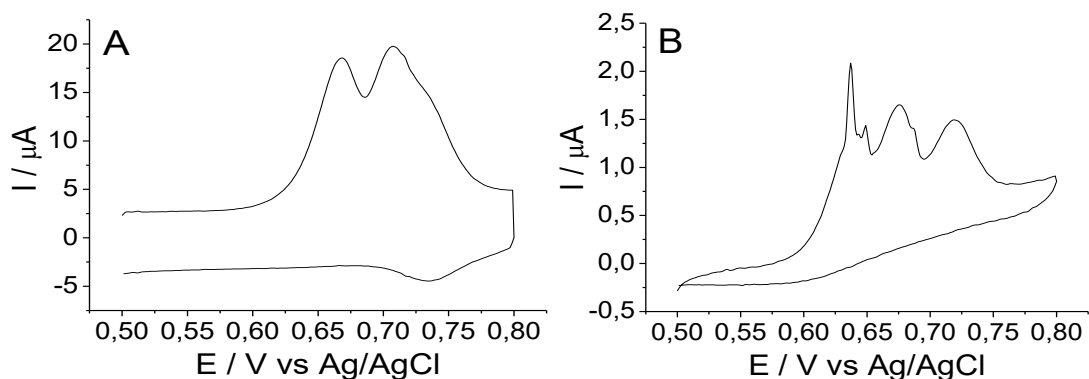
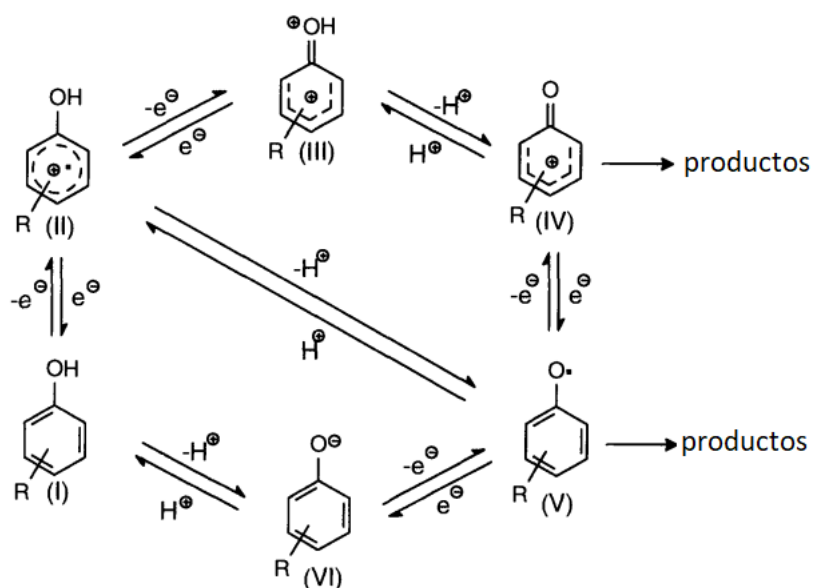


Figura 31. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE/MWCNT a velocidad de barrido de 10 mV/s (A) y 1 mV/s (B) en HCl pH 1,2.

Se advierte que, al disminuir la velocidad de barrido, se puede tener una mejor resolución de los picos anódicos. A una velocidad de 10 mV/s se aprecian dos picos anódicos no resueltos a los 650 y 700 mV aproximadamente y uno catódico a los 725 mV, en cambio, a una velocidad de barrido de 1 mV/s se observa un primer pico tipo adsorptivo a los 630 mV aproximadamente, seguido de dos picos difusivos a 670 y 720 mV. Los picos de tipo adsorptivo corresponden

a corrientes no faradaicas y tienen forma puntiaguda, debido a que este proceso de adsorción genera cambios en la doble capa, resultando en un cambio en su capacitancia⁹⁸. Posiblemente, a esta velocidad de barrido, se alcanza a oxidar el paracetamol a NAPQI, que luego se hidrata y por ende no se observa una onda catódica. A velocidades más altas, junto con la adsorción, NAPQI sí alcanza a reducirse a paracetamol. Las electrooxidaciones de fenoles y sus derivados son procesos complejos (**esquema 3**). Las especies involucradas se encuentran relacionadas entre sí debido a una serie de transferencias de protones y electrones que pueden ocurrir tanto por procesos bimoleculares^c como ser un proceso electródico primario. Las variables experimentales como el pH, la superficie del electrodo, entre otras, son aspectos clave sobre la prevalencia de una u otra especie⁹⁹.



Esquema 3. Electrooxidación de fenoles⁹⁹.

^c Un proceso bimolecular consiste en la combinación química de dos entidades moleculares y se puede dar entre 2 moléculas químicamente diferentes o idénticas.

La aparición de señales en los voltamperogramas corresponde a transferencias electrónicas, por lo que, las posibles nuevas especies que se formen se pudieran estar oxidando electroquímicamente. Ciertamente, la composición de la superficie tiene un rol en la presencia de estas señales ya que sólo se observan cuando hay *MWCNT* sobre el electrodo de carbono vítreo. Si bien ambas superficies carbonáceas poseen hibridación sp^2 , el electrodo de carbono vítreo es plano, mientras que el electrodo modificado es poroso. Sumado a esto, las propiedades de los nanotubos como nanomaterial, así como efectos de nanoconfinamiento, dentro de los cuales podemos destacar el aumento de las tasas de transferencia electrónica así como cambios en las constantes dieléctricas de los solventes en nanoespacios¹⁰⁰, ciertamente la respuesta electroquímica se verá alterada.

Estudio en medio acetato pH 4,5

A pH 4,5 la señal anódica se observa a 498 mV, además, aparece una señal catódica sobre el electrodo GCE a los 446 mV ($\Delta E_p = 52$ mV), **figura 32A**, contrario a lo que se observó a pH 1,2.

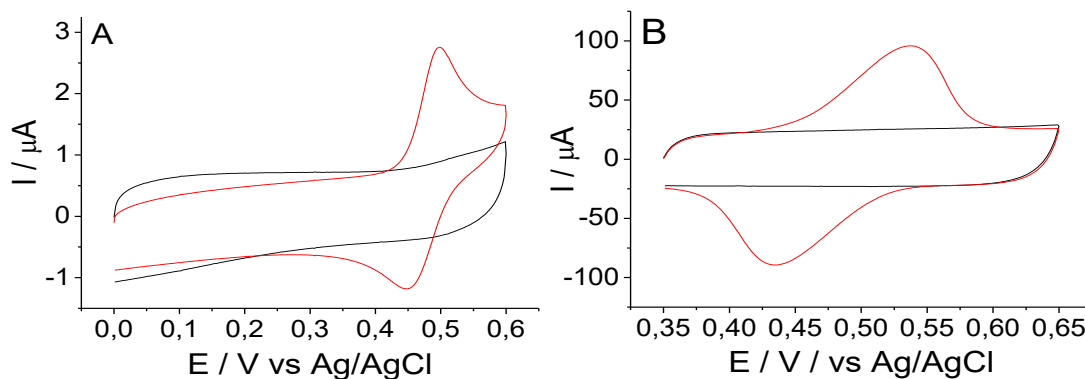


Figura 32. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWNT (B) en acetato pH 4,5. Vel. Barrido 0,1 V/s.

Sobre la superficie GCE/MWCNT (**figura 32B**), el pico anódico se observa a los 539 mV, mientras que el catódico a los 430 mV ($\Delta E_p = 109$ mV). Con la incorporación del nanomaterial, la corriente de oxidación aumentó aproximadamente 31 veces.

En la **figura 33** se aprecian los voltamperogramas cíclicos de paracetamol en acetato pH 4,5 a velocidades de barrido crecientes sobre ambas superficies. Los insertos corresponden a las curvas de dependencia de la corriente en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y las curvas $\log I_p$ vs $\log v$. La **tabla 9** resume las ecuaciones.

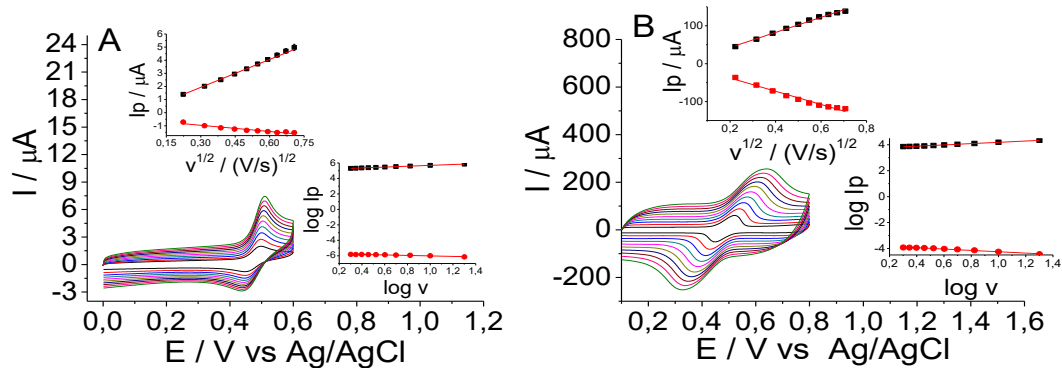


Figura 33. VCs paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWNT (B) en acetato pH 4,5. Desde 0,05 hasta 0,5 V/s. En los insertos se presentan las curvas I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$.

Tabla 9. Ecuaciones de la recta I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$ sobre GCE y GCE/MWCNT en acetato pH 4,5.

Superficie	Proceso	I_p vs $v^{1/2}$	r^2	$\log I_p$ vs $\log v$	r^2
GCE	Anódico	$Y = 7,47 \times 10^{-6} X - 3,46 \times 10^{-7}$	0,999	$Y = 0,554 X + 5,14$	0,999
	Catódico	$Y = -1,58 \times 10^{-6} X - 4,89 \times 10^{-7}$	0,919	$Y = -0,316 X - 5,70$	0,955
GCE/MWCNT	Anódico	$Y = 1,99 \times 10^{-4} X - 3,01 \times 10^{-6}$	0,992	$Y = 0,498 X + 3,69$	0,996
	Catódico	$Y = -1,74 \times 10^{-4} X - 2,90 \times 10^{-6}$	0,972	$Y = -0,520 X - 3,73$	0,980

El proceso de oxidación de paracetamol sobre GCE y GCE/MWCNT es del tipo difusivo, además es cuasi reversible en ambas superficies.

Estudio en medio fosfato pH 6,8.

A pH 6,8 la señal anódica se observa a los 363 mV, mientras que la señal catódica se observa a 324 mV, con un $\Delta E_p = 39$ mV, (**figura 34A**).

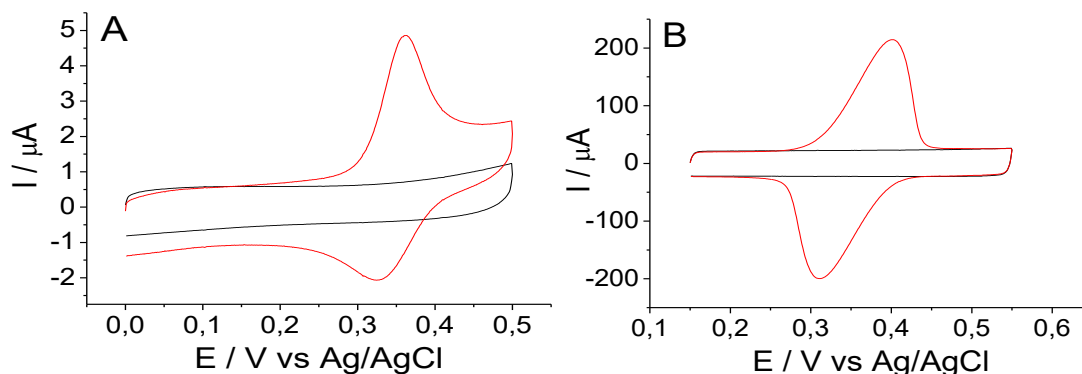


Figura 34. VCs de paracetamol 40 μ M sobre GCE (A) y GCE/MWNT (B) en fosfato pH 6,8. Vel. Barrido 0,1 V/s.

Sobre la superficie GCE/MWCNT (**figura 34B**) el potencial pico de oxidación se observa a los 400 mV y el de reducción a los 312 mV ($\Delta E_p = 88$ mV). La incorporación de los nanotubos de carbono incrementa la corriente anódica en aproximadamente 49 veces.

En la **figura 20A** se aprecian los voltamperogramas de paracetamol en fosfato pH 6,8 a velocidades de barrido entre 0,05 y 0,5 V/s sobre la superficie sin modificar y en la **figura 20B** sobre la superficie modificada. Los insertos corresponden a las curvas de dependencia de la corriente en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido y las curvas $\log I_p$ vs $\log v$.

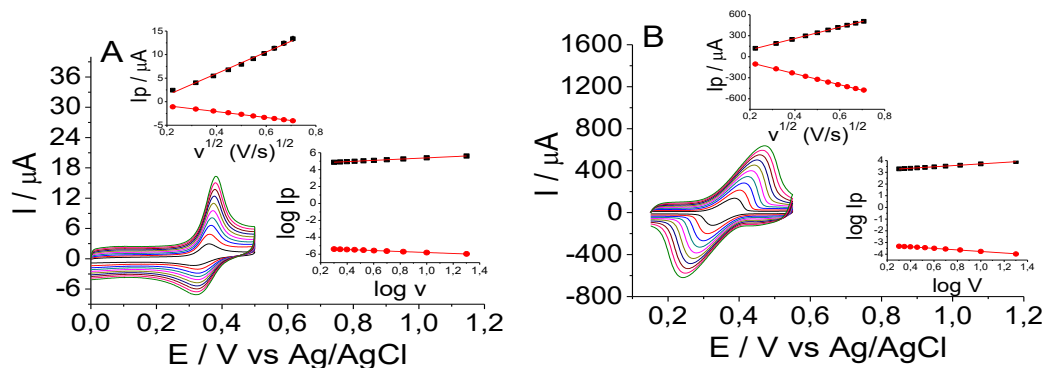


Figura 35. VCs de paracetamol 40 μM sobre GCE (A) y GCE/MWNT (B) en fosfato pH 6,8. Desde 0,05 hasta 0,5 V/s. En los insertos se presentan las curvas I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$.

Se observa el desplazamiento de los potenciales picos anódicos y catódicos, con el incremento en la velocidad de barrido sobre la superficie GCE/MWCNT, es decir, un aumento en el ΔE_p con el aumento de la velocidad de barrido. En la **tabla 10** se recopilan las ecuaciones de la recta I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$ sobre GCE y GCE/MWCNT en medio fosfato pH 6,8.

Tabla 10. Ecuaciones de la recta I_p vs $v^{1/2}$ y $\log I_p$ vs $\log v$ sobre GCE y GCE/MWCNT en fosfato pH 6,8.

Superficie	Proceso	I_p vs $v^{1/2}$	r^2	$\log I_p$ vs $\log v$	r^2
GCE	Anódico	$Y = 2,29 \times 10^{-5} X - 3,21 \times 10^{-6}$	0,993	$Y = 0,740 X + 4,65$	0,999
	Catódico	$Y = -6,28 \times 10^{-6} X - 4,04 \times 10^{-7}$	0,997	$Y = -0,581 X - 5,22$	0,999
GCE/MWCNT	Anódico	$Y = 8,09 \times 10^{-4} X - 6,31 \times 10^{-5}$	0,999	$Y = 0,625 X + 3,10$	0,999
	Catódico	$Y = -7,86 \times 10^{-4} X + 7,20 \times 10^{-5}$	0,999	$Y = -0,661 X - 3,10$	0,997

El comportamiento de paracetamol en este medio es del tipo mixto sobre GCE y más bien difusivo sobre GCE/MWCNT.

Como se mencionó anteriormente, sobre la superficie desnuda (GCE) el proceso de oxidación de paracetamol en medio HCl pH 1,2 es del tipo difusivo

irreversible, mientras que sobre la superficie modificada es del tipo adsorptivo cuasi reversible. En medio acetato pH 4,5 el proceso es difusivo y cuasi reversible. En medio fosfato pH 6,8 el proceso es mixto sobre GCE, pero difusivo sobre los GCE/MWCNT. Similar a los trabajos publicados por otros autores^{97,101}, en donde utilizan superficies de carbono vítreo modificadas con nanotubos de carbono de multipared, en los cuales se observa que a valores de pH cercanos a 7,0 el proceso de oxidación electroquímica corresponde a un proceso difusivo.

Ya obtenida la modificación del electrodo de carbono vítreo con nanotubos de carbono multipared, se procedió a modificar la superficie con nanopartículas de oro.

Modificación con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro

El objetivo de incorporar nanopartículas de oro es incrementar la respuesta en corriente del electrodo, lo que se traducirá en mayores valores de corriente y por ende, menores límites de detección y cuantificación. Para esto, se evaluaron 2 técnicas con las cuales modificar la superficie del electrodo GCE/MWCNT con nanopartículas de oro, la electrodeposición y el *drop casting*. Primero se evalúa la electrodeposición, técnica que consiste en producir recubrimientos metálicos *in situ* por la acción de una corriente eléctrica sobre un material conductor sumergido en una solución de la sal del metal a electrodepositar¹⁰²; para ello se propuso la metodología publicada por *Zhao & Liu*².

Caracterización de la superficie

En su método, *Zhao & Liu* someten al electrodo de trabajo a 5 ciclos de voltamperometría cíclica en una ventana de potencial entre -1,4 y 0,6 V a una velocidad de barrido de 50 mV/s en una solución de ácido cloroáurico. En este trabajo se estudiaron 1, 2 y 3 ciclos. En la **figura 36** se muestran las distribuciones de tamaño de las nanopartículas obtenidas desde las imágenes *SEM* mostradas en las **figuras 37, 38 y 39** correspondientes a 1, 2 y 3 ciclos de electrodeposición, respectivamente. En la **tabla 11** se comparan los valores promedio.

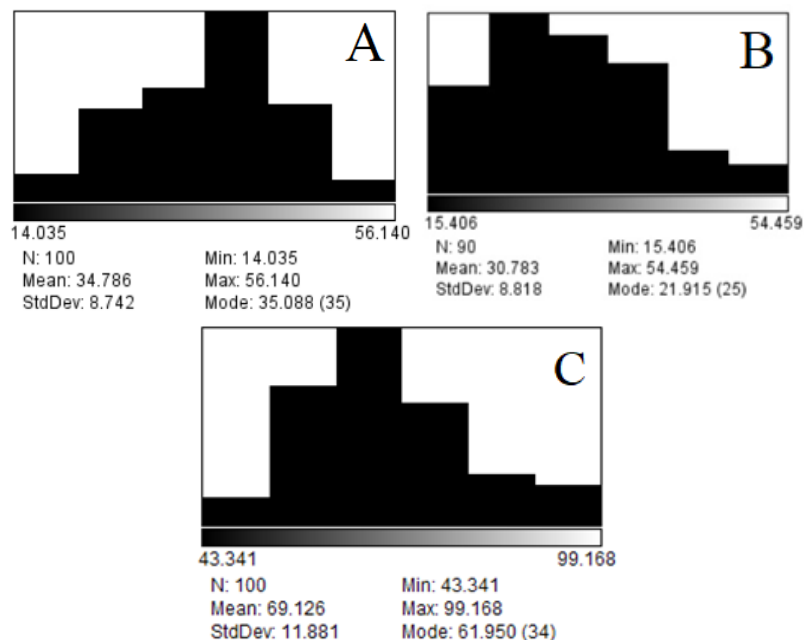


Figura 36. Distribución de tamaño de nanopartículas de oro sobre GCE/MWCNT electrodepositadas con 1 ciclo de VC (A), 2 ciclos (B) y 3 ciclos (C).

Tabla 11. Distribución de tamaño AuNPs.

Ciclos de VC	Tamaño / nm
1	34,79 ± 8,74
2	30,78 ± 8,82
3	69,13 ± 11,9

De acuerdo con la distribución de tamaño, las nanopartículas de oro electrodepositadas mediante 1 y 2 ciclos de VC son similares en tamaño, sin embargo, con 3 ciclos de electrodeposición éstas alcanzan un tamaño significativamente mayor. Dentro de los factores que afectan el tamaño de las nanopartículas se encuentran el tiempo de depósito y la concentración de la sal añadida¹⁰³, siendo esta última constante.

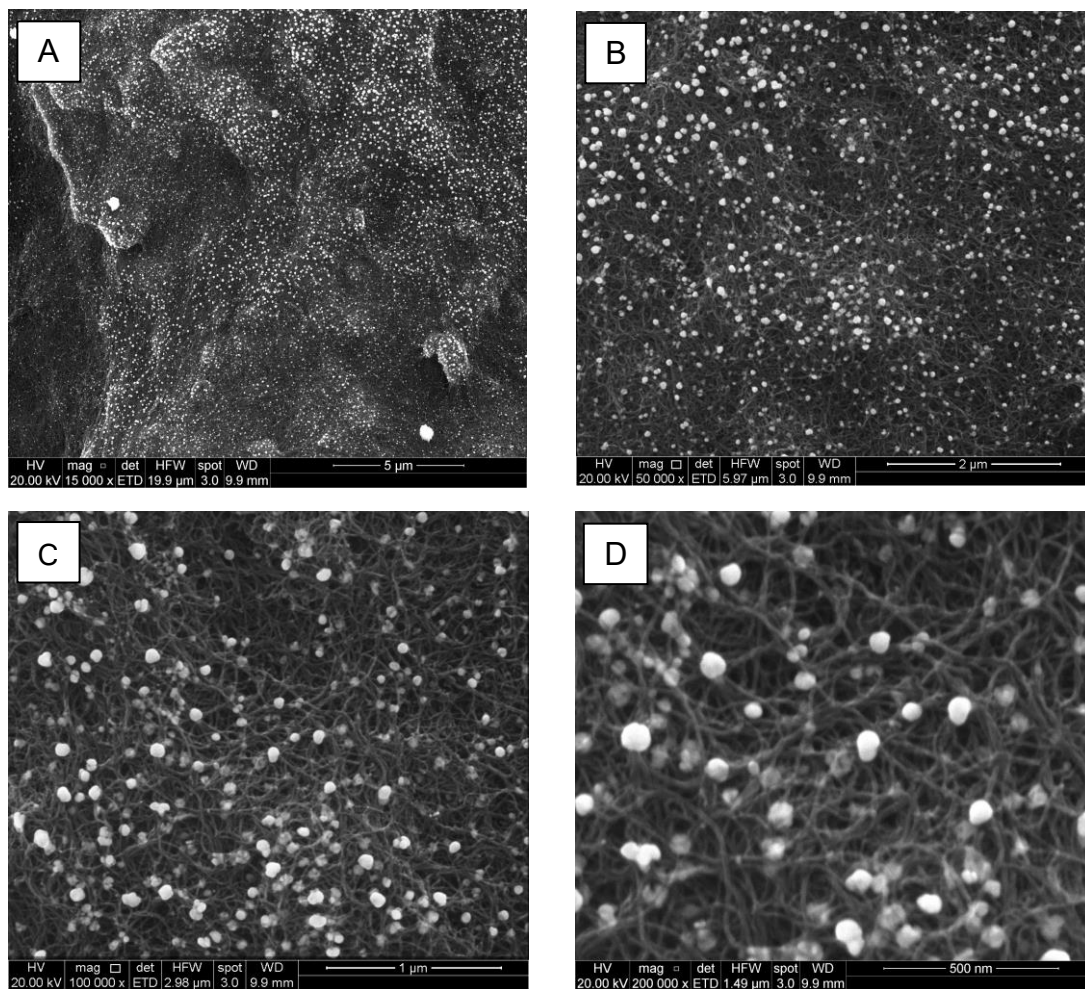


Figura 37. Imágenes SEM de GCE/MWCNT/AuNP 1 cED metodología *Zhao & Liu* a diferentes magnificaciones. 15.000× (A), 50.000× (B), 100.000× (C), 200.000× (D).

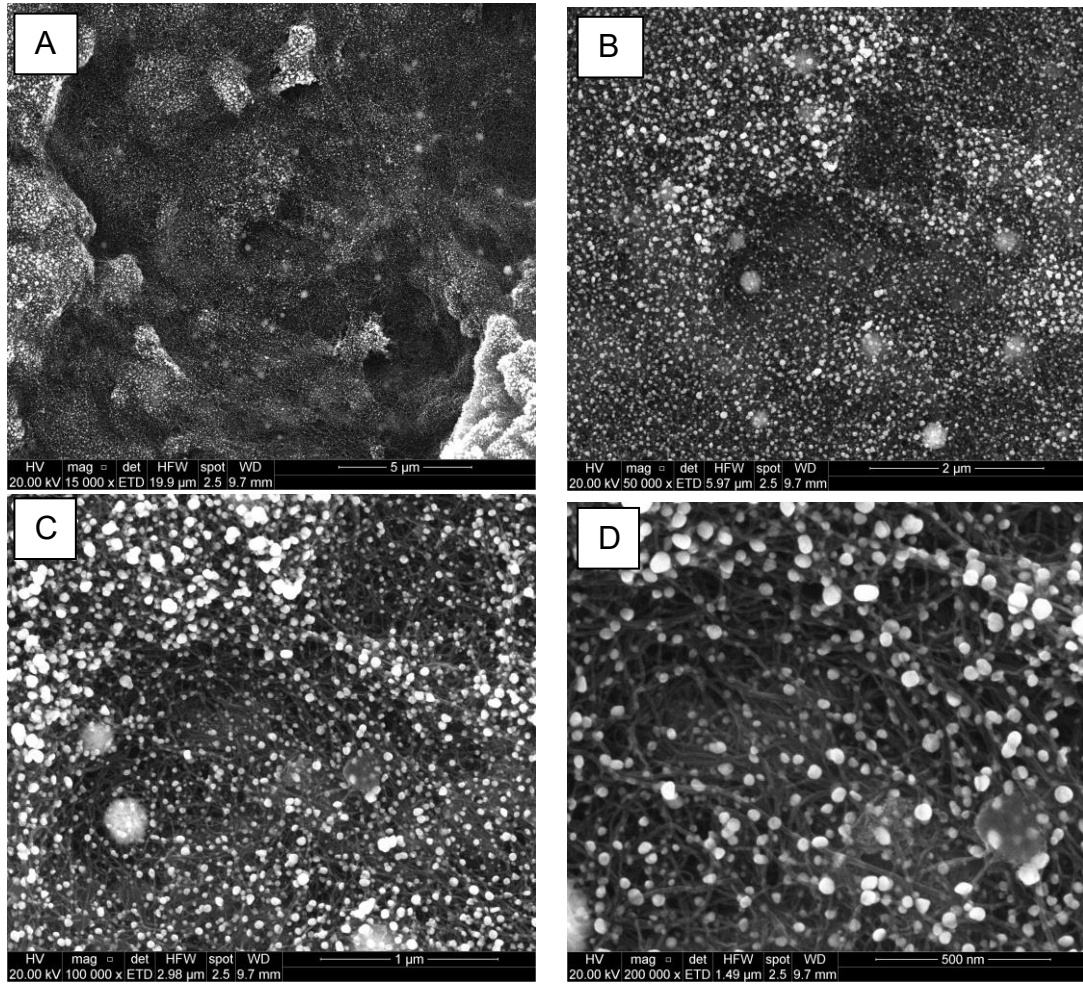


Figura 38. Imágenes SEM de GCE/MWCNT/AuNP 2 cED metodología *Zhao & Liu* a diferentes magnificaciones. 15.000× (A), 50.000× (B), 100.000× (C), 200.000× (D).

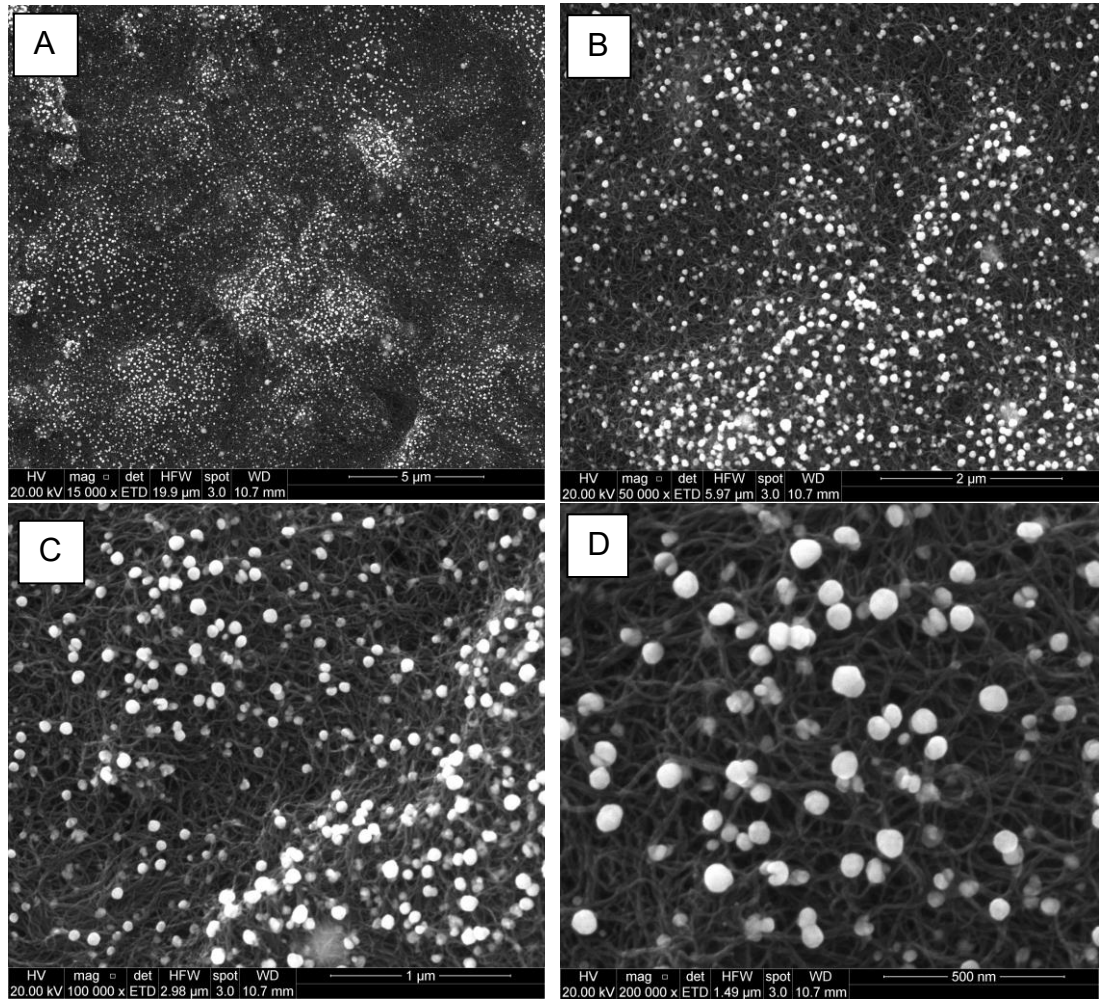


Figura 39. Imágenes SEM de GCE/MWCNT/AuNP 3 cED metodología *Zhao & Liu* a diferentes magnificaciones. 15.000× (A), 50.000× (B), 100.000× (C), 200.000× (D).

Además, en la **figura 40** se muestra el análisis por dispersión de rayos X (EDX) de la superficie modificada con nanopartículas de oro y nanotubos de carbono.

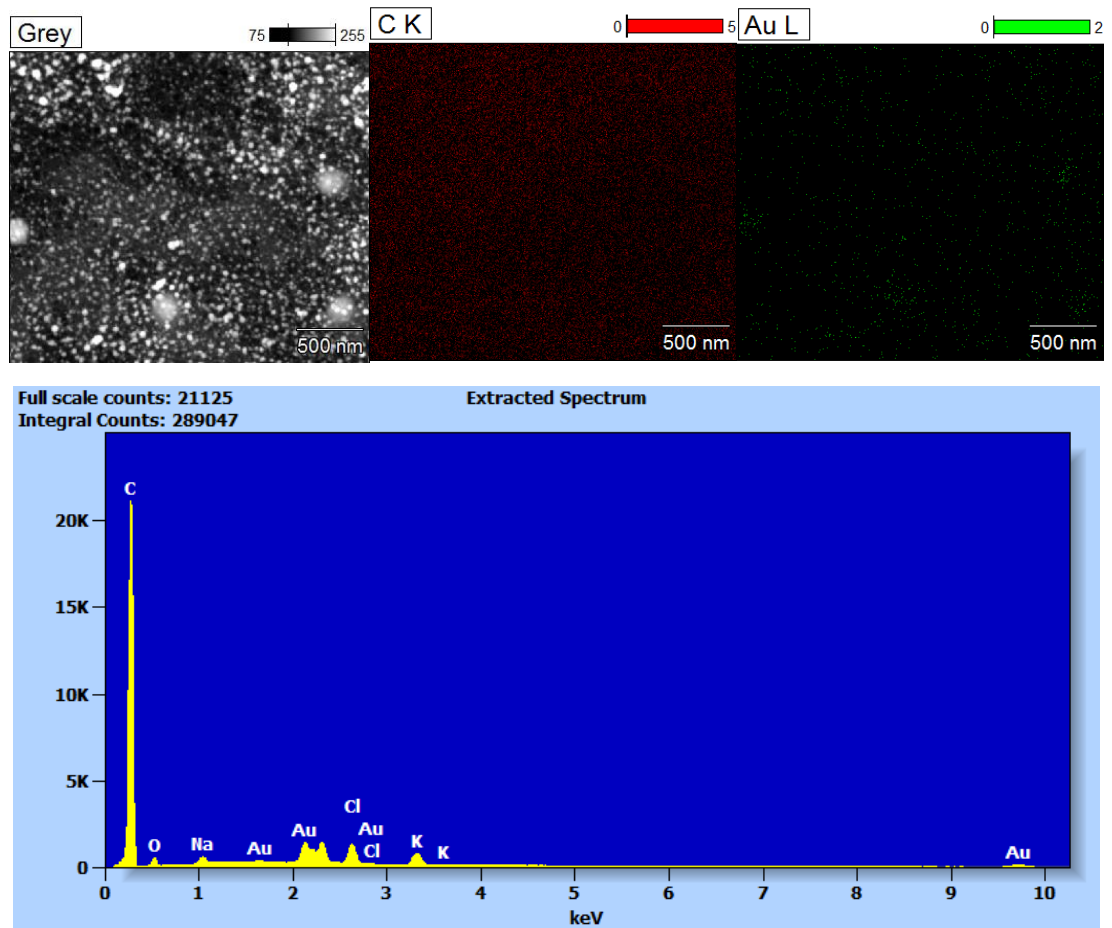


Figura 40. Análisis EDX de superficie GCE/MWCNT/AuNP 2 cED. Electro depósito por metodología *Zhao & Liu*.

El espectro demuestra predominantemente la presencia de carbono (72 %) debido a la presencia de nanotubos de carbono multipared, además de que el disco utilizado para la imagen es de carbono, también muestra la presencia de oro (14 %) debido a las nanopartículas.

Por otra parte, se registraron VCs de los electrodos modificados en los 3 medios electrolíticos, comparando electrodos GCE/MWCNT con y sin AuNPs electrodepositadas (**figura 41**). La adición de las AuNPs a la superficie trae consigo cambios en los VCs. En medio ácido clorhídrico pH 1,2 se observa un aumento de corriente desde 0,8 V correspondiente a la oxidación de Au. En el barrido inverso (hacia valores menores de potencial), se observa la aparición de un pico catódico cercano a los 0,4 V, que se atribuye a la remoción de una capa de óxido cuando se invierte el barrido¹⁰⁴.

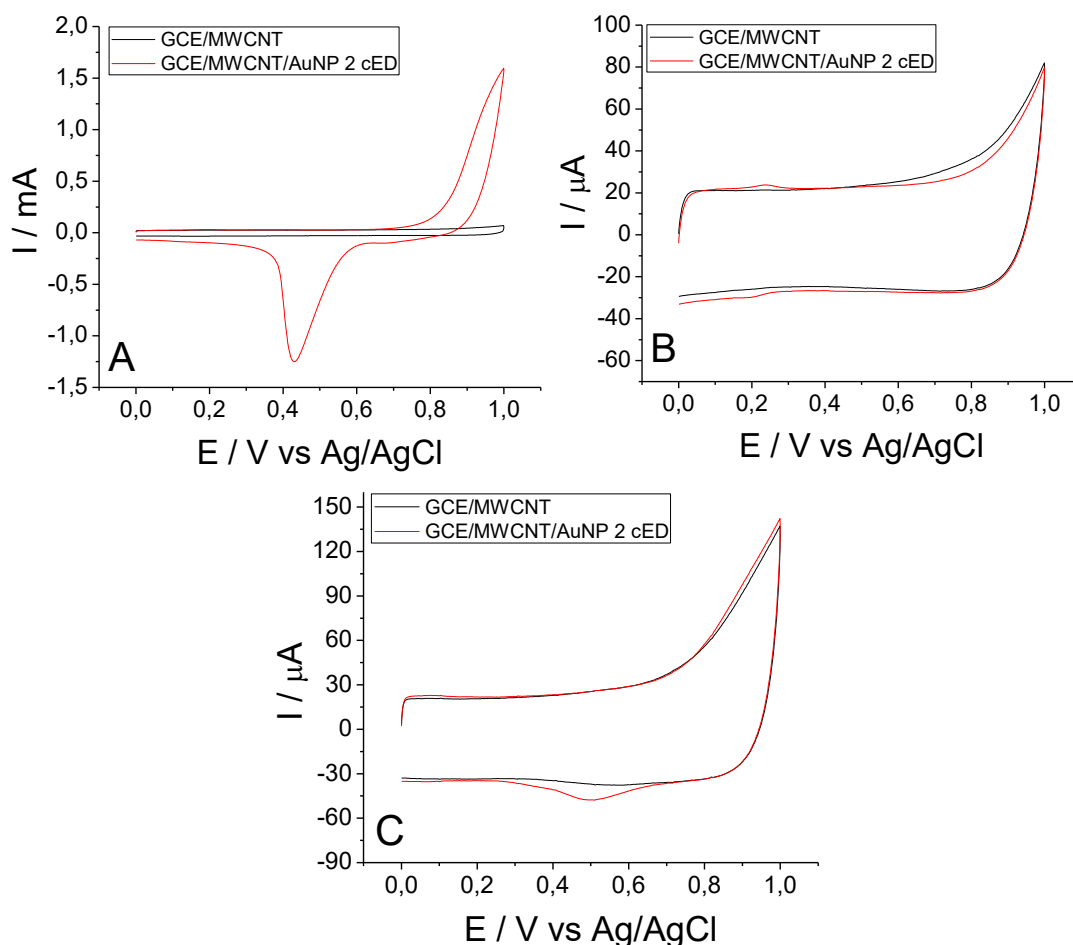


Figura 41. VCs de electrodos GCE/MWCNT y GCE/MWCNT/AuNP 2 cED por metodología *Zhao & Liu* en medio HCl pH 1,2 (A), acetato pH 4,5 (B) y fosfato pH 6,8 (C). Vel. Barrido 0,1 V/s.

En medio acetato pH 4,5 se aprecia a los 0,2 V un ligero aumento de corriente en el barrido anódico y catódico, que dan cuenta de alguna especie adsorbida, mientras que en medio fosfato pH 6,8 se observa un pico catódico cercano a los 0,5 V, similar al visto en medio ácido clorhídrico, pero de muy baja intensidad.

Para complementar la caracterización de la superficie, se estimó el área electroactiva para los electrodos con ambos nanomateriales y se resumen en la **tabla 12**, evidenciándose que no hay un aumento sustancial del área electroactiva de la superficie en presencia de AuNPs.

Tabla 12. Áreas electroactivas estimadas.

Superficie	Área electroactiva (cm²)
GCE/MWCNT	0,164 ± 0,011
GCE/MWCNT/AuNP 1 ciclo ED	0,173 ± 0,032
GCE/MWCNT/AuNP 2 ciclos ED	0,164 ± 0,015
GCE/MWCNT/AuNP 3 ciclos ED	0,182 ± 0,018

Se confirma entonces la presencia de nanopartículas de oro sobre la superficie de los nanotubos de carbono obtenidas a través de la electrodeposición.

Optimización de número de ciclos de electrodeposición

La optimización del número de ciclos de electrodeposición se evalúa mediante la respuesta anódica de paracetamol. En la **figura 42**, se compara dicha respuesta en medio acetato pH 4,5. Se evidencia que la modificación con 1 ciclo de electrodeposición produce valores de intensidades de corriente de aproximadamente un 7 % más alta a los 5 minutos de tiempo de acumulación, sin embargo, al normalizar por el área electroactiva se aprecia que no hay diferencias. Incluso, se observa que, con 3 ciclos de electrodeposición, la respuesta en corriente y densidad de corriente es menor y con más alta variación que la vista en las otras superficies.

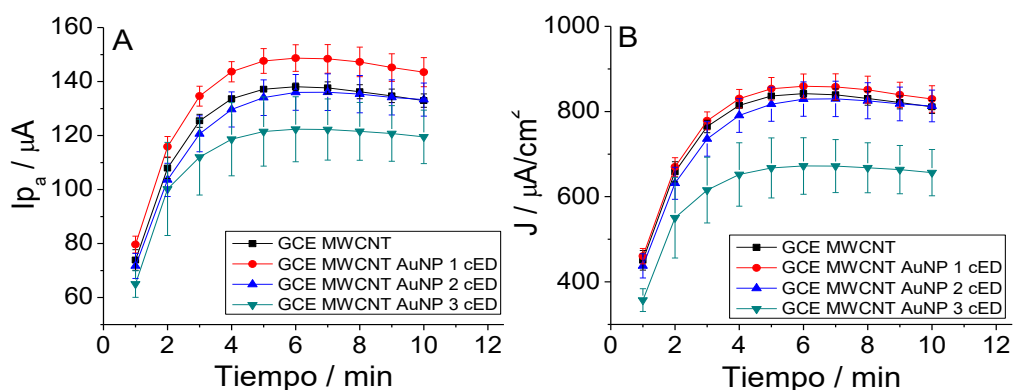


Figura 42. Respuesta en corriente (A) y densidad de corriente (B) anódicas de paracetamol $40 \mu M$ sobre distintas superficies y a diferentes tiempos de acumulado en acetato pH 4,5.

Por otra parte, al hacer la comparación en medio fosfato pH 6,8, se aprecia que no hay diferencia tanto en corriente como en densidad de corriente (**figura 43A y 43B**). Como no se obtuvo el resultado esperado ni en medio acetato ni fosfato, no se procedió a comprobar en medio ácido clorhídrico.

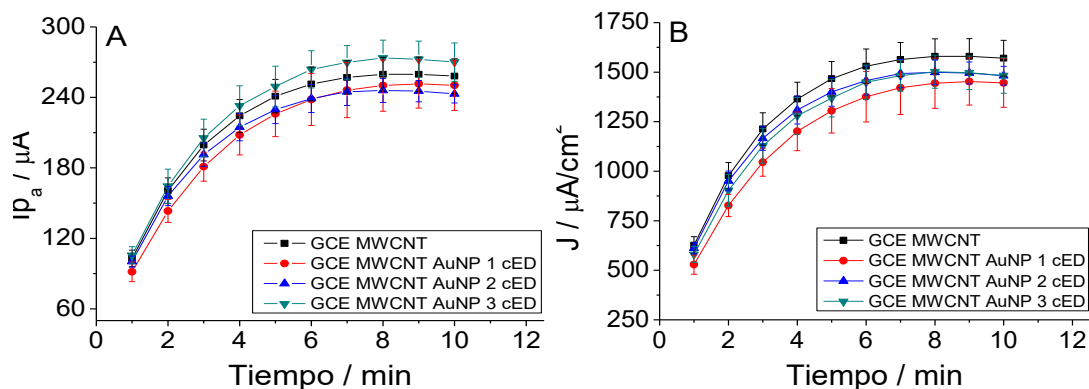


Figura 43. Corriente y densidad de corrientes anódicas de paracetamol $40 \mu\text{M}$ sobre distintas superficies y a diferentes tiempos de acumulado en fosfato pH 6,8.

Electrodeposición en presencia de citrato

Considerando que los resultados obtenidos en la sección anterior no fueron los esperados, se electro depositaron nanopartículas de oro mediante 1 ciclo de electro depósito sobre el electrodo GCE/MWCNT, pero en presencia de citrato, un agente estabilizante de nanopartículas de oro¹⁰⁵, con el objetivo de examinar su influencia. Para esto, se prepararon 2 soluciones de HAuCl_4 tal como está descrito para la metodología *Zhao & Liu*, de las cuales una de ellas cuenta con citrato disuelto. Para la solución con citrato, la relación molar entre citrato/ HAuCl_4 fue de 4/1, ya que con una relación molar menor a 3/1 se obtienen menos AuNPs y de mayor tamaño, debido a que no habría suficiente citrato para estabilizar las nanopartículas¹⁰⁶. Las micrografías en la **figura 44** muestran que la superficie del electrodo tiene una alta densidad de nanopartículas de oro. Además, estas AuNPs tienen un tamaño promedio de 23 nm aproximadamente (**figura 45**). Por otro lado, se destaca que la desviación estándar de la distribución

de tamaño es menor que en las nanopartículas electrodepositadas sin la presencia de citrato, es decir, las nanopartículas tienen un tamaño más uniforme debido al efecto estabilizador del citrato.

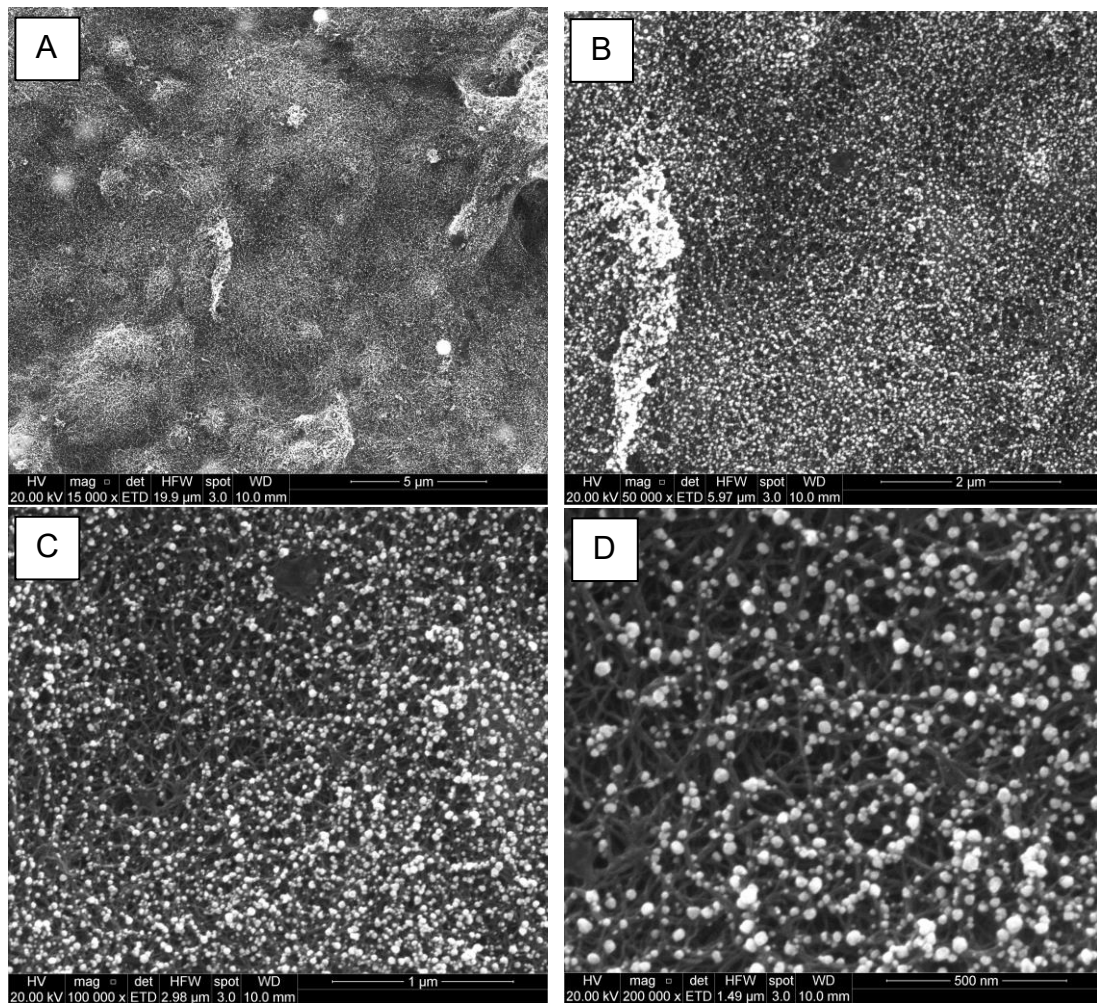


Figura 44. Imágenes SEM de GCE/MWCNT/AuNP 1 cED metodología *Zhao & Liu* en presencia de citrato a diferentes magnificaciones. 15.000× (A), 50.000× (B), 100.000× (C), 200.000× (D).

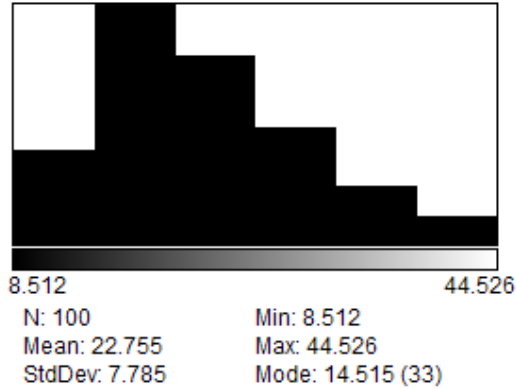


Figura 45. Distribución de tamaño AuNPs mediante electro depósito en presencia de citrato.

Se evaluó la respuesta en intensidad de corriente anódica de paracetamol de ambas superficies con nanopartículas electrodepositadas. Como se observa en la **figura 46**, en los 3 electrolitos de soporte, la respuesta en corriente es menor para los electrodos sometidos a electro depósito en presencia de citrato.

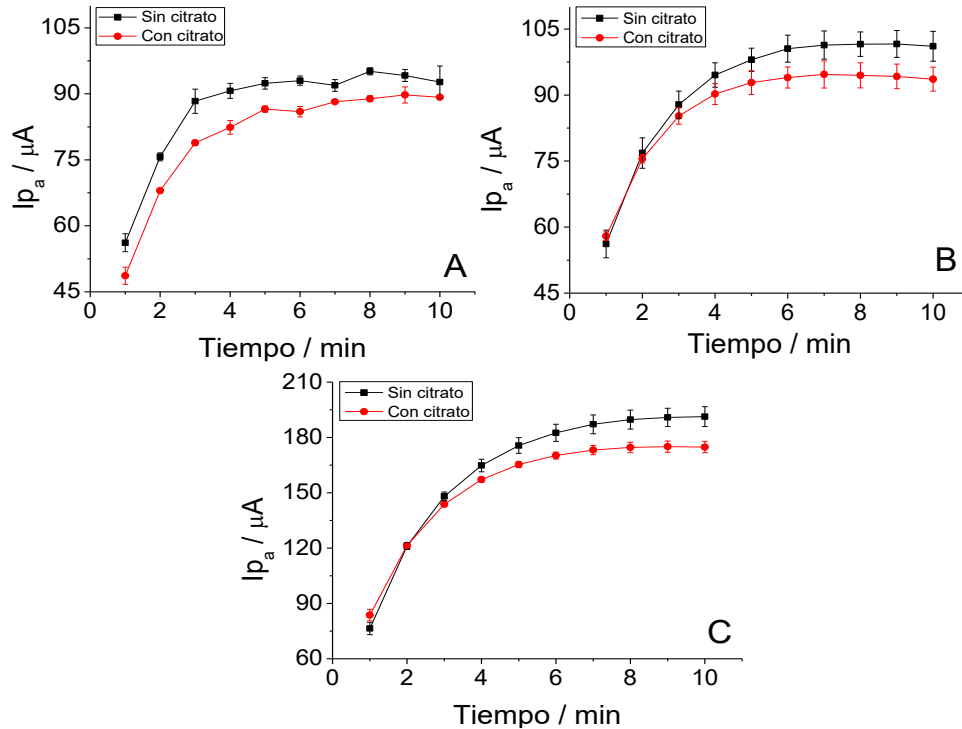


Figura 46. Intensidad de corriente pico anódica de paracetamol 40 μM en medio HCl pH 1,2 (A), acetato pH 4,5 (B) y fosfato pH 6,8 (C) sobre electrodos GCE/MWCNT/AuNP 1cED con y sin citrato.

Modificación con nanopartículas de oro mediante *drop casting*

Para descartar que sea un efecto del electro depósito, se modificó el electrodo GCE/MWCNT con nanopartículas de oro a través de la técnica de depósito por gota o *drop casting* (**figura 47**). Estas nanopartículas fueron sintetizadas mediante el método por reducción con citrato⁴⁹ y tienen un tamaño promedio aproximado de $43 \pm 8,4$ nm de acuerdo con la distribución de tamaño (**figura 47D**). Comparado con el método de electrodeposición, estas imágenes muestran una menor densidad de nanopartículas de oro.

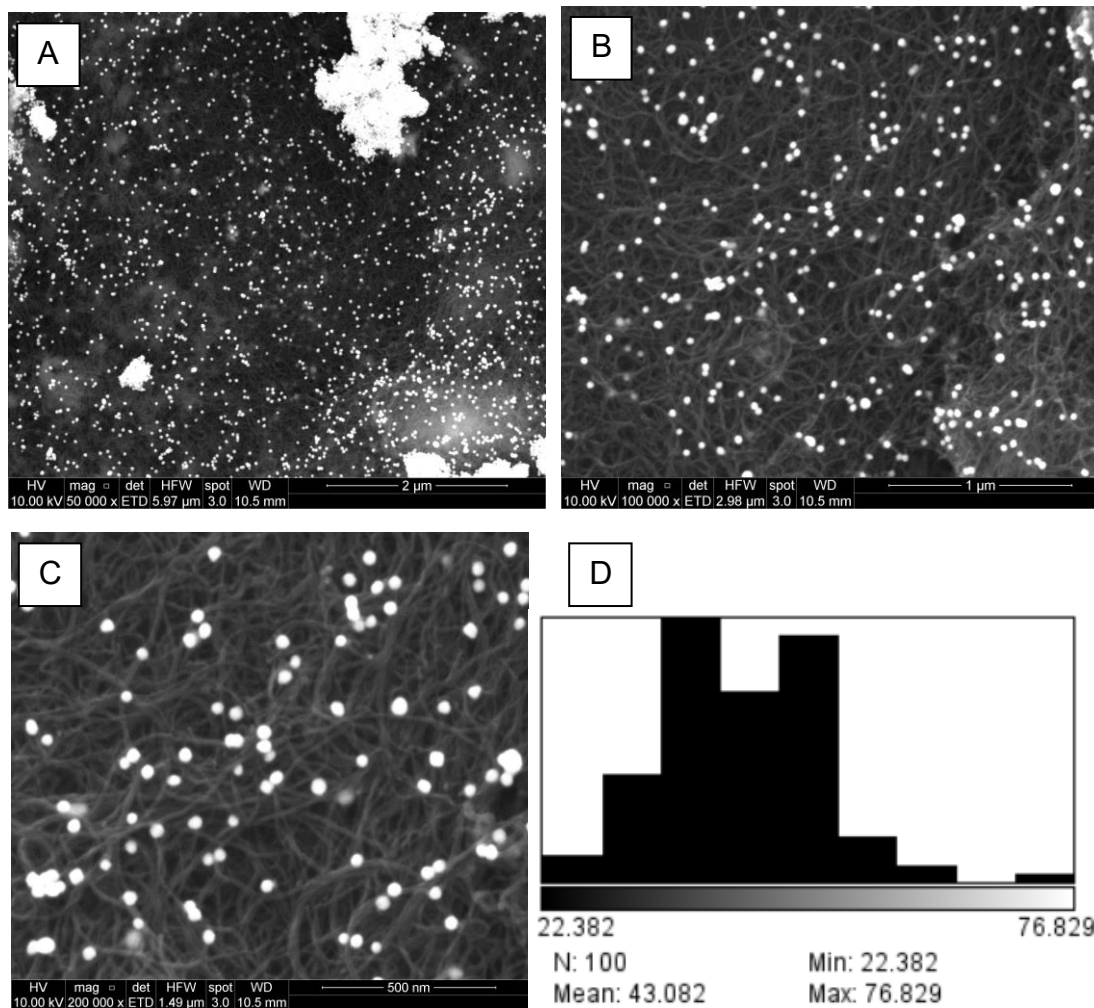


Figura 47. Imágenes SEM de GCE/MWCNT/AuNPs Turkevich a diferentes magnificaciones. 50.000× (A), 100.000× (B), 200.000× (C). Distribución de tamaño (D).

Se prepararon 7 electrodos GCE/MWCNT (**tabla 13**) y se comparó la intensidad de corriente pico de oxidación de paracetamol mediante la técnica VPD. Las condiciones fueron una concentración de paracetamol 40 μM en tampón acetato pH 4,5 con 4 minutos de tiempo de acumulación.

Tabla 13. Electrodoos con variaciones en la modificación.

Electrodo	Observación
E ₁	Sin AuNP
E ₂	AuNP 2 ciclos ED método Zhao
E ₃	2 ciclos ED sin H ₂ AuCl ₄ *
E ₄	5 μ L suspensión AuNP
E ₅	10 μ L suspensión AuNP
E ₆	15 μ L suspensión AuNP
E ₇	20 μ L suspensión AuNP

* Este electrodo se sometió a las mismas condiciones de la electrodeposición del método *Zhao*, pero la solución no contenía H₂AuCl₄.

En la **figura 48** se muestra la comparación de las respuestas de los 7 electrodoos. No se aprecia diferencia en las intensidades de corrientes pico anódicas.

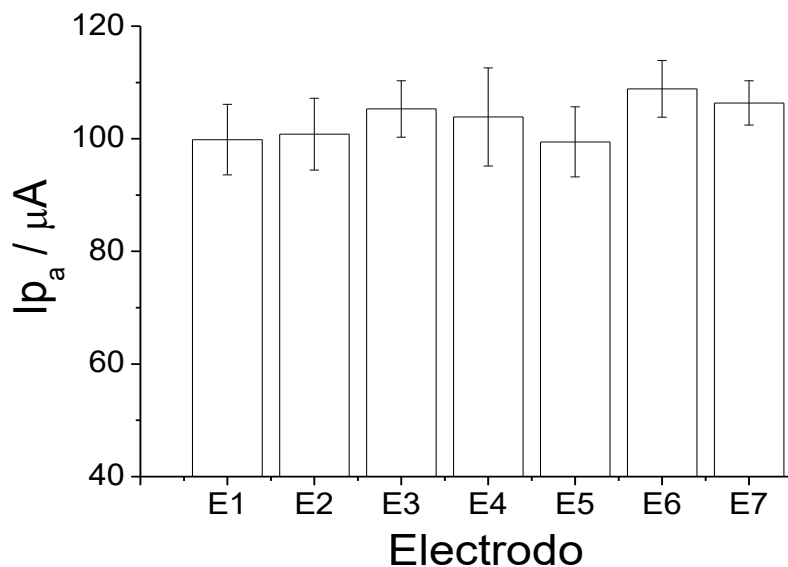


Figura 48. Comparación de corrientes pico anódicas de paracetamol 40 μ M en electrodoos GCE/MWCNT con diferentes modificaciones en acetato pH 4,5. Tiempo de acumulado 4 minutos.

La literatura señala que la afinidad entre los nanotubos de carbono multipared y nanopartículas de oro viene dada principalmente por 3 factores que, en orden de importancia por el impacto que tienen en la afinidad entre los nanomateriales son (i) el diámetro de los nanotubos, (ii) el diámetro de las nanopartículas y (iii) el largo de los nanotubos, en donde las nanoestructuras de carbono más anchas y más largas, por ende más grandes, se polarizan con mayor facilidad y son las que presentan mejor adsorción a las nanopartículas. En dicho trabajo, consideran nanotubos como anchos a los de diámetro de $29,1 \pm 12,5$ nm y como delgados a los de $9,2 \pm 2,1$ nm¹⁰⁷. En este trabajo se utilizaron nanotubos de carbono de 10 nm de ancho de acuerdo con el fabricante.

Rance y Khlobystov¹⁰⁷ señalan que tanto el pH como la fuerza iónica tienen un rol en cuanto a la interacción entre los nanotubos y las nanopartículas. En aquel trabajo, los autores utilizan nanotubos de carbono multipared funcionalizados con carboxilos y nanopartículas de oro obtenidas mediante reducción por citrato ($16,3 \pm 1,5$ nm) y concluyen que, a valores de pH entre 2,9 y 7,6 y fuerza iónica hasta 0,06 M, ambos nanomateriales aparentemente están cargados negativamente y se repelen. Sin embargo, al ir disminuyendo el valor de pH y al ir aumentando la fuerza iónica, la barrera electrostática disminuye y las nanopartículas se depositan sobre los nanotubos. Si bien se intentó comprobar con nanopartículas de oro sintetizadas por el método de reducción con citrato, no se observó un aumento en la respuesta anódica de paracetamol, lo que podría explicarse en términos de una despreciable interacción de tipo van der Waals y/o electrostáticas entre ambos nanomateriales.

Guo y Li^{108,109}, mencionan que para obtener una electrodeposición exitosa de nanopartículas de platino sobre nanotubos de carbono de pared simple, es imperativo contar con sitios funcionalizados, los cuales, actúan como una especie de “puente” entre los nanomateriales. Ellos incorporaron esta funcionalización mediante una oxidación electroquímica de los nanotubos de carbono, evitando así el proceso de oxidación química que a veces resulta ser tedioso.

Como se muestra en la **tabla 14**, sí es posible modificar electrodos con nanotubos de carbono y nanopartículas de oro. Se destaca una variedad en el tamaño de nanopartículas de oro, que a pesar de encontrar tamaños de hasta los 120 nm, los autores evidencian respuestas electroquímicas colaborativas con los nanotubos. Incluso se presentan variados analitos.

No obstante, la evidencia presentada permite concluir que para este sistema las nanopartículas de oro tienen poca o nula contribución en cuanto al aumento en la corriente anódica de paracetamol. Incluso, se observó en algunos casos que la adición de nanopartículas de oro tiene un efecto negativo en cuanto a la oxidación de paracetamol, lo que se traduce en menores intensidades de corriente.

Tabla 14. Trabajos con nanotubos y nanopartículas de oro.

Electrodo	Tipo de nanotubo	Tamaño AuNP (nm)	Síntesis AuNP	Analito	pH	Ref
GCE	MWCNT	<50	ED	Diclofenaco de sodio	4,0	⁸⁰
GCE	fMWCNT – unión covalente con NAC	2 – 5	In situ con NAC	Dopamina y ácido úrico	7,0	¹¹⁰
GCE	fMWCNT	40	ED	Triptófano	7,4	¹¹¹
GCE	MWCNT-NH ₂	12 – 13	Reducción con citrato	Hidroquinona y catecol	2,0	¹¹²
GCP	MWCNT-COOH	20 – 100	ED	Doxorrubicina	7,0	¹¹³
GCE	fMWCNT	60 (30 – 90)	ED	Tinidazol	7,0	¹¹⁴
GCE	fMWCNT	No menciona	ED	Docetaxel	7,0	¹¹⁵
ITO	fMWCNT	No menciona	Reducción con ácido ascórbico	Paracetamol y epinefrina	7,2	¹¹⁶
GCE	fMWCNT	No menciona	Reducción con citrato	BPA	6,0	¹¹⁷
GCE	MWCNT	120	ED	Tirosina, ácido ascórbico y paracetamol	6,0	¹¹⁸

GCP: Glassy Carbon Plate (1,5 cm²). fMWCNT: nanotubo de carbono multipared funcionalizados. NAC: N-acetil cisteína. MWCNT-NH₂: nanotubo de carbono multipared funcionalizado con aminas comercial. MWCNT-COOH: nanotubo de carbono multipared funcionalizado con carboxilos comercial. ED: electrodeposición.

Yang y Xing¹¹⁹ mencionan que los compuestos orgánicos pueden interactuar con los nanotubos de carbono de 5 diferentes formas: interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones covalentes, interacciones electrostáticas e interacciones π - π . Estas últimas explican la interacción de moléculas que poseen dobles enlaces carbono-carbono o moléculas que presentan anillos de benceno con los anillos en la superficie de los nanotubos. Esto es debido a que dichas moléculas orgánicas tienen electrones π capaces

de interactuar con los electrones π de los nanotubos. La molécula de paracetamol es un *para*-amino fenol N-acetilado (**esquema 2, I**). Adicionalmente, Woods *et al*¹²⁰, discuten que esta interacción se ve afectada por la posición relativa de los anillos de benceno de los compuestos orgánicos y de los nanotubos de carbono, donde sugieren que la interacción más fuerte y por ende la más importante ocurre cuando los anillos de benceno de estos compuestos están paralelos a la pared de los nanotubos de carbono. Incluso, Lin y Xing¹²¹ sugieren que compuestos fenólicos sustituidos se adsorben en mayor grado que compuestos fenólicos sin sustituciones. Complementario a esto, Yang *et al*¹²², indican que la adsorción de fenoles y anilinas se ven favorecidas cuando existen sustituciones en el anillo aromático, especialmente en los compuestos con sustituciones en posición *para*, los que presentaron las mayores tasas de adsorción sobre los nanotubos de carbono multipared.

Sousa *et al*¹²³ estudiaron computacional y experimentalmente la interacción entre MWCNT y paracetamol. En el artículo se menciona el desarrollo de un electrodo GCE/MWCNT mediante la técnica del *drop casting* de una suspensión de MWCNT en polietilenimina. Los estudios computacionales permitieron evaluar que la posición del fármaco en los nanotubos es con el anillo *p*-amino fenólico “acostado” sobre la superficie. Pero lo que es más interesante es que las simulaciones demostraron que la adsorción ocurre preferentemente en la cara (superficie) interna de los nanotubos, además de que el polímero mejora esta adsorción.

En base a lo expuesto, se concluye que las nanopartículas de oro estarían impidiendo la aproximación de la molécula de paracetamol a la superficie de los nanotubos de carbono, dificultando su oxidación y evidenciándose en menores valores de corriente.

Si bien la funcionalización de los nanotubos podría mejorar la interacción entre ambos nanomateriales y así aumentar la respuesta electroquímica, no sería en el mejor de los intereses llevarla a cabo. La funcionalización permite aumentar la capacidad de los nanotubos de dispersarse en agua al crear grupos que pueden interaccionar mediante puentes de hidrógeno, por lo que, si estos nanotubos se someten a una agitación constante por 30 minutos en la prueba de disolución, es probable que se empiece a perder el material de la superficie del electrodo de carbono vítreo. Esto sin duda alterará la respuesta electroquímica del material electrodico.

Considerando la sencillez de preparación y buena respuesta, se escogió como electrodo de trabajo al electrodo GCE/MWCNT para su uso en las pruebas de equivalencia terapéutica *in vitro*.

Aplicación del electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono multipared

Acumulación de paracetamol por convección en GCE/MWCNT

Para optimizar las condiciones experimentales, se estudió el tiempo que toma en alcanzar la máxima intensidad de corriente utilizando el electrodo GCE/MWCNT, en cada medio y con agitación a 250 rpm mediante la técnica VC. Se registraron los valores de corrientes anódicas obtenidos de los voltamperogramas a velocidad de barrido de 100 mV/s. La **figura 49** demuestra la relación entre la intensidad de corriente anódica pico y el tiempo.

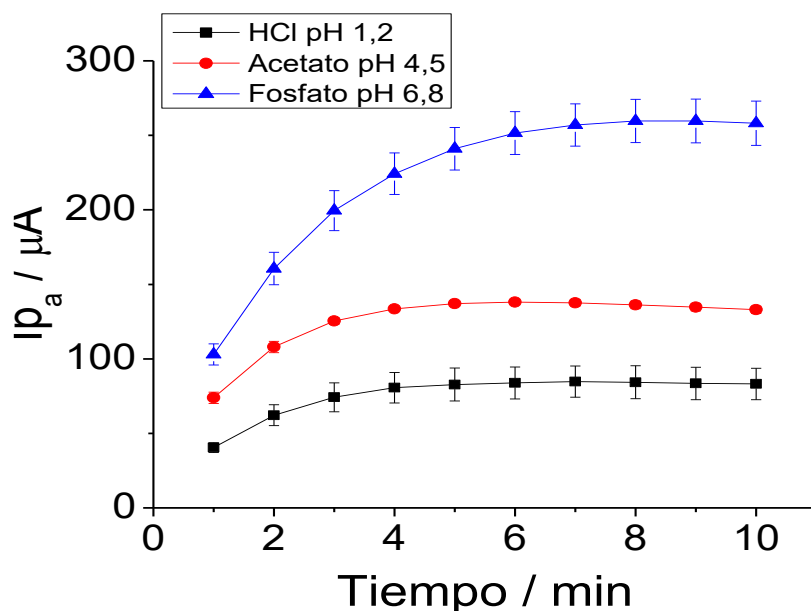


Figura 49. Efecto del tiempo de acumulación en la corriente anódica de paracetamol 40 μM sobre GCE/MWCNT en los 3 medios. Velocidad de barrido 0,1 V/s.

Cumplido el tiempo, los voltamperogramas se registran en ausencia de agitación. El análisis gráfico revela que en medio HCl pH 1,2 el *plateau* se alcanza a los 5 minutos de acumulación, mientras que en medio acetato pH 4,5 a los 4 minutos, siendo fosfato pH 6,8 el medio en que se requiere más tiempo con un total de 7 minutos.

Dependencia de la corriente con la concentración de paracetamol sobre GCE/MWCNT

Con el tiempo de acumulación optimizado y mediante la técnica de voltamperometría de pulso diferencial (VPD) se estudió el rango lineal. En medio ácido clorhídrico pH 1,2 se aprecia un amplio rango lineal (**figura 50A**). En medio buffer acetato pH 4,5 se logra visualizar que hay 2 zonas con pendientes diferentes (**figura 50B**). A concentraciones de 10 μM se evidencia que la respuesta anódica alcanza un máximo. En tampón fosfato pH 6,8 (**figura 50C**), el comportamiento de paracetamol es similar a la respuesta observada en tampón acetato. A concentraciones sobre los 10 μM , la pendiente decrece en sensibilidad. En las **figuras 50D – F** se presentan las curvas de calibrado mientras que en las **figuras 50G – I** se muestran los voltamperogramas de pulso diferencial. En medio HCl pH 1,2 se aprecia un pico a 615 mV junto con un hombro a 655 mV. Para la construcción de la curva se utiliza el pico que aparece a los 615 mV. En medio tampón acetato pH 4,5, el potencial pico de oxidación de

paracetamol es aproximadamente 445 mV. Mientras que en tampón fosfato pH 6,8, el potencial pico de oxidación de paracetamol es aproximadamente 300 mV.

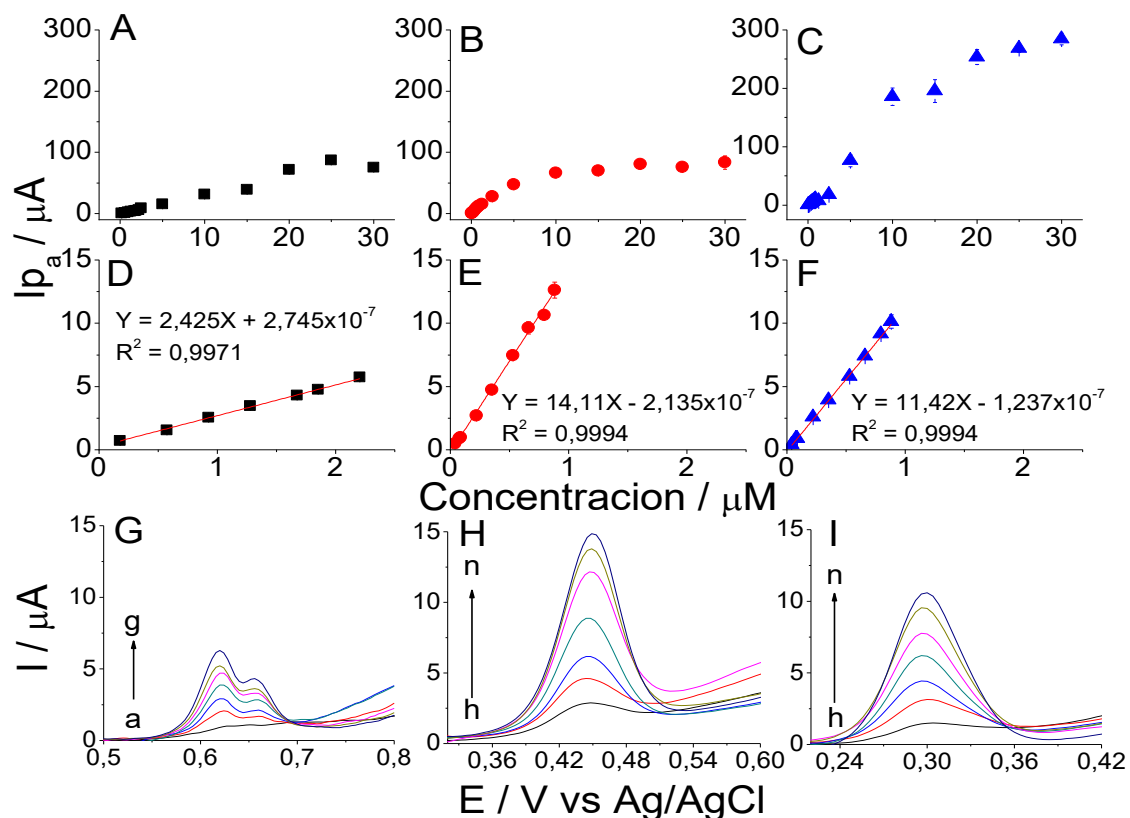


Figura 50. Dependencia de la corriente con la concentración de paracetamol en HCl pH 1,2 (A), tampón acetato pH 4,5 (B) y tampón fosfato pH 6,8 (C). Curvas de calibrado de paracetamol sobre GCE/MWCNT en HCl pH 1,2 (D), tampón acetato pH 4,5 (E) y tampón fosfato pH 6,8 (F). Voltamperogramas de pulso diferencial en HCl pH 1,2 (G). a – g: 0.176; 0.573; 0.926; 1.279; 1.675; 1.852; 2.205 μM . T_{ac} : 5 min, tampón acetato pH 4,5 (H), T_{ac} : 4 min. y tampón fosfato pH 6,8 (I), T_{ac} : 7 min. h – n: 0.0882; 0.2204; 0.3527; 0.5291; 0.6614; 0.7495; 0.8818 μM .

En las **tablas 15, 16 y 17** se muestra el estudio de linealidad en los 3 electrolitos de soporte. La evaluación en los 3 medios cumple la prueba, ya que el factor respuesta es menor al 5 % y el t_{exp} es mayor que el t_{tabla} .

Tabla 15. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante VPD en medio HCl pH 1,2.

% fármaco disuelto	Concentración / μM	I_{p_a} promedio / μA	Factor de respuesta y/x	CV factor respuesta / %	3,19
10	0,176	0,4859	2,755	r	0,9990
30	0,573	1,540	2,687	r^2	0,9980
50	0,926	2,555	2,759	t_{exp}	2,178
70	1,279	3,477	2,719	t_{tabla}	2,571
90	1,675	4,301	2,567	m	2,547
100	1,852	4,764	2,573	n	$1,028 \times 10^{-7}$
120	2,205	5,722	2,596		

Tabla 16. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante VPD en medio acetato pH 4,5.

% fármaco disuelto	Concentración / μM	I_{p_a} promedio / μA	Factor de respuesta y/x	CV factor respuesta / %	3,65
10	0,0882	1,264	14,33	r	0,9992
30	0,2204	2,905	13,18	r^2	0,9985
50	0,3527	4,742	13,44	t_{exp}	2,939
70	0,5291	7,446	14,07	t_{tabla}	2,547
90	0,6614	9,643	14,58	m	14,54
100	0,7495	10,64	14,20	n	$-1,974 \times 10^{-7}$
120	0,8818	12,61	14,30		

Tabla 17. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante VPD en medio fosfato pH 6,8.

% fármaco disuelto	Concentración / μM	I_{p_a} promedio / μA	Factor de respuesta y/x	CV factor respuesta / %	4,98
10	0,0882	0,8854	10,01	r	0,9992
30	0,2204	2,583	11,72	r^2	0,9985
50	0,3527	3,933	11,15	t_{exp}	2,920
70	0,5291	5,792	10,95	t_{tabla}	2,547
90	0,6614	7,407	11,20	m	11,54
100	0,7936	9,137	11,51	n	$-1,199 \times 10^{-7}$
120	0,8818	10,13	11,49		

Por otra parte, la evaluación de la recuperación para los 3 medios en estudio se muestra en la **tabla 18**. Tanto con una solución estándar como con comprimidos de paracetamol.

Tabla 18. Evaluación de la recuperación mediante VPD.

Medio	Solución estándar		Comprimidos	
	Señal / μA	Recuperación / %	Señal / μA	Recuperación / %
HCl pH 1,2	3,202 \pm 0,0264	96,29	3,379 \pm 0,0483	103,2
Acetato pH 4,5	7,344 \pm 0,0976	101,7	7,469 \pm 0,216	104,5
Fosfato pH 6,8	5,849 \pm 0,0699	99,34	5,742 \pm 0,0598	98,59

Esta se encuentra entre un 95 y 105 % tanto para una solución estándar como para una solución de comprimidos de paracetamol, por lo tanto, se cumplen los criterios establecidos por la norma chilena. Mientras que en la **tabla 19** se resume la evaluación de la precisión a través del coeficiente de variación de 6 medidas en los 3 medios.

Tabla 19. Evaluación de la precisión mediante VPD.

Lectura	HCl pH 1,2 / I_{p_a} / μA	Acetato pH 4,5 / I_{p_a} / μA	Fosfato pH 6,8 / I_{p_a} / μA
1	4,768	10,83	9,236
2	4,901	10,89	9,053
3	4,702	10,64	9,188
4	4,774	10,34	9,028
5	4,632	10,62	9,203
6	4,821	10,45	9,331
Promedio	4,772	10,62	9,173
CV / %	1,95	1,99	1,25

El coeficiente de variación es menor al 2 % en los 3 medios estudiados, por lo tanto, cumple los criterios establecidos por la norma chilena.

De acuerdo con estos resultados, la metodología por VPD utilizando el electrodo GCE/MWCNT cumple los criterios de linealidad, exactitud y precisión en los 3 electrolitos de soporte estudiados.

Construcción de curvas de calibrado por amperometría

En la **figura 36** se muestran los amperogramas de paracetamol en los 3 electrolitos de soporte. En los insertos se aprecian las curvas de calibrado.

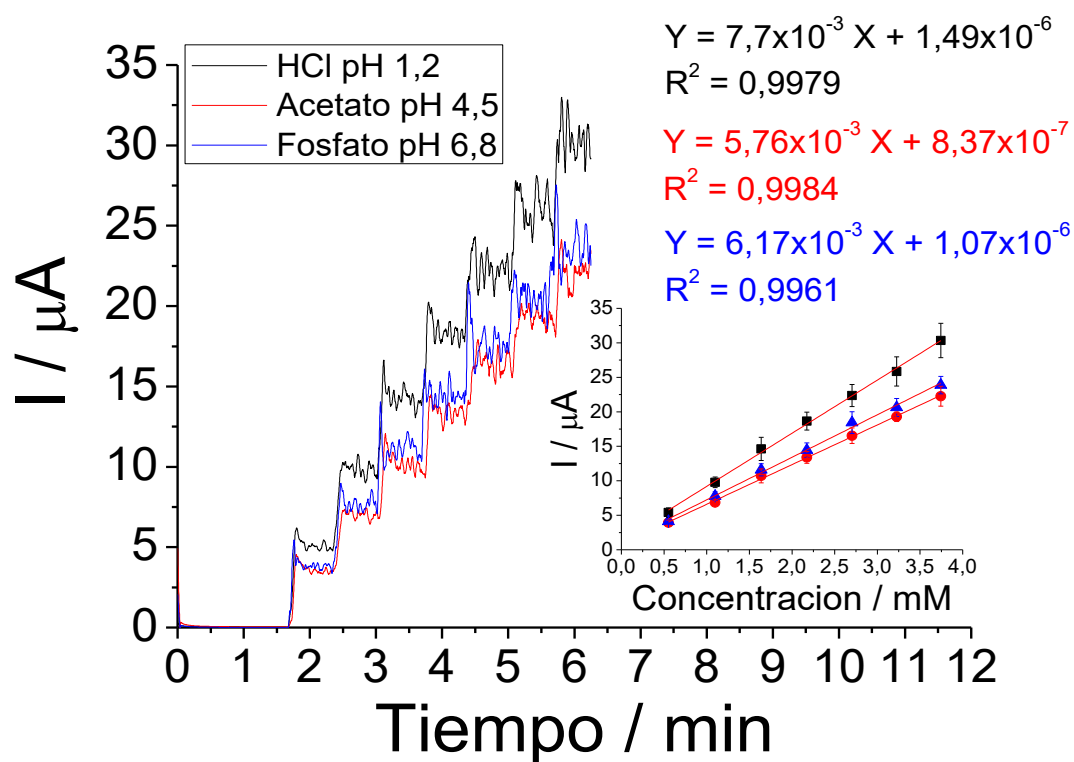


Figura 51. Respuesta amperométrica de GCE/MWCNT a adiciones sucesivas de alícuotas de 5 mL de paracetamol 0,1 M cada 40 s en HCl pH 1.2, tampón acetato pH 4,5 y tampón fosfato pH 6,8. En el inserto se aprecian las curvas de calibrado. Estabilización de corriente por 100 s. Volumen de la celda 900 mL. $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$. $E_{\text{pH } 1,2} = 800\text{ mV}$. $E_{\text{pH } 4,5} = 600\text{ mV}$. $E_{\text{pH } 6,8} = 450\text{ mV}$.

En las **tablas 20, 21 y 22** se resume la evaluación de la linealidad en los 3 medios.

Tabla 20. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante amperometría en medio HCl pH 1,2.

Concentración / mM	I promedio / μA	Factor de respuesta y/x	CV factor respuesta / %	7,10
0,553	5,401	0,00978	r	0,9990
1,10	9,787	0,00891	r ²	0,9979
1,64	14,63	0,00892	t _{exp}	48,74
2,17	18,66	0,00858	t _{tabla}	2,571
2,70	22,36	0,00827	m	7,7×10 ⁻³
3,23	25,85	0,00801	n	1,49×10 ⁻⁶
3,74	30,34	0,00811		

Tabla 21. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante amperometría en medio acetato pH 4,5.

Concentración / mM	I promedio / μA	Factor de respuesta y/x	CV factor respuesta / %	6,58
0,553	3,939	0,00713	r	0,9992
1,10	6,848	0,00623	r ²	0,9984
1,64	10,72	0,00654	t _{exp}	55,86
2,17	13,38	0,00616	t _{tabla}	2,571
2,70	16,54	0,00612	m	5,76×10 ⁻³
3,23	19,29	0,00598	n	8,37×10 ⁻⁷
3,74	22,27	0,00595		

Tabla 22. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante amperometría en medio fosfato pH 6,8.

Concentración / mM	I promedio / μA	Factor de respuesta y/x	CV factor respuesta / %	5,79
0,553	4,122	0,00746	r	0,9981
1,10	7,772	0,00707	r ²	0,9961
1,64	11,59	0,00707	t _{exp}	35,74
2,17	14,45	0,00665	t _{tabla}	2,571
2,70	18,43	0,00682	m	6,17×10 ⁻³
3,23	20,63	0,0064	n	1,07×10 ⁻⁶
3,74	23,87	0,00638		

De acuerdo con los análisis de linealidad en los 3 medios estudiados, el factor de respuesta es mayor al 5 % por lo que no cumple con el parámetro de linealidad. Sin embargo, son menores al 7,5 %.

En la **tabla 23** se presenta un resumen de algunos trabajos en diferentes superficies con sus respectivos límites de detección en el cual se estudia paracetamol como analito. Además, se comparan con esta tesis.

Tabla 23. Valores de límites de detección y cuantificación de varios autores.

Electrodo	Técnica	pH	LOD (nM)	LOQ (nM)	Sensibilidad ($\mu\text{A/M}$)	Rango lineal (μM)	Ref.
GCE	VPD	4,5	370	1.230	$2,2 \times 10^4$	4,0 – 100	92
GCE/ZnO NPs	VPD	7,0	3,6	12,1	$2,49 \times 10^4$	0,4 – 24	93
GCE/MWCNT-GNS	VPD	7,5	100	N.R.	$1,43 \times 10^4$	0,8 – 110	94
GCE/AuNP/SDS-LDH	VPD	7,0	130	N.R.	$2,0 \times 10^4$	0,5 – 400	95
GCE/MWCNT	VPD	7,0	330	N.R.	$1,65 \times 10^5$	0,79 – 340	97
GCE/MWCNT-Polyhistidine	VPD	7,4	32	97	$6,3 \times 10^5$	0,25 – 10	101
GCE/fMWCNT/Co(II)-phthalocyanine	VOC	5,0	140	450	$5,4 \times 10^5$	1,5 – 48	124
GCE/MWCNT- β CD	VPD	7,4	12	N.R.	$2,6 \times 10^6$	0,05 – 1	125
CPE/SWCNT-Nd _{ox}	VOC	3,2	50	N.R.	N.R.	0,1 – 9,5	126
GCE/MnO ₂ /MWCNT-NH ₂	VPD	7,0	1	N.R.	$1,4 \times 10^6$	0,001 – 20	127
GCE/RGO- β CD	AMP	7,0	2.300	N.R.	$2,78 \times 10^4$	10 – 800	128
GCE/AG/PE-DOT	AMP	7,0	41	N.R.	$5,11 \times 10^4$	0,15 – 5.881	129
CPE/PtMWCNT/TX100	AMP	7,0	18	N.R.	$2,02 \times 10^5$	0,09 – 10	130
GCE/MWCNT	VPD	1,2	48	160	$2,4 \times 10^6$	0,18 – 2,2	Esta tesis
		4,5	15	51	$1,4 \times 10^7$	0,088 – 0,88	
		6,8	4,6	15	$1,1 \times 10^7$	0,088 – 0,88	
	AMP	1,2	135.507	447.173	$7,7 \times 10^3$	552 – 3.740	
		4,5	117.785	388.690	$5,76 \times 10^3$		
		6,8	183.597	550.791	$6,17 \times 10^3$		

AG: Au@Grafeno. β CD: beta-ciclodextrina. CPE: Electrodo de pasta de carbono. fMWCNT: Nanotubos de carbono multipared funcionalizados. MWCNT-NH₂: Nanotubos de carbono multipared funcionalizados con grupos amina. Nd_{ox}: óxidos de neodimio. N.R.: No reportado. PEDOT: poli(3,4-etilendioxitiofeno). PtMWCNT: Nanotubos de carbono multipared decorados con platino RGO: óxido de grafeno reducido. SDS-LDH: Dodecil sulfato de sodio -Hidróxido doble en capas. TX100: Triton™ X-100.

Para la metodología por VPD, el sensor demostró una elevada sensibilidad en comparación a otros métodos reportados. Por otra parte, para el método amperométrico, las figuras de mérito muestran menor sensibilidad y mayores LOD y LOQ. Esto último es de esperar considerando que el registro de la señal amperométrica ocurre en tiempo real desde el aparato disolutor y, por lo tanto, no existen diluciones de por medio.

Análisis de interferentes

Este estudio se llevó a cabo mediante la técnica de voltamperometría de pulso diferencial y la técnica amperométrica. A través de la VPD, se compara la respuesta de 2 soluciones de paracetamol de diferente concentración (4 y 40 μM) en presencia y ausencia de excipientes. Como se observa en la **figura 52**, en los 3 medios y a 2 niveles de concentración la respuesta anódica de paracetamol es la misma.

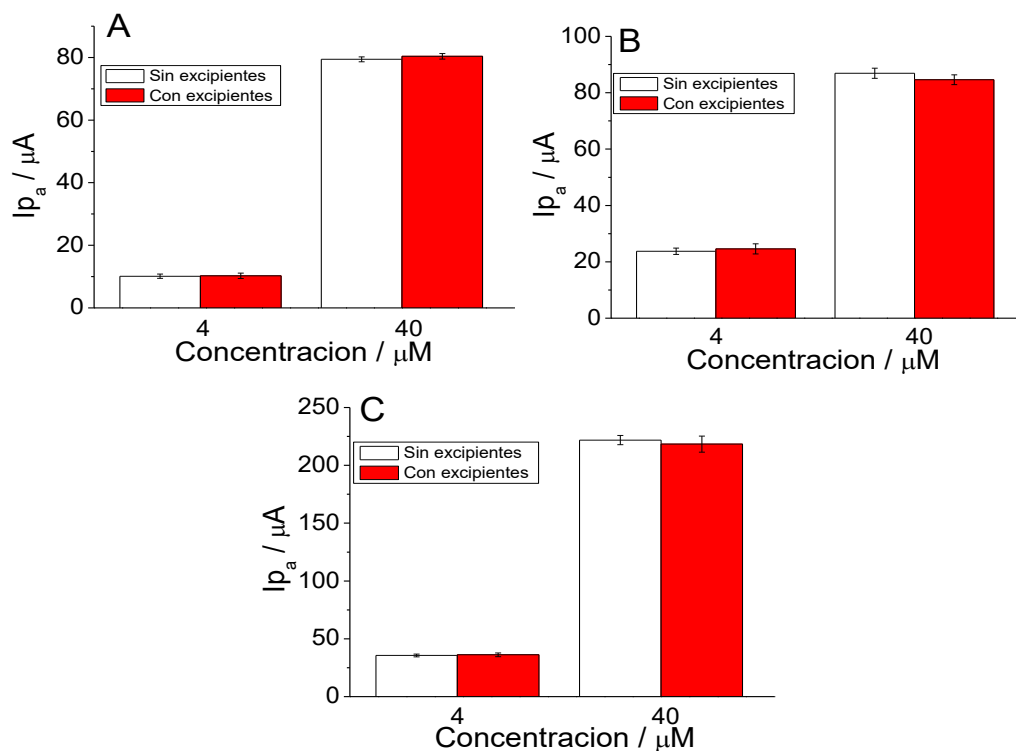


Figura 52. Intensidad de corriente pico mediante VPD a diferentes concentraciones de paracetamol en presencia y ausencia de excipientes en medio HCl pH 1,2 con 5 min t_{acum} (A), acetato pH 4,5 con 4 min t_{acum} (B) y fosfato pH 6,8 con 7 min t_{acum} (C).

Se utilizaron cantidades de excipientes que superan ampliamente lo encontrado en un comprimido. La masa promedio ($n = 20$) de un comprimido de paracetamol LCh es aproximadamente 560 mg. La dosis de paracetamol es 500 mg, lo que significa que 60 mg corresponden a excipientes. Dicho de otra forma, hay 8 veces más paracetamol que excipiente.

Como ejemplo, se utilizó una alícuota de 10 μL de una suspensión de estearato de magnesio de 10 mg/mL en una celda electroquímica de 10 mL, lo que da una “concentración” final de 10 ppm en la celda. Esto representa una cantidad de estearato de magnesio de más de 13 veces lo requerido para

mantener una proporción 8 a 1 de paracetamol/excipiente manteniendo una concentración fija de paracetamol de 40 μ M en la celda electroquímica. En la **tabla 24** se enumeran los excipientes estudiados junto con su concentración en la celda. Además, se menciona su categoría funcional¹³¹.

Tabla 24. Excipientes estudiados.

#	Excipiente	Categoría funcional	Concentración en celda electroquímica / ppm
1	Talco	Lubricante/Diluyente	100
2	Lactosa	Diluyente	100
3	Celulosa microcristalina	Aglutinante/Diluyente	100
4	Polivinilpirrolidona (PVP)	Desintegrante/Aglutinante	50
5	Fosfato tricálcico	Agente	100
6	Almidón de maíz	Diluyente/Desintegrante	100
7	Estearato de magnesio	Lubricante	10

Los comprimidos del Laboratorio Chile contienen en su formulación Almidón, PVP y ácido esteárico. Mientras que los del laboratorio Mintlab contienen lauril sulfato de sodio, PVP, almidón glicolato de sodio, estearato de magnesio, almidón de maíz y celulosa microcristalina.

Por otra parte, con la técnica amperométrica se estudió si los excipientes producen alguna señal medible comparada a la señal del paracetamol. Como se aprecia en la **figura 38**, ninguno de los 7 excipientes estudiados produce una señal (flechas negras) en comparación al fármaco (flechas rojas).

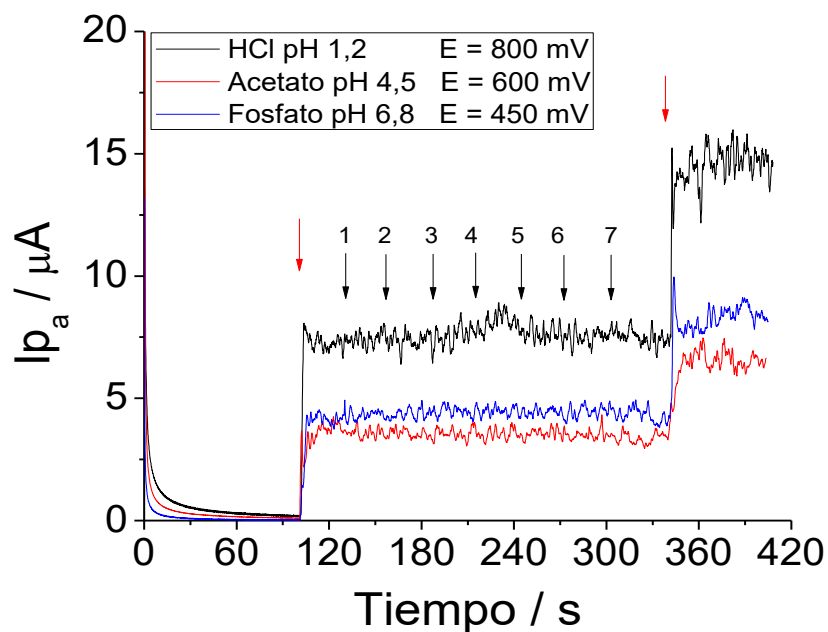


Figura 53. Análisis amperométrico de interferentes. Vol. Alícuota 10 μL paracetamol 0,1 M (flechas rojas). Vol alícuota 10 μL excipientes (flechas negras). 1 Talco; 2 Lactosa; 3 Celulosa microcristalina; 4 PVP; 5 Fosfato tricálcico; 6 Almidón; 7 Estearato de magnesio. Volumen celda 10 mL. Estabilización de corriente por 100 s. Vel. Agitación 500 rpm.

Así como otros autores han reportado estudios con variados excipientes en los cuales se incluyen la celulosa, almidón, talco, dióxido de titanio, lauril sulfato de sodio, lactosa, entre otros; estos no interfieren con la señal electroquímica de diferentes principios activos, tales como pitavastatina, atorvastatina, teofilina, pramipexol y amlodipino, utilizando diferentes electrodos de trabajo basados en materiales carbonáceos^{132–136}. De forma análoga, en estudios electroquímicos con paracetamol como analito, tampoco se observó interferencia de los excipientes en la señal electroquímica^{137–139}.

De acuerdo con esta experiencia, se concluye que los excipientes no pasivan la superficie y tampoco producen una señal medible, por lo que no afectan la señal electroquímica de paracetamol.

Efecto de la temperatura y agitación sobre los electrodos GCE/MWCNT (prueba de estrés de electrodos)

Debido a que los electrodos GCE/MWCNT estarán sumergidos en el aparato disolutor, con agitación constante a 75 rpm por 30 minutos y a una temperatura de 37 °C (condiciones de prueba), se realizó una prueba sumergiendo 3 electrodos en cada medio y se sometieron a una agitación de 100 rpm por 45 minutos y a una temperatura de 40 °C, es decir, en condiciones más exigentes (condiciones de estrés). Se comparó la respuesta ciclo voltamperométrica de ferricianuro antes y después de la prueba en los 3 medios.

En la **tabla 25** se resume la variación de la corriente anódica y catódica pico antes y después de la prueba.

Tabla 25. Resultados prueba de estrés de electrodos.

Medio	Parámetro	Condiciones de estrés	Condiciones de prueba
		Variación / %	Variación / %
HCl pH 1,2	$I_{p_c} / \mu A$	-1.85	+0.3
	$I_{p_a} / \mu A$	-6.99	+5.2
Acetato pH 4,5	$I_{p_c} / \mu A$	-3.46	-5.4
	$I_{p_a} / \mu A$	-9.42	+4.39
Fosfato pH 6,8	$I_{p_c} / \mu A$	+1.53	+1.26
	$I_{p_a} / \mu A$	+7.59	+1.23

Como se observa, existen variaciones que en el caso del medio acetato es cercana al 10 % en condiciones de estrés. No obstante, al realizar la evaluación en condiciones de prueba, las variaciones son más cercanas al 5 %.

Efecto del uso de extensiones de cables

El potencióstato se comunica con la celda electroquímica mediante un conductor electrónico o cable. Un cable tiene asociada una resistencia que viene dada por el largo (l), la sección o área transversal (S) y la resistividad del material (ρ), de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$R = \rho \frac{l}{S}$$

Esto se traduce en que a mayor largo mayor resistencia. Debido a que se utilizaron extensiones de 50 cm para conectar al potencióstato con los electrodos de trabajo, referencia y contraelectrodo, se estudió el efecto en la corriente anódica y catódica de la sonda ferricianuro mediante voltamperometría cíclica. En la **tabla 26** se resumen los resultados.

Tabla 26. Resultados prueba con extensión de cables.

Parámetro	Sin extensión / μA	Con extensión / μA	Variación / %
i_{p_c}	$-30,2 \pm 0,9$	$-31,3 \pm 0,8$	+ 3,64
i_{p_a}	$23,5 \pm 0,8$	$24,1 \pm 0,9$	+ 2,55

Existe una variación positiva ante la presencia de cables debido a que se añade un elemento de resistencia. Sin embargo, los electrodos serán sometidos a las mismas condiciones.

Saturación del electrodo

Como se observa en la **figura 54**, aproximadamente a los 15 minutos la corriente se estabiliza, lo cual puede atribuirse a la saturación del electrodo y no a que el principio activo se encuentre disuelto en su mayoría. Para descartar esto, se estudió cualitativamente la respuesta de alícuotas de solución estándar a los 30 minutos de ser sometida a la liberación/disolución de comprimidos de paracetamol.

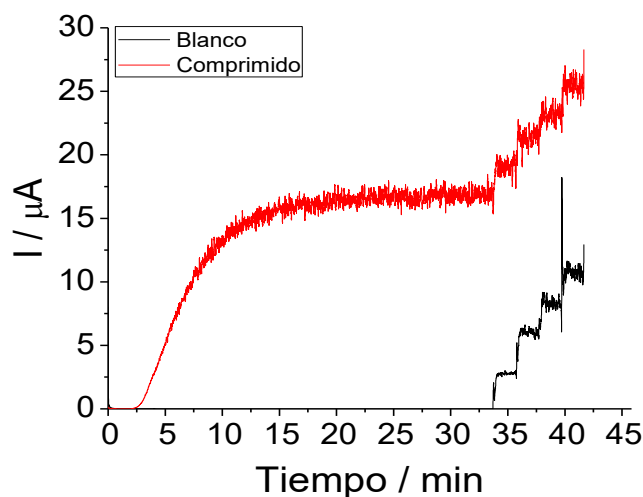


Figura 54. Liberación/disolución de comprimido de paracetamol (rojo) vs blanco acetato pH 4,5 (negro). Alícuotas de 5 mL de paracetamol 0,1 M a los 32, 34, 36 y 38 min. Vol. Celda 900 mL. Agitación a 75 rpm. 100 s de estabilización de corriente. E_{pH} 4,5: 600 mV.

Se distingue que hay un aumento en la corriente anódica de paracetamol al añadir alícuotas de estándar, por lo que la estabilización en la corriente no corresponde a una saturación de la superficie.

Análisis de muestras

En la **figura 55** se comparan los perfiles de disolución de los comprimidos de ambos laboratorios, cuantificados por VPD (**figuras 55A – C**) y amperometría (**figuras 55D – F**). Las curvas están graficadas sin barras de error, ya que el coeficiente de variación es menor al 10 % en todos los puntos, lo cual es aceptado por la normativa chilena y por las guías de bioequivalencia^{13,82}. Se observa que el principio activo se encuentra disuelto en un 85 % a los 15 minutos para ambas formulaciones en estudio, esto significa que presentan características de muy rápida liberación/disolución. De acuerdo con esto, los perfiles se consideran similares y no es necesario utilizar el factor de similitud f_2 para comparar las curvas.

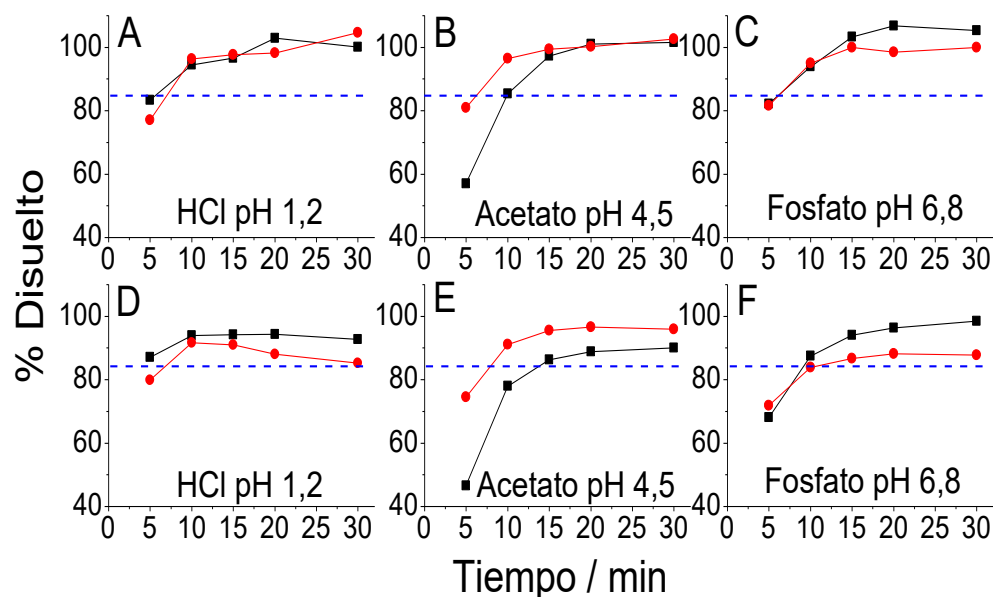


Figura 55. Comparación de perfiles de disolución entre paracetamol LCh (cuadrados negros) y Geniol® (círculos rojos) cuantificados por VPD (A, B y C) y por amperometría (D, E y F) en los 3 medios. Línea punteada marca los 85 % disueltos.

La cuantificación por el método amperométrico alcanza niveles de recuperación menores que los observados por el método VPD. Esto puede ser atribuido a la no linealidad de las curvas de calibrado o al hecho de que no se optimizó la construcción de la curva de calibrado. En las **tablas 27 y 28** se resumen los porcentajes disueltos calculados mediante los métodos VPD y amperometría, respectivamente.

Tabla 27. Resultados ensayo disolución comprimidos paracetamol LCh y Geniol® cuantificados por VPD.

Medio Tiempo / min	% Disuelto					
	HCl pH 1,2		Acetato pH 4,5		Fosfato pH 6,8	
	LCh	Geniol®	LCh	Geniol®	LCh	Geniol®
5	83,37	77,08	57,03	80,99	82,21	81,67
10	94,49	96,40	85,42	96,43	93,97	95,02
15	96,66	97,68	97,31	99,40	103,3	99,90
20	102,9	98,16	101,0	100,2	106,8	98,51
30	100,1	104,6	101,5	102,7	105,4	99,90

Tabla 28. Resultados ensayo disolución comprimidos paracetamol LCh y Geniol® cuantificados por amperometría.

Medio Tiempo / min	% Disuelto					
	HCl pH 1,2		Acetato pH 4,5		Fosfato pH 6,8	
	LCh	Geniol®	LCh	Geniol®	LCh	Geniol®
5	87,15	79,93	46,58	74,57	68,16	71,81
10	93,97	91,63	78,03	91,09	87,58	83,95
15	94,20	90,96	86,28	95,50	94,11	86,74
20	94,35	88,17	88,87	96,56	96,30	88,15
30	92,74	85,23	90,06	95,97	98,49	87,84

Si bien la señal electroquímica obtenida corresponde a la oxidación de paracetamol cuando éste alcanza la superficie del electrodo, el procesamiento de las señales es diferente en ambas técnicas. En el método por VPD se aplican pulsos de potencial combinado con una rampa lineal de potencial y la corriente se registra antes (I_1) y al final del pulso (I_2). La diferencia entre I_2 e I_1 es lo que se registra (vs el potencial) para la construcción del voltamperograma. Esta operación permite una corrección efectiva de la corriente asociada a la carga capacitiva²⁶ y permite obtener menores límites de detección y cuantificación.

En la **tabla 29** se muestran las intensidades de corriente pico anódicas, junto con el coeficiente de variación de las muestras de paracetamol Laboratorio Chile obtenidas desde el equipo disolutor. Corresponden al promedio de 12 comprimidos.

Tabla 29. Promedio I_{pa} comprimidos paracetamol LCh cuantificadas por VPD.

Tiempo / min	Medio					
	HCl pH 1,2		Acetato pH 4,5		Fosfato pH 6,8	
	I_{pa} promedio / μA	CV / %	I_{pa} promedio / μA	CV / %	I_{pa} promedio / μA	CV / %
5	3,25	5,89	5,89	8,78	6,78	5,60
10	3,64	5,13	8,84	7,34	7,76	8,43
15	3,72	6,00	10,1	6,56	8,55	4,14
20	3,94	2,11	10,4	5,53	8,84	9,28
30	3,84	3,69	10,5	3,39	8,72	2,39

De forma análoga, en la **tabla 30** se muestran los promedios de las muestras para los comprimidos de Geniol®.

Tabla 30. Promedio I_{p_a} comprimidos Geniol® cuantificadas por VPD.

Tiempo / min	Medio					
	HCl pH 1,2		Acetato pH 4,5		Fosfato pH 6,8	
	I_{p_a} promedio / μA	CV / %	I_{p_a} promedio / μA	CV / %	I_{p_a} promedio / μA	CV / %
5	3,02	9,33	8,38	4,30	6,73	3,11
10	3,71	4,96	9,98	5,42	7,85	5,31
15	3,76	5,13	10,3	2,96	8,26	5,81
20	3,77	3,95	10,1	8,17	8,15	6,23
30	4,09	2,94	10,6	6,03	8,26	5,07

En la **tabla 31** se muestran los promedios de las corrientes obtenidas de los amperogramas de liberación/disolución de los comprimidos de paracetamol LCh.

Tabla 31. Promedio Intensidad de corriente comprimidos paracetamol LCh cuantificadas por amperometría.

Tiempo / min	Medio					
	HCl pH 1,2		Acetato pH 4,5		Fosfato pH 6,8	
	I promedio / μA	CV / %	I promedio / μA	CV / %	I promedio / μA	CV / %
5	26,15	8,19	10,70	9,63	16,54	8,54
10	28,08	8,68	17,35	9,25	20,95	9,84
15	28,15	9,60	19,10	9,29	22,43	9,80
20	28,19	9,96	19,65	9,47	22,92	9,64
30	27,73	11,1	19,90	10,0	23,42	10,5

De forma similar, en la **tabla 32** se muestran los promedios de las corrientes obtenidas de los amperogramas de liberación/disolución de los comprimidos de Geniol®.

Tabla 32. Promedio Intensidad de corriente comprimidos Geniol® cuantificadas por amperometría.

Tiempo / min	Medio					
	HCl pH 1,2		Acetato pH 4,5		Fosfato pH 6,8	
	I promedio / μA	CV / %	I promedio / μA	CV / %	I promedio / μA	CV / %
5	24,11	7,76	16,62	9,81	17,37	9,85
10	27,42	9,89	20,12	9,97	20,12	9,03
15	27,23	9,56	21,05	9,37	20,76	8,70
20	26,42	9,43	21,28	9,20	21,08	8,62
30	25,61	10,1	21,15	8,77	21,01	9,07

En la **figura 56** se muestran los perfiles de liberación/disolución medidos directamente en el vaso del equipo disolutor.

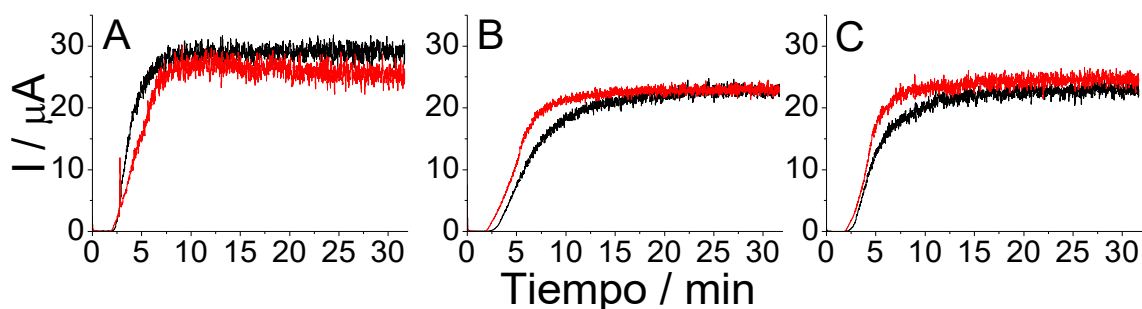


Figura 56. Comparación entre la respuesta amperométrica de paracetamol LCh (línea negra) y Geniol® (línea roja) in HCl pH 1,2 (A), tampón acetato pH 4,5 (B) tampón fosfato pH 6,8 (C) por amperometría directa. Estabilización de la corriente por 100 s. Volumen de la celda 900 mL. $E_{\text{pH } 1,2} = 800 \text{ mV}$. $E_{\text{pH } 4,5} = 600 \text{ mV}$. $E_{\text{pH } 6,8} = 450 \text{ mV}$. $T^\circ = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se observa que la corriente alcanza un “techo” o *plateau* aproximadamente a los 10 minutos en ambas formulaciones y en los 3 medios, indicando que la mayoría (85 %) del principio activo se encuentra disuelto. Además de ser similares entre sí, los perfiles son los esperados para formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata¹⁴⁰. En la **tabla 33** se

enumeran las áreas bajo la curva promedio de los perfiles de liberación/disolución.

Tabla 33. Comparación áreas bajo la curva de perfiles de liberación/disolución de comprimidos estudiados.

	Medio					
	HCl pH 1,2		Acetato pH 4,5		Fosfato pH 6,8	
	AUC	CV / %	AUC	CV / %	AUC	CV / %
Paracetamol / LCh	0,0467	9,49	0,0291	9,75	0,0358	9,86
Geniol® / Mintlab	0,0428	9,50	0,0334	9,61	0,0334	9,21
Relación AUC/AUC	1,091	-	0,8713	-	1,072	-

La relación entre las áreas bajo la curva promedio son cercanas a la unidad en dos de los 3 medios estudiados y superior a 0,85 en uno de los medios. Se podría pensar que un coeficiente de variación cercano al 10 % inhabilitaría las medidas, sin embargo, como se mencionó se acepta una variación del 20 % en los puntos más tempranos de la curva y una variación del 10 % en los puntos más tardíos^{13,82}. Esta comparación podría emplearse como una forma de evaluar la equivalencia terapéutica *in vitro*, y en este caso indicaría que los perfiles de disolución son similares. Adicionalmente, luego de un análisis de costos, este método demostró ser más eficiente en términos de los recursos utilizados (ANEXO 2).

CONCLUSIONES

- De acuerdo con las estrategias propuestas, fue posible construir un electrodo de carbono vítreo modificado con ambos nanomateriales, sin embargo, para este sistema no se observó un efecto colaborativo entre ambos.
- Se logró desarrollar una metodología electro analítica sensible y selectiva, en base a electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono, para la cuantificación de paracetamol desde muestras obtenidas del aparato disolutor.
- Fue posible establecer equivalencia terapéutica *in vitro* mediante la metodología electro analítica basada en voltamperometría de pulso diferencial. Sin embargo, mediante la técnica amperométrica al cuantificar paracetamol se observó una menor recuperación.
- Es posible utilizar los electrodos modificados con nanomateriales directamente en el aparato disolutor a través de un sistema de análisis electroquímico en paralelo. Se demostró la potencial aplicabilidad de esta metodología de análisis electroquímico directo. No obstante, se requieren más estudios que demuestren que la recuperación se encuentra dentro de un 95 – 105 %, que la linealidad evaluada mediante el factor respuesta sea menor al 5 % y así validar el método de acuerdo con la normativa chilena.

- El análisis amperométrico directo demostró ser más eficiente en cuanto a tiempo de análisis y recursos empleados en comparación con la metodología electroquímica indirecta y la metodología por HPLC-UV. De ser validada, esta metodología reduciría el tiempo para que los laboratorios establezcan la equivalencia terapéutica entre medicamentos innovadores y genéricos, lo que beneficiaría a la población con la disponibilidad de fármacos seguros, eficaces y a un menor precio en un lapso de espera menor al tradicional.

ANEXO 1

Evaluación de desempeño del equipo disolutor: metodología

Calibración del equipo disolutor

Para asegurar la confiabilidad de los resultados, la USP recomienda calibrar mecánica y químicamente el equipo disolutor cada 6 meses o cuando éste sea trasladado o reparado. Esta calibración se debe evaluar en cada vaso (en los casos que aplique)¹⁴¹.

Calibración mecánica

La calibración mecánica consiste en comprobar los siguientes parámetros (tabla A1):

Tabla A1. Parámetros calibración mecánica del equipo disolutor.

Parámetro	Condición
Dimensiones de la paleta	Medidas indicadas en capítulo <711> Disolución USP
Dimensiones del vaso	Medidas indicadas en capítulo <711> Disolución USP. Los vasos deben estar limpios y sin rayones
Ubicación del equipo	Mesa firme con una inclinación menor a 1°
Base que soporta a los vasos	Inclinación no mayor a 0,5° medida a lo largo y ancho
Verticalidad del eje de la paleta	Inclinación no mayor a 0,5° desde los 90°
Centrado de la paleta	Distancia entre paleta y vaso no debe ser superior a 2 mm entre la mayor y menor lectura
Velocidad de rotación	Evaluar a 50 y 100 rpm. El error debe ser no mayor a ± 1 rpm
Temperatura	El equipo alcanza los 37 °C desde la temperatura ambiente. Evaluar con 500 mL de agua. Luego del equilibrio, la diferencia de temperatura entre los vasos no debe ser mayor a 0,4 °C

Calibración química

En la calibración química o prueba de verificación de rendimiento se debe evaluar la liberación/disolución de comprimidos de prednisona USP en el aparato disolutor y se debe comparar contra el estándar de referencia mediante espectrofotometría UV.

La solución estándar se preparó pesando 25 mg de prednisona USP estándar de referencia, se llevó a un matraz de aforo de 25 mL y se disolvió con 10 mL de etanol bajo ultrasonido. Una vez se alcanzó el equilibrio térmico se llevó a volumen con etanol. Se hizo una dilución de 5 mL a 500 mL con agua y se midió la absorbancia a 242 nm de la solución diluida. Se debe calcular el coeficiente de absortividad molar, el cual debe concordar con los registros históricos.

El procedimiento de disolución de los comprimidos de prednisona se realizó en las siguientes condiciones (**tabla A2**):

Tabla A2. Condiciones disolución comprimidos de prednisona.

Parámetro	Condición
Medio	500 mL de agua desgasificada
Temperatura	37 °C
Velocidad de agitación	50 rpm
Tiempo de agitación	30 minutos

El número de comprimidos a analizar depende del número de vasos que tiene el aparato disolutor. Debido a que el aparato utilizado cuenta con 8 vasos se deben analizar 16 comprimidos en 2 etapas.

Una vez alcanzado los 30 minutos se extraen 30 mL del vaso desde la “zona media”, se filtra con filtro PVDF 0,45 μm descartando los primeros 5 mL y se analiza por espectrofotometría UV a 242 nm una vez que la muestra haya alcanzado el equilibrio térmico. Se calcula el promedio geométrico y coeficiente de variación del porcentaje disuelto y se compara con los valores reportados en el certificado de los comprimidos USP^{84,141-143}.

El desgasificado del medio se realizó de acuerdo con lo indicado en el capítulo <711> Disolución de la USP 39; calentando el medio hasta 41 °C y luego filtrando al vacío con una membrana de 0,45 μm o menor.

Evaluación de desempeño del equipo disolutor: resultados

Calibración mecánica

1) Las dimensiones de la paleta deben ajustarse a las medidas indicadas por el capítulo <711> Disolución de la USP 39.

- ✓ De acuerdo con la hoja de especificaciones del fabricante, las dimensiones son compatibles con las directrices de la USP¹⁴⁴.

2) Las dimensiones de los vasos deben ajustarse a las medidas indicadas por el capítulo <711> Disolución de la USP 39. Los vasos deben estar limpios y sin rayones en la superficie.

- ✓ De acuerdo con la hoja de especificaciones del fabricante, las dimensiones son compatibles con las directrices de la USP¹⁴⁴.
- ✓ Vasos limpios y sin rayones (**figura A1**).



Figura A1. Vaso equipo disolutor limpio y sin rayones. Capacidad 1 L.

3) El equipo debe estar ubicado en una mesa firme y nivelada con no más de 1° de inclinación.

- ✓ La mesa se encuentra nivelada con menos de 1° de inclinación (**figura A2**).



Figura A2. Nivel digital sobre mesa en donde se poya el equipo disolutor. Lectura de $0,2^\circ$ de desnivel.

4) La base de que soporta a los vasos no debe tener una inclinación superior a $0,5^\circ$ medidas a lo largo y ancho.

✓ La inclinación a lo largo y ancho es inferior a $0,5^\circ$ (figura A3).



Figura A3. Nivel digital en la base de los vasos de equipo disolutor. A lo ancho con una lectura de $0,1^\circ$ de desnivel (izquierda), y a lo largo de $0,3^\circ$ (derecha).

5) La verticalidad del eje de la paleta debe ser de 90° con una inclinación inferior a $0,5^\circ$.

✓ La inclinación en todos los ejes es inferior a $0,5^\circ$ (**figura A4, tabla A3**).



Figura A4. Nivel digital sobre eje de paleta de equipo disolutor. Lectura de $89,7^\circ$ de verticalidad.

Tabla A3. Verticalidad 8 paletas.

Paleta	Inclinación
1	$89,6^\circ$
2	$89,8^\circ$
3	$89,7^\circ$
4	$89,8^\circ$
5	$89,7^\circ$
6	$89,9^\circ$
7	$89,6^\circ$
8	$89,9^\circ$

6) La paleta debe estar centrada. La diferencia entre el eje y el vaso no debe ser mayor a 2 mm entre la mayor y menor lectura.

- ✓ La diferencia es inferior a 2 mm (figura A5 y tabla A4).



Figura A5. Distancia entre eje de paleta y vaso de equipo disolutor. Lectura de 40,1 mm.

Tabla A4. Distancia eje-vaso.

Paleta	Mayor distancia / mm	Menor distancia / mm	Δ / mm
1	40,1	38,2	1,9
2	40,1	38,3	1,8
3	39,5	38,1	1,4
4	39,9	38,2	1,7
5	39,4	38,8	0,6
6	39,3	38,2	1,1
7	39,2	38,5	0,7
8	39,4	38,2	1,2

7) La velocidad de rotación a 50 y 100 rpm se comprobó con un tacómetro. La velocidad medida debe ser no más de ± 1 rpm del valor establecido.

- ✓ Las lecturas se encuentran dentro de los ± 1 rpm (**figura A6** y **tabla A5**).



Figura A6. Tacómetro sobre eje de paleta de equipo disolutor. Lectura de 50,0 rpm y 99,7 rpm.

Tabla A5. Velocidad de rotación.

Paleta	Rotación a 50 rpm / rpm	Rotación a 100 rpm / rpm
1	50,0	100,0
2	50,0	99,9
3	49,9	99,8
4	49,8	100,0
5	50,0	99,7
6	50,0	100,0
7	50,0	100,0
8	50,4	100,4

8) El equipo alcanza los 37 °C desde la temperatura ambiente. Para esto se debe llenar el vaso con 500 mL de agua y esperar a que alcance el equilibrio.

La diferencia entre los vasos no debe ser superior a $\pm 0,4$ °C.

✓ La diferencia es inferior a $\pm 0,4$ °C (**figura A7, tabla A6**).



Figura A7. Termómetro digital en vaso de equipo disolutor. Lectura de 36,8 °C.

Tabla A6. Temperaturas de los vasos.

Vaso	Temperatura / °C
1	36,8
2	36,9
3	36,7
4	36,8
5	36,7
6	36,7
7	36,6
8	36,7

Calibración química

La absorbancia de la solución estándar de prednisona es de 0,442 U.A.

Utilizando la Ley de Beer, se calcula el coeficiente de absorptividad molar.

$$A = \varepsilon bc$$

$$\varepsilon = \frac{A}{bc}$$

$$\varepsilon = \frac{0,442}{1 \text{ cm} \times 2,769 \times 10^{-5} \text{ mol/L}}$$

$$\varepsilon = 15.964 \text{ L/mol cm}$$

Debido a que no se cuentan con registros históricos del coeficiente calculado, se utiliza como valor de referencia la absorptividad molar tabulada¹⁴⁵, la cual es 16.100 L/mol×cm. El error es menor al 1 %.

Por otra parte, en la **tabla A7** se muestran los valores de absorbancias obtenidas de los comprimidos de prednisona USP junto con el porcentaje disuelto a los 30 minutos.

Tabla A7. Porcentaje disuelto prednisona para calibración química.

Etapa	Vaso	Absorbancia	% Disuelto
1	1	0,294	33,01
	2	0,301	33,79
	2	0,315	35,36
	4	0,303	34,02
	5	0,327	36,71
	6	0,346	38,84
	7	0,316	35,47
	8	0,306	34,35
2	1	0,289	32,44
	2	0,276	30,98
	3	0,264	29,64
	4	0,327	36,71
	5	0,296	33,23
	6	0,325	36,49
	7	0,286	32,11
	8	0,317	35,59
Promedio			34,30
Desviación estándar			2,385
CV / %			6,955
Promedio geométrico			34,22

De acuerdo con el certificado de los comprimidos de referencia, para un equipo disolutor de 8 vasos sometido a una prueba en 2 etapas, el promedio geométrico del porcentaje disuelto debe encontrarse entre 27 y 37. Mientras que el coeficiente de variación no debe ser superior a 7,4 %¹⁴².

En base a lo expuesto, el aparato disolutor se desempeña correctamente y puede ser utilizado en los ensayos de disolución para establecer bioequivalencia *in vitro*.

Cromatografía líquida

Construcción de curvas de calibrado

En la **figura A8** se muestra el cromatograma de paracetamol a diferentes concentraciones junto con la curva de calibrado en medio HCl pH 1,2. En la **tabla A8** se resume el análisis de linealidad.

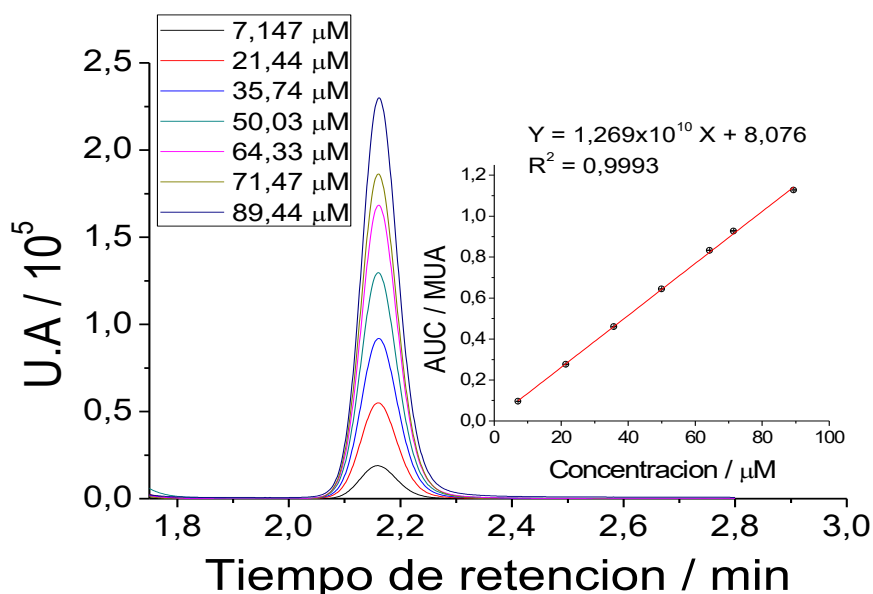


Figura A8. Cromatograma de paracetamol en HCl pH 1,2 a diferentes concentraciones. Curva de calibrado en el inserto. Tr = 2,16 min. $\lambda = 243$ nm.

Tabla A8. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante HPLC-UV/DAD en medio HCl pH 1,2.

% fármaco disuelto	Concentración / μM	AUC promedio / UA	Factor de respuesta $y/x / \times 10^{10}$	CV factor respuesta / %	1,88
10	7,147	95.927,67	1,342	r	0,9996
30	21,44	276.725,67	1,291	r^2	0,9993
50	35,74	460.506,33	1,289	t_{exp}	82,69
70	50,03	644.377,33	1,288	t_{tabla}	2,571
90	64,33	833.058,33	1,295	m	$1,269 \times 10^{10}$
100	71,47	926.871,33	1,297	n	8.076
120	89,44	1.126.990	1,260		

Asimismo, en las **figuras A9** y **A10** se exponen los cromatogramas y curvas de calibrado en medio acetato pH 4,5 y fosfato pH 6,8 y en las **tablas A9** y **A10** las evaluaciones de linealidad.

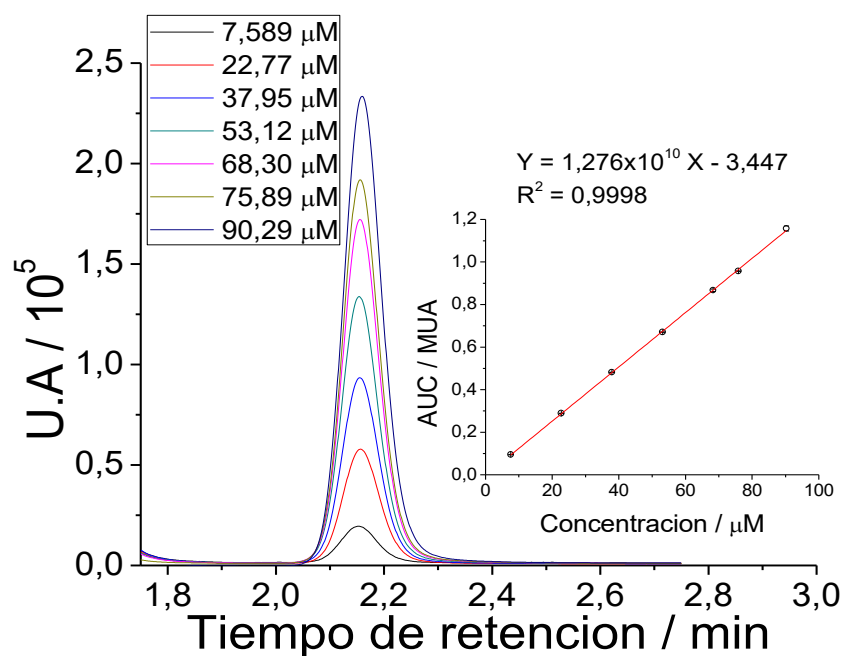


Figura A9. Cromatograma de paracetamol en Acetato pH 4,5 a diferentes concentraciones. Curva de calibrado en el inserto. $T_r = 2,16$ min. $\lambda = 243$ nm.

Tabla A9. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante HPLC-UV/DAD en medio acetato pH 4,5.

% fármaco disuelto	Concentración / µM	AUC promedio / UA	Factor de respuesta $y/x / \times 10^{10}$	CV factor respuesta / %	0,72
10	7,589	95.003	1,252	r	0,9999
30	22,77	288.437,33	1,267	r ²	0,9998
50	37,95	481.549,33	1,269	t _{exp}	152,88
70	53,12	670.746,33	1,263	t _{tabla}	2,571
90	68,30	867.092	1,270	m	$1,276 \times 10^{10}$
100	75,89	957.114,33	1,261	n	-3.447
120	90,29	1.157.190	1,282		

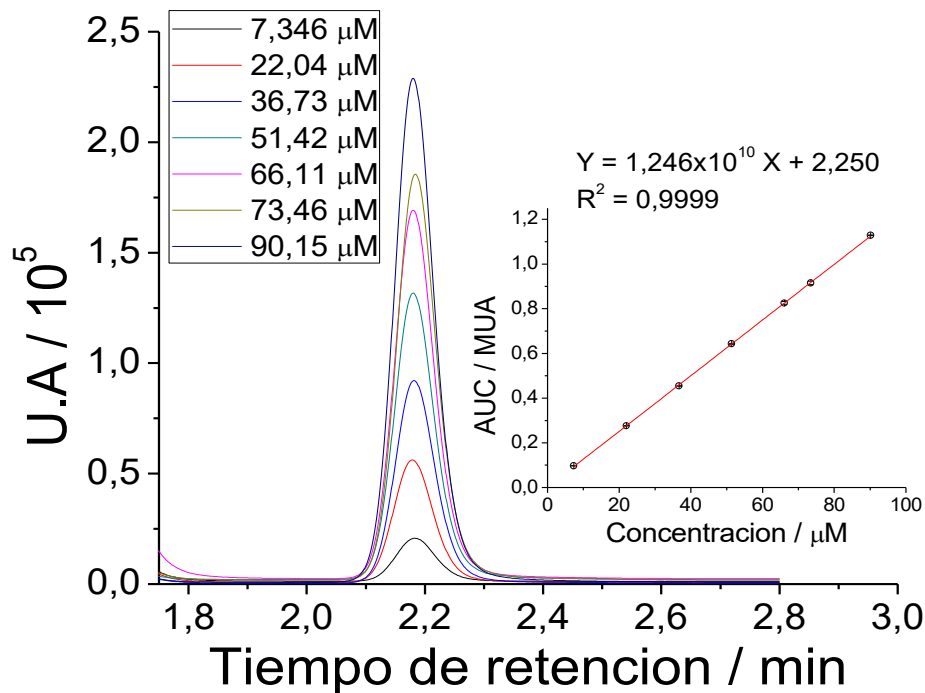


Figura A10. Cromatograma de paracetamol en Fosfato pH 6,8 a diferentes concentraciones. Curva de calibrado en el inserto. Tr = 2,18 min. λ = 243 nm.

Tabla A10. Evaluación de la linealidad curva de calibrado mediante HPLC-UV/DAD en medio fosfato pH 6,8.

% fármaco disuelto	Concentración / μM	AUC promedio / UA	Factor de respuesta y/x / $\times 10^{10}$	CV factor respuesta / %	2,37
10	7,346	97.422	1,326	r	0,9999
30	22,04	276.292,33	1,254	r ²	0,9999
50	36,73	455.115,33	1,239	t _{exp}	267,13
70	51,42	642.797	1,250	t _{tabla}	2,571
90	66,11	825.818,33	1,249	m	1,246 $\times 10^{10}$
100	73,46	915.563	1,246	n	2.250
120	90,15	1.128.250	1,252		

En la **tabla A11** se muestra la evaluación de la recuperación como medida de exactitud tanto con una solución estándar como con comprimidos de paracetamol, en los 3 medios.

Tabla A11. Evaluación de la recuperación de HPLC-UV/DAD.

Medio	Solución estándar		Comprimidos	
	AUC / UA	Recuperación / %	AUC / UA	Recuperación / %
HCl pH 1,2	628.346 ± 11.944	97,48	638.488 ± 2.567	100,10
Acetato pH 4,5	628.856 ± 455,79	98,82	651.364 ± 4.840	103,40
Fosfato pH 6,8	628.849 ± 9418,0	100,00	614.460 ± 2.698	99,03

Y en la **tabla A12** se resume la evaluación de la precisión de 6 inyecciones en los 3 medios.

Tabla A12. Evaluación de precisión mediante HPLC-UV/DAD.

Inyección	Medio		
	HCl pH 1,2 / U.A	Acetato pH 4,5 / U.A	Fosfato pH 6,8 / U.A
1	917.059	991.432	930.176
2	917.237	990.004	918.091
3	915.428	987.693	910.861
4	927.257	986.512	920.694
5	916.355	988.572	918.751
6	918.856	976.761	912.554
Promedio	918.698,67	986.829	918.521,17
CV / %	0,47	0,53	0,75

La metodología por cromatografía líquida cumple los parámetros de linealidad, exactitud y precisión en los 3 medios estudiados.

Análisis de muestras obtenidas desde el equipo disolutor

En la **tabla A13** se muestran las áreas bajo la curva junto con el coeficiente de variación de las muestras de paracetamol Laboratorio Chile, obtenidas desde el equipo disolutor. Corresponden al promedio de 12 comprimidos.

Tabla A13. Promedio AUC comprimidos paracetamol LCh cuantificados por HPLC-UV/DAD.

Tiempo / min	Medio					
	HCl pH 1,2		Acetato pH 4,5		Fosfato pH 6,8	
	AUC promedio	CV / %	AUC promedio	CV / %	AUC promedio	CV / %
5	807.981	3,75	536.848	8,92	749.321	6,33
10	920.572	2,73	814.528	5,06	875.602	2,53
15	940.889	4,07	914.496	4,08	963.761	5,12
20	957.565	3,72	939.590	5,04	959.038	4,14
30	966.380	3,13	939.897	3,71	946.017	5,20

De forma similar, en la **tabla A14** se muestran los promedios de las muestras para los comprimidos de Geniol®.

Tabla A14. Promedio AUC comprimidos Geniol ® cuantificados por HPLC-UV/DAD.

Tiempo / min	Medio					
	HCl pH 1,2		Acetato pH 4,5		Fosfato pH 6,8	
	AUC Promedio	CV / %	AUC Promedio	CV / %	AUC Promedio	CV / %
5	723.203	8,50	757.810	6,05	751.574	6,48
10	905.272	3,17	891.668	6,45	866.722	4,35
15	937.222	4,29	928.849	2,89	905.880	3,62
20	946.722	6,65	912.386	5,78	897.854	4,35
30	962.317	2,27	943.835	1,30	901.957	2,14

En la **figura A11** se presentan los perfiles de disolución en los 3 medios, mientras que en la **tabla A15** se muestran los valores de porcentaje disuelto en el tiempo cuantificado mediante HPLC-UV/DAD. Nótese la falta de las desviaciones estándar, lo cual es intencional ya que como se mencionó en el apartado de materiales y métodos, se permite una variación del 20 % en los primeros puntos (hasta los 10 minutos) y 10 % en los puntos finales.

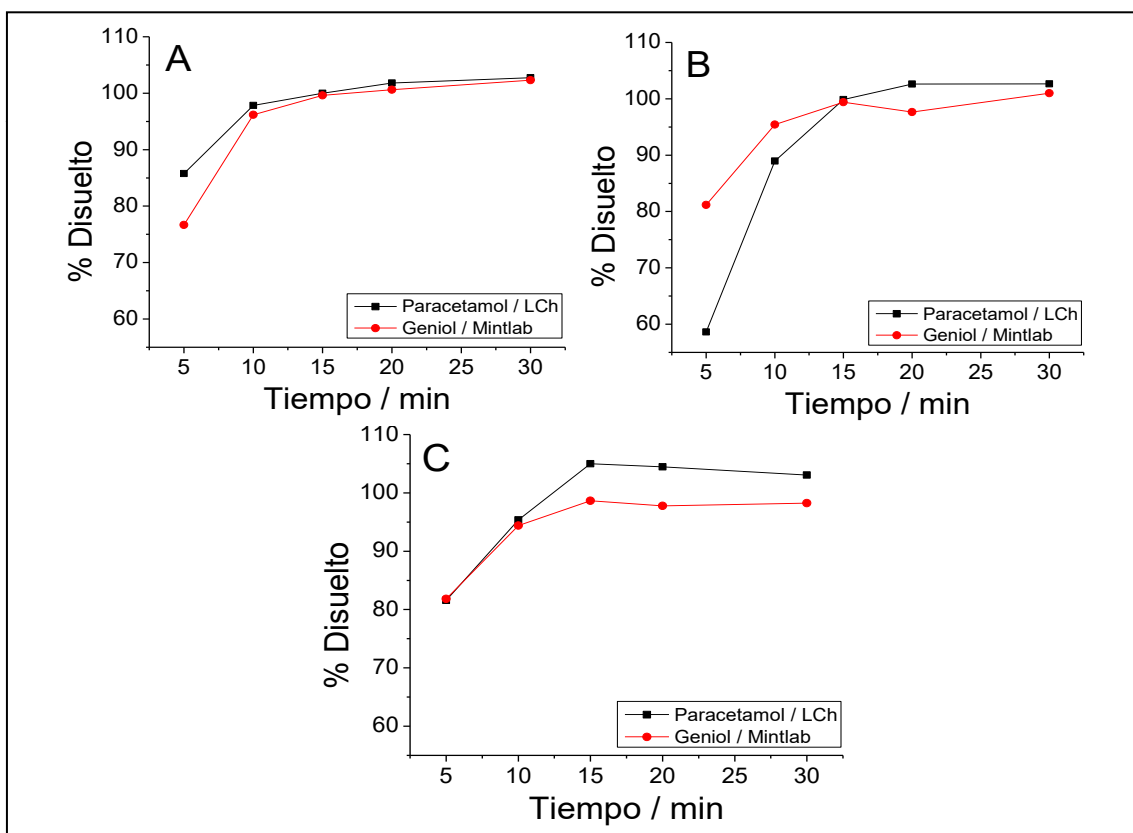


Figura A11. Comparación de perfiles de disolución de paracetamol LCh vs Geniol[®] en medio HCl pH 1,2 (A), acetato pH 4,5 (B) y fosfato pH 6,8 (C) cuantificados mediante HPLC-UV/DAD.

Tabla A15. Resultados ensayo disolución comprimidos paracetamol LCh y Geniol® cuantificados por HPLC-UV/DAD.

Medio	% Disuelto					
	HCl pH 1,2		Acetato pH 4,5		Fosfato pH 6,8	
	Paracetamol LCh	Geniol®	Paracetamol LCh	Geniol®	Paracetamol LCh	Geniol®
5	85,76	76,67	58,64	81,17	81,57	81,82
10	97,83	96,19	88,97	95,44	95,36	94,39
15	100,01	99,61	99,88	99,40	104,98	98,67
20	101,79	100,63	102,62	97,65	104,47	97,79
30	102,74	102,30	102,66	101,00	103,05	98,24

ANEXO 2

Análisis de costos

Para el análisis económico (**tabla A16**) se consideraron valores aproximados de los equipos en base a cotizaciones. A continuación, una descripción de los ítems:

- Instrumento/equipo: Considera el precio del equipo.
- Columna: Considera el precio de la columna cromatográfica.
- Insumos: Considera jeringas, filtros de jeringas, entre otros.
- Fase móvil: Considera el total gastado de metanol, incluidas las diluciones.
- Electroodos: Considera electrodos de trabajo (GCE), referencia y electrodo auxiliar.
- Nanotubos de carbono: Considera un frasco con nanotubos de carbono.

Tabla A16. Comparación de costos.

	Cromatografía líquida	Electroanálisis	
		VPD	AMP
Instrumento/equipo	30.000.000	6.000.000	6.000.000
Columna	1.000.000	-	-
Insumos	70.000	70.000	-
Fase móvil	130.000	-	-
Electrodos	-	2.900.000	2.900.000
Nanotubos de carbono	-	300.000	300.000
Total	31.200.000	9.270.000	9.200.000

En la **tabla A17** se compara el gasto de tiempo y solventes para cada una de las metodologías

Tabla A17. Gasto de tiempo y solventes.

HPLC-UV						
Medio	Comprimidos	Marcas de tiempo	Tiempo de análisis (min)	Tiempo total (min)	Volumen (mL)	Volumen total (mL)
HCl pH 1,2	24	5	3	360	3	1.080
Acetato pH 4,5	24	5	3	360	3	1.080
Fosfato pH 6,8	24	5	3	360	3	1.080
Subtotal				1.080		3.240
Equipo disolutor				30		64.800
TOTAL				2.190		71.280

VPD						
Medio	Comprimidos	Marcas de tiempo	Tiempo de análisis (min)	Tiempo total (min)	Volumen (mL)	Volumen total (mL)
HCl pH 1,2	24	5	5	600	10	1.200
Acetato pH 4,5	24	5	4	480	10	1.200
Fosfato pH 6,8	24	5	7	840	10	1.200
Subtotal				1.920		3.600
Equipo disolutor				30		64.800
TOTAL				3.870		72.000

Amperometría						
Medio	Comprimidos	Marcas de tiempo	Tiempo de análisis (min)	Tiempo total (min)	Volumen (mL)	Volumen total (mL)
HCl pH 1,2	24	5	-	-	-	-
Acetato pH 4,5	24	5	-	-	-	-
Fosfato pH 6,8	24	5	-	-	-	-
Subtotal			-	-	-	-
Equipo disolutor				30		64.800
TOTAL				30		64.800

REFERENCIAS

1. MINSAL. Resolución exenta N°515/04. Política Nacional de Medicamentos en la Reforma de Salud. (2004).
2. Estudio del SERNAC detectó diferencias de más de \$25 mil entre un medicamento referente y un bioequivalente - Portal SERNAC. *SERNAC: Noticias* <https://www.sernac.cl/portal/604/w3-article-70602.html>.
3. Wouters, O. J., McKee, M. & Luyten, J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *JAMA* **323**, 844–853 (2020).
4. Van Norman, G. A. Drugs, Devices, and the FDA: Part 1: An Overview of Approval Processes for Drugs. *JACC: Basic to Translational Science* **1**, 170–179 (2016).
5. Alabama, J. D., PhD Professor, Pharmacal Sciences Harrison School of Pharmacy Auburn University, Auburn, Alabama Pamela L. Holston, RPh, BS, BA Health Information Designs Inc Auburn. Drug Patent Expirations and the “Patent Cliff”. <https://www.uspharmacist.com/article/drug-patent-expirations-and-the-patent-cliff>.
6. MINSAL. Resolución exenta N°727/05. Norma que define los criterios destinados a establecer equivalencia terapéutica en productos farmacéuticos en Chile. (2005).
7. Instituto de Salud Pública de Chile. <https://www.ispch.gob.cl/anamed/bioequivalencia/>.
8. Rey, M. E. Bioequivalencia, biodisponibilidad y EFG. Algunas consideraciones. *Farmacia Profesional* **15**, 88–93 (2001).
9. Jalali, R. K. & Rasaily, D. Chapter 20 - Generic Drug and Bioequivalence Studies. in *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research* (eds. Vohora, D. & Singh, G.) 327–339 (Academic Press, Boston, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-802103-3.00021-3.
10. FDA. Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs — General Considerations. (2014).
11. Mallol, J., Aguirre, V., Rhem, R., Rodriguez, J. & Dolovich, M. Therapeutic equivalence of three metered-dose inhalers containing salbutamol (Albuterol) in protecting against methacholine-induced bronchoconstriction in children with asthma. *Pediatric Pulmonology* **32**, 447–452 (2001).
12. Costanzo, Lisa S. *Fisiología*. (Wolters Kluwer, 2019).

13. ISP. Guía Técnica G-Biof 02: Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales. (2007).
14. Neslihan Gursoy, R. & Benita, S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **58**, 173–182 (2004).
15. FDA/CDER/"Purdie, F. P. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry. (2017).
16. Cheng, C.-L. *et al.* Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet. *Eur J Pharm Sci* **22**, 297–304 (2004).
17. Silva, L. R., Vasconcellos, M. & Ferreira, R. A portable electroanalytical procedure to determine paracetamol in organic fertilizers. *Ionics* **28**, 1–10 (2022).
18. MINSAL e ISP alertan sobre peligros del exceso de consumo de Paracetamol y lanzan campaña sobre el uso responsable de los medicamentos. *Ministerio de Salud – Gobierno de Chile* <https://www.minsal.cl/minsal-e-isp-alertan-sobre-el-mal-uso-del-paracetamol-y-lanzan-campana-sobre-el-uso-responsable-de-los-medicamentos/> (2017).
19. Estudio de Medicamentos - Portal SERNAC. *SERNAC: Información de mercados y productos* <https://www.sernac.cl/portal/619/w3-article-70603.html> (2022).
20. Silva, D. Más de dos millones de medicamentos han sido decomisados por venta ilegal en la RM: paracetamol y zopiclona encabezan lista. *La Tercera* <https://www.latercera.com/nacional/noticia/mas-de-dos-millones-de-medicamentos-han-sido-decomisados-por-venta-ilegal-en-la-rm-paracetamol-y-zopiclona-encabezan-lista/ASBTJOFNIRCK3IYC3AXD4CUSUU/> (2023).
21. Chefirat, B., Zergui, A., Nour Belmessabih, M., Rahmani, C. & Rezk-kallah, H. Validation of a spectrophotometric method for the determination of paracetamol in plasma applicable for toxicological emergencies in laboratories with limited resources. *Toxicologie Analytique et Clinique* **32**, 266–277 (2020).
22. Perera, G. W. C. S., de Costa, M. D. P. & Mahanama, K. R. R. Development of a fluorimetric method for assessing paracetamol in pharmaceuticals tablets. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **368**, 248–253 (2019).
23. Hewavitharana, A. K., Lee, S., Dawson, P. A., Markovich, D. & Shaw, P. N. Development of an HPLC–MS/MS method for the selective determination of

paracetamol metabolites in mouse urine. *Analytical Biochemistry* **374**, 106–111 (2008).

24. Meyer, J. & Karst, U. Determination of paracetamol (acetaminophen) by HPLC with post-column enzymatic derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia* **54**, 163–167 (2001).

25. Bard, Allen J., F., Larry R. & White, Henry S. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2022).

26. Wang, J. *Analytical Electrochemistry. Analytical Electrochemistry, Third Edition* (Wiley-VCH, Hoboken, New Jersey, 2006). doi:10.1002/0471790303.

27. Minteer, S. D. Advances in Electroanalytical Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 2701–2703 (2018).

28. Orimolade, B. O. *et al.* Advancements in electrochemical technologies for the removal of fluoroquinolone antibiotics in wastewater: A review. *Science of The Total Environment* **881**, 163522 (2023).

29. Yadav, S. & Kamsonlian, S. A review of electrochemical methods for treatment of wastewater. *Materials Today: Proceedings* **78**, 36–39 (2023).

30. Tanner, E. E. L. & Compton, R. G. How can Electrode Surface Modification Benefit Electroanalysis? *Electroanalysis* **30**, 1336–1341 (2018).

31. Monteiro, M. K. S. *et al.* Novel cork-graphite electrochemical sensor for voltammetric determination of caffeine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **839**, 283–289 (2019).

32. Monteiro, M. K. S., Santos, E. C. M. M., Silva, D. R., Martínez-Huitle, C. A. & dos Santos, E. V. Simultaneous determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations and synthetic urine using cork-modified graphite electrodes. *Journal of Solid State Electrochemistry* **24**, 1789–1800 (2020).

33. Cui, X. *et al.* A wearable electrochemical sensor based on β -CD functionalized graphene for pH and potassium ion analysis in sweat. *Talanta* **245**, 123481 (2022).

34. Mazaheri, M., Aashuri, H. & Simchi, A. Three-dimensional hybrid graphene/nickel electrodes on zinc oxide nanorod arrays as non-enzymatic glucose biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **251**, 462–471 (2017).

35. McMahon, S. J. & Currell, F. J. Chapter 3 - Gold Nanoparticles for Imaging and Radiotherapy. in *Frontiers of Nanoscience* (ed. Summers, H.) vol. 5 65–93 (Elsevier, 2013).

36. Karmakar, B. Chapter 1 - Fundamentals of Glass and Glass Nanocomposites. in *Glass Nanocomposites* (eds. Karmakar, B., Rademann, K. &

Stepanov, A. L.) 3–53 (William Andrew Publishing, Boston, 2016). doi:10.1016/B978-0-323-39309-6.00001-8.

37. Administration, D. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology Contains Nonbinding Recommendations. (2014).

38. Li, Z. & Yu, C. Chapter 2 - Structure types and characteristics of nanomaterials. in *Nanostructured Materials* (eds. Li, Z. & Yu, C.) 15–41 (Elsevier, 2024). doi:10.1016/B978-0-443-19256-2.00004-1.

39. Malhotra, B. D. & Ali, Md. A. Chapter 1 - Nanomaterials in Biosensors: Fundamentals and Applications. in *Nanomaterials for Biosensors* (eds. Malhotra, B. D. & Ali, Md. A.) 1–74 (William Andrew Publishing, 2018). doi:10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7.

40. Asha, A. B. & Narain, R. Chapter 15 - Nanomaterials properties. in *Polymer Science and Nanotechnology* (ed. Narain, R.) 343–359 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-816806-6.00015-7.

41. Mino, L. *et al.* Low-dimensional systems investigated by x-ray absorption spectroscopy: A selection of 2D, 1D and 0D cases. *JOURNAL OF PHYSICS D-APPLIED PHYSICS* **46**, (2013).

42. Saleh, T. A. Chapter 8 - Properties of nanoadsorbents and adsorption mechanisms. in *Interface Science and Technology* (ed. Saleh, T. A.) vol. 34 233–263 (Elsevier, 2022).

43. Bhardwaj, P., Singh, B. & Behera, S. P. Chapter 7 - Green approaches for nanoparticle synthesis: emerging trends. in *Nanomaterials* (eds. Kumar, R. P. & Bharathiraja, B.) 167–193 (Academic Press, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-822401-4.00015-5.

44. Akash, B. A. *et al.* Cytotoxicity of 5-Fluorouracil- Loaded, β -Cyclodextrin-Tethered Metallic Copper Nanoparticles on Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Molecular Structure* **1295**, 136530 (2024).

45. Shivananda, C. S. Silk fibroin-based green colloidal silver nanoparticle synthesis and their antibacterial and anticancer properties. *Inorganic Chemistry Communications* **158**, 111611 (2023).

46. Hassani, F., Larki, A., Ghomi, M. & Pourreza, N. Gold nanoparticles embedded Fe-BTC (AuNPs@Fe-BTC) metal-organic framework as a fluorescence sensor for the selective detection of As(III) in contaminated waters. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **302**, 123104 (2023).

47. Pissuwan, D., Gazzana, C., Mongkolsuk, S. & Cortie, M. B. Single and multiple detections of foodborne pathogens by gold nanoparticle assays. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **12**, e1584 (2020).
48. Mafuné, Fumitaka, Kohno, J., Takeda, Y. & Kondow, T. Full Physical Preparation of Size-Selected Gold Nanoparticles in Solution: Laser Ablation and Laser-Induced Size Control. *J. Phys. Chem. B* **106**, 7575–7577 (2002).
49. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55–75 (1951).
50. Sau, T. K. & Murphy, C. J. Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8648–8649 (2004).
51. Yu, Chang, S.-S., Lee, C.-L. & Wang, C. R. C. Gold Nanorods: Electrochemical Synthesis and Optical Properties. *J. Phys. Chem. B* **101**, 6661–6664 (1997).
52. Raj, C. R., Okajima, T. & Ohsaka, T. Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **543**, 127–133 (2003).
53. Yuan, Y., Wang, Y., Wang, H. & Hou, S. Gold nanoparticles decorated on single layer graphene applied for electrochemical ultrasensitive glucose biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **855**, 113495 (2019).
54. Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**, 56–58 (1991).
55. Hong, S. & Myung, S. A flexible approach to mobility. *Nature Nanotech* **2**, 207–208 (2007).
56. Sivasubramaniam, V., Ramasamy, S., Venkatraman, M., Gatto, G. & Kumar, A. Carbon Nanotubes as an Alternative to Copper Wires in Electrical Machines: A Review. *Energies* **16**, 3665 (2023).
57. Radhamani, A. V., Lau, H. C. & Ramakrishna, S. CNT-reinforced metal and steel nanocomposites: A comprehensive assessment of progress and future directions. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* **114**, 170–187 (2018).
58. Lara-Romero, J. Chapter 2 - Properties, classification, synthesis, purification and characterization of carbon nanotubes. in *Emerging Applications of Carbon Nanotubes in Drug and Gene Delivery* (ed. Kesharwani, P.) 37–59 (Woodhead Publishing, 2023). doi:10.1016/B978-0-323-85199-2.00010-8.

59. Cooper, D. R. *et al.* Experimental Review of Graphene. *International Scholarly Research Notices* **2012**, e501686 (2012).
60. Dinadayalane, T. C. & Leszczynski, J. Remarkable diversity of carbon–carbon bonds: structures and properties of fullerenes, carbon nanotubes, and graphene. *Struct Chem* **21**, 1155–1169 (2010).
61. Zhang, Y., Bai, Y. & Yan, B. Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. *Drug Discovery Today* **15**, 428–435 (2010).
62. Maruyama, T. Chapter 6 - Carbon nanotubes. in *Handbook of Carbon-Based Nanomaterials* (eds. Thomas, S., Sarathchandran, C., Ilangovan, S. A. & Moreno-Piraján, J. C.) 299–319 (Elsevier, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-821996-6.00009-9.
63. Sisto, T. J., Zakharov, L. N., White, B. M. & Jasti, R. Towards pi-extended cycloparaphenylenes as seeds for CNT growth: investigating strain relieving ring-openings and rearrangements. *Chem. Sci.* **7**, 3681–3688 (2016).
64. Hamada, N., Sawada, S. & Oshiyama, A. New one-dimensional conductors: Graphitic microtubules. *Phys. Rev. Lett.* **68**, 1579–1581 (1992).
65. Thostenson, E. T., Ren, Z. & Chou, T.-W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology* **61**, 1899–1912 (2001).
66. Sivaganga, K. C. & Varughese, T. Physical Properties of Carbon Nanotubes. in *Handbook of Carbon Nanotubes* (eds. Abraham, J., Thomas, S. & Kalarikkal, N.) 283–297 (Springer International Publishing, Cham, 2022). doi:10.1007/978-3-030-91346-5_62.
67. Abiman, P., Wildgoose, G. G. & Compton, R. G. Investigating the Mechanism for the Covalent Chemical Modification of Multiwalled Carbon Nanotubes Using Aryl Diazonium Salts. *International Journal of Electrochemical Science* **3**, 104–117 (2008).
68. Wang, Y. Y. *et al.* Experimental studies of the formation process and morphologies of carbon nanotubes with bamboo mode structures. *Diamond and Related Materials* **13**, 1287–1291 (2004).
69. Abdallah, B., Elhissi, A. M. A., Ahmed, W. & Najlah, M. Chapter 16 - Carbon nanotubes drug delivery system for cancer treatment. in *Advances in Medical and Surgical Engineering* (eds. Ahmed, W., Phoenix, D. A., Jackson, M. J. & Charalambous, C. P.) 313–332 (Academic Press, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-819712-7.00016-4.
70. Yardimci, A. I. & Yagmurcukardes, N. Synthesis Methods of Carbon Nanotubes. in *Handbook of Carbon Nanotubes* (eds. Abraham, J., Thomas, S. &

Kalarikkal, N.) 25–56 (Springer International Publishing, Cham, 2022). doi:10.1007/978-3-030-91346-5_52.

71. Saito, R., Dresselhaus, G. & Dresselhaus, M. S. *Physical Properties of Carbon Nanotubes*. (PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO., 1998). doi:10.1142/p080.

72. Collins, P. G. & Avouris, P. Nanotubes for electronics. *Sci Am* **283**, 62–69 (2000).

73. Chen, C. *et al.* An efficient flexible electrochemical glucose sensor based on carbon nanotubes/carbonized silk fabrics decorated with Pt microspheres. *Sensors and Actuators B: Chemical* **256**, 63–70 (2018).

74. Guo, M., Chen, J., Li, J., Nie, L. & Yao, S. Carbon Nanotubes-Based Amperometric Cholesterol Biosensor Fabricated Through Layer-by-Layer Technique. *Electroanalysis* **16**, 1992–1998 (2004).

75. Hočevár, S. B., Wang, J., Deo, R. P., Musameh, M. & Ogorevc, B. Carbon Nanotube Modified Microelectrode for Enhanced Voltammetric Detection of Dopamine in the Presence of Ascorbate. *Electroanalysis* **17**, 417–422 (2005).

76. Fernandes, A. M. *et al.* Development of highly sensitive electrochemical genosensor based on multiwalled carbon nanotubes–chitosan–bismuth and lead sulfide nanoparticles for the detection of pathogenic *Aeromonas*. *Biosensors and Bioelectronics* **63**, 399–406 (2015).

77. Ferrier, D. C. & Honeychurch, K. C. Carbon Nanotube (CNT)-Based Biosensors. *Biosensors (Basel)* **11**, 486 (2021).

78. Moscoso, R., Carbajo, J. & Squella, J. A. 1,3-Dioxolane: A green solvent for the preparation of carbon nanotube-modified electrodes. *Electrochemistry Communications* **48**, 69–72 (2014).

79. Zhao, G. & Liu, G. Electrochemical deposition of gold nanoparticles on reduced graphene oxide by fast scan cyclic voltammetry for the sensitive determination of As(III). *Nanomaterials* **9**, (2019).

80. Afkhami, A., Bahiraei, A. & Madrakian, T. Gold nanoparticle/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a sensitive voltammetric sensor for the determination of diclofenac sodium. *Materials Science and Engineering C* **59**, 168–176 (2016).

81. Shetti, N. P., Nayak, D. S., Malode, S. J. & Kulkarni, R. M. An electrochemical sensor for clozapine at ruthenium doped TiO₂ nanoparticles modified electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **247**, 858–867 (2017).

82. FDA. M9 Biopharmaceutics Classification System - Based Biowaivers Guidance for Industry.
83. ICH Q2(R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). (2005).
84. *INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE. Bioexención de Los Estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia Para Establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales. In Vitro* (2007).
85. Quattrocchi, O. Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica. (1992).
86. Keeley, G. P. & G Lyons, M. E. The Effects of Thin Layer Diffusion at Glassy Carbon Electrodes Modified with Porous Films of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Int. J. Electrochem. Sci* **4**, 794–809 (2009).
87. Streeter, I., Wildgoose, G. G., Shao, L. & Compton, R. G. Cyclic voltammetry on electrode surfaces covered with porous layers: An analysis of electron transfer kinetics at single-walled carbon nanotube modified electrodes. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **133**, 462–466 (2008).
88. Elgrishi, N. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education* **95**, 197–206 (2018).
89. Miner, D. J., Rice, J. R., Riggin, R. M. & Kissinger, P. T. Voltammetry of Acetaminophen and Its Metabolites. *Analytical Chemistry* **53**, 2258–2263 (1981).
90. Van Benschoten, J. J., Lewis, J. Y., Heineman, W. R., Roston, D. A. & Kissinger, P. T. Cyclic voltammetry experiment. *Journal of Chemical Education* **60**, 772–776 (1983).
91. Guin, P. S., Das, S. & Mandal, P. C. Electrochemical Reduction of Quinones in Different Media: A Review. *International Journal of Electrochemistry* **2011**, 1–22 (2011).
92. Engin, C., Yilmaz, S., Saglikoglu, G., Yagmur, S. & Sadikoglu, M. Electroanalytical investigation of paracetamol on glassy carbon electrode by voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science* **10**, 1916–1925 (2015).
93. Hanabaratti, R. M., Tuwar, S. M., Nandibewoor, S. T. & Gowda, J. I. Fabrication and characterization of zinc oxide nanoparticles modified glassy carbon electrode for sensitive determination of paracetamol. *Chemical Data Collections* **30**, 100540 (2020).
94. Arvand, M. & Gholizadeh, T. M. Simultaneous voltammetric determination of tyrosine and paracetamol using a carbon nanotube-graphene nanosheet

nanocomposite modified electrode in human blood serum and pharmaceuticals. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **103**, 84–93 (2013).

95. Yin, H., Shang, K., Meng, X. & Ai, S. Voltammetric sensing of paracetamol, dopamine and 4-aminophenol at a glassy carbon electrode coated with gold nanoparticles and an organophilic layered double hydroxide. *Microchimica Acta* **175**, 39–46 (2011).

96. Nematollahi, D., Shayani-Jam, H., Alimoradi, M. & Niroomand, S. Electrochemical oxidation of acetaminophen in aqueous solutions: Kinetic evaluation of hydrolysis, hydroxylation and dimerization processes. *Electrochimica Acta* **54**, 7407–7415 (2009).

97. Ghoreishi, S. M., Behpour, M., Hajisadeghian, E. & Golestaneh, M. Electrochemical determination of acetaminophen at the surface of a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. *Journal of the Chilean Chemical Society* **58**, 1513–1516 (2013).

98. Kissinger, Peter T. Heineman, W. R. Laboratory techniques in electroanalytical chemistry. **2nd ed**, 1008 (1996).

99. *Organic Electrochemistry*. (CRC Press, Boca Raton, 2000). doi:10.1201/9781420029659.

100. Seo, M. & Chung, T. D. Nanoconfinement effects in electrochemical reactions. *Current Opinion in Electrochemistry* **13**, 47–54 (2019).

101. Dalmasso, P. R., Pedano, M. L. & Rivas, G. A. Electrochemical determination of ascorbic acid and paracetamol in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes dispersed in polyhistidine. *Sensors and Actuators B* **173**, 732–736 (2012).

102. Basile, F. *et al.* A novel electrochemical route for the catalytic coating of metallic supports. in *Studies in Surface Science and Catalysis* vol. 175 51–58 (Elsevier Inc., 2010).

103. Quinn, B. M., Dekker, C. & Lemay, S. G. Electrodeposition of Noble Metal Nanoparticles on Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 6146–6147 (2005).

104. McCormick, W., McDonagh, P., Doran, J. & McCrudden, D. Covalent immobilisation of a nanoporous platinum film onto a gold screen-printed electrode for highly stable and selective non-enzymatic glucose sensing. *Catalysts* **11**, (2021).

105. Park, J. W. & Shumaker-Parry, J. S. Structural study of citrate layers on gold nanoparticles: Role of intermolecular interactions in stabilizing nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 1907–1921 (2014).

106. Dong, J., Carpinone, P. L., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P. & Moudgil, B. M. Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method. *KONA Powder and Particle Journal* **37**, 224–232 (2020).
107. Rance, G. A. & Khlobystov, A. N. Nanoparticle-nanotube electrostatic interactions in solution: The effect of pH and ionic strength. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 10775–10780 (2010).
108. Guo, D. J. & Li, H. L. High dispersion and electrocatalytic properties of palladium nanoparticles on single-walled carbon nanotubes. *Journal of Colloid and Interface Science* **286**, 274–279 (2005).
109. Guo, D. J. & Li, H. L. High dispersion and electrocatalytic properties of Pt nanoparticles on SWNT bundles. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **573**, 197–202 (2004).
110. Wang, Z. *et al.* Simultaneous and selective measurement of dopamine and uric acid using glassy carbon electrodes modified with a complex of gold nanoparticles and multiwall carbon nanotubes. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **255**, 2069–2077 (2018).
111. Guo, Y., Guo, S., Fang, Y. & Dong, S. Gold nanoparticle/carbon nanotube hybrids as an enhanced material for sensitive amperometric determination of tryptophan. *Electrochimica Acta* **55**, 3927–3931 (2010).
112. Piña, S. *et al.* Glassy carbon electrode modified with c/au nanostructured materials for simultaneous determination of hydroquinone and catechol in water matrices. *Chemosensors* **9**, 88 (2021).
113. Sharifi, J. & Fayazfar, H. Highly sensitive determination of doxorubicin hydrochloride antitumor agent via a carbon nanotube/gold nanoparticle based nanocomposite biosensor. *Bioelectrochemistry* **139**, 107741 (2021).
114. Shahrokhian, S. & Rastgar, S. Electrochemical deposition of gold nanoparticles on carbon nanotube coated glassy carbon electrode for the improved sensing of tinidazole. *Electrochimica Acta* **78**, 422–429 (2012).
115. Najari, S., Bagheri, H., Monsef-Khoshhesab, Z., Hajian, A. & Afkhami, A. Electrochemical sensor based on gold nanoparticle-multiwall carbon nanotube nanocomposite for the sensitive determination of docetaxel as an anticancer drug. *Ionics* **24**, 3209–3219 (2018).
116. Goyal, R. N., Rana, A. R. S., Aziz, M. A. & Oyama, M. Effect of gold nanoparticle attached multi-walled carbon nanotube-layered indium tin oxide in monitoring the effect of paracetamol on the release of epinephrine. *Analytica Chimica Acta* **693**, 35–40 (2011).

117. Ben Messaoud, N., Ghica, M. E., Dridi, C., Ben Ali, M. & Brett, C. M. A. Electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube and gold nanoparticle modified electrode for the sensitive detection of bisphenol A. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **253**, 513–522 (2017).
118. Madrakian, T., Haghshenas, E. & Afkhami, A. Simultaneous determination of tyrosine, acetaminophen and ascorbic acid using gold nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/glassy carbon electrode by differential pulse voltammetric method. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **193**, 451–460 (2014).
119. Yang, K. & Xing, B. Adsorption of organic compounds by carbon nanomaterials in aqueous phase: Polanyi theory and its application. *Chemical Reviews* **110**, 5989–6008 (2010).
120. Woods, L. M., Bădescu, Ş. C. & Reinecke, T. L. Adsorption of simple benzene derivatives on carbon nanotubes. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* **75**, 1–9 (2007).
121. Lin, D. & Xing, B. Adsorption of Phenolic Compounds by Carbon Nanotubes: Role of Aromaticity and Substitution of Hydroxyl Groups. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 7254–7259 (2008).
122. Yang, K., Wu, W., Jing, Q. & Zhu, L. Aqueous Adsorption of Aniline, Phenol, and their Substitutes by Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 7931–7936 (2008).
123. Sousa, C. P. *et al.* Computational modeling of functionalized multi-walled carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine for electrochemical sensing of acetaminophen. *Sensors and Actuators B: Chemical* **246**, 969–978 (2017).
124. De Holanda, L. F. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine modified electrode for electroanalytical determination of acetaminophen. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **772**, 9–16 (2016).
125. Alam, A. U., Qin, Y., Howlader, M. M. R., Hu, N. X. & Deen, M. J. Electrochemical sensing of acetaminophen using multi-walled carbon nanotube and B-cyclodextrin. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **254**, 896–909 (2018).
126. Arancibia, V., Penagos-Llanos, J., Nagles, E., García-Beltrán, O. & Hurtado, J. J. Development of a microcomposite with single-walled carbon nanotubes and Nd₂O₃ for determination of paracetamol in pharmaceutical dosage by adsorptive voltammetry. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **9**, 62–69 (2019).
127. Lan, H. *et al.* Highly sensitive electrochemical detection of paracetamol based on MnO₂/MWCNTs-NH₂ composite. *Inorganic Chemistry Communications* **146**, 110105 (2022).

128. Fu, L., Lai, G. & Yu, A. Preparation of β -cyclodextrin functionalized reduced graphene oxide: application for electrochemical determination of paracetamol. *RSC Adv.* **5**, 76973–76978 (2015).
129. Li, M., Wang, W., Chen, Z., Song, Z. & Luo, X. Electrochemical determination of paracetamol based on Au@graphene core-shell nanoparticles doped conducting polymer PEDOT nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical* **260**, 778–785 (2018).
130. D'Souza, O. J. *et al.* Platinum decorated multi-walled carbon nanotubes/Triton X-100 modified carbon paste electrode for the sensitive amperometric determination of Paracetamol. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **739**, 49–57 (2015).
131. Rowe, R. C., Sheskey, P. J. & Owen, S. C. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. (Pharmaceutical Press and The American Pharmacists Association, 2006).
132. Pandit, U. J. *et al.* Electrochemical determination of an anti-hyperlipidemic drug pitavastatin at electrochemical sensor based on electrochemically pre-treated polymer film modified GCE. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **7**, 258–264 (2017).
133. Yilmaz, B. & Kaban, S. Electrochemical Behavior of Atorvastatin at Glassy Carbon Electrode and its Direct Determination in Pharmaceutical Preparations by Square Wave and Differential Pulse Voltammetry. *pharmaceutical-sciences* **78**, 360–367 (2016).
134. Patil, V. B. *et al.* An Electrochemical Electrode to Detect Theophylline Based on Copper Oxide Nanoparticles Compositing with Graphene Oxide. *Micromachines* **13**, 1166 (2022).
135. Shanbhag, Y. M. *et al.* Direct and Sensitive Electrochemical Evaluation of Pramipexole Using Graphitic Carbon Nitride (gCN) Sensor. *Biosensors (Basel)* **12**, 552 (2022).
136. Kokab, T., Shah, A., Abdullah Khan, M., Nisar, J. & Naeem Ashiq, M. Electrochemical sensing platform for the simultaneous femtomolar detection of amlodipine and atorvastatin drugs. *RSC Advances* **11**, 27135–27151 (2021).
137. Pontié, M. *et al.* Paracetamol Sensitive Cellulose-Based Electrochemical Sensors. *Journal of Renewable Materials* **6**, 242–250 (2018).
138. Farag, A. S. Voltammetric determination of acetaminophen in pharmaceutical preparations and human urine using glassy carbon paste electrode modified with reduced graphene oxide. *Anal Sci* **38**, 1213–1220 (2022).

139. Santos, A. M., Silva, T. A., Vicentini, F. C. & Fatibello-Filho, O. Flow injection analysis system with electrochemical detection for the simultaneous determination of nanomolar levels of acetaminophen and codeine. *Arabian Journal of Chemistry* **13**, 335–345 (2020).
140. Awad, A., Trenfield, S. J. & Basit, A. W. Chapter 19 - Solid oral dosage forms. in *Remington (Twenty-third Edition)* (ed. Adejare, A.) 333–358 (Academic Press, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-820007-0.00019-2.
141. Dissolution Toolkit Procedures for Mechanical Calibration and Performance Verification Test Apparatus 1 and Apparatus 2 Version 2.0. (2010).
142. Certificate. Prednisone Tablets. https://www.ivicres.com/wp-content/themes/temp01_05/images/under/R080J0.pdf (2018).
143. United States pharmacopeial Convention, Inc. *The United States Pharmacopeia. The National Formulary*. (Rockville, Md, 1979).
144. Hoja de especificaciones Varian VK 7010. https://www.agilent.com/Library/datasheets/Public/si-0345_7010_ds_v09.pdf.
145. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. (Merck & CO, Inc., Whitehouse Station, New Jersey, 1996).