



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

LABORATORIO DE ANÁLISIS DE FÁRMACOS

Comportamiento de bromhexina en electrodos de pasta de carbono modificados con líquido iónico y desarrollo analítico

PATROCINANTE

Dr. Alejandro Álvarez Lueje
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alejandro Álvarez Lueje
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Francisco Javier Muñoz Soto

Junio, 2015

AGRADECIMIENTOS

Quiero utilizar este espacio para agradecerle de todo corazón a la persona más importante en mi vida, Daniela muchas gracias por todo su apoyo en todo este proceso, por aguantarme, darme ánimos y estar para mí en todo momento, la quiero mucho y quiero que este sea el comienzo de una nueva vida para ambos.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN.....	viii
SUMMARY	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1 MATERIALES.....	8
2.1.1 Líquidos iónicos y fármaco.....	8
2.1.2 Reactivos y disolventes.....	8
2.1.3 Material de vidrio	9
2.1.4 Material Instrumental de uso general.....	9
2.1.5 Equipos.....	10
2.2 MÉTODOS	11
2.2.1 Preparación de las disoluciones.....	11
2.2.2 Preparación de las pastas de trabajo.....	13
2.3 MÉTODOS	13
2.3.1 Voltamperometría cíclica.....	13
2.3.2 Voltamperometría de pulso diferencial.....	15
2.3.3 Cronoculombimetría	16
2.3.4 Morfología de los electrodos	18
2.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA	19
2.4.1 Estudio de concentración	19
2.4.2 Estudio de repetibilidad	19
2.4.3 Cálculo del límite de detección y de cuantificación.....	19
2.4.4 Ensayo de recuperación.....	20
2.4.5 Aplicación a la cuantificación de bromhexina en jarabe comercial.....	21
2.4.6 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	21

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
3.1 DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DEL ELECTRODO MODIFICADO	23
3.1.1 Antecedentes.....	23
3.1.2 Efecto del líquido iónico	25
3.1.3 Efecto de la agitación	27
3.1.4 Medición de la capacitancia	30
3.1.5 Cálculo del área electroactiva	33
3.1.6 Morfología de los electrodos	34
3.2 COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE LA BROMHEXINA.....	38
3.2.1 Efecto del líquido iónico	38
3.2.2 Efecto de la velocidad de barrido	41
3.2.3 Estudio del comportamiento anódico de bromhexina en función del pH	42
3.3 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	46
3.3.1 Estudio de acumulación	46
3.3.2 Estudio de concentración	47
3.3.3 Repetibilidad.....	48
3.3.4 Ensayo de recuperación.....	51
3.4 APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE BROMHEXINA EN JARABE	52
3.4.1 Cuantificación por el método propuesto (VPD, EPC-LI)	52
3.4.2 Cuantificación de bromhexina en jarabe por HPLC	53
4. CONCLUSIONES.....	55
5. REFERENCIAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de las publicaciones de electrodos modificados con líquidos iónicos	2
Figura 2. Estructura de algunos líquidos iónicos utilizados para modificar electrodos.....	3
Figura 3. Estructura química de la bromhexina.....	5
Figura 4. Voltamperogramas cíclicos para (A) ferrocenometanol y (B) ferricianuro de potasio con los electrodos modificado (EPC-LI —) y no modificado (EPC —). Ambas disoluciones 1×10^{-3} M, pH 7,4, 5 minutos de agitación (600 rpm) y 0,1 V/s como velocidad de barrido.	25
Figura 5. Voltamperogramas cíclicos para ferrocenometanol 1×10^{-3} M, pH 7,4 (A) agitando 5 min (600 rpm) y (B) sin agitar, para ambos tipos de electrodos: modificado (EPC-LI —) y no modificado (EPC —).....	27
Figura 6. Voltamperogramas cíclicos para ferricianuro de potasio en (A) electrodo modificado y (B) electrodo no modificado, con 5 min de agitación (600 rpm) (—) y sin agitación (—).....	29
Figura 7. Voltamperogramas cíclicos para el blanco (metanol/tampón Britton-Robinson 0,1 M 2,5:97,5 v/v, pH 6), 5 min de agitación (600 rpm) (—) y sin agitación (—).....	30
Figura 8. Gráfico de corriente vs velocidad de barrido para (A) electrodo modificado y (B) electrodo no modificado.	32
Figura 9. Cronoculombimetría para el electrodo modificado y no modificado, con ferrocenometanol y ferricianuro de potasio.	34
Figura 10. Imágenes SEM para (A) electrodo de pasta de carbono no modificado y (B) electrodo de pasta de carbono modificado, 50.000 de magnificación.....	36
Figura 11. Imágenes SEM para (A) electrodo de pasta de carbono no modificado y (B) electrodo de pasta de carbono modificado, 5.000 de magnificación.	36
Figura 12. Imágenes SEM para (A) electrodo de pasta de carbono no modificado y (B) electrodo de pasta de carbono modificado, 2.500 de magnificación.	37
Figura 13. Imágenes SEM para (A) electrodo de pasta de carbono no modificado y (B) electrodo de pasta de carbono modificado, 1.000 de magnificación.	37
Figura 14. Estructura de los analitos estudiados con el electrodo de pasta de carbono modificado.	39
Figura 15. Voltamperogramas cíclicos para disoluciones de bromhexina 1×10^{-4} M, con electrodo modificado y sin modificar, pH 6, 5 minutos de agitación (600 rpm) y 0,1 V/s como velocidad de barrido.	41

Figura 16. Voltamperogramas del efecto de la velocidad de barrido sobre la corriente.	41
Figura 17. Efecto de la velocidad de barrido sobre la corriente de pico de bromhexina. Disolución 1×10^{-4} M, pH 6 y 5 min de agitación.	42
Figura 18. Voltamperogramas de pulso diferencial de bromhexina 5×10^{-5} M, 3 minutos de agitación (600 rpm)	43
Figura 19. Efecto del pH sobre el potencial de pico de bromhexina 5×10^{-5} M por voltamperometría de pulso diferencial. Cada punto representa el promedio de 3 medidas.....	44
Figura 20. Efecto del pH sobre la corriente de pico de bromhexina. Disolución 5×10^{-5} M, 3 min de agitación (600 rpm). Cada punto representa el promedio de 3 medidas.....	45
Figura 21. (A) Efecto de la agitación en la corriente de pico y (B) voltamperogramas de bromhexina a distintos tiempos de acumulación. Disolución 5×10^{-5} M, pH 6, agitación de 600 rpm.	46
Figura 22. Estudio de concentración de bromhexina.	47
Figura 23. Curvas de calibración para bromhexina. (A) Intervalo de trabajo: 6×10^{-6} a 3×10^{-5} M y (B) intervalo de trabajo: 1×10^{-5} a 1×10^{-4} M.	48
Figura 24. Voltamperogramas de pulso diferencial del estudio de repetibilidad. Disolución de bromhexina 5×10^{-5} M, pH 6 y 5 minutos de agitación (600 rpm)	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales de la voltamperometría cíclica.....	14
Tabla 2. Condiciones experimentales de la voltamperometría de pulso diferencial.	15
Tabla 3. Condiciones experimentales de la cronoculombimetría.	17
Tabla 4. Resultados de las corrientes de pico para los mediadores redox.	26
Tabla 5. Resultados de corrientes de pico para los mediadores redox con y sin agitación.	28
Tabla 6. Parámetros de los gráficos para la determinación de la capacitancia.	32
Tabla 7. Áreas electroactivas calculadas para los electrodos modificado y sin modificar, calculadas con dos mediadores redox.	33
Tabla 8. Fármacos estudiados con el electrodo modificado	39
Tabla 9. Corrientes de pico de la bromhexina con el electrodo modificado y no modificado.	40
Tabla 10. Datos del gráfico corriente de pico vs velocidad de barrido.	42
Tabla 11. Parámetros de las curvas de calibración.....	48
Tabla 12. Parámetros de eficiencia analítica.	50
Tabla 13. Parámetros analíticos de otras técnicas reportadas en la literatura.	51
Tabla 14. Porcentajes de recuperación de bromhexina*	52
Tabla 15. Cantidad encontrada de bromhexina en jarabe* empleando el método propuesto (VPD, EPC-LI).....	53
Tabla 16. Comparación de los resultados obtenidos para la cuantificación de bromhexina en jarabe, por VPD y HPLC	54

RESUMEN

En esta memoria se modificó una pasta de carbono convencional, agregando el líquido iónico 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato a grafito, obteniendo una pasta con proporción 59,2:40,8 (p/p) de grafito y líquido iónico, respectivamente. Utilizando esta superficie como electrodo de trabajo, el fármaco bromhexina presentó una señal anódica en disolución metanol/tampón Britton-Robinson 0,1 M (2,5:97,5 v/v), tanto en voltamperometría cíclica como voltamperometría de pulso diferencial en el intervalo de pH 2-6,5. Esta respuesta fue irreversible y controlada por adsorción de la especie electroactiva. El potencial de pico de oxidación de bromhexina tuvo una dependencia lineal respecto al pH de trabajo, con un punto de inflexión a pH 5, lo cual estaría relacionado con cambios en los equilibrios protonación-deprotonación de la especie electroactiva, con lo cual se estima que el pK_a voltamperométrico de la bromhexina es cercano a 5, valor cercano con lo reportado en la literatura. Desde el punto de vista analítico pH 6 fue la condición en la que se obtuvo una mejor reproducibilidad en la señal de corriente, por lo que se seleccionó como pH de trabajo para las medidas voltamperométricas.

El electrodo modificado con el líquido iónico se caracterizó empleando mediadores redox clásicos. En el caso del ferrocenometanol se obtuvo un incremento de 4,4 veces en el pico anódico y de 2,7 veces en el pico catódico vs el electrodo sin modificar. Con ferricianuro de potasio se obtuvo un incremento en la respuesta anódica de alrededor de 6 veces debido al efecto del líquido iónico. Por otra parte, al comparar el efecto del líquido iónico en la medición de bromhexina por voltamperometría cíclica vs la pasta sin modificar, se encontró que la señal voltamperométrica se incrementa alrededor de 24,5 veces con el electrodo modificado ($I_p = 7,49 \mu A$ vs $185,9 \mu A$, respectivamente, una disolución 1×10^{-4} M). Por otro lado se caracterizó

morfológicamente cada uno de estos electrodos por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), en la que se pudo observar que el líquido iónico permite obtener mejor calidad de imágenes, además la pasta mostró una mejor aglutinación y una superficie más homogénea.

En las condiciones experimentales seleccionadas (disolución metanol/tampón Britton-Robinson 0,1 M (2,5:97,5 v/v), pH 6), se desarrolló una metodología analítica empleando la técnica de voltamperometría de pulso diferencial. Se obtuvo una respuesta corriente-concentración en un amplio intervalo de concentraciones (6×10^{-6} - 1×10^{-4} M), describiéndose dos curvas de calibración, para los intervalos 6×10^{-6} - 3×10^{-5} M (r^2 : 0,99888; m: 995943 $\mu\text{A/C}$; intercepto: 0,597 μA) y 1×10^{-5} - 1×10^{-4} M (r^2 : 0,99711; m: 758767 $\mu\text{A/C}$; intercepto: 7,021 μA). Los límites de detección y cuantificación calculados fueron $1,9 \times 10^{-6}$ M y $3,4 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. La reproducibilidad del método desarrollado exhibió un coeficiente de variación de 5,1 % (en una disolución 5×10^{-5} M), lo que es un valor aceptable para ser un electrodo modificado.

En el ensayo de recuperación; en una matriz compuesta por sacarosa, metilparabeno y ácido cítrico anhidro; se obtuvieron porcentajes similares al valor real: 101 ± 2 % de la cantidad agregada, utilizando la curva de calibración de concentraciones elevadas y $102,3 \pm 1,6$ % utilizando la curva de concentraciones más bajas. En cuanto a la aplicación del método desarrollado, se cuantificó la cantidad de bromhexina en un jarabe comercial (4 mg/5 mL), y la cantidad encontrada fue $100,9 \pm 0,1$ % de lo declarado por el fabricante, utilizando la curva de calibración de concentraciones más altas y $100,3 \pm 1,1$ % utilizando la curva de concentraciones más bajas, además no se requiere un tratamiento previo de la muestra. Utilizando la prueba de t-student se comprobó que el promedio de este método no es significativamente diferente comparado con el promedio de las mediciones del mismo jarabe

por HPLC y que cada uno tampoco es significativamente diferente comparados con el valor nominal de 4 mg declarado por el fabricante.

SUMMARY

Behavior of bromhexine in carbon paste electrodes modified with ionic liquid and analytical development.

Conventional carbon paste was modified by adding 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (ionic liquid) at graphite, obtaining a paste with proportion 59.2:40.8 (w/w) of graphite and ionic liquid, respectively. Using this surface as a working electrode, the drug bromhexine had anodic response in methanol/0.1 M Britton-Robinson buffer solution (2.5:97.5 v/v) both by using cyclic voltammetry and by differential pulse voltammetry in the pH range 2-6.5. This response was irreversible and mainly controlled for adsorption of electroactive species. The peak potential had a linear dependence respect on the working pH, with an inflection point at pH 5, which could be related with changes in protonation-deprotonation equilibrium of the electroactive species, whereby an estimated pK_a voltammetric of the bromhexine is close to 5, similar value to that reported in the literature. From analytical point view at pH 6 was the condition which better reproducibility in the current signal was obtained, which was selected as working pH.

The modified electrode with ionic liquid was characterized using classic redox mediators. In the case of ferrocenemethanol an increase of 4.4 times in the anodic peak and of 2.7 times in the cathodic peak *versus* unmodified electrode was obtained. With potassium ferricyanide an increase in the anodic response about 6 times due to the effect of the ionic liquid was obtained. On the other hand, to compare the effect of the ionic liquid in the measurement of bromhexine by cyclic voltammetry versus unmodified paste was found that the voltammetric signal was increased about 24.5 times with the modified electrode ($i_p = 7.49 \mu A$ vs $185.9 \mu A$, respectively, 1×10^{-4} M solution). Each electrode was characterized morphologically by

scanning electron microscopy (SEM), in which it was possible to observe that the ionic liquid allows obtain better image quality, in addition the paste showed a better agglutination and most homogeneous surface.

In the selected experimental conditions (methanol/0.1 M Britton-Robinson buffer solution (2.5:97.5 v/v), pH 6), an analytical methodology using the differential pulse voltammetry technique was developed. A current-concentration response in a wide concentration range (6×10^{-6} - 1×10^{-4} M) was obtained, describing two calibration curves, in the ranges 6×10^{-6} - 3×10^{-5} M (r^2 : 0.99888, m: 995943 $\mu\text{A}/\text{C}$ intercept: 0.597 μA) and 1×10^{-5} - 1×10^{-4} M (r^2 : 0.99, m: 758767 $\mu\text{A}/\text{C}$, intercept: 7.021 μA). The detection and quantification limits calculated were 1.9×10^{-6} M and 3.4×10^{-6} M, respectively. The reproducibility of the developed method showed a variation coefficient of 5.1% (5×10^{-5} M solution), which is an acceptable value for a modified electrode.

Regarding the application of the developed method, the amount of bromhexine in syrup 4 mg/5 mL was measured. The amount found was 100.9 ± 0.1 % of the declared for the manufacturer, using the calibration curve of higher concentrations and 100.3 ± 1.1 %, using the curve of lower concentrations. In the recovery test similar percentage were obtained respect to reference value, these being 101 ± 2 % of the amount added, using the calibration curve of higher concentrations and 102.3 ± 1.6 % using the curve of lower concentrations, further pretreatment of the sample is not required. Using the t-student test found that the average of this method is not significantly different compared to the average of the measurements of the same syrup by HPLC and the value is also not significantly different compared to the value of 4 mg declared by manufacturer.

1. INTRODUCCIÓN

Entre los materiales más usados como electrodos de trabajo se encuentran el carbono y distintos metales, como platino u oro. Dentro de estos materiales los electrodos de carbono (carbón vítreo, pasta de carbono y fibra de carbono) son usados ampliamente en electroanálisis, principalmente porque poseen una amplia ventana de potencial, baja corriente de fondo, bajo costo, son químicamente inertes y útiles para distintas aplicaciones. Específicamente los electrodos de pasta de carbono ofrecen una superficie fácilmente renovable y modificable, bajo costo y baja corriente de fondo^{1,2}.

Típicamente los electrodos de pasta de carbono se preparan mezclando grafito con un aglutinante orgánico no electrolítico, como aceite mineral o parafina, entre otros¹⁻⁴. Este tipo de pasta fue utilizada por primera vez hace más de 50 años (1958)⁵ y desde entonces se ha vuelto uno de los materiales más utilizados para la preparación de electrodos⁶.

Los electrodos de pasta de carbono se pueden modificar con diversos materiales como polímeros y nanomateriales, entre otros¹. Uno de los modificadores más novedosos y que ha incrementado su uso de manera sostenida durante los últimos años son los líquidos iónicos. Durante los primeros años del siglo XXI había pocas publicaciones por año referentes a electrodos modificados con líquidos iónicos; eso cambió desde el año 2005, observándose un rápido aumento de este tipo de publicaciones, siendo estas 500 en el año 2010⁷. Este fenómeno ocurrió debido a investigaciones pioneras como las realizadas por Liu y cols.², Opallo y cols.⁸ y Maleki y cols.^{4,9}, quienes investigaron el efecto que tiene el líquido iónico al utilizarlo como modificador de electrodos de pasta de

carbono, tanto en la transferencia de electrones como en la determinación de un analito. Información más reciente muestra que el aumento de las publicaciones ha sido sostenido y se mantiene hasta el día de hoy, como se observa en la Figura 1.

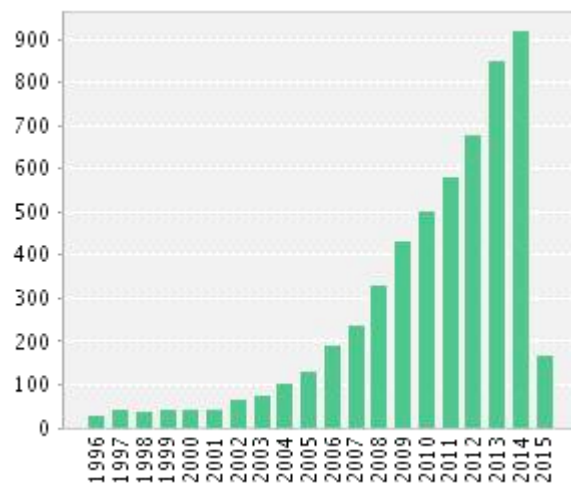


Figura 1. Evolución de las publicaciones de electrodos modificados con líquidos iónicos¹⁰

Los líquidos iónicos también conocidos como sales fundidas, están conformados completamente por aniones y cationes, el punto de fusión de la mayoría de los miembros de este grupo se encuentra por debajo de la temperatura ambiente^{6,11,12}, aunque la definición operacional fija sus puntos de fusión hasta los 100 °C¹². Normalmente están compuestos por un catión de gran tamaño y un anión pequeño, obteniéndose una baja tendencia a la cristalización, gracias a esto algunas de estas sales permanecen como líquidos a temperatura ambiente^{6,12,13}. Se puede observar la estructura de distintos líquidos iónicos en la Figura 2, que ejemplifica lo mencionado anteriormente.

La razón por la que se utilizan los líquidos iónicos, como material de interés para distintas aplicaciones químicas es debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, como

por ejemplo: excelentes propiedades de solvatación, alta conductividad, baja volatilidad, estabilidad térmica y química, baja toxicidad, amplia ventana electroquímica y una buena estabilidad electroquímica^{2,6,12-15}.

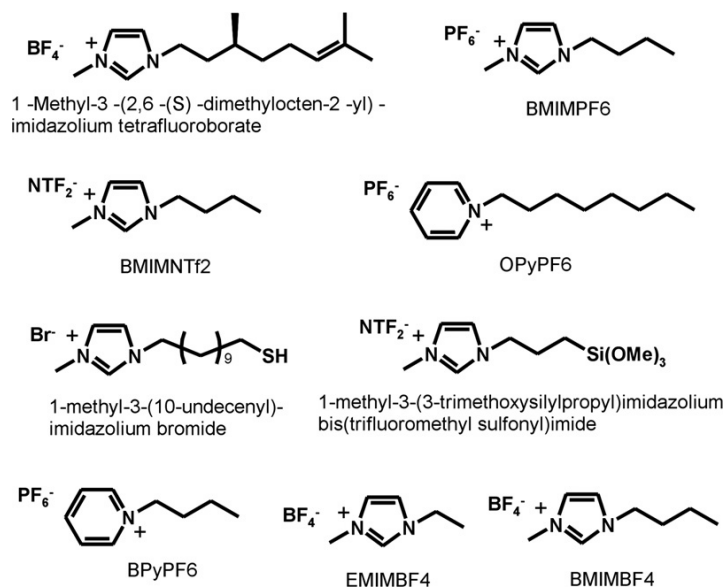


Figura 2. Estructura de algunos líquidos iónicos utilizados para modificar electrodos.

Diferentes estudios han demostrado el efecto que ejerce el líquido iónico como modificador de electrodos, utilizando para esto un electrodo de pasta de carbono modificado con líquido iónico (EPC-LI) y comparando la respuesta obtenida con la de un electrodo de pasta de carbono sin modificar (EPC), tanto en la determinación de un analito, como en la calidad e intensidad de la señal obtenida. Sun y cols.¹⁶ reportaron un aumento de 27,5 veces en la señal de la rutina (un flavonoide de origen natural) al utilizar un EPC-LI *versus* el EPC, con lo que se disminuyeron los límites de detección. Así mismo encontraron una mejoría en la reversibilidad de la reacción electródica, siendo más reversible con el EPC-LI. Safavi y cols.⁹ desarrollaron un método para la determinación

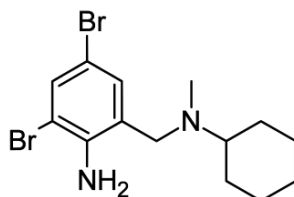
simultánea de paracetamol y p-aminofenol en formulaciones farmacéuticas, logrando establecer un método sensible y preciso para la determinación de ambos analitos. Se pudo observar una menor separación entre los potenciales de pico, una mayor velocidad en la transferencia de electrones y mayores corrientes de pico, en comparación al electrodo sin modificar, indicando por tanto una mejoría en la reacción electroquímica y la cinética. ShangGuan y Zhang¹⁷ también estudiaron el paracetamol, obteniendo resultados similares a los encontrados por el grupo de Safavi; la respuesta de corriente del paracetamol fue 9 veces mayor utilizando un EPC-LI en vez del EPC, se obtuvo una mejor reversibilidad y sensibilidad al utilizar el electrodo modificado y el método desarrollado presentó buena selectividad, no interfiriendo en la medición del paracetamol los excipientes típicos que se encuentran en una forma farmacéutica.

A nivel local; específicamente en este mismo laboratorio; se han realizado estudios previos sobre el efecto que tiene el líquido iónico como modificador de electrodos. En uno de ellos se obtuvo buenos resultados en la cuantificación de levodopa, obteniéndose un efecto catalítico y bajos límites de cuantificación y detección al utilizar un electrodo de pasta de carbono modificado con un líquido iónico¹⁸. Además, también se obtuvo buenos resultados en el estudio de la metildopa utilizando un electrodo de carbono vítreo modificado con un líquido iónico y con nanotubos de carbono, obteniéndose un efecto catalítico, bajos límites de cuantificación y detección y buena reproducibilidad; adicionalmente se aplicó el método desarrollado en la cuantificación de metildopa en muestras de orina¹⁹

Tomando en cuenta la información anteriormente expuesta, en esta Memoria se pretende aprovechar las características únicas de los líquidos iónicos y la información que se encuentra en la literatura sobre estos, para desarrollar un electrodo de pasta de

carbono modificado con un líquido iónico, con el objetivo de estudiar el comportamiento voltamperométrico de un fármaco modelo de conocida actividad redox, la bromhexina y además poder desarrollar una metodología analítica que permita determinar este fármaco en distintas matrices, utilizando para estos propósitos distintas técnicas voltamperométricas, con el fin de desarrollar un método con mejores parámetros analíticos en comparación con los de anteriores metodologías electroanalíticas, encontradas en la literatura para la determinación de bromhexina²⁰.

La bromhexina (Figura 3) es un agente mucolítico utilizado en enfermedades respiratorias asociadas con una mucosidad excesiva o demasiado viscosa, se ha visto



que mejora la penetración de ciertos antibióticos en el tejido bronquial, así como los síntomas en pacientes ancianos con crisis agudas de enfermedades respiratorias crónicas²¹.

Figura 3. Estructura química de la bromhexina.

En la literatura se pueden encontrar diversos métodos para la determinación de bromhexina en formulaciones farmacéuticas, como por ejemplo la colorimetría²², la espectrofotometría²³⁻²⁹, el análisis por inyección de flujo con detección potenciométrica³⁰, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)³¹⁻³³, la cromatografía electrocinética³⁴ y la isotacoforesis³⁵. También se ha determinado este fármaco en matrices biológicas como sangre, suero u orina por electroforesis capilar³⁶, cromatografía líquida de alta eficiencia

(HPLC)³⁷ y cromatografía líquida acoplada a masa con ionización por electrospray³⁸, respectivamente.

Desde un enfoque electroquímico, la bromhexina ha sido estudiada por HPLC con detección potenciométrica³¹, con un electrodo con membrana de PVC selectivo para la bromhexina basado en bromhexinio tetrafenilborato³⁹ y también ha sido estudiado su comportamiento voltamperométrico con un electrodo de carbón vítreo⁴⁰. A pesar de que anteriormente ha sido analizado el comportamiento voltamperométrico de la bromhexina, es importante volver a analizar su conducta en una nueva superficie, debido a que ésta (y por lo tanto el desarrollo de una metodología analítica) depende del material del electrodo de trabajo, ya que un mismo compuesto puede dar distintas señales o de distinta intensidad dependiendo de la superficie con la que se estudie.

Basado en todo lo mencionado anteriormente, se conoce que la bromhexina es un fármaco con reconocida actividad redox, por lo que se pretende emplearlo como modelo para analizar su comportamiento voltamperométrico con un electrodo de pasta de carbono modificado con líquido iónico (EPC-LI), ya que es una superficie en la que no se ha analizado antes este fármaco.

HIPÓTESIS

En función de las reconocidas propiedades de los líquidos iónicos; como su alta conductividad; la modificación de un electrodo de carbono con un líquido iónico mejorará el rendimiento electroanalítico, para cuantificar bromhexina en bajas concentraciones y en formulaciones farmacéuticas.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un nuevo electrodo modificado en base a pasta de carbono y un líquido iónico, para mejorar la sensibilidad y/o la selectividad de los electrodos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar electrodos de pasta de carbono modificados con un líquido iónico.
2. Evaluar la superficie y los procesos de transferencia de electrones en los nuevos electrodos modificados.
3. Determinar el papel del líquido iónico en la electroactividad y la morfología de los electrodos resultantes.
4. Desarrollar una metodología analítica para cuantificar bromhexina.
5. Aplicar el método desarrollado para cuantificar bromhexina en una formulación farmacéutica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Líquidos iónicos y fármaco

a) Líquido iónico: 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (Aldrich®) $\geq 97,0\%$ (HPLC)

Fórmula empírica: $C_8H_{15}F_6N_2P$

Masa molar: 284,18 g/mol

Densidad: 1,38 g/mL a 20 °C

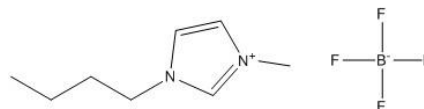


b) Líquido iónico: 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato (Aldrich®) $\geq 98,0\%$

Fórmula empírica: $C_8H_{15}BF_4N_2$

Masa molar: 226,02 g/mol

Densidad: 1,21 g/mL a 20 °C



c) Fármaco: bromhexina, Laboratorios Labomed, Santiago, Chile (99,8 %
cromatográficamente pura)

Nombre IUPAC: 2,4-dibromo-6-[[ciclohexil(metil)amino]metil]anilina

Fórmula empírica: $C_{14}H_{20}Br_2N_2$

Masa Molar: 376,13 g/mol

2.1.2 Reactivos y disolventes

- Aceite mineral para espectroscopia IR, Sigma-Aldrich
- Acetonitrilo grado gradiente para cromatografía en fase líquida, Merck

- Ácido acético glacial para análisis, Merck
- Ácido bórico para análisis, Merck
- Ácido cítrico anhidro
- Ácido clorhídrico para análisis, Fisher Chemicals
- Ácido ortofosfórico 85,0 % para análisis, Merck
- Agua calidad ultrapura, Milli-Q
- Cloruro de potasio para análisis, Merck
- Ferricianuro de potasio 99 %, Merck
- Ferrocenometanol 97 %, Merck
- Fosfato monobásico de sodio, Merck
- Grafito grado 38, Fisher Chemicals
- Hidróxido de sodio pellets para análisis, Merck
- Metanol grado gradiente para cromatografía en fase líquida, Merck
- Metilparabeno
- Sacarosa (como azúcar comercial)
- Solución Buffer, calibrador pH-metro pH 4, Certipur®
- Solución Buffer, calibrador pH-metro pH 7, Certipur®

2.1.3 Material de vidrio

Todo el material de vidrio utilizado fue de clase A

2.1.4 Material Instrumental de uso general

- Filtro para jeringa desechable Chromafil® Xtra PTFE-45/25, Macherey-Nagel
- Micropipeta de 200 µL, Brand
- Micropipeta de 1000 µL, Eppendorf

- Micropipeta de 1000 μ L Pos-D ,Rainin
- Mortero de ágata

2.1.5 Equipos

a) Sistema voltamperométrico

- Analizador electroquímico CH Instruments 1030B
- Celda electroquímica de 10 mL
- Electrodo de trabajo: electrodo de pasta de carbono y electrodo de pasta de carbono modificado con líquido iónico
- Electrodo de referencia: Ag/AgCl_(sat)
- Electrodo auxiliar: platino

b) Sistema HPLC

- Jasco LC Net II equipado con una bomba de gradiente cuaternaria (PU-2089 U Plus), un detector de fotodiodo (MD-2018), un detector de fluorescencia (FP-2020) y un termostato de columna (CO-2060).
- Columna C-18 de fase reversa Kinetex-Phenomenex, Torrance, CA, USA

c) Otros equipos

- Agitador magnético Standard Multi-Position Stirrer
- Balanza analítica Radwag®
- Ultrasonido VWRSymphony
- Estufa Drying Oven
- pH-metro WTW

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

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparación de las disoluciones

a) Disoluciones tampón

Para los experimentos voltamperométricos se utilizó tampón Britton-Robinson 0,1 M, el que fue preparado pesando 6,2 g de ácido bórico y disueltos en agua Milli-Q en un matraz aforado de 1000 mL, luego se tomó con pipeta graduada 6,8 mL de ácido ortofosfórico y 5,8 mL de ácido acético, agregándolos al matraz de 1000 mL y se aforó al volumen final con agua Milli-Q. Posteriormente, para ajustar al pH deseado se utilizaron disoluciones concentradas de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

Para los experimentos en HPLC se utilizó tampón fosfato 0,01 M, pH 3; para esto se pesaron 1,286 g de fosfato monobásico de sodio y se disolvieron en 900 mL de agua Milli-Q, se ajustó al pH deseado con ácido ortofosfórico y se llevó a 1000 mL con agua Milli-Q.

b) Disolución madre del fármaco

Se pesaron 154 mg de bromhexina y se disolvieron en metanol con ayuda de 4 min de sonicación, llevándose a un volumen de 10 mL en un matraz aforado ámbar, obteniéndose una disolución de concentración $4,1 \times 10^{-2} \text{ M}^{40}$.

Para las mediciones con HPLC se pesó 1 mg de bromhexina y se disolvieron en metanol con ayuda de 4 min de sonicación, llevándose a un volumen de 10 mL en un matraz aforado ámbar.

c) Disoluciones de trabajo

Bromhexina

Para los experimentos voltamperométricos se diluyeron volúmenes adecuados de la disolución madre en un matraz aforado ámbar de 10 mL, con una mezcla de metanol y tampón Britton-Robinson 0,1 M, en una proporción de 2,5:97,5 v/v.

Para los experimentos con HPLC se diluyeron volúmenes adecuados de la disolución madre en un matraz aforado ámbar de 10 mL con metanol. Una porción de la disolución se filtró con un filtro para jeringa desechable (tamaño de poro de 0,45 μm y diámetro 25 mm), finalmente 20 μL de la disolución filtrada se inyectaron en el equipo.

Ferrocenometanol

Se pesaron 2,16 mg de ferrocenometanol y se disolvieron en tampón Britton-Robinson 0,1 M pH 7,4 en un matraz aforado ámbar de 10 mL con ayuda de sonicación, obteniéndose una disolución de concentración 1×10^{-3} M.

Ferricianuro de potasio

Se pesaron 3,29 mg de ferricianuro de potasio y se disolvieron en tampón Britton-Robinson 0,1 M pH 7,4 en un matraz aforado ámbar de 10 mL con ayuda de sonicación, obteniéndose una disolución de concentración 1×10^{-3} M.

2.2.2 Preparación de las pastas de trabajo

Pasta no modificada

Se pesaron 0,28 g de grafito a los cuales se les agregó 0,12 g aceite mineral (142,8 μL), se mezcló mecánicamente durante 30 min en un mortero de ágata y se obtuvo una pasta con una proporción de grafito y aceite mineral de 70:30 (p/p).

Pasta modificada

Se pesaron 0,56 g de grafito, a los cuales se les agregó 0,3864 g del líquido iónico (280 μL), se mezcló mecánicamente durante 30 min en un mortero de ágata y se obtuvo una pasta con una proporción de grafito y líquido iónico de 59,2:40,8 (p/p).

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Voltamperometría cíclica

a) Condiciones experimentales

Electrodo de trabajo: electrodo de pasta de carbono no modificado y electrodo de pasta de carbono modificado.

Electrodo de referencia: $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$

Electrodo auxiliar: platino

En la Tabla 1 se resumen las condiciones experimentales para cada analito.

Tabla 1. Condiciones experimentales de la voltamperometría cíclica.

	Ferrocenometanol	Ferricianuro de K	Bromhexina
Potencial inicial (V)	-0,4	-0,4	0
Potencial máximo (V)	0,8	0,8	1,9
Potencial mínimo (V)	-0,4	-0,4	0
Polaridad	Positiva	Positiva	Positiva
Velocidad de barrido (V/s)	0,1	0,1	0,1
Intervalo de muestreo (V)	0,008	0,008	0,008
Tiempo de reposo (s)	2	2	2
Sensibilidad (A/V)	1×10^{-3}	1×10^{-3}	1×10^{-3}

b) Estudio de los analitos

Para realizar las mediciones se agregaron en una celda electroquímica 5 mL de la disolución correspondiente, ferrocenometanol 1×10^{-3} M, ferricianuro de potasio 1×10^{-3} M o bromhexina 1×10^{-4} M.

c) Efecto de la velocidad de barrido

Para determinar el efecto de la velocidad de barrido, se midió una disolución de bromhexina 1×10^{-4} M a pH 6, variando la velocidad de barrido en el intervalo de 0,1-1 V/s y registrando los voltamperogramas y las corrientes de pico para cada medición. Posteriormente se graficó la corriente de pico vs la velocidad de barrido.

d) Determinación de la capacitancia

Se realizaron mediciones por voltamperometría cíclica a una disolución de tampón Britton-Robinson 0,1 M pH 7,4, variando la velocidad de barrido en cada medición en el intervalo de 0,1-1 V/s. Se escogió un punto de potencial determinado, en este caso 0,1 V, se realizó una diferencia de las corrientes determinadas en ese punto para ambos

segmentos del voltamperograma cíclico, para luego graficar estas diferencias de corrientes vs la velocidad de barrido, siendo la pendiente de este gráfico la capacitancia. Se realizó este procedimiento para ambas pastas.

2.3.2 Voltamperometría de pulso diferencial

a) Condiciones experimentales

Electrodos de trabajo: electrodo de pasta de carbono modificado y electrodo de pasta de carbono no modificado. En cada nueva medición se renovó y pulió la superficie del electrodo con papel de pesar, hasta obtener una superficie homogénea.

Electrodo de referencia: $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$

Electrodo auxiliar: platino

En la Tabla 2 se presentan las condiciones experimentales de esta técnica.

Tabla 2. Condiciones experimentales de la voltamperometría de pulso diferencial.

Potencial inicial (V)	0
Potencial final (V)	1,5
Incremento de potencial (V)	0,008
Amplitud (V)	0,1
Ancho de pulso (s)	0,1
Ancho de muestreo (s)	0,1
Periodo de pulso (s)	0,2
Tiempo de reposo (s)	2
Sensibilidad (A/V)	1×10^{-3}

b) Estudio de concentración

Para esto se tomó un volumen adecuado de la disolución madre del fármaco hacia un matraz de 10 mL, aforando con una mezcla de metanol y tampón Britton-Robinson 0,1 M al pH deseado, en una proporción 2,5:97,5 v/v, respectivamente. Estas mediciones se realizaron con el electrodo modificado en estudio en este trabajo.

c) Estudio de pH

A una disolución de trabajo de bromhexina 5×10^{-5} M se le modificó el pH en el intervalo de 2 a 6,5; agregando cantidades necesarias de disoluciones de HCl o NaOH concentradas para obtener el pH deseado. Las mediciones se realizaron con el electrodo modificado en estudio en este trabajo.

d) Estudio de acumulación

A una disolución de bromhexina 5×10^{-5} M a pH 6 se realizaron mediciones a distintos tiempos de agitación con un agitador magnético, desde 1 hasta 7 min.

2.3.3 Cronoculombimetría

a) Condiciones experimentales

Electrodo de trabajo: electrodo de pasta de carbono no modificado y electrodo de pasta de carbono modificado

Electrodo de referencia: Ag/AgCl

Electrodo auxiliar: platino

En la Tabla 3 se pueden observar las condiciones experimentales de la técnica.

Tabla 3. Condiciones experimentales de la cronoculombimetría.

Potencial inicial (V)	Potencial final (V)	Ancho de pulso (s)	Intervalo de muestreo (s)	Tiempo de reposo (s)	Sensibilidad (A/V)
0	1	0,25	$2,5 \times 10^{-4}$	2	1×10^{-3}

b) Determinación de las áreas electroactivas

Para esto se midieron por separado disoluciones de ferricianuro de potasio y ferrocenometanol, ambas 1×10^{-3} M y pH 7,4; se agregaron 5 mL de cada una en una celda electroquímica. Para obtener la información necesaria para el cálculo del área electroactiva, teniendo abierto el voltamperograma correspondiente se modificó el dato carga y tiempo, obteniéndose un nuevo voltamperograma de carga vs raíz del tiempo, a partir del cuál se obtiene el valor de la pendiente. A través de la ecuación de Anson se obtuvo el valor del área electroactiva, la ecuación utilizada se muestra a continuación

$$Qt = \left[\frac{2nFAC\sqrt{tD_0}}{\sqrt{\pi}} \right] + Qdl + NFA$$

A partir de esta ecuación se despeja el área usando la pendiente, obteniendo la siguiente ecuación:

$$A = \left[\frac{(SLp\sqrt{\pi})}{(2nFC\sqrt{D_0})} \right]$$

Donde:

A: área en cm^2

SLp: Pendiente del gráfico de Anson (Carga vs raíz del tiempo)

n: número de equivalentes/mol

F: 96485,309 Coulomb/equivalente

C: Concentración de la disolución en mol/cm³

D₀: 7,6×10⁻⁶ cm²/s para el ferricianuro de potasio^{19 - 41} y 7×10⁻⁶ cm²/s para el ferrocenometanol⁴².

2.3.4 Morfología de los electrodos

Se obtuvieron imágenes de la pasta modificada con líquido iónico como también de la pasta sin modificar, utilizando un microscopio de barrido electrónico FEI Inspect F50, con los siguientes parámetros:

Voltaje de aceleración de electrones: 25,00 kV

Magnificación: 50.000x – 25.000x – 10.000x – 5.000x – 2.500x – 1.000x – 500x

Detección: Detector Everhart-Thornley (ETD)

Ancho del campo horizontal (HFW): 5,97 μm

Distancia de trabajo (WD): 4,7 – 5,0 mm

Tamaño del lugar (spot size): 3,0

2.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA

2.4.1 Estudio de concentración

Para la preparación de la curva de calibración de bromhexina se realizaron medidas entre las concentraciones estudiadas de 6×10^{-6} M a 1×10^{-4} M, registrándose el voltamperograma para cada uno de los puntos seleccionados y los valores de corrientes de pico obtenidos.

2.4.2 Estudio de repetibilidad

Una disolución de bromhexina 5×10^{-5} M a pH 6 se midió 10 veces consecutivas por voltamperometría de pulso diferencial, agregando 5 mL de esta disolución en una celda electroquímica. Se calculó el coeficiente de variación en función de la corriente de pico como parámetro estadístico para conocer la dispersión de los puntos.

2.4.3 Cálculo del límite de detección y de cuantificación

Para esto se midieron por triplicado los tres puntos más bajos de la curva de calibración inicial de 1×10^{-5} a 1×10^{-4} M. Al graficar el promedio de la corriente de pico vs concentración, se obtuvo una curva en la que la pendiente era mayor que en la curva de calibración, por lo que se hizo una nueva curva de calibración a concentraciones más bajas, encontrándose una relación lineal entre 6×10^{-6} M y 3×10^{-5} M. Al graficar corriente de pico vs concentración e interpolando el valor de la concentración a 0 se obtuvo la respuesta estimada del blanco; al realizar el gráfico de desviación estándar vs concentración e interpolando el valor de la concentración a 0 se obtuvo la desviación estándar estimada del blanco. Con estos resultados se calcularon los límites de detección y cuantificación con las siguientes fórmulas⁴³:

$$LD = \left[\frac{Y_b + 10SD_b}{m} \right] \quad LD = \left[\frac{Y_b + 3SD_b}{m} \right]$$

Y_b : Respuesta estimada del blanco

SD_b : Desviación estándar el blanco

m : Pendiente de la curva de calibración

2.4.4 Ensayo de recuperación

Para esto se utilizaron los excipientes del jarabe declarados por el fabricante, pesándose 3,3 g de sacarosa, 0,05 g de ácido cítrico anhidro y 0,05 g de metilparabeno. Se traspasaron todos los componentes a un matraz ámbar de 50 mL, se ayudó a la disolución con 8 min de sonicación, completando a volumen final con agua Milli-Q. Posteriormente se tomaron volúmenes adecuados de la disolución de excipientes y de la disolución madre de bromhexina, para obtener una disolución final de 5 mL con una concentración de bromhexina de 4 mg/5 mL, para así simular la concentración presente en el jarabe comercial.

De esta disolución se tomaron 200 μ L hacia un matraz ámbar de 10 mL, aforando con una mezcla de metanol/tampón Britton-Robinson 0,1 M 2,5:97:5 v/v, pH 6, para obtener una disolución con concentración de $4,25 \times 10^{-5}$ M (concentración dentro del intervalo de la curva A), este procedimiento fue realizado 5 veces. Para obtener disoluciones con concentraciones más bajas se tomaron 40 μ L de la disolución de 4 mg/5 mL hacia un matraz ámbar de 10 mL, aforando con una mezcla de metanol/tampón Britton-Robinson 0,1 M 2,5:97:5 v/v, pH 6, para obtener una disolución con concentración $8,5 \times 10^{-6}$ M (concentración dentro del intervalo de la curva B), realizando este procedimiento 5 veces. Las 5 disoluciones preparadas para cada concentración fueron medidas por voltamperometría de pulso diferencial, traspasando 5 mL de cada una a una celda electroquímica.

2.4.5 Aplicación a la cuantificación de bromhexina en jarabe comercial

Se utilizó un jarabe de bromhexina obtenido comercialmente, “bromhexina clorhidrato 4 mg/5 mL, 100 mL, Mintlab”.

Para esto se tomó 1 mL del jarabe hacia un matraz ámbar de 50 mL, aforando con una mezcla de metanol/tampón Britton Robinson 0,1 M 2,5:97,5 v/v, pH 6. Este procedimiento se realizó para preparar tanto la muestra como la contra muestra, obteniéndose dos disoluciones con una concentración teórica de $4,25 \times 10^{-5}$ M (concentración dentro del intervalo de la curva A). De forma separada se midió cada una de estas disoluciones, traspasando 5 mL a una celda electroquímica y realizando un barrido entre 0 y 1,5 V, por voltamperometría de pulso diferencial.

Posteriormente, de manera independiente se tomaron 2 mL de cada una de las disoluciones anteriores hacia un matraz ámbar de 10 mL, aforando con una mezcla de metanol/tampón Britton Robinson 0,1 M 2,5:97,5 v/v, pH 6 obteniéndose dos disoluciones con una concentración teórica de $8,5 \times 10^{-6}$ M. (concentración dentro del intervalo de la curva B) Se midió cada una de estas disoluciones por separado, traspasando 5 mL a una celda electroquímica y midiendo por voltamperometría de pulso diferencial.

2.4.6 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

a) Condiciones experimentales

Fase Móvil: acetonitrilo/tampón fosfato 0,01 M, pH 3, 30:70 v/v.

Velocidad de Flujo: 1 mL/min

Temperatura: 40 °C

Volumen de inyección: 20 μ L

Longitud de onda: 245 nm

b) Determinación de bromhexina en jarabe

Como método comparativo se utilizó HPLC⁴⁰, preparando una fase móvil compuesta de acetonitrilo y tampón fosfato 0,01 M, pH 3, 30:70 v/v, respectivamente.

Para preparar la muestra de jarabe, se tomaron 200 μ L de éste hacia un matraz ámbar de 10 mL, aforando con metanol, obteniéndose una concentración teórica de $4,25 \times 10^{-5}$ M. Se filtró una porción de esta disolución con un filtro para jeringa desechable (tamaño de poro de 0,45 μ m y diámetro 25 mm) y se inyectaron 20 μ L de la disolución filtrada en el equipo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DEL ELECTRODO MODIFICADO

3.1.1 Antecedentes

El proceso para la confección de un nuevo electrodo de pasta de carbono modificado con un líquido iónico, comenzó utilizando el líquido iónico 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato (BMImiBF₄). Con este electrodo no se obtuvo buenos resultados cuando se ensayaron porcentajes de líquido iónico entre 10 y 30 % y sin reemplazar el aceite mineral de la mezcla. Con este electrodo modificado se ensayaron distintos fármacos con reconocida actividad redox, a modo de prueba en esta nueva superficie, como loratadina, desloratadina y oseltamivir, no observándose la aparición de ninguna señal voltamperométrica. Cuando se ensayó con paracetamol sí se obtuvo una respuesta anódica, pero la diferencia entre usar el electrodo modificado y el electrodo no modificado fue casi nula, siendo similares los valores de las corrientes de pico.

Debido a estos resultados y recabando la información bibliográfica pertinente, para encontrar la mejor pasta para estudiar el paracetamol (u otro fármaco), se encontró que en el trabajo de Safavi y cols.⁹ utilizaron el líquido iónico sintetizado por ellos 1-octilpiridinio hexafluorofosfato, para cuantificar simultáneamente paracetamol y p-aminofenol. De manera similar, los mismos autores ensayaron distintos líquidos iónicos en la preparación de electrodos de pasta de carbono⁴. Al realizar el procedimiento que ellos describen para preparar el electrodo modificado, pero aplicándolo a los líquidos iónicos presentes en el laboratorio (1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato, 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato y 1-butil-4-metilpiridinio hexafluorofosfato), no se obtuvo una buena aglutinación con la mayoría de estos (incluso después de calentar) y la pasta

se desprendió del electrodo a la disolución, mientras se realizaba la medida voltamperométrica. Sólo el 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (BMImiPF₆) fue capaz de mantenerse estable al sumergirse el electrodo modificado en la disolución y aplicar el potencial necesario para producir la oxidación del paracetamol. Además de esta ventaja fisicoquímica, según lo reportado en el mismo trabajo⁴ sólo con los líquidos iónicos que poseen un sistema de electrones π se obtuvieron electrodos modificados con baja resistencia (valores similares a los encontrados en carbono vítreo) y que además esta interacción con el grafito ocurre en los líquidos iónicos que contienen el grupo imidazolio en su estructura. En base a lo anterior y para aprovechar las dos ventajas descritas anteriormente, es que se decidió continuar los experimentos utilizando este líquido iónico, en la proporción que propusieron en el trabajo antes mencionado⁴: 70/30 p/p de grafito y líquido iónico, respectivamente, logrando reemplazar de esta forma todo el aceite mineral de la pasta.

Aún con este nuevo electrodo no se obtuvieron mejoras significativas en la cuantificación del paracetamol. A pesar de esto, al medir un mediador redox como ferrocenometanol, se obtenía una respuesta adecuada con la pasta, tanto en el valor de corriente de pico como en la definición de la señal; además se obtenía una pasta con la estabilidad adecuada para trabajar en un amplio intervalo de potencial (0 a 2 V), por lo que se decidió seguir con este electrodo pero buscando las condiciones y el fármaco adecuado para obtener una respuesta óptima. De esa manera y basándose en el trabajo de ShangGuan y Zhang¹⁷ es que se decidió utilizar un 41 % (p/p) de BMImiPF₆, ya que con este líquido iónico se logró reemplazar todo el aceite mineral de la pasta y además medir con buena sensibilidad el paracetamol. Utilizando esta pasta como base, se volvió a ensayar todos los fármacos nombrados anteriormente más algunos nuevos, también de

reconocida actividad redox (loratadina, desloratadina, oseltamivir, modafinilo y atomoxetina), no logrando obtener señal en ninguno de ellos. Sin embargo al medir el fármaco bromhexina se obtuvo una señal similar a la descrita previamente en carbono vítreo⁴⁰, pero con valores de corriente mucho mayores a los reportados en ese trabajo; por lo que se decidió concentrar el estudio en la bromhexina para describir su comportamiento voltamperométrico y desarrollar una metodología analítica en esta nueva superficie.

3.1.2 Efecto del líquido iónico

En el proceso de caracterizar el electrodo en estudio de este trabajo, es importante determinar cuál es el papel que cumple el líquido iónico en la respuesta obtenida, por lo que se realizaron ensayos comparativos entre el electrodo modificado y el electrodo sin modificar. Para tal efecto se utilizaron los mediadores redox clásicos ferrocenometanol y ferricianuro de potasio. En la Figura 4 se presentan los voltamperogramas comparativos entre ambas pastas, en tanto que los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.

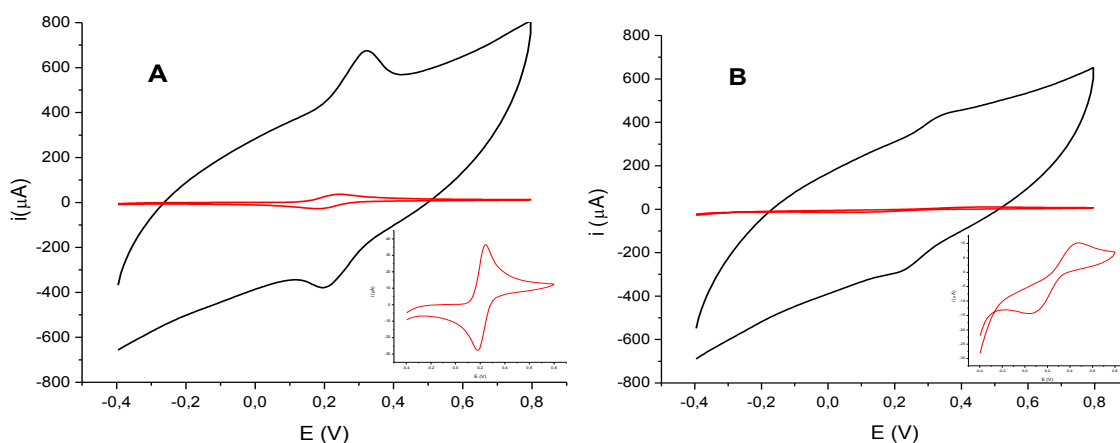


Figura 4. Voltamperogramas cíclicos para (A) ferrocenometanol y (B) ferricianuro de potasio con los electrodos modificado (EPC-LI —) y no modificado (EPC —). Ambas disoluciones 1×10^{-3} M, pH 7,4, 5 minutos de agitación (600 rpm) y 0,1 V/s como velocidad de barrido.

Tabla 4. Resultados de las corrientes de pico para los mediadores redox.

Tipo de electrodo	Ferrocenometanol		Ferricianuro de potasio	
	i_{pa} (μA)	i_{pc} (μA)	i_{pa} (μA)	i_{pc} (μA)
Electrodo modificado	159,3	-82,84	44,48	n.i.
Electrodo no modificado	36,07	-30,97	7,918	n.i.

i_{pa} : corriente de pico anódica

i_{pc} : corriente de pico catódica

n.i.: señal no integrable

En el caso del ferrocenometanol se obtuvo un incremento de 4,4 veces en el pico anódico y de 2,7 veces en el pico catódico con el electrodo modificado vs el sin modificar, por lo que se puede estimar que hay una influencia importante del líquido iónico en el aumento de la respuesta obtenida, ya que el procedimiento y las condiciones experimentales en ambos casos fueron las mismas.

Para el ferricianuro de potasio se observa un aumento de 5,6 veces de la señal, gracias al efecto del líquido iónico. Por otra parte, la cantidad de veces que crece la señal entre un electrodo y otro es mayor en el ferricianuro de potasio, en comparación con el ferrocenometanol. Por el contrario, este último es el que exhibe un mayor valor absoluto de corriente de pico, siendo 3,6 veces mayor la corriente obtenida en el ferrocenometanol que en el ferricianuro de potasio, ambas medidas con el electrodo modificado; por lo que a una misma concentración de ambos analitos, el electrodo en estudio obtiene una mejor respuesta, tanto en la corriente de pico como en la definición de la señal para el ferrocenometanol, tanto es así que en el ferricianuro de potasio la señal catódica no es integrable o medible por el equipo, tal como se puede observar en la Figura 4B.

3.1.3 Efecto de la agitación

Se analizó la influencia que tiene la agitación en la respuesta obtenida con los mediadores redox, midiendo el ferrocenometanol y el ferricianuro de potasio con el electrodo de pasta de carbono modificado y no modificado, con agitación y sin agitación, para así ver la influencia en cada caso. En la Figura 5 se presentan los voltamperogramas.

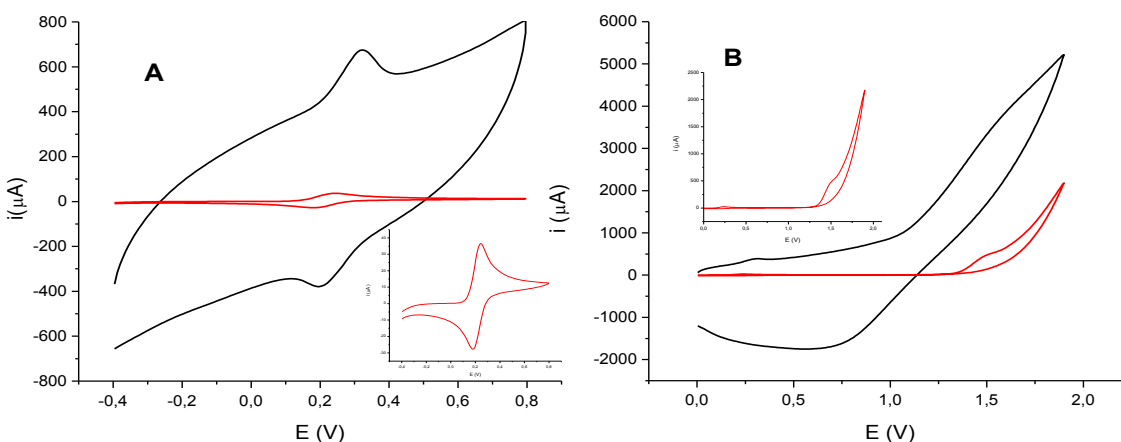


Figura 5. Voltamperogramas cíclicos para ferrocenometanol 1×10^{-3} M, pH 7,4 (A) agitando 5 min (600 rpm) y (B) sin agitar, para ambos tipos de electrodos: modificado (EPC-LI —) y no modificado (EPC —).

En primer lugar, al realizar las mediciones en ferrocenometanol con el electrodo no modificado, el pico anódico aumenta 1,5 veces, por lo que la agitación tiene cierta influencia pero no es tan importante en el electrodo no modificado; mientras que en el electrodo modificado hubo un aumento de 3,6 veces en el pico anódico. Al analizar el pico catódico, en el electrodo no modificado hay un aumento de 3,3 veces al agitar, mientras que en el electrodo modificado sin agitación no se logra apreciar un pico catódico definido, lo cual cambia drásticamente al agitar por 5 min, ya que aparece una señal que antes no

se lograba observar. Esto demuestra que el efecto de la agitación en el electrodo modificado en estudio es muy importante, ya que logra aumentar varias veces la señal anódica y hace aparecer la señal catódica. En ambos casos el aumento es mejor que su contraparte con el electrodo no modificado; se presenta esta información de manera resumida en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de corrientes de pico para los mediadores redox con y sin agitación.

Tipo de electrodo	Ferrocenometanol				Ferricianuro de potasio			
	Sin agitar		Agitando 5 min		Sin agitar		Agitando 5 min	
	$i_{pa}(\mu A)$	$i_{pc}(\mu A)$	$i_{pa}(\mu A)$	$i_{pc}(\mu A)$	$i_{pa}(\mu A)$	$i_{pc}(\mu A)$	$i_{pa}(\mu A)$	$i_{pc}(\mu A)$
Electrodo modificado	44,36	n.i.	159,3	-82,84	20,47	n.i.	44,48	n.i.
Electrodo no modificado	24,11	-9,268	36,07	-30,97	7,334	n.i.	7,918	n.i.

i_{pa} : corriente de pico anódica

i_{pc} : corriente de pico catódica

n.i.: señal no integrable

En el caso de ferricianuro de potasio, al analizar el pico anódico se observa en el electrodo no modificado un aumento de 1,1 veces de la señal, por lo que no hay un aumento significativo de esta, siendo prácticamente la misma, lo que también se puede observar en la Figura 6B; mientras que en el electrodo modificado se presenta un aumento de 2,2 veces en la corriente, por lo que hay un efecto mayor de la agitación en comparación al electrodo no modificado. Se puede observar en la Figura 6A, que junto al aumento en corriente hay una mejoría en la definición de la señal gracias al efecto de la agitación.

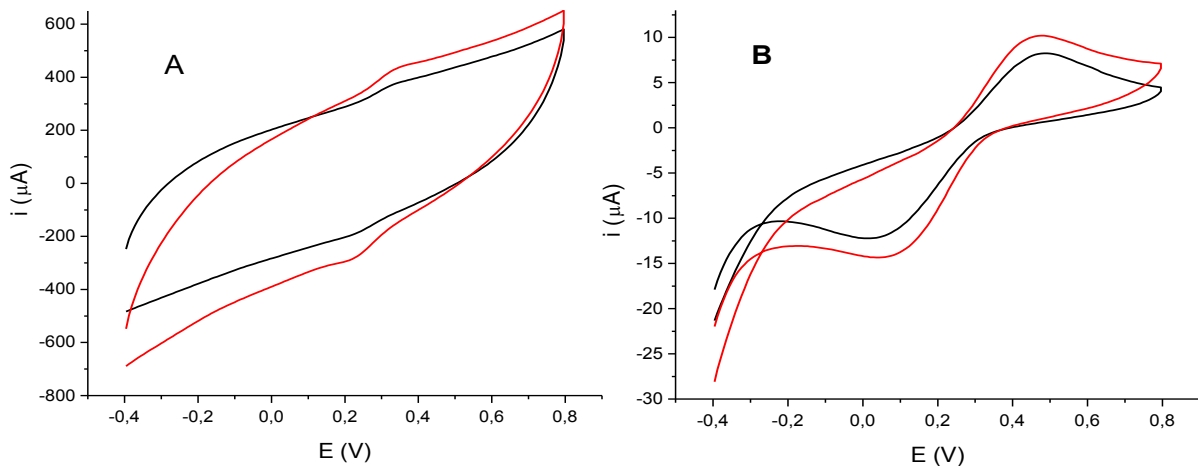


Figura 6. Voltamperogramas cíclicos para ferricianuro de potasio en (A) electrodo modificado y (B) electrodo no modificado, con 5 min de agitación (600 rpm) (—) y sin agitación (—).

Analizando las figuras anteriores, podemos decir que para ambos mediadores redox en el electrodo modificado hay un efecto importante de la agitación, en el incremento de la corriente y en la calidad y definición de la señal, comparado con el electrodo no modificado. Comparando la respuesta obtenida de ambos mediadores con el electrodo modificado, se observa que el aumento en corriente al agitar la disolución del ferrocenometanol es mayor que el del ferricianuro de potasio: 3,6 y 2,2 veces, respectivamente. Además el valor absoluto de corriente para el ferrocenometanol es 3,6 veces mayor que el del ferricianuro de potasio, por lo que en concordancia con los resultados anteriores, el ferrocenometanol llegaría en mayor cantidad a la superficie del electrodo y el efecto que tiene la agitación en este mediador es mayor también, a través de un mecanismo de convección, por lo que este tipo de superficie específicamente tiene una mejor respuesta para el ferrocenometanol, en comparación al ferricianuro de potasio.

Siguiendo con el análisis del efecto que tiene la agitación en el electrodo modificado, se midió el blanco con y sin agitación, encontrándose una diferencia importante en la corriente de fondo, siendo menor con la agitación; lo que concuerda con que se observe una mejoría en la señal al realizar las mediciones con agitación, como se comprobó para ambos mediadores redox. Esto se puede observar en la Figura 7.

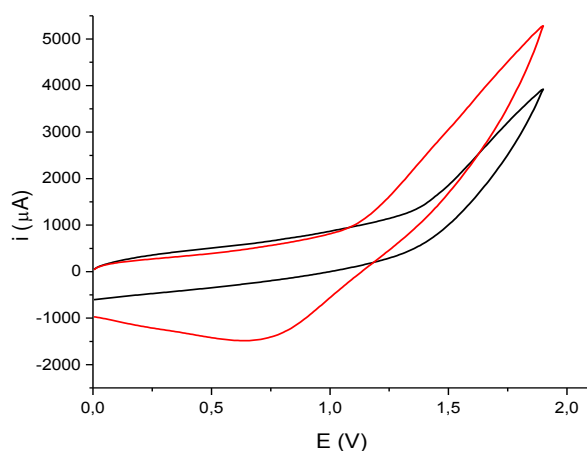


Figura 7. Voltamperogramas cíclicos para el blanco (metanol/tampón Britton-Robinson 0,1 M 2,5:97,5 v/v, pH 6), 5 min de agitación (600 rpm) (—) y sin agitación (—).

3.1.4 Medición de la capacitancia

La capacitancia es un reflejo del área electroactiva del electrodo, debido a que en el sistema electrodo-electrolito la interfase electrificada es una región en que se acumulan cargas y la capacidad para almacenar cargas, es la propiedad característica de un condensador eléctrico. Por lo tanto se puede analizar la capacitancia de una interfase electrificada de forma semejante a como se estudia un condensador, a través de la siguiente ecuación⁴⁴:

$$Q = C \times V$$

En que Q es la carga, C la capacitancia y V es el voltaje

La capacitancia es la carga total que se necesita para elevar en 1 V la diferencia de potencial a través del condensador, esta es la capacidad integral y se utiliza para condensadores eléctricos de capacitancia constante e independiente del potencial, sin embargo esto puede no cumplirse en el caso de las interfases eléctricas, por lo que es mejor utilizar una capacitancia diferencial⁴⁴, de acuerdo a:

$$\frac{dQ}{dt} = C \times \frac{dV}{dt}$$

La diferencial de la carga en función del tiempo es la corriente, mientras que la diferencial de voltaje en función del tiempo es la velocidad de barrido (v), por lo tanto la ecuación se puede escribir de la siguiente forma:

$$i = C \times v$$

Así, de acuerdo a esta ecuación, la pendiente del gráfico corriente vs velocidad de barrido será la capacitancia.

Para determinar el efecto que tiene el líquido iónico en la capacitancia de la superficie, se realizaron las mediciones correspondientes con el electrodo modificado y con el no modificado, según lo descrito en la sección de materiales y métodos. Los gráficos se muestran en la Figura 8.

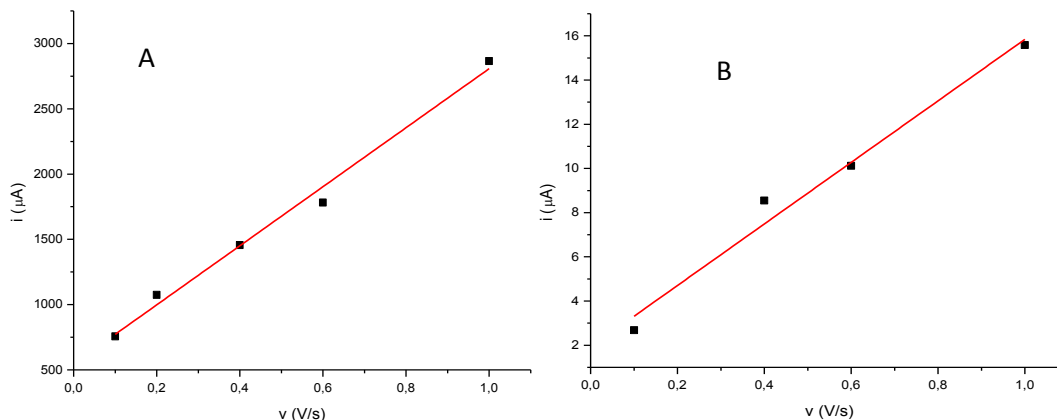


Figura 8. Gráfico de corriente vs velocidad de barrido para (A) electrodo modificado y (B) electrodo no modificado.

Los resultados muestran un aumento de 162 veces en la capacitancia, al comparar el electrodo modificado con el no modificado, por lo que se podría estimar en primera instancia de que efectivamente hay un cambio en la capacitancia de la superficie al utilizar el líquido iónico como aglutinante. Esto implica que también debería existir un cambio en el área electroactiva entre ambos electrodos, lo que se comprobó más adelante al realizar las mediciones correspondientes empleando cronoculombimetría. Los parámetros de los gráficos se pueden observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de los gráficos para la determinación de la capacitancia.

Tipo de electrodo	Capacitancia (A/Vs^{-1})	Intercepto (A)	r^2
Electrodo modificado	0,0023	$5,46 \times 10^{-4}$	0,98
Electrodo no modificado	$1,39 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	0,97

3.1.5 Cálculo del área electroactiva

Como se describió en la sección de materiales y métodos, para realizar este cálculo se realizaron mediciones con la técnica de cronocoulombimetría, y con el valor de la pendiente se calculó el área electroactiva utilizando la ecuación de Anson. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos. Utilizando cualquiera de las dos pastas se observa que al emplear el ferrocenometanol se obtiene una mayor área que con ferricianuro de potasio, lo que apoya los resultados presentados anteriormente para cada uno de los mediadores por voltamperometría cíclica, en los cuales con ferrocenometanol se obtenían los mayores valores de corriente. En la misma lógica, con los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica, el incremento al ocupar un electrodo u otro es mayor en el ferricianuro de potasio (incremento de 69,5 veces en el área), mientras que con el ferrocenometanol el aumento es de 40,4 veces. Por lo tanto podemos decir que empleando cualquiera de los dos mediadores redox, el electrodo modificado mostró un aumento importante en el área electroactiva en comparación al electrodo no modificado.

Tabla 7. Áreas electroactivas calculadas para los electrodos modificado y sin modificar, calculadas con dos mediadores redox.

Tipo de electrodo	Área_{ferrocenometanol} (cm²)	Área_{ferricianuro de potasio} (cm²)
Electrodo modificado	10,31	7,3
Electrodo no modificado	0,255	0,105

En la Figura 9 se presenta la información anterior de manera gráfica. En ella se observan diferencias entre las curvas dependiendo de si se utilizó el electrodo modificado o el electrodo no modificado y si se utiliza ferrocenometanol o ferricianuro de potasio, lo que se condice con los valores de área obtenidos.

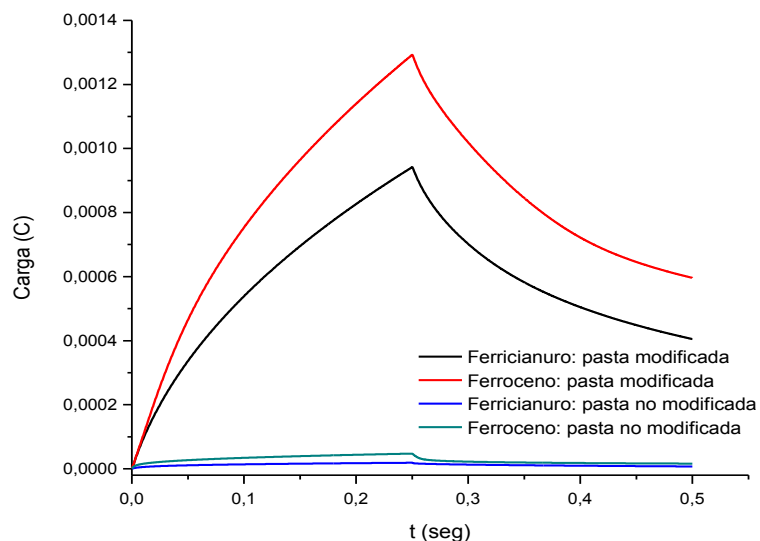


Figura 9. Cronocoulombimetría para el electrodo modificado y no modificado, con ferrocenometanol y ferricianuro de potasio.

3.1.6 Morfología de los electrodos

Se utilizaron las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) para analizar y comparar la morfología del electrodo de pasta de carbono modificado, con la del electrodo de pasta de carbono sin modificar. Las imágenes comparativas a distintos niveles de magnificación se presentan a continuación, en las Figuras 10 a la 13.

En primer lugar se observa una clara diferencia en la calidad de la imagen a magnificaciones altas (Figura 10, 50.000X), en la cual se obtuvo una mejor definición al utilizar la pasta modificada. Esto ocurrió debido a que el proceso para obtener la imagen en la microscopía de barrido electrónico es por medio de un haz de electrones, por lo que con muestras que tengan una buena conductividad se obtendrán mejores resultados que con otra muestra que conduzca con menor eficiencia los electrones, eso es lo que ocurre en este caso ya que el líquido iónico tiene una mejor conductividad que el aceite mineral;

eso se ve reflejado en la calidad de la imagen: se pudieron observar más detalles con una alta magnificación en la pasta modificada en comparación a una imagen más borrosa y con menos detalles en la pasta sin modificar (Figuras 10 y 11). Esta información concuerda con nuestros resultados anteriores, en los que las señales obtenidas con el electrodo modificado son mejores que en el electrodo sin modificar, debido a una mejora en el proceso de transferencia de electrones.

Otros aspectos que se analizaron son la uniformidad y la aglutinación en ambas pastas; en la pasta modificada se observó una superficie más uniforme en cada “gránulo” siendo ésta más plana y lisa, mientras que en la pasta sin modificar la superficie se mostró irregular y con surcos, además la aglutinación fue mayor en la pasta modificada, observándose partículas de mayor tamaño (110 μm) en comparación con la pasta sin modificar, donde el tamaño es menor (19 - 85 μm) (Figuras 12 y 13). En la pasta sin modificar los “gránulos” son irregulares y diversos entre sí, tanto en forma como en tamaño. En la pasta modificada al existir una mayor aglutinación se observan “gránulos” más uniformes entre ellos. Gracias a estos resultados se comprobó que el líquido iónico tiene influencia en la morfología, aglutinación y forma microscópica de la pasta resultante. Estos cambios estructurales y morfológicos se reflejaron en una mejor respuesta en comparación al electrodo sin modificar, al realizar voltamperometrías cíclicas utilizando los mediadores redox como analitos, como se ha mostrado en los resultados anteriores.

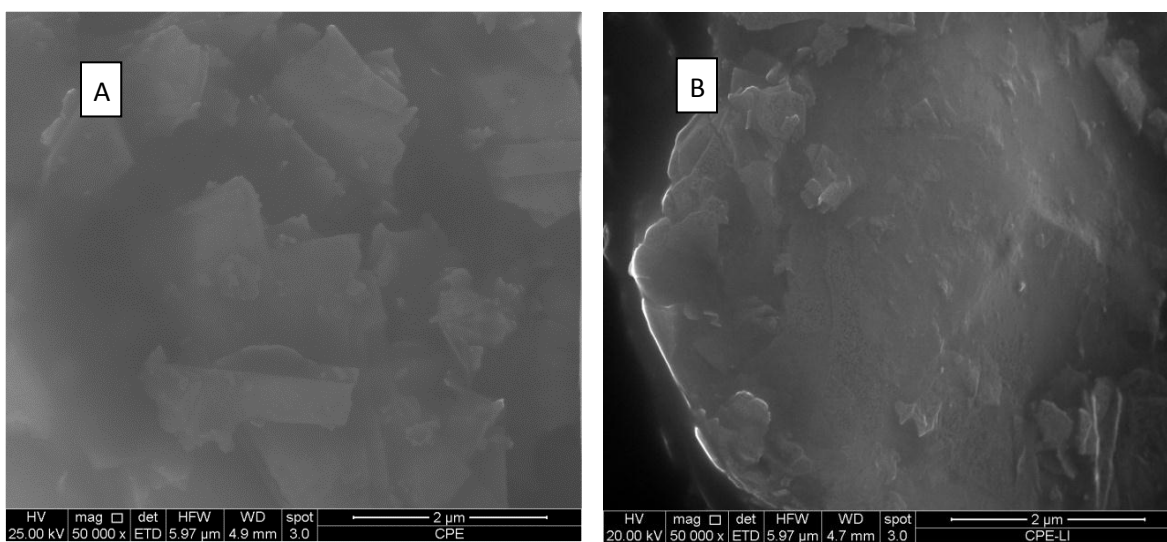


Figura 10. Imágenes SEM para (A) electrodo de pasta de carbono no modificado y (B) electrodo de pasta de carbono modificado, 50.000 de magnificación.

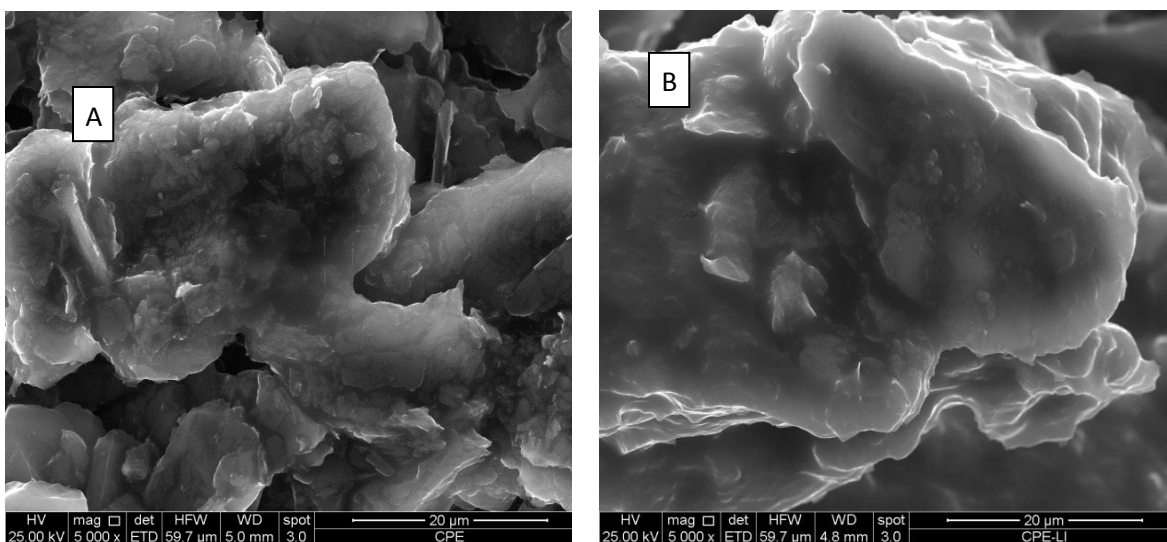


Figura 11. Imágenes SEM para (A) electrodo de pasta de carbono no modificado y (B) electrodo de pasta de carbono modificado, 5.000 de magnificación.

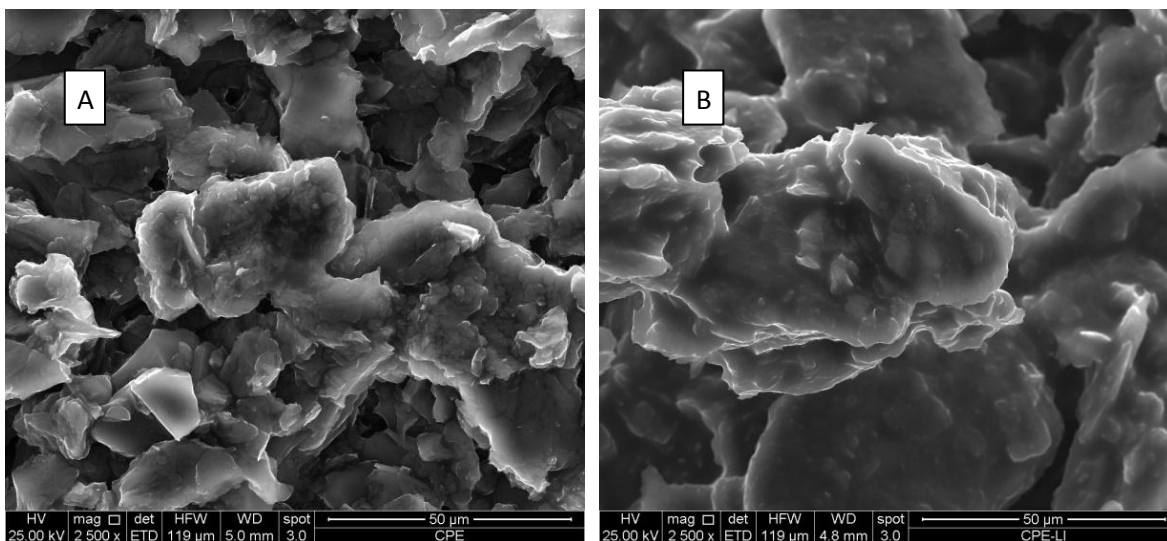


Figura 12. Imágenes SEM para (A) electrodo de pasta de carbono no modificado y (B) electrodo de pasta de carbono modificado, 2.500 de magnificación.

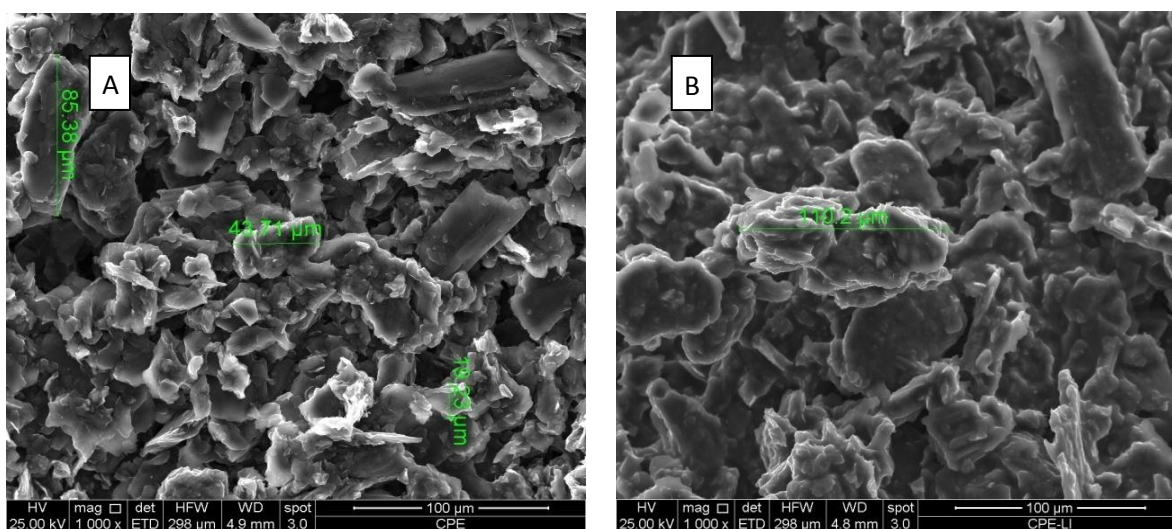


Figura 13. Imágenes SEM para (A) electrodo de pasta de carbono no modificado y (B) electrodo de pasta de carbono modificado, 1.000 de magnificación.

3.2 COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE LA BROMHEXINA

3.2.1 Efecto del líquido iónico

En la Figura 14 se presentan las estructuras de los distintos fármacos y mediadores redox estudiados con el electrodo modificado. Con modafinilo, oseltamivir, loratadina, desloratadina y atomoxetina no se obtuvo señal alguna al realizar mediciones por voltamperometría de pulso diferencial, con el paracetamol se obtuvieron señales muy pequeñas, aun aplicando agitación antes de medir. Se debe destacar que todos estos fármacos tienen actividad redox y han sido estudiados previamente con otros electrodos.

Una posible explicación para este fenómeno, es que la cantidad de fármaco que llega a la superficie del electrodo depende de las interacciones π que hay entre el líquido iónico y el analito (como se mencionó anteriormente, los líquidos iónicos que poseen el grupo imidazolio presentan este tipo de interacciones). La bromhexina también posee una nube electrónica π , por lo que puede haber una fuerte interacción entre ambos compuestos, provocando que la bromhexina se adsorba bien en la superficie del electrodo. Por otro lado, el oseltamivir no tiene el anillo aromático que sí posee la bromhexina, por lo que no posee esta nube electrónica π , por lo tanto el oseltamivir no llega a la superficie del electrodo, esto explicaría por qué no se obtiene señal. En el caso de la loratadina y desloratadina, sí poseen una nube π pero la estructura tricíclica que presentan puede causar un impedimento estérico para que no ocurra la interacción con el líquido iónico. Además estos 2 fármacos se reducen y al ensayar la pasta hacia potenciales negativos, ésta se caía hacia la disolución. Por otra parte, tanto el modafinilo como la atomoxetina, tienen un sistema electrónico π y se observa una similitud estructural al poseer 2 anillos aromáticos; aún así con ninguno de ellos se obtuvo señal,

debido posiblemente a los 2 anillos que poseen, debido a que los fármacos que presentaron señal sólo poseen un anillo aromático (bromhexina y paracetamol), por lo que de alguna forma el poseer estos 2 anillos debe causar algún impedimento para que ocurra la interacción con el líquido iónico, relacionado tal vez con el tamaño de la molécula. Además, haciendo un análisis de los pesos moleculares y los coeficientes de partición de los fármacos estudiados, no es posible obtener ninguna conclusión sobre el efecto de estos parámetros en la respuesta obtenida (Tabla 8).

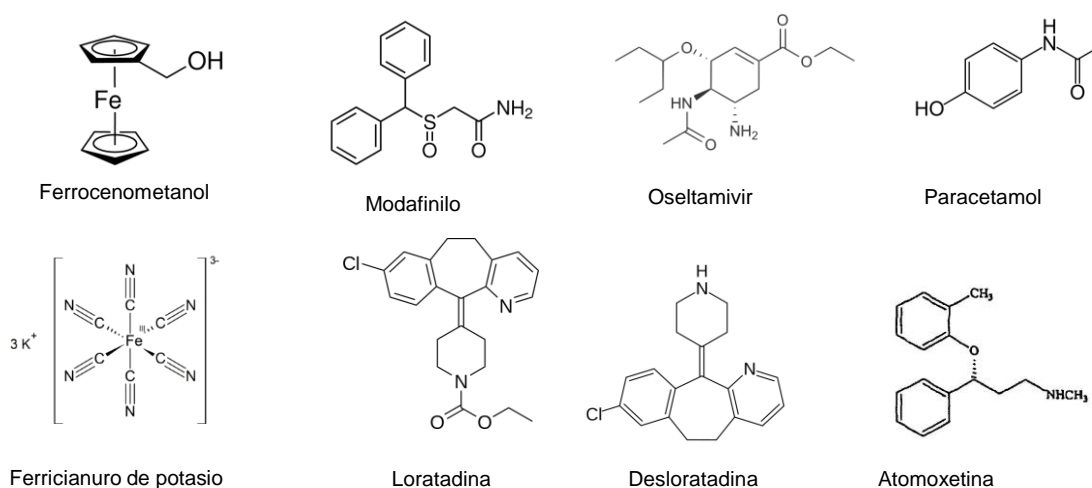


Figura 14. Estructura de los analitos estudiados con el electrodo de pasta de carbono modificado.

Tabla 8. Fármacos estudiados con el electrodo modificado

Fármaco	Masa Molar (g/mol)	log P	Electrodo
Modafinilo	273,35	0,6	Carbono vítreo ⁴⁵
Oseltamivir	312,4	1	Oro ⁴⁶ , membrana PVC ⁴⁷
Paracetamol	151,163	0,46	EPC-LI9 ¹⁷
Loratadina	382,88	5,2	ME Oro ⁴⁸ , Mercurio ⁴⁹
Desloratadina	310,82	3,2	Carbono vítreo ⁵⁰
Atomoxetina	255,36	3,9	Carbono vítreo ⁵¹
Bromhexina	376,13	4,42	Carbono vítreo ⁴⁰

Por los motivos anteriormente expuestos, el trabajo experimental desarrollado en esta Memoria se concentró en el análisis de la bromhexina, para esto se realizaron mediciones por voltamperometría cíclica a una disolución de bromhexina 1×10^{-4} M. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Corrientes de pico de la bromhexina con el electrodo modificado y no modificado.

Tipo de electrodo	i_{pa} (μA)	E_p (V)
Electrodo modificado	185,9	0,800
Electrodo no modificado	7,490	0,864

i_{pa} : corriente de pico anódica

E_p : potencial de pico

Como se puede apreciar de la Tabla 9, se observa que la señal de la bromhexina aumenta de manera considerable con el electrodo modificado, siendo este incremento de alrededor de 25 veces gracias al efecto del líquido iónico, además hay una disminución de 0,064 V en el potencial de pico al emplear el electrodo modificado, por lo que el líquido iónico tiene un efecto catalítico y facilita la oxidación de la bromhexina. También se realizó la comparación entre la medición de una disolución que contiene bromhexina y otra disolución blanco sin fármaco, viéndose claramente que ambas curvas tienen la misma línea base, pero que en la curva de la disolución con fármaco se observa una señal bien definida, por lo que se puede descartar que la señal obtenida pueda ser efecto del tampón o del metanol. Estas diferencias se muestran gráficamente en la Figura 15.

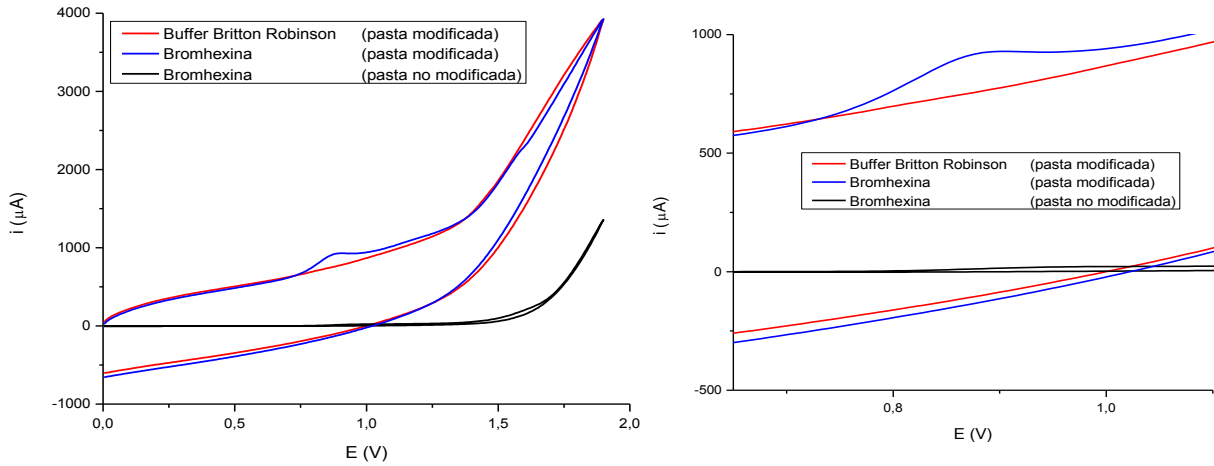


Figura 15. Voltamperogramas cíclicos para disoluciones de bromhexina 1×10^{-4} M, con electrodo modificado y sin modificar, pH 6, 5 minutos de agitación (600 rpm) y 0,1 V/s como velocidad de barrido.

3.2.2 Efecto de la velocidad de barrido

En la Figura 17 se muestran los voltamperogramas de estas mediciones, observándose el efecto de la velocidad de barrido en la corriente de pico y en la forma de la curva.

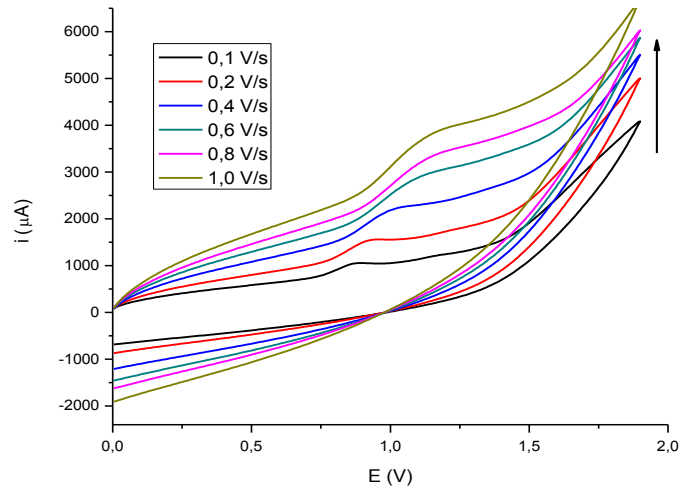


Figura 16. Voltamperogramas del efecto de la velocidad de barrido sobre la corriente.

Se analizó el efecto de la velocidad de barrido sobre la corriente de pico de la señal de oxidación de la bromhexina; para esto se graficó la corriente de pico (i_p) vs la velocidad de barrido (v), encontrándose una relación lineal (Figura 16 y Tabla 10).

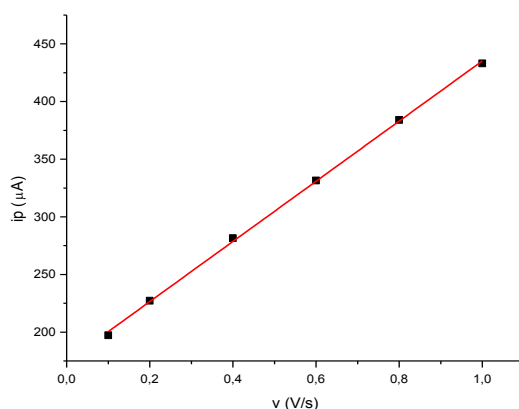


Figura 17. Efecto de la velocidad de barrido sobre la corriente de pico de bromhexina. Disolución 1×10^{-4} M, pH 6 y 5 min de agitación.

Tabla 10. Datos del gráfico corriente de pico vs velocidad de barrido.

r^2	Pendiente ($\mu A/Vs^{-1}$)	Intercepto (μA)
0,99927	261	174

La relación lineal obtenida en el gráfico i_p vs v implica que el proceso por el cual accede la bromhexina al electrodo es por adsorción, quedando el fármaco confinado a la superficie de este, no ocurriendo un proceso de difusión⁵²⁻⁵³.

3.2.3 Estudio del comportamiento anódico de bromhexina en función del pH

Dentro del proceso de caracterización de la bromhexina, se realizaron medidas por voltamperometría de pulso diferencial a distintos pHs, esta información se presenta en la Figura 18.

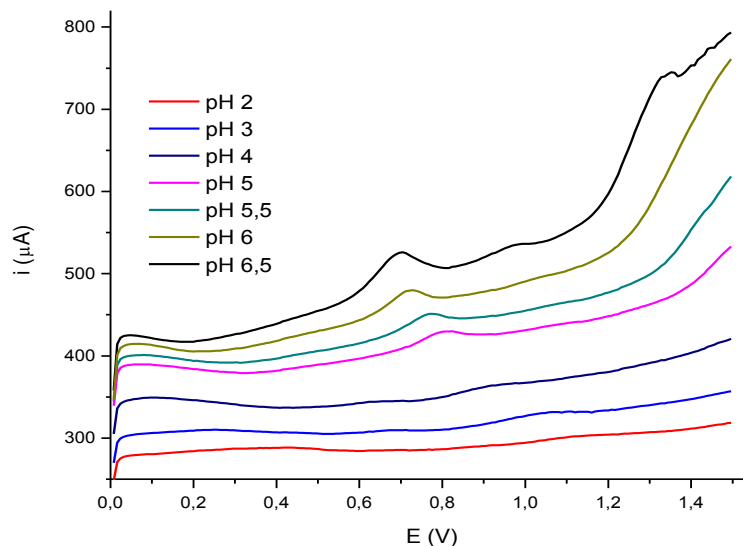


Figura 18. Voltamperogramas de pulso diferencial de bromhexina 5×10^{-5} M, 3 minutos de agitación (600 rpm)

Se observó el efecto que tiene el pH sobre el potencial al que aparece la señal del fármaco. Se presenta esta información en la Figura 19.

Del gráfico del efecto del pH sobre el potencial de pico de la bromhexina se observa que existe una dependencia lineal entre ambos parámetros, con un quiebre a pH 5. A medida que aumenta el pH, el potencial se desplaza hacia valores más cercanos a cero, a una razón de $-0,096$ V/pH en el primer tramo (pH 2-5) y de $-0,0702$ V/pH en el segundo (pH 5-6,5), por lo que a mayores valores de pH en el intervalo estudiado (2-6,5) la oxidación de la bromhexina se ve facilitada. El punto de inflexión a pH 5 estaría relacionado con cambios en el equilibrio protonación-deprotonación de la especie electroactiva, estimándose en base a esto un pK_a voltamperométrico cercano a 5, lo que concuerda con los valores de pK_a reportados en la literatura de $5,5^{40}$. Para el estudio de pH se seleccionaron estos valores de intervalo de pH, debido a que según lo determinado

experimentalmente y lo reportado en la literatura, a pH 7 o mayores disminuye la respuesta del fármaco debido a una precipitación de este, lo cual se comprobó experimentalmente observando disoluciones opacas de aspecto lechoso a pH superiores o iguales a 7. Además de los motivos anteriores, existió una imposibilidad física, ya que la pasta se desprendió de la superficie del electrodo a pH 7 o superiores.

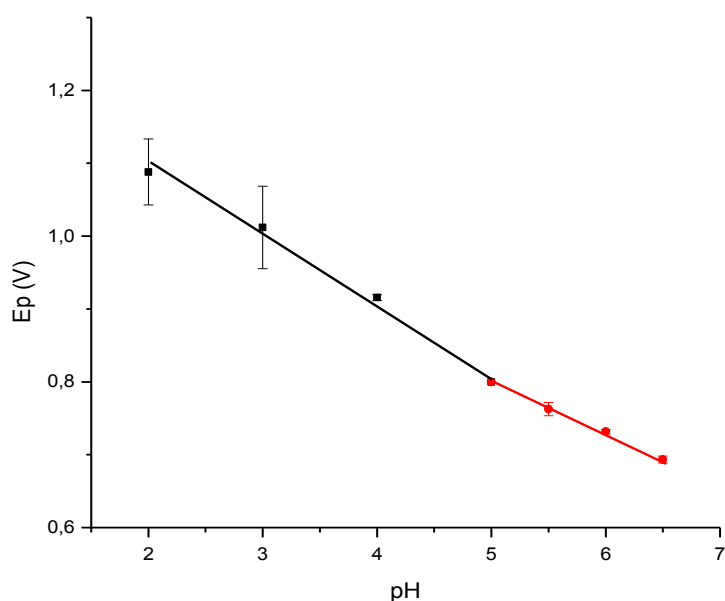


Figura 19. Efecto del pH sobre el potencial de pico de bromhexina 5×10^{-5} M por voltamperometría de pulso diferencial. Cada punto representa el promedio de 3 medidas.

Además se evaluó el efecto que tiene el pH sobre la respuesta de la corriente de pico de la bromhexina. Se observa que a medida que aumenta el pH la corriente de pico también aumenta, llegando a un máximo a pH 6,5 (Figura 20). No se seleccionó este pH como la condición experimental para el análisis, debido a la baja repetibilidad que

presentó al realizar la medida por triplicado, obteniéndose un coeficiente de variación para la medida de corriente de 26,9 %.

Uno de los objetivos de este trabajo es desarrollar un método analíticamente óptimo; en función de este propósito se buscó obtener la mejor corriente de pico y repetibilidad posible, bajo estos parámetros el pH de trabajo seleccionado fue de 6, debido a que en este pH se obtiene una buena señal de corriente comparado con pHs menores y es el punto en el que se obtiene una menor dispersión al realizar la medida múltiples veces. Esta información se presenta graficada en la Figura 20.

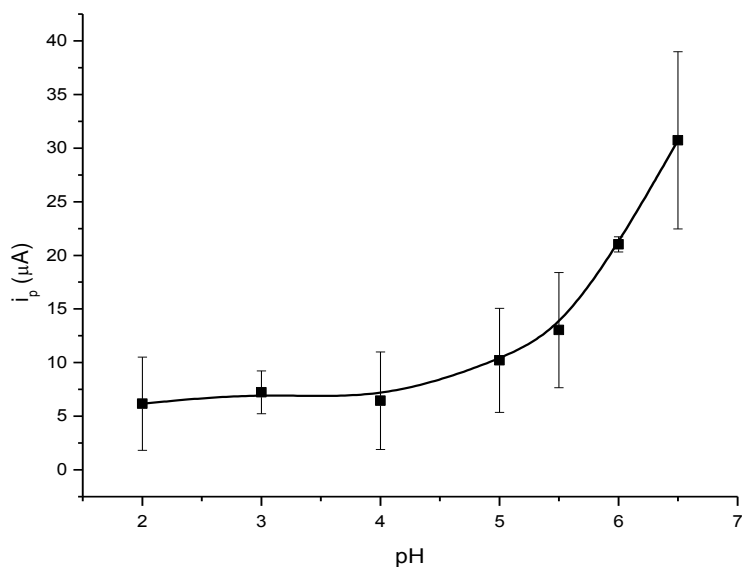


Figura 20. Efecto del pH sobre la corriente de pico de bromhexina. Disolución 5×10^{-5} M, 3 min de agitación (600 rpm). Cada punto representa el promedio de 3 medidas.

3.3 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.3.1 Estudio de acumulación

En función de desarrollar una metodología analítica óptima, se realizó el estudio de acumulación, para determinar el tiempo de agitación adecuado en el que la mayor cantidad posible de fármaco llegó a la superficie del electrodo, para conseguir así mejores respuestas de corriente. En el caso de la bromhexina la señal obtenida sin agitación fue bastante pequeña y casi imperceptible.

Los resultados mostraron que la bromhexina en el electrodo modificado, aumentó la intensidad de la corriente de pico al aplicar un tiempo de acumulación previo a la medición, hasta un máximo de 5 min de agitación. A tiempos de acumulación mayores disminuye la señal como se observa en la Figura 21A. En la Figura 21B se presentan los voltamperogramas obtenidos a los distintos tiempos de agitación.

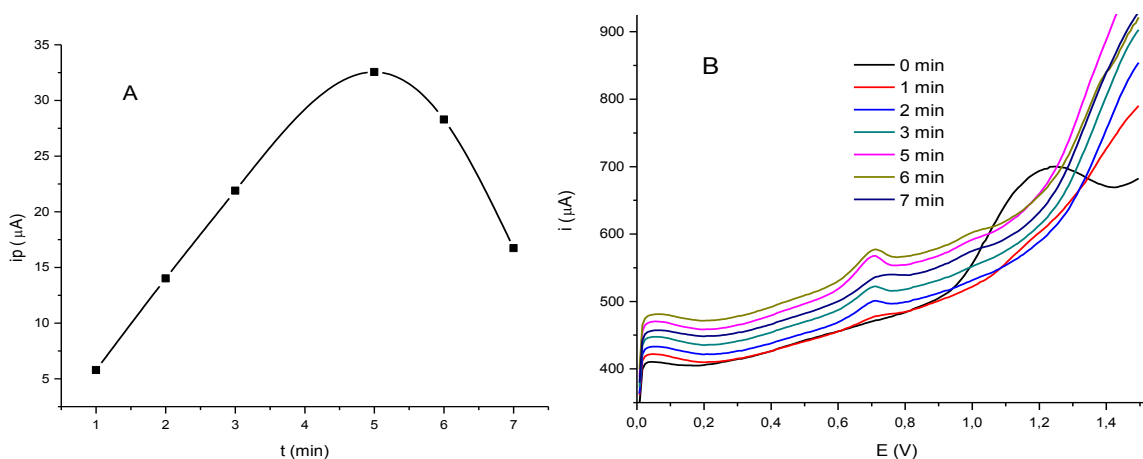


Figura 21. (A) Efecto de la agitación en la corriente de pico y (B) voltamperogramas de bromhexina a distintos tiempos de acumulación. Disolución 5×10^{-5} M, pH 6, agitación de 600 rpm.

Por los resultados obtenidos se seleccionó como condiciones de trabajo óptimas pH 6 y un tiempo de acumulación de 5 min.

3.3.2 Estudio de concentración

Para desarrollar la metodología analítica se realizó un estudio de concentración en que la bromhexina mostró una respuesta lineal con la corriente de pico de la señal, siendo esta desde 6×10^{-6} M hasta 1×10^{-4} M. En este intervalo de concentración se encontraron dos tramos lineales, uno a concentraciones altas (Curva A) y otro a concentraciones más bajas (Curva B). En la Figura 22 se presenta gráficamente esta información.

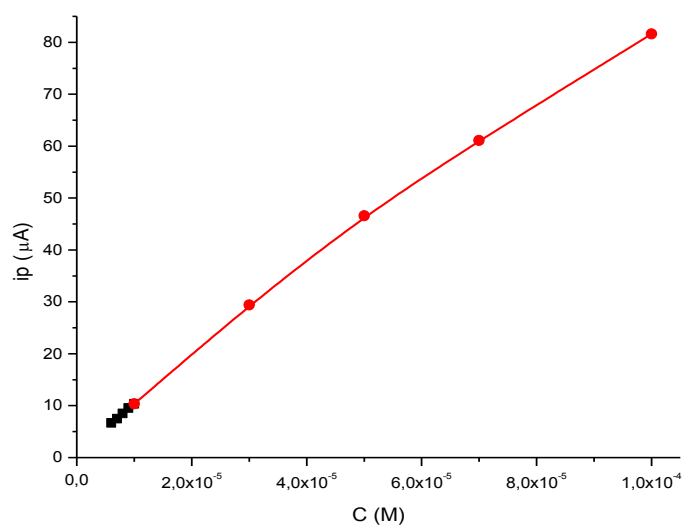


Figura 22. Estudio de concentración de bromhexina.

Los tramos lineales estuvieron comprendidos entre 6×10^{-6} y 3×10^{-5} M (línea en negro en la Figura 22, Curva B) y 1×10^{-5} y 1×10^{-4} M (línea en rojo en la Figura 22, Curva A). Cada tramo se muestra por separado en la Figura 23.

Ambas rectas de calibración se pueden utilizar como curva de trabajo, dependiendo de en qué zona se encuentre la concentración de la muestra, se decidirá usar una curva u otra. Los parámetros de cada curva se resumen en la Tabla 11.

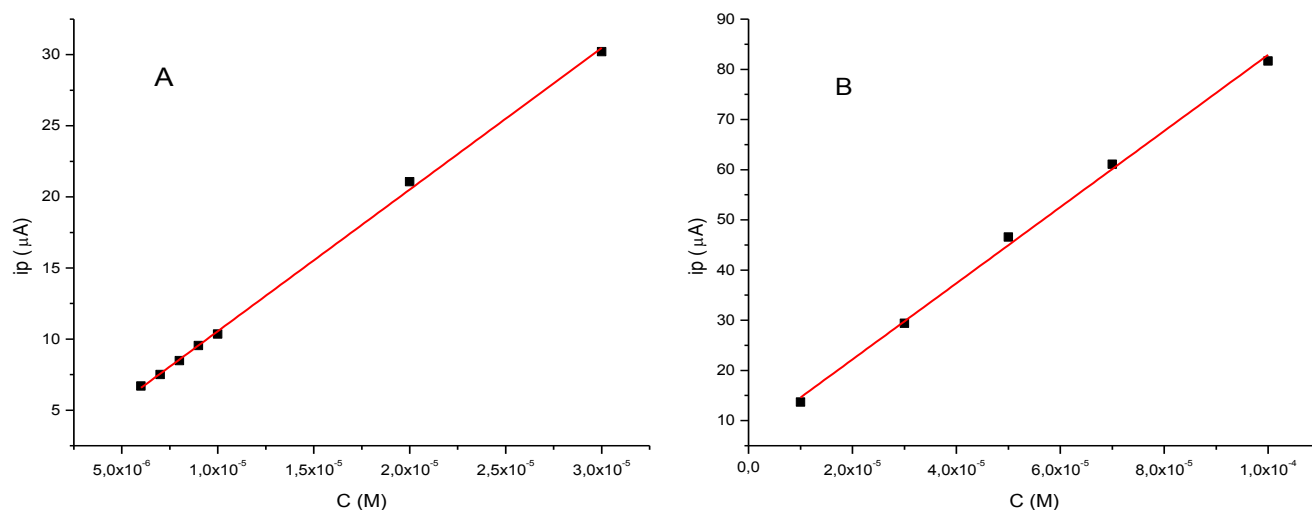


Figura 23. Curvas de calibración para bromhexina. (A) Intervalo de trabajo: 6×10^{-6} a 3×10^{-5} M y (B) intervalo de trabajo: 1×10^{-5} a 1×10^{-4} M.

Tabla 11. Parámetros de las curvas de calibración.

Intervalo (M)	r^2	Pendiente ($\mu\text{A}/\text{C}$)	Intercepto (μA)
$6 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-5}$	0,9989	995943	0,597
$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$	0,9971	758767	7,02

3.3.3 Repetibilidad

Para calcular la repetibilidad se midió 10 veces un determinado punto dentro de la curva de calibración (5×10^{-5} M), calculándose el coeficiente de variación para estas

medidas, obteniéndose un valor de 5,1 %; lo que es un porcentaje aceptable de desviación para ser un electrodo modificado. En la Figura 24 se presentan los diez voltamperogramas de estas mediciones.

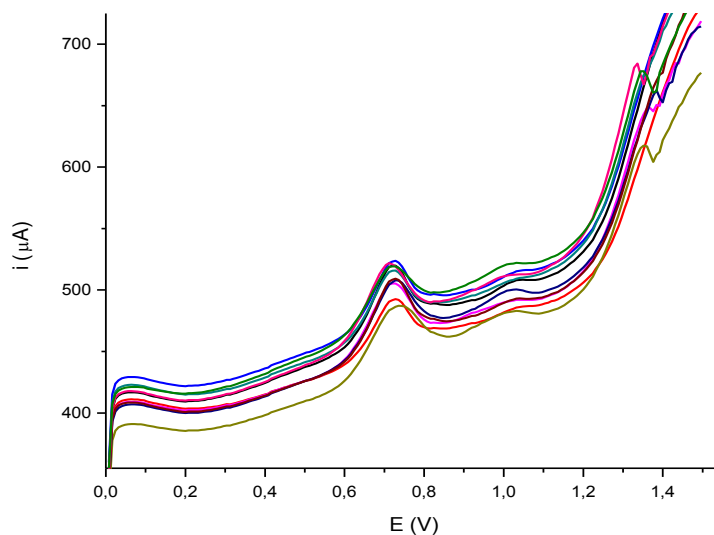


Figura 24. Voltamperogramas de pulso diferencial del estudio de repetibilidad. Disolución de bromhexina 5×10^{-5} M, pH 6 y 5 minutos de agitación (600 rpm)

En la Tabla 12 se presentan los parámetros de eficiencia analítica para el método desarrollado en esta Memoria, obteniéndose valores de repetibilidad y reproducibilidad aceptables para un electrodo modificado (menores a un 6 %), considerando los factores que están involucrados en la fabricación de este electrodo, como por ejemplo la preparación de la pasta, el llenado y pulido del electrodo antes de cada medición, etc.

Tabla 12. Parámetros de eficiencia analítica.

Parámetro	Curva A	Curva B
Límite de detección (M)	$1,9 \times 10^{-6}$	-
Límite de cuantificación (M)	$3,4 \times 10^{-6}$	-
Repetibilidad (CV, %)	0,97	5,1
Reproducibilidad (CV, %)	-	5,7
Curva de calibración	$i_p = 995943 \times C + 0,597$	$i_p = 758767 \times C + 7,02$
Intervalo de concentración (M)	$6 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$
Recuperación (%)	$102,3 \pm 1,0$	$101 \pm 2,0$

Al comparar los parámetros de eficiencia analítica obtenidos en este trabajo, con los parámetros de los métodos reportados anteriormente en la literatura para la determinación de bromhexina en formas farmacéuticas (ver Tabla 13), podemos observar que el método desarrollado es comparable e incluso mejor que varios de los métodos ya existentes, mejorando tanto en el intervalo lineal como en los límites de detección y cuantificación. No obstante, los parámetros de este método no son mejores que los reportados por HPLC con detección UV-visible, siendo el límite de detección 7 veces menor, ya que esta es una técnica con una gran calidad analítica tanto para la cualificación como para la cuantificación de fármacos. A pesar de esto, algunas de las ventajas que presentan los métodos electroquímicos son la simpleza en su preparación, alta sensibilidad, los electrodos son pequeños y pueden ser ubicados directamente en una muestra biológica, mientras que el HPLC es una técnica que requiere una instrumentación sofisticada, su manejo es complejo y tiene un mayor costo¹⁶.

La discusión se concentra en la determinación de bromhexina en formas farmacéuticas, debido a que los niveles que alcanza el fármaco en distintas matrices biológicas (como suero, sangre u orina) son del orden de los nanogramos por mL (intervalo lineal 0,5 – 100 ng/mL)^{37,38}, mientras que el límite de detección del método en

este trabajo es de 0,7 µg/mL (700 ng/mL), por lo que la diferencia es demasiada como para intentar cuantificar la bromhexina en matrices biológicas con este electrodo. Por lo tanto, la aplicación del método desarrollado se concentró en determinar la bromhexina en formulaciones farmacéuticas.

Tabla 13. Parámetros analíticos de otras técnicas reportadas en la literatura.

Técnica	Intervalo lineal (µg/mL)	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
Espectrofotometría UV (234 y 334 nm) ²⁷	2-60	1,6	5,5
HPLC (detector UV, 225 nm) ³²	0,2-15	0,1	-
Cromatografía electrocinética ³⁴	8-32	2,1	-
VPD (electrodo de carbón vítreo) ⁴⁰	7,5-37,6	5,3	6,0
VPD (EPC-LI, esta Memoria)	2,3-37,6	0,7	1,27

VPD: voltamperometría de pulso diferencial

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

EPC-LI: electrodo de pasta de carbono modificado con líquido iónico

Comparando el método desarrollado en esta Memoria con la anterior determinación voltamperométrica de bromhexina con un electrodo de carbón vítreo, podemos observar que el desarrollo con este nuevo electrodo mejora todos los aspectos analíticos con respecto a los que existían en la literatura, refiriéndonos sólo de los métodos voltamperométricos. Por lo tanto el desarrollo de este electrodo modificado permite determinar concentraciones más bajas por voltamperometría de pulso diferencial, que las que se podían determinar hasta ahora.

3.3.4 Ensayo de recuperación

Se realizó este estudio para determinar cuánto es capaz de recuperar el método desarrollado a partir de una cantidad conocida de bromhexina que fue agregada a una disolución de excipientes, para así analizar el efecto que tiene la matriz en la

cuantificación de la bromhexina. En la Tabla 14 se resumen los resultados obtenidos, se puede observar que utilizando cualquiera de las 2 curvas de calibración (curva A con concentración de $4,25 \times 10^{-5}$ M y curva B a una concentración de $8,5 \times 10^{-6}$ M); tanto para concentraciones más altas como para concentraciones más bajas; se obtienen buenos resultados, ya que los porcentajes de recuperación son cercanos al valor de referencia y además la desviación estándar es baja, por lo que es reproducible. Por lo tanto el método desarrollado tiene una buena exactitud y precisión. También se observa que los excipientes no interfieren en la cuantificación de bromhexina, lo que se condice con los resultados obtenidos en la cuantificación del fármaco en jarabe, en donde la cantidad determinada fue similar a lo declarado por el fabricante.

Tabla 14. Porcentajes de recuperación de bromhexina*

Concentración de trabajo (M)	Curva A	Curva B
Muestra 1 [mg (%)]	3,99 (99,8)	4,08 (102)
Muestra 2 [mg (%)]	4,02 (100,5)	4,06 (101,5)
Muestra 3 [mg (%)]	3,99 (99,8)	4,07 (101,8)
Muestra 4 [mg (%)]	4,02 (100,5)	4,16 (104)
Muestra 5 [mg (%)]	4,18 (104,5)	4,09 (102,3)
Promedio \pm desv. Est. [mg (%)]	4,04 \pm 0,08 (101,0 \pm 2,0)	4,09 \pm 0,04 (102,3 \pm 1,0)

*Cantidad agregada de bromhexina: 4 mg

3.4 APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE BROMHEXINA EN JARABE

3.4.1 Cuantificación por el método propuesto (VPD, EPC-LI)

El método analítico desarrollado se utilizó para medir la concentración de bromhexina en jarabe, las disoluciones de trabajo fueron preparadas según lo detallado

en la sección materiales y métodos. El método se aplicó tanto en concentraciones altas como bajas de bromhexina, utilizando para esto ambas curvas de calibración. En la Tabla 15 se presentan los resultados obtenidos; en ella se observa que las cantidades determinadas por voltamperometría de pulso diferencial son bastante cercanas a la cantidad declarada por el fabricante.

Los resultados demuestran que se pudo cuantificar de manera directa y simple la bromhexina contenida en un jarabe comercial, no siendo necesario ningún tratamiento de la muestra ni proceso de extracción previo, constituyéndose en una gran ventaja para el método desarrollado. Sólo se diluyó el jarabe para llevar la concentración dentro del intervalo de alguna de las dos curvas de calibración desarrolladas.

Tabla 15. Cantidad encontrada de bromhexina en jarabe* empleando el método propuesto (VPD, EPC-LI)

Curva utilizada	Curva A	Curva B
Muestra [mg (%)]	4,04 (101,0)	3,98 (99,5)
Contra muestra [mg (%)]	4,03 (100,8)	4,04 (101,0)
Promedio \pm desv. Est. [mg (%)]	4,04 \pm 0,01 (100,9 \pm 0,14)	4,01 \pm 0,04 (100,3 \pm 1,1)

*Cantidad declarada de bromhexina: 4 mg

Se observó que para obtener los mejores resultados lo recomendable es preparar la disolución de trabajo justo antes de realizar la medición, debido a que se comprobó que al dejar una disolución de bromhexina preparada durante un par de horas, cambiaba la corriente de pico y la forma de la señal en comparación a si se realizaba la medida inmediatamente después de preparar la disolución.

3.4.2 Cuantificación de bromhexina en jarabe por HPLC

Como método comparativo para cuantificar la cantidad de bromhexina en jarabe se utilizó HPLC⁴⁰, para esto en primer lugar se midió una muestra estándar con una

concentración de bromhexina de $4,42 \times 10^{-5}$ M y posteriormente se midió una muestra de jarabe, diluida hasta una concentración de $4,25 \times 10^{-5}$ M. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 16, donde también se comparan los resultados obtenidos por voltamperometría de pulso diferencial.

Tabla 16. Comparación de los resultados obtenidos para la cuantificación de bromhexina en jarabe, por VPD y HPLC

Técnica	VPD	HPLC
Cantidad encontrada [mg (%)]	4,04 (100,9)	4,11 (102,7)
Desviación estándar [mg (%)]	0,01 (0,14)	0,06 (1,6)

*Cantidad declarada de bromhexina: 4 mg

VPD: voltamperometría de pulso diferencial

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

Se puede observar que el valor obtenido por voltamperometría de pulso diferencial es bastante cercano al valor obtenido por HPLC, además utilizando la prueba de t-student se comprobó que los promedios de ambos métodos no son significativamente diferentes entre sí⁵⁴. Por lo tanto podemos decir que la cantidad promedio encontrada por el método desarrollado en este trabajo no es significativamente distinta que la cantidad encontrada por HPLC, por lo que se comprueba la exactitud del método propuesto.

En vista de los límites de detección y cuantificación alcanzados por el método voltamperométrico desarrollado en esta Memoria, se podría aplicar este método en un ensayo de disolución de comprimidos de bromhexina (comprimidos de 8 mg, en vasos de disolución de 900 mL), el que no se pudo realizar debido a que actualmente no se comercializa esa forma farmacéutica en Chile, pero queda abierta la posibilidad de realizar esta aplicación en el futuro.

4. CONCLUSIONES

En esta memoria se obtuvieron los siguientes resultados principales:

- Se preparó un electrodo de pasta de carbono modificado con 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato como líquido iónico, siendo este el único aglutinante, logrando eliminar el aceite mineral de la mezcla.
- Se observó un cambio morfológico en la superficie del electrodo modificado, obteniéndose una pasta con mayor aglutinación y uniformidad.
- De acuerdo a la mayor capacitancia del electrodo modificado, debe ocurrir un cambio en el área del electrodo debido al efecto del líquido iónico, lo cual resulta en un incremento del área electroactiva.
- El electrodo modificado con líquido iónico mostró un aumento importante en la intensidad y calidad de la señal obtenida, tanto para el ferrocenometanol como para el ferricianuro de potasio, comparado con el electrodo no modificado.
- Bromhexina exhibió una respuesta anódica en disolución metanol/tampón Britton-Robinson 0,1 M (2,5:97,5 v/v) por voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso diferencial, siendo esta de carácter irreversible y controlada por adsorción.
- La señal de oxidación de bromhexina es dependiente del pH, facilitándose su proceso de oxidación a medida que aumenta el pH.
- La señal de la bromhexina aumentó considerablemente su corriente de pico al utilizar el electrodo modificado, concluyendo que el efecto que tiene el líquido iónico en la capacidad del electrodo para cuantificar la bromhexina es muy importante.
- Se desarrolló una metodología analítica para la cuantificación de bromhexina, obteniendo una respuesta lineal con la corriente en un amplio intervalo de

concentraciones, definiéndose dos tramos lineales (6×10^{-6} a 3×10^{-5} M y 1×10^{-5} a 1×10^{-4} M).

- Se obtuvieron límites de detección y cuantificación en el orden 10^{-6} M ($\mu\text{g/mL}$). Además la reproducibilidad del método desarrollado exhibió un coeficiente de variación de 5,1 %; por lo que se puede concluir que el método propuesto es analíticamente adecuado para cuantificar la bromhexina.
- El método fue aplicado satisfactoriamente en la cuantificación de bromhexina en jarabe, no interfiriendo ninguno de los excipientes de la formulación, por lo que se puede medir de manera simple y directa con el electrodo modificado, sin tratar la muestra ni realizar una extracción previa.
- El método tuvo porcentajes de recuperación similares al valor de referencia, no interfiriendo los excipientes en la cuantificación, siendo los resultados obtenidos exactos y precisos.
- No hay diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad encontrada de bromhexina por el método propuesto en este trabajo, y la cantidad encontrada por un método cromatográfico comparativo, según la prueba de t-student.

A partir de estos resultados, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- Las curvas de calibración obtenidas fueron adecuadas para cuantificar bromhexina, tanto en una disolución estándar como en una muestra de jarabe.
- El método desarrollado es más sensible que otros métodos para la cuantificación de bromhexina, obteniendo mejores parámetros analíticos que un método voltamperométrico realizado previamente con un electrodo de carbón vítreo.

5. REFERENCIAS

- [1] J. Wang. *Analytical Electrochemistry*, Wiley and Sons 2nd edition, New York, 2001.
- [2] H. Liu, P. He, Z. Li, C. Sun, L. Shi, Y. Liu, G. Zhu, J. Li. *Electrochem. Comm.* 7 (2005), 1357-1363.
- [3] C.M.A Brett, A.M.O. Brett. *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press, New York, 1993.
- [4] N. Maleki, A. Safavi, F. Tajabadi. *Anal. Chem.* 78 (11) (2006), 3820-3826.
- [5] R.N. Adams. *Anal. Chem.* 30 (1958), 1576.
- [6] I. Svancara, K. Vytras, K. Kalcher, A. Walcarius, J. Wang. *Electroanalysis* 21 (2009), 7-28.
- [7] M. Opallo, A. Lesniewski. *J. Electroanal. Chem.* 656 (2011), 2-16.
- [8] G. Shul, J. Sirieux-Plenet, L. Gaillon, M. Opallo. *Electrochem. Comm.* 8 (2006), 1111-1114.
- [9] A. Safavi, N. Maleki, O. Moradlou. *Electroanalysis* 20 (2008), 2158-2162.
- [10] Web of science <https://apps.webofknowledge.com> (consulta: 23 de Marzo del 2015).
- [11] I. Svancara, A. Walcarius, K. Kalcher, K. Vytras, *Cent. Eur. J. Chem* 7 (4) (2009), 598-656.
- [12] M.C Buzzeo, R.G Evans, R.G. Compton. *Chem. Phys. Chem.* 5 (2004), 1106-1120.
- [13] D. Wei, A. Ivaska. *Anal. Chim. Acta* 607 (2008), 126-135.
- [14] N. Jain, A. Kumar, S. Chauhan, S.M.S Chauhan. *Tetrahedron* 61 (2005), 1015-1060.
- [15] Y. Zhang, J.B. Zheng. *Electrochim. Acta* 52 (2007), 7210-7216.
- [16] W. Sun, M. Yang, Y. Li, Q. Jiang, S. Liu, K. Jiao. *J. Pharm. Biomed Anal* 48 (2008), 1326-1331.
- [17] X. ShangGuan, H. Zhang. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008), 1049-1055.
- [18] V. Moncada, A. Álvarez-Lueje. *J. Chil. Chem. Soc.* 58 (2) (2014), 2248-2251.
- [19] B. Pérez-Mella, A. Álvarez-Lueje. *Electroanalysis* 25 (9) (2013), 2193-2199.
- [20] E.T.G. Cavalheiro, C.M.A. Brett, A.M.Oliveira-Brett, O. Fatibello-Filho. *Bioanal. Rev.* 4 (2012), 31-53.
- [21] M.E. Ribone, A.P. Pagani, A.C. Olivieri. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000), 591-595.
- [22] G. Vijaya Raja, G. Venu gopal, V. Mounika, S. Satyavathi. *Ch. Lanvaya. Int. J. Pharm. Sci. Res.* 1 (2) (2010), 90-94.

- [23] S. Al-Ward. *Iraqi. J. Sci.* 52 (4) (2011), 400-407.
- [24] K. Susmitha, M. Thirumalachary, G. Venkateshwarlu. *ISRN Anal. Chem.* (2013), Article ID 861851 <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/861851Z>>
- [25] A.C.B. Dias, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, E.A.G Zaggato. *Anal. Chim. Acta* 499 (2003), 107-113.
- [26] H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri. *Talanta* 49 (1999), 793-800.
- [27] V. Tantishaiyakul, C. Poeaknapo, P. Sribun, K, Sirisuppanon. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998), 237-243.
- [28] I.H.I. Habib, M.E.M. Hassouna, G.A. Zaki. *Farmaco* 60 (2005), 249-254.
- [29] S.V.M.M. Rao, I.N. Rao, T.R.S Reddy, C.S.P Sastry. *Indian J. Chem. Technol.* 12 (2005), 170-174.
- [30] N.T. Abdel-Ghani, Y.M. Issa, H.M. Ahmed. *Sci. Pharm.* 74 (2006), 121-135.
- [31] G. Bazylak, L.J. Nagels. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003), 887-903.
- [32] S. Liu, L. Zhao, X. Liu, F. Zhou, S. Jiang. *J. Food Drug Anal* 12 (4) (2004), 306-310.
- [33] M. Dhoka, V. Gawande, P. Joshi. *Int. J. Pharm Pharm Sci* 2 (2010), 129-133.
- [34] H. Okamoto, T. Nakajima, Y. Ito, T. Aketo, K. Shimada, S. Yamato. *J. Pharm. Biomed Anal* 37 (2005), 517-528.
- [35] M. Pospisilova, M. Polasek, V. Jokl. *J. Pharm. Biomed Anal* 24 (2001), 421-428.
- [36] T. Pérez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, A. Sanz, E. Bravo. *J. Chromatogr B* 692 (1997), 199-205.
- [37] M. Javanbakht, M.H. Namjumanesh, B. Akbari-adergani. *Talanta* 80 (2009), 133-138.
- [38] W. Zhang, F. Feng, Y. Wang. *J. Pharm. Biomed Anal* 48 (2008), 1206-1210.
- [39] S. Khalil, M.M. Elrabiehi. *Microchem. J.* 62 (1999), 237-243.
- [40] M. Turchán, P. Jara-Ulloa, S. Bollo, L.J. Núñez-Vergara, J.A. Squella, A. Álvarez-Lueje. *Talanta* 73 (2007), 913-919.
- [41] A. Gutiérrez, M. Bárcena, N. Casillas, J.I. Escalante. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 11 (7) (2010), 457-470.
- [42] C. Cannes, F. Kanoufi, A.J. Bard. *J. Electroanal. Chem.* 547 (2003), 83-91.
- [43] C. Aguilera, C. Herrera, J. Ponce. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 38 (2) (2010), 227-233.
- [44] J. O'M. Brockis, A.K.N. Reddy. *Electroquímica moderna Vol 2*, Editorial Reverté, España, 2003.

- [45] C. Velasco (2010). Estudio del comportamiento electroquímico de fármacos de acción central: modafinilo y naratriptan. Disponible en <<http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/115651>>
- [46] M.L.A. Ivic, S.D. Petrovic, D.Z. Mijin, K.M. Drljevic-Duric. *Hem. Ind.* 65 (1) (2011), 87-91.
- [47] S.M. Hamza, N.M.H. Rizk, H.A.B Matter. *Arab. J. Chem.* (2013).
- [48] P. Norouzi, M.R. Ganjali. *J. Anal. Chem.* 63 (6) (2008), 566-573.
- [49] M.M. Ghoneim, M.M. Mabrouk, A.M. Hassanein, A. Tawfik. *J. Pharm. Biomed Anal.* 25 (2001), 933-939.
- [50] D.S Vidya, M.S. Prasad, M.V. Priya, K. Roja, N.Y. Sreedhar. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6 (10) (2014), 119-122.
- [51] M. Pérez-Ortiz, C. Muñoz, C. Zapata-Urzúa, A. Álvarez-Lueje. *Talanta* 82 (2010), 398-403.
- [52] T. El Ouafy, A. Chtaini, H. Oulfajrete, R. Najih. *ESAIJ* 9 (10) (2014), 352-358.
- [53] H.S. Nalwa. Handbook of Surface and Interface of Materials, Five-Volume Set, Academic Press, 2001.
- [54] J.C. Miller, J.N. Miller. *Estadística para química analítica*, Addison-Wesley Iberoamericana 2^{da} edición, Estados Unidos, 1993.