



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**“Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para
la cuantificación de diclofenaco”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO
LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTA:

Andrés Zamora Suárez

ASESOR

Dr. Gian Arturo Álvarez Romero

COASESORA

Q.A. Guadalupe Yoselin Aguilar Lira



PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

Septiembre 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Área Académica de Química
Chemistry Department

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:

Por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de Licenciatura en Química **Andrés Zamora Suárez**, quien presenta el trabajo de titulación "**Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco**" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	M. en C. Araceli Sierra Zenteno
PRIMER VOCAL:	Dr. Giaan Arturo Álvarez Romero
SEGUNDO VOCAL:	Dr. Luis Humberto Mendoza Huizar
TERCER VOCAL:	Dra. Irma Pérez Silva
SECRETARIO:	Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
PRIMER SUPLENTE:	Dra. Maria Luisa Soarez Da Silva
SEGUNDO SUPLENTE:	L. Q. en A. Guadalupe Yoselin Aguilar Lira

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 15 de agosto de 2017.

Dra. Myriam Meléndez Rodríguez
Coordinadora Adjunta de la Lic. en Química.



Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
Colonia Carboneras
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts. 2200 y 2201, Fax 6502
aaq_icbi@uaeh.edu.mx



En este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Química Analítica y de Electroquímica del Área Académica de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. La investigación se realizó gracias al financiamiento del proyecto 180989.

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

VI Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química (2015) “Cuantificación y caracterización electroquímica de diclofenaco en electrodo de grafito”.

IX encuentro de investigación del área academica de ciencias de la tierra y materiales (2016) “Cuantificación y caracterización electroquímica de diclofenaco en electrodo composite de pasta de carbono y nanotubos de carbono”.

Y ayudó a la publicación del artículo en la revista científica Journal of Electroanalytical Chemistry (2017) “New insights on diclofenac electrochemistry using graphite as working electrode”.



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Azcapotzalco

Otorga la presente
Constancia

a: **Zamora Suárez Andrés**

por presentar la ponencia

CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE DICLOFENACO
EN ELECTRODO DE GRAFITO
en modalidad cartel dentro del

VI Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química 2015
celebrado los días 23,24 y 25 de septiembre de 2015.

Coautor (es) Aguilar Lira Guadalupe Yoselin, Rojas Hernández Alberto
México, D.F., a 23 de septiembre de 2015.

Dr. Luis Enrique Noreña Franco
Director de la
División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Dr. David Elizarraraz Martínez
Jefe del
Departamento de Ciencias Básicas

Dra. María Teresa Castañeda Briones
Presidenta del Comité Organizador
VI Congreso de Investigación en Química

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Otorga la presente

CONSTANCIA

a **Andrés Zamora Suárez, G. A. Álvarez Romero, G. y Aguilar Lira**

Por la presentación del trabajo

CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE DICLOFENACO

EN ELECTRODO COMPOSITE DE PASTA DE CARBONO Y NANOTUBOS DE CARBONO

en el IX Encuentro de Investigación del Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales,
celebrado del 26 al 29 de septiembre de 2016 en las instalaciones de este Instituto.

“Amor, orden y progreso”

UNIVERSIDAD ~~ESTADO DE HIDALGO~~ ~~Mineral de la Reforma Hgo.~~, a 29 de septiembre del 2016.

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería



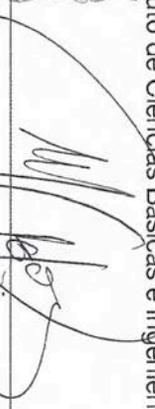
Dr. Víctor Esteban Reyes Cruz

Líder del **CAM** de Ciencias Básicas e Ingeniería

Dra. Ma. Aurora Veloz Rodríguez

Jefa del **ACTYM**

Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales



Dr. Orlando Ávila Pozos

Director del ICBI





New insights on diclofenac electrochemistry using graphite as working electrode



G.Y. Aguilar-Lira^a, G.A. Álvarez-Romero^a, A. Zamora-Suárez^a, M. Palomar-Pardavé^b, A. Rojas-Hernández^c, J.A. Rodríguez-Ávila^a, M.E. Páez-Hernández^a

^a Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Área Académica de Química, Carretera Pachuca-Tulancingo km. 4.5, 42076 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México

^b Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco, Departamento Materiales, Av. San Pablo Xalpa 180, Col. Reynosa Tamaulipas, C.P. 02200, Ciudad de México, México

^c Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, Área de Química Analítica, Av. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina, C.P. 09340, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Graphite electrode
Cyclic voltammetry
Diclofenac characterization
Pharmaceuticals
Urine

ABSTRACT

This paper reports new investigation on the electrochemical behavior of diclofenac using a bare graphite electrode. The electrochemical oxidation of diclofenac was studied using cyclic voltammetry (CV), an anodic peak was found at 0.557 V as reported earlier by other authors, reversing the cycle results in a new cathodic peak at 0.272 V, which is proposed to be related with the reduction of 2-(2-hydroxyprop-2-enyl) acetic acid. During the second cycle a new cathodic peak is observed at 0.333 V, associated to the oxidation of 2-(2-hydroxyprop-2-enyl) acetic acid to 1-hydroxy-2-(hydroxyphenyl) ethanolate. Both electrochemical processes resulted to be adsorption-controlled, statistical fit of theoretical information with the experimental voltammograms, one electron transference is demonstrated which supports the proposed mechanism. From an analytical point of view, it was demonstrated that direct quantification of diclofenac using the anodic oxidation peak results less favorable when compared with an indirect quantification using the 2-(2-hydroxyprop-2-enyl) acetic acid oxidation peak. The modified Simplex method was used to optimize differential pulse voltammetry parameters to achieve an exact and precise quantification of diclofenac in standard and real samples obtaining very competitive results compared with other more sophisticated working electrodes.

1. Introduction

Diclofenac ([2 - [(2,6-Dichlorophenyl) amino] phenyl] acetic acid) (Fig. 1) is one of the most used nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), which blocks the cyclooxygenase enzyme and degrades prostaglandins produced by cells that cause inflammation, pain and fever [1]. Due to its low solubility, it is usually used as its sodium salt. Since 1974, diclofenac is widely prescribed for the treatment of pain, joint injuries, chronic inflammation, degenerative diseases, rheuma-tism, rheumatoid arthritis, osteoarthritis and musculoskeletal injuries [2,3].

Diclofenac is used as tablets, capsules, suppositories, intravenous solutions and gels for dermal application.

Due to the high demand of diclofenac in the pharmaceutical industry, a large number of analytical methods have been proposed for its quantification, usually high performance liquid chromatography (HPLC) [4–7], gas chromatography [8,9], capillary zone electrophoresis (CZE) [10], spectrophotometry [11], spectrofluorometry [12], and

layer chromatography [13]. All these methods have some disadvantages such as: sample pretreatment (extractions or chemical reactions), previous derivatization, time-consuming analysis, the high analysis cost due to the technicians needed and the maintenance of the equipment.

Electrochemical techniques for the characterization and quantification of this drug have recently rise as a promising alternative due to its many advantages: shorter analysis times compared with routine techniques, lower cost per analysis, good sensitivity and selectivity, in some cases the sample does not requires pre-treatment and/or is not destroyed. In electrochemical techniques, the working electrode plays an important role since the analytical parameters depend on the electrode's response. Different materials for the working electrodes used for diclofenac quantification have already been reported in literature: modified with nickel hydroxide [14], edge-plane pyrolytic graphite with or without single walled carbon nanotubes [15,16], potentiometric electrode [17], bismuth [18], modified carbon paste [19–23], modified glassy carbon [24], and boron-doped diamond [25]. So far, the use of graphite as working electrode has been extensively

Corresponding author.

E-mail address: giaan@uaeh.edu.mx (G.A. Álvarez-Romero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.03.050>

Received 25 January 2017; Received in revised form 15 March 2017; Accepted 28 March 2017

Available online 19 April 2017

1572-6657/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

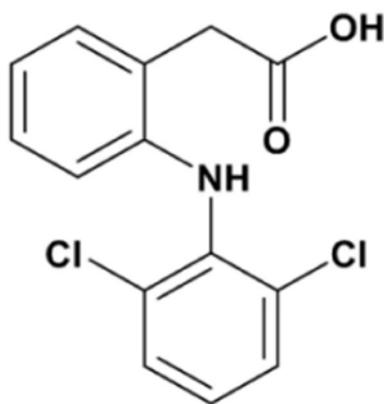


Fig. 1. Chemical structure of diclofenac.

reported in literature due to the great working potential window and the low cost of this material [26–28], even though, no diclofenac has not been reported to be studied with such electrodes.

There exist very few reports about the electrochemical characterization of diclofenac. Goyal et al. reported a cyclic voltammetry study of diclofenac using an edge-plane pyrolytic graphite electrode (EPPGE) coated with single wall carbon nanotubes. In the anodic sweep, a maximum current for diclofenac's oxidation was observed at a potential of 0.55 V with the production of 5-OH diclofenac, which is reduced in the successive cathodic sweep to diclofenac-2,5-quinone imine. During the second anodic sweep, a new oxidation peak is observed and related to the oxidation of diclofenac-2,5-quinone imine, involving $2e^-$ and $2H^+$ [15]. Afkhami et al. reported almost the same electrochemical behavior for diclofenac but using an Au-nanoparticles/Multi Walled Carbon Nanotubes/Glassy Carbon electrode, establishing an adsorption process for the reduction of 5-OH diclofenac [29]. Recently, Cid-Cerón et al. demonstrated that the electrochemical oxidation of diclofenac using a carbon paste electrode (CPE) involves a $1e^-$ EC mechanism, with a consecutive chemical reaction where 2,6 dichloroaniline and 2-(2-hydroxyprop-2-phenyl) acid acetic are formed [30].

In this work, diclofenac is characterized electrochemically using a bare graphite electrode, in order to have a better understanding of the chemical processes happening, and with this knowledge and the use of chemometrics, establish a simple, inexpensive, but competitive methodology to quantify diclofenac in pharmaceutical and biological samples.

2. Material and methods

2.1. Material and equipment

All chemical reagents used were analytical grade. Pharmaceutical samples were purchased at local pharmacies. All solutions used were prepared using deionized high purity water (18.2 MΩ/cm). Electrochemical tests were performed using an AUTOLAB PGSTAT302N potentiostat connected to a PC. A three electrode system was used, where the reference electrode is a double-junction saturated Ag/AgCl (KCl saturated) electrode, high purity graphite rods are used as auxiliary and working electrodes. pH measurements were performed using a Corning digital pH meter pH/ION 450; also a Sartorius CPA224S analytical balance was used. UV–vis absorbance spectra were recorded on a HACH (DR 3900) spectrophotometer with a 1.0 cm quartz cell.

Sodium diclofenac (Sigma-Aldrich) solutions were bubbled with high purity nitrogen before each experiment in order to remove oxygen. A 0.1 mol L^{-1} pH 7 phosphate buffer was used to maintain a constant working pH (monobasic potassium phosphate and dibasic potassium phosphate from Sigma-Aldrich). All electrical potentials in this work are referred to the Ag/AgCl (KCl saturated) reference electrode.

2.2. Construction of the support for the working electrode

A $\phi = 6 \text{ mm}$ (Sigma Aldrich, purity 99.999%) graphite rod was used as working electrode. In order to maintain a constant working surface, Teflon tubes $\phi = 9 \text{ mm}$ were used to support the graphite rod, using epoxy resin (Araldite-HY) to immobilize the graphite. To harden the resin, the electrodes were treated for 12 h at $60 \text{ }^\circ\text{C}$. After this, one of the ends was sanded until graphite was exposed.

2.3. Electrochemical analysis of diclofenac by means of cyclic voltammetry using graphite as working electrode

Cyclic voltammetry (CV) is performed to a 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer (pH 7) with and without the presence of diclofenac ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), starting at the equilibrium potential in anodic direction using a potential window of -1.3 to 1.3 V at different scan rates. Anodic and cathodic peaks are analyzed in order to establish the relation between the maximum current intensity of the anodic peak with the scan rate.

2.4. Differential pulse voltammetry optimization for diclofenac quantification

Diclofenac quantification was performed using differential pulse voltammetry (DPV). DPV variables were optimized with the modified Simplex method: pulse width (ms), pulse amplitude (mV), step potential (mV) and pulse period (ms), in order to achieve the higher analytical response (anodic current).

Multisimplex @ v. 2.1 was used to perform the simplex optimization. A simplex is a geometric structure having a number of vertex of $k + 1$, where k is the number of factors to be optimized. The optimization uses an algorithm which consists of a series of rules that forces the simplex to "move" towards the optimal response region. After 18 experiments, the optimum parameters were obtained: a pulse width of 73 ms, a pulse amplitude of 123 mV, a step potential of 13 mV and a pulse period of 178 ms.

2.5. Analytical characterization of the optimized methodology

Statistical analysis of the calibration curves obtained with the optimized system was performed in order to establish the detection (LOD) and quantification (LOQ) limits, along with the sensitivity of the proposed analytical method. LOD and LOQ were estimated as $a + 3s_{y/x}$ and $a + 10s_{y/x}$ respectively, where the value of a , the calculated intercept of the adjusted calibration curve and $s_{y/x}$ is the standard deviation.

Interference effect of other chemical species was evaluated as the relative error percentage related to the variation of the analytical response with and without the presence of the interference. The study was conducted using solutions with the same diclofenac concentration but different interference concentrations: equal, 10, 100 and 1000 times higher than diclofenac concentration.

Reproducibility of the electrode's response was determined constructing five different graphite electrodes and measuring several times the maximum anodic current obtained in a solution with a fixed diclofenac concentration ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). The relative standard deviation was used to determine the reproducibility. Repeatability was evaluated almost the same way, but measuring nine consecutive times with just one of the electrodes, using a $7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sodium diclofenac solution.

2.6. Diclofenac quantification in real samples

For the analysis of real samples, two different commercial tablets (A and B, both from different brands) are analyzed. For this, ten tablets of each commercial product were crushed to fine powder. A sample of this

powder was weighed to the same value reported in the drug's label, then it was diluted using a 0.1 mol L⁻¹ pH 7.0 phosphate buffer solution. The obtained solution was stirred using an ultrasonic bath for approximately 5 min, then filtered using a Whatman Glass Microfiber filter with a pore diameter of 70 mm. The filtrate was then transferred to a 100 mL volumetric flask.

In the case of urine samples, these were stored in a refrigerator immediately after collection. 10 mL of each sample was centrifuged for 10 min at 2500 rpm. The supernatant was filtered using a 0.45- μ m filter and then diluted 1:100 with the phosphate buffer solution (pH 7.0). The solution was doped with a standard of diclofenac in order to achieve a 7×10^{-6} mol L⁻¹ concentration.

The optimized DPV methodology was used along with the standard addition method for diclofenac quantification. A Student test (t) [31] was used to evaluate whether there was significant difference between the value obtained with the proposed methodology and both, the value reported on the drug's label, and that obtained with the official spectrophotometric methodology [7]. In this last, diclofenac was determined by calibration, registering the absorbance of the samples and standards at 276 nm.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of the electrochemical kinetics of diclofenac in the graphite electrode

Fig. 2 presents the CVs of the phosphate buffer system (blank) and the buffer-diclofenac system. For this last, it can be observed the formation of an anodic peak (Ia) with a maximum current at 0.557 V, which is related with the oxidation of the anionic form of diclofenac, since the pKa of the molecule is 4.15 [31]. Cid-Cerón et al. found that diclofenac's electrochemical oxidation involves an EC mechanism, where the electrochemical reaction involves a one electron-exchange while the chemical reaction involves breaking up the oxidation product through the nitrogen atom, with the formation 2,6-dichloroaniline and 2-(2-hydroxyphenyl) acetic acid, as shown in Fig. 3 [30].

When the potential scan was reversed, a cathodic peak (IIc) was observed at 0.272 V. As there is no information in literature about this process, it can be assumed that it corresponds to the reduction of 2-(2-hydroxyphenyl) acetic acid to 1-hydroxy-2-(hydroxyphenyl) ethanolate. During the second sweep, one new anodic peak (IIa) appears at 0.333 V, this could be related to the oxidation of 1-hydroxy-2-(hydroxyphenyl) ethanolate (previously formed) to 2-(2-hydroxyphenyl) acetic acid (Fig. 4); indicating that peaks IIc and IIa are related to the

same REDOX process.

To support this proposal, several CVs were carried out right after the first potential sweep, but limiting the potential window to values where the diclofenac molecule is no longer oxidized (Fig. 2). Three consecutive potential sweeps clearly show that peaks IIc and IIa remain without significant changes supporting the REDOX process proposed.

Fig. 5a shows a family of CVs recorded as described earlier (where peaks IIa and IIc were formed) but at different scan rates. Analyzing the results, a linear relationship between the logarithm of the respective peak currents and the logarithm of the scan rate can be observed, with slopes close to one, suggesting that both electrochemical processes are controlled by adsorption (Fig. 5b).

Considering the adsorption-controlled processes occurring in IIa and IIc, Eq. (1) can be used to obtain the i vs E theoretical plots [32,33].

$$i = \frac{n^2 F^2 v A \Gamma_0 (b_O / b_R) \exp[(nF/RT)(E - E^{0'})]}{RT \{1 + (b_O / b_R) \exp[(nF/RT)(E - E^{0'})]\}^2} \quad (1)$$

where: A is the electrode surface area, n is the number of electrons, v is the potential scan rate, R is the universal gas constant, T is the absolute temperature and F is the Faraday constant, E^{0'} is the formal potential, Γ_0 is the surface excess concentration, b_O and b_R are related to the standard free of adsorption energy of the oxidized (O) and reduced (R) species respectively.

The corresponding potential and current peaks can be depicted as:

$$E_p = E^{0'} - (RT/nF) \ln(b_O/b_R) \quad (2)$$

$$i_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} v A \Gamma_0 \quad (3)$$

Substitution of Eq. (3) in Eq. (1), and rearranging leads to Eq.(4):

$$i = \frac{4i_p (b_O/b_R) \exp[(nF/RT)(E - E^{0'})]}{\{1 + (b_O/b_R) \exp[(nF/RT)(E - E^{0'})]\}^2} \quad (4)$$

Proper parametrization of Eq. (4) results in Eq. (5):

$$i = \frac{P_1 P_2 \exp[P_3 (E - P_4)]}{\{1 + P_2 \exp[P_3 (E - P_4)]\}^2} \quad (5)$$

where:

$$P_1 = 4i_p, P_2 = b_O/b_R, P_3 = nF/RT \text{ and } P_4 = E^{0'}$$

A non-linear fit of the experimental data, corresponding to peaks IIa and IIc, with the theoretical model described by Eq. (5) was performed, so parameters P₁, P₂, P₃ and P₄ can be estimated; for this purpose Origin@ software V 8.0 was used for the statistical analysis.

Fig. 6 shows a graphic comparison of the experimental and the

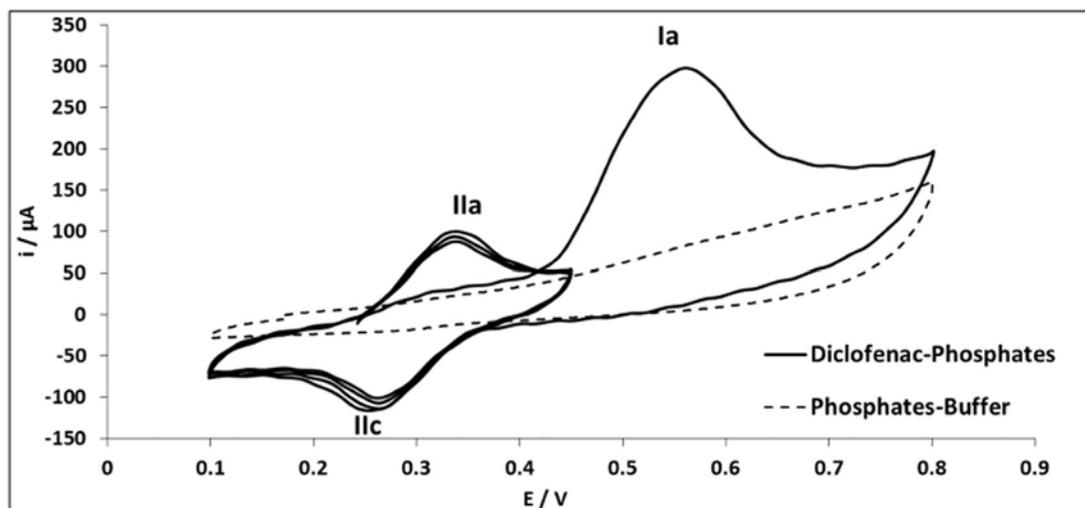


Fig. 2. CVs recorded in the system graphite/phosphate buffer pH = 7 in the absence (broken line) and presence of 1×10^{-3} mol L⁻¹ diclofenac (solid line). Consecutive CVs were obtained after 3 consecutive cycles but limiting the potential window from 0.1 to 0.8 V. In all the cases the potential scan starts at 0.3 V in the positive direction at 50 mVs⁻¹.

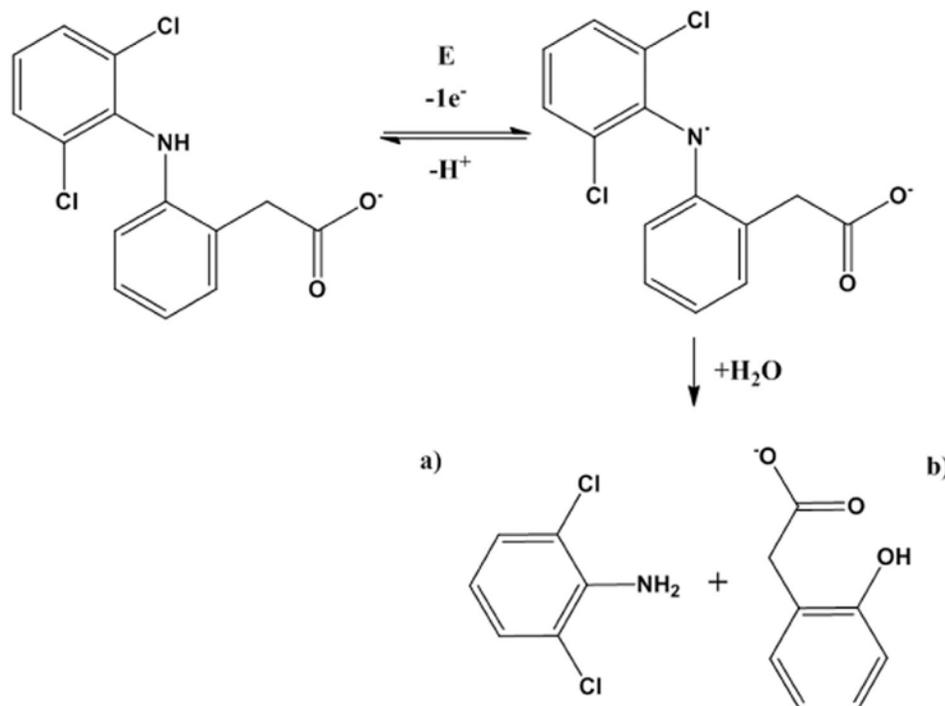


Fig. 3. Oxidation mechanism for diclofenac anion [30].

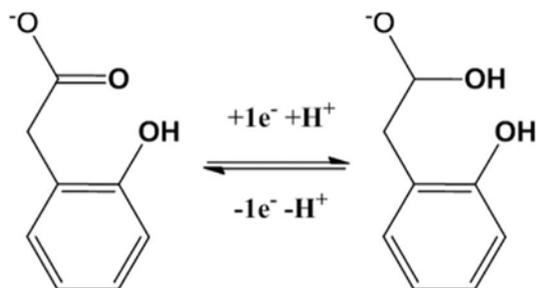


Fig. 4. Mechanism proposed for the electrochemical reduction of 2-(2-(2-hydroxyprop-2-enyl)acetic acid to 1-hydroxy-2-(hydroxyphenyl)ethanolate and its oxidation at pH 7.

theoretical data. The values obtained for parameters P₁, P₂, P₃ and P₄ through the best fit are shown in Table 1. From P₃ it can be estimated the number of electrons *n* involved in the electrochemical process related to IIa and IIc peaks; values very close to one were obtained for both cases, this gives support to the proposed mechanism shown Fig. 4.

3.2. Quantitative analysis of diclofenac through peak IIa

Traditionally, voltammetric proposals for the quantification of diclofenac are based in the analysis of the anodic peak corresponding to the direct oxidation of diclofenac, this was made with the graphite electrode (considering peak Ia) and the analytical parameters obtained are shown in Table 2.

Although, considering the behavior observed for diclofenac in the graphite electrode, and taking advantage of the adsorption of 1-hydroxy-2-(hydroxyphenyl)ethanolate, a methodology can be proposed for the indirect quantification of diclofenac through peak IIa. A similar strategy has already been studied and reported for the quantification of naproxen by our research group [34].

3.2.1. Preconcentration of 1-hydroxy-2-(hydroxyphenyl)ethanolate

3.2.1.1. Potentiodynamic pretreatment. In order to maximize the anodic peak current IIa, which will serve as analytical response, a potentiodynamic pretreatment is proposed prior to quantification. Two DPVs were performed consecutively using a potential window from 0.1 V to 0.8 V in order to oxidize diclofenac and adsorb as much as possible the 1-hydroxy-2-(hydroxyphenyl)ethanolate in the electrode's

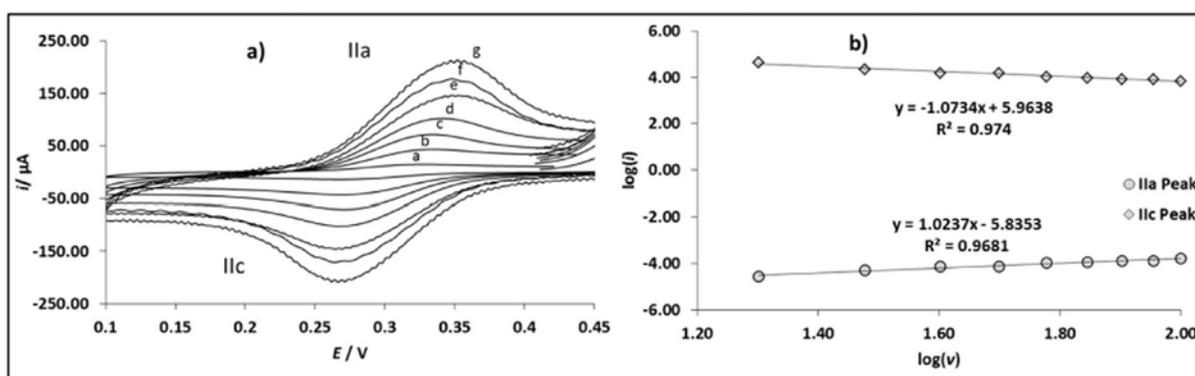


Fig. 5. a) CVs recorded in 1×10^{-3} mol L⁻¹ diclofenac-phosphate buffer pH = 7 at different scan rates (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 60, (f) 80 (g) 100 mV s⁻¹. Previously, a linear voltammetry (not shown) was carried out in order to oxidize diclofenac. b) logarithm of the peak current (*I*_p) vs logarithm of the scan rate for peaks IIa and IIc.

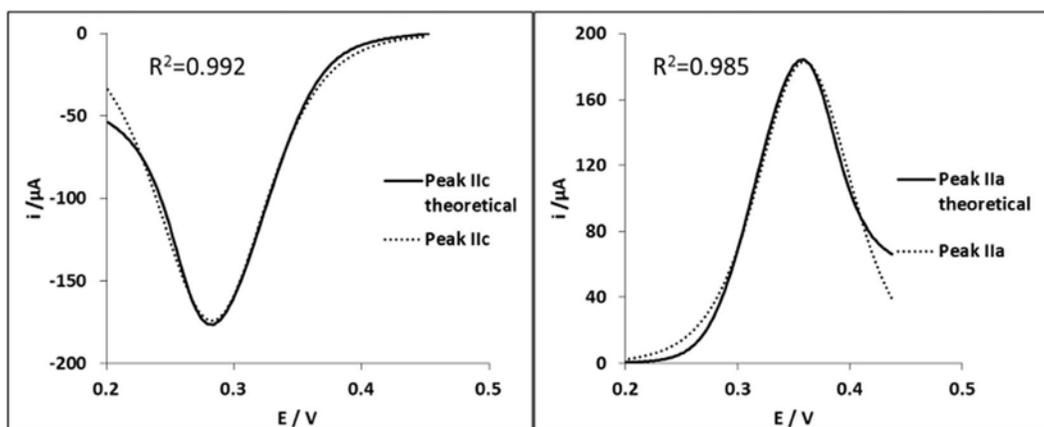


Fig. 6. Non-linear fit of the experimental peaks for processes IIc and IIa with Eq. (5).

Table 1

Values obtained for parameters P_1 , P_2 , P_3 and P_4 of Eq. (5) obtained through the non-linear fit of the experimental and theoretical data. Also, the number of electrons (n) involve in each electrochemical process calculated through parameter P_3 are presented.

Parameter	Value (peak IIc)	Value (peak IIa)
P_1 (μA)	-696.76	731.608
r_2	1.167	0.001
P_3 (V^{-1})	35.66	35.946
P_4 (V)	0.286	0.169
n	0.915	0.922

surface. After this, in order to clean the electrode's surface and prepare it for a new measure, a potential of -0.5 V was imposed for 60 s in a methanol media followed by a DPV, without polishing the electrode's surface.

An average calibration curve was obtained considering three replicates when measuring each standard concentration (Fig. 7). Least squares analysis was used to fit the experimental data and obtain the equation with which the analytical parameters were evaluated (Table 2).

3.2.1.2. Potentiostatic pretreatment. Another pretreatment procedure was evaluated where a potential of 0.610 V was imposed for 50 s, once again oxidizing diclofenac expecting to adsorb as much 1-hydroxy-2-(hydroxyphenyl) ethanolate as possible in the electrode's surface. Then a DPV was performed to register the analytic response. An average calibration curve is then constructed with three replicates as explained in the potentiodynamic pretreatment (Fig. 8) and the resulting analytical parameters from the statistical analysis were obtained (Table 2).

The indirect strategies proposed for the indirect quantification of diclofenac were compared with the traditional direct quantification using the oxidation peak of the drug, results are shown in Table 2. It becomes clear that the indirect proposals have better sensitivities and detection limits (LOD), whereby this methodology was further used for the quantification in real samples.

Table 3 summarizes the analytical parameters reported in literature

Table 2

Analytical parameters obtained with the indirect quantification methodologies (peak IIa from Fig. 2) and the traditional direct quantification (peak Ia from Fig. 2).

Analytical parameters	Potentiostatic pretreatment (IIa peak)	Potentiodynamic pretreatment (IIa peak)	Quantification with peak Ia (direct oxidation of diclofenac)
Sensitivity ($\mu\text{A}\cdot\text{L}/\mu\text{mol}$)	2.26 ± 0.53	3.02 ± 0.24	1.00 ± 0.53
R^2	0.995	0.999	0.954
[LOD] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.76	2.45	21.86
[LOQ] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2.56	8.19	72.87
Linear range ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.80–9.5	5.08–111	30–100

for other electrochemical methodologies, so these can be compared with those obtained with the proposed methodologies in this work. The obtained LOD results better than those reported using modified Ni(OH)₂-Nickel electrode, ISE and Bismuth electrode; almost equivalent when compared to that reported for a carbon paste/carbon nanotubes electrode and only slightly higher compared to the Boron Doped Diamond (DDB) electrode. Also, the linear range results to be wider than those reported for DDB, Bismuth, Carbon paste/CNT's and ISE electrodes, and the LOQ is lower when compared with the ISE and the Modified Ni(OH)₂-Nickel electrodes. SWCNTs-EPPGE and EPPGE electrodes have better linear ranges and LOD, but the construction of these electrodes is complex, expensive and in some cases they use mercury.

Reproducibility and repeatability were evaluated by means of the relative standard deviation percentage, obtaining in both cases values under 10%, which is acceptable for an analytical methodology. A complete discussion of these results can be found in the Supplementary Material section.

Also, considering the effect of some chemical interferences, different concentrations of some chemicals possibly found in commercial excipients or biological samples are studied to establish their influence in the analytical signal used for the quantification of diclofenac. Only naproxen produced a significant variation of the analytical signal when present in the same concentration of diclofenac. A complete discussion of this results can be found in the Supplementary Material section.

3.3. Diclofenac quantification in real samples

Commercial and urine samples were analyzed with the proposed methodology as described in Section 2.6, and it is validated comparing with those obtained with the accepted spectrophotometric method (direct measurement of absorbance at 276 nm). Table 4 shows the results obtained for diclofenac quantification in commercial drugs and urine with the respective statistical parameters used for comparison.

In the case of commercial drugs, for the first sample (A) and based on the statistical t analysis, it can be concluded that there is no significant differences between the results obtained with the proposed methodology and the quantity reported in the drug's label. On the other hand, analysis of sample B shows significant difference, this suggests

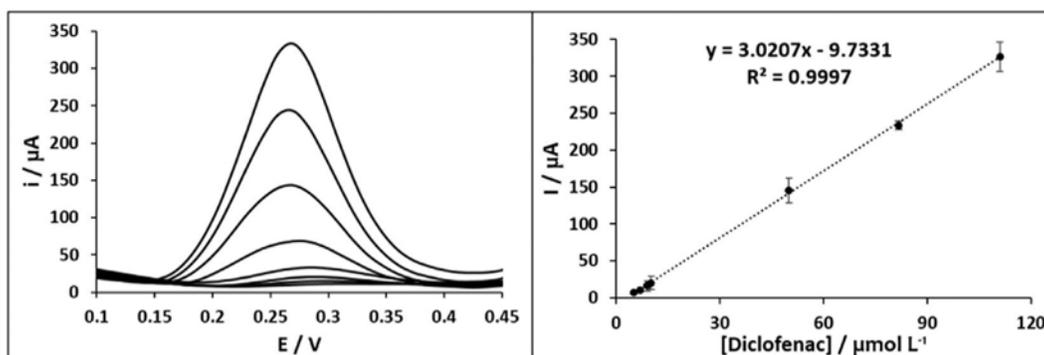


Fig. 7. a) DPVs obtained at different diclofenac concentration, phosphate buffer pH = 7. b) Average calibration curve for diclofenac using the potentiodynamic pretreatment.

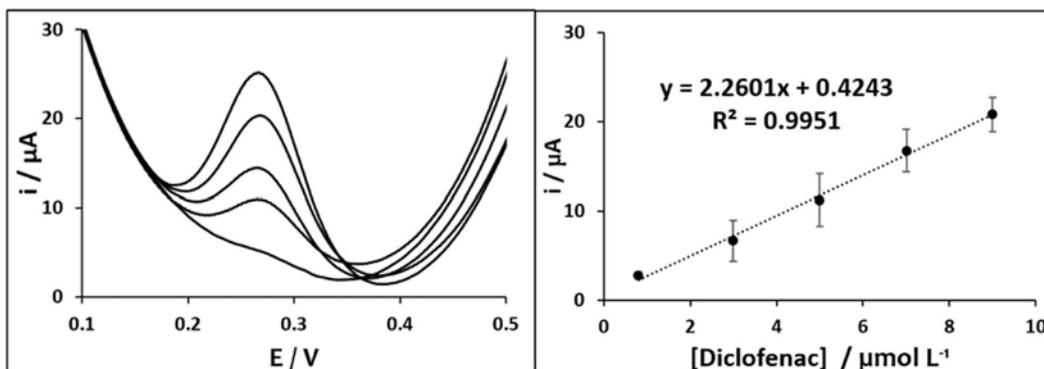


Fig. 8. a) DPVs obtained at different diclofenac concentration, phosphate buffer pH = 7. b) Average calibration curve for diclofenac using the potentiostatic pretreatment.

Table 3

Comparison of the analytical parameters obtained in this work with those reported in literature.

Electrode	pH	E (V) anodic peak	Method	Linear interval ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Reference
^a Graphite	7	0.295	DPV	8.19–111	2.45	This work
^b Graphite	7	0.295	DPV	2.56–9.5	0.76	This work
Modified Ni(OH) ₂ –Nickel	100 mM NaOH	0.490	Amperometry	196–2650	3.17	[14]
SWCNTs-EPPGE	7.2	0.439 y 0.854	SWV	1.0×10^{-3} – 500×10^{-3} and 2.5×10^{-5} – 1500×10^{-5}	0.82×10^{-3} and 22.5×10^{-5}	[15]
EPPGE	7.2	0.66	SWV	10×10^{-3} – 1000×10^{-5}	6.2×10^{-5}	[16]
ISE	6.0–9.0	–	Potentiometry	10^{-1} –1000	4	[17]
Bismuth	–	–	Amperometry	6–50	4.3	[18]
Carbon paste/CNT's	–	–	Voltamperometry	2–100	0.8	[19]
Boron doped diamon (DDB)	1.0 (HClO ₄)	–	Amperometry	5–50	0.14	[26]

^a Potentiodynamic pretreatment

^b Potentiostatic pretreatment.

Table 4

Diclofenac concentration in the analyzed pharmaceutical and urine samples with the corresponding statistical parameters.

Sample	Commercial tablets A	Commercial tablets B	Urine
Diclofenac reported at label (mg)	100	100	
Diclofenac found with the proposed method in drug (mg)	98.68 ± 5.39	91.81 ± 1.74	
Diclofenac found with the spectrophotometric method in drug sample (mg)	102.65 ± 3.07	92.83 ± 1.23	
Recovery percentage (Spectrophotometric vs DPV)	96.13%	98.90%	
t_{exp} (drug label vs DPV)	0.42	8.1	
$n = 3$; $t_{\text{critic}} = 4.30$, confidence level of 95%			
t_{exp} (Spectrophotometric vs DPV)	1.10	0.82	
$n_1 = 3$, $n_2 = 3$; $t_{\text{critic}} = 2.78$, confidence level of 95%			
Diclofenac found with the spectrophotometric method in urine ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			7.2 ± 0.64
t_{exp} (Spectrophotometric vs DPV)			7.41 ± 0.01
$n_1 = 3$, $n_2 = 3$; $t_{\text{critic}} = 2.78$, confidence level of 95%			0.56

that sample B contains less diclofenac than that reported on the label. When comparing the proposed DPV methodology to the official spectrophotometric methodology, assuming equal variances (as demonstrated in an F test), experimental coefficient results to be smaller than the critical for both A and B samples, demonstrating that there are no significant differences between both methodologies, which demonstrates that the proposed methodology can be used with confidence to quantify diclofenac in this kind of samples.

The same conclusions arise when comparing the results obtained with both methodologies when applied in urine samples. This demonstrates that the proposed methodology is reliable for diclofenac quantification in simple samples, like the pharmaceutical ones, and other more complex like urine.

4. Conclusions

With the results obtained, it was confirmed that diclofenac's oxidation involves the formation of 2,6-dichloroaniline and 2-(2-hydroxyphenyl) acetic acid. This last presents a quasireversible REDOX equilibrium with 1-hydroxy-2-(hydroxyphenyl) ethanolate which is adsorption controlled, and involves a one-electron transfer. With this knowledge, a competitive methodology for the indirect quantification of diclofenac was proposed, based in the anodic response of 1-hydroxy-2-(hydroxyphenyl) ethanolate oxidation. The DPV methodology presented better results compared with the direct quantification using the diclofenac oxidation peak. No significant differences were registered comparing the results obtained with both, the proposed methodology and the official one. These results demonstrate that simple electrodes, as graphite, can still be useful for quantitative analysis when considering robust chemometrics for the optimization of each one of the methodology stages, even when compared with more sophisticated electrodes, where organic solvents and mercury are sometimes used to improve the analytical signal.

Acknowledgments

The authors thank CONACYT for the financial support given through project 180989. Also, GAAR, MEPH, JARA and ARH thank the SNI for the distinction of their memberships and the stipend received. GAAR, MEPP, ARH, JARA and MEP like to thank SEP PRODEP for financial support through the RedNIQAE-2015. GYAL thanks CONACYT for the stipend granted for Doctoral studies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.03.050>.

References

- N.M. Davies, J.Y. Saleh, N.M. Skjoldt, Detection and prevention of NSAID-induced enteropathy, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (1) (2000) 137–155.
- M. Manrique, P. Garidel, M. Suwalsky, J. Howe, K. Brandenburg, The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (6) (2009) 1296–1303.
- X. Yang, F. Wang, S. Hu, Enhanced oxidation of diclofenac sodium at a nano-structured electrochemical sensing film constructed by multi-wall carbon nanotubes-surfactant composite, *Mater. Sci. Eng. C* 28 (1) (2008) 188–194.
- L. González, G. Yuln, M. Volonté, Determination of cyanocobalamin, betamethasone, and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations, by high performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (3) (1999) 487–492.
- M.E. Abdel-Hamid, L. Novotny, H. Hamza, Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (4) (2001) 587–594.
- United States Pharmacopeia National Formulary, USP 26, NF 21, Rockville, (2003) 1273.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 10a edición, (2011) 1–2.
- D. Lansdorp, T. Janssen, P. Gurlen, T. Vree, High-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac and its hydroxy metabolites in human plasma and urine, *J. Chromatogr.* 528 (1990) 487–494.
- A. Siou, F. Pommier, J. Godbillon, Determination of diclofenac in plasma and urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry with possible simultaneous determination of deuterium-labeled diclofenac, *J. Chromatogr.* 571 (1–2) (1991) 87–100.
- W. Jin, J. Zhang, Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A* 868 (1) (2000) 101–107.
- J. Botello, J.G. Pérez-Caballero, Spectrophotometric determination of diclofenac sodium with methylene blue, *Talanta* 42 (1) (1995) 105–108.
- L.A. Carreira, M. Rizk, Y. El-Shabrawy, N.A. Zakhari, S.S. Toubar, Europium(III) ion probe spectrofluorometric determination of diclofenac sodium, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (11) (1995) 1331–1337.
- S. Sun, H. Fabre, J. Maillols, Test procedure validation for the TLC assay of a degradation product in a pharmaceutical formulation, *J. Liq. Chromatogr.* 17 (11) (1994) 2495–2509.
- M. Hajjizadeh, A. Jabbari, H. Heli, A. Moosavi-Movahedi, S. Haghgo, Electrochemical oxidation of some anti-inflammatory drugs on a nickel hydroxide-modified nickel electrode, *Electrochim. Acta* 53 (4) (2007) 1766–1774.
- R. Goyal, S. Chatterjee, B. Agrawal, Electrochemical investigations of diclofenac at edge plane pyrolytic graphite electrode and its determination in human urine, *Sensors and Actuators B* 145 (2010) 743–748.
- R. Goyal, S. Chatterjee, A. Singh Rana, The effect of modifying an edge-plane pyrolytic graphite electrode with single-wall carbon nanotubes on its use for sensing diclofenac, *Carbon* 48 (2010) 4136–4144.
- M. Shamsipur, F. Jalali, S. Ershad, Preparation of a diclofenac potentiometric sensor and its application to pharmaceutical analysis and to drug recovery from biological fluids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (5) (2005) 943–947.
- A. Rodríguez, E. Barrado, Y. Castrillejo, R. Santos, J. Lima, Validation of a tubular bismuth film amperometric detector: Determination of diclofenac sodium by multisyringe flow injection analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (1) (2007) 47–53.
- A. Ambrosi, R. Antiochia, L. Campanella, R. Dragone, I. Lavagnini, Electrochemical determination of pharmaceuticals in spiked water samples, *J. Hazard. Mater.* 122 (3) (2005) 219–225.
- B. Chethana, S. Basavanna, Y. Arthoba Naik, Voltammetric determination of diclofenac sodium using tyrosine-modified carbon paste electrode, *Ind. Eng. Chem. Res.* 51 (2012) 10287–10295.
- A. Ensafi, M. Izadi, Karimi-Maleh H (2013) sensitive voltammetric determination of diclofenac using room-temperature ionic liquid-modified carbon nanotubes paste electrode, *Ionics* 19 (2013) 137–144.
- B. Moghaddam, A. Mohammadi, M. Fathabadi, Application of carbon nanotube-graphite mixture for the determination of diclofenac sodium in pharmaceutical and biological samples, *Pharmaceut. Anal. Acta* 3 (5) (2012) 1–6.
- K. Sarhangzadeh, M. Jabbari, A. Khatami, S. Bahari, Simultaneous determination of diclofenac and indomethacin using a sensitive electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube and ionic liquid nanocomposite, *J. Appl. Electrochem.* 43 (2013) 1217–1224.
- M. Blanco-López, M. Lobo-Castañón, J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco, Voltammetric response of diclofenac-molecularly imprinted film modified carbon electrodes, *Anal. Bioanal. Chem.* 2003 (377) (2003) 257–261.
- T. Gimenes, M. de Freitas, A. Munoz, M. Richter, Flow-injection Amperometric method for determination of diclofenac in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode, *Electroanalysis* 223 (11) (2011) 2521–2525.
- E. Dede, Ö. Saglam, Y. Dilgin, Sensitive voltammetric determination of niclosamide at a disposable pencil graphite electrode, *Electrochim. Acta* 104 (2014) 127 (2014) 20–26.
- D. Long, B. Ertek, Y. Dilgin, L. Červenka, Voltammetric determination of tannic acid in beverages using pencil graphite electrode, *Czech J. Food Sci.* 33 (1) (2005) 72–76.
- L. Young, J. Sam, K. Hoon, H. Kwon, J. Won, K. Sook, Determination of caffeine using a simple graphite pencil electrode with square-wave anodic stripping voltammetry, *Microchim. Acta* 146 (2004) 207–213.
- A. Afkhami, A. Bahiraei, T. Madrakian, Gold nanoparticle/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a sensitive voltammetric sensor for the determination of diclofenac sodium, *Mater. Sci. Eng. C* 59 (2016) 168–176.
- M.M. Cid-Cerón, D.S. Guzmán-Hernández, M.T. Ramírez-Silva, A. Galano, M. Romero-Romo, M. Palomar-Pardavé, New insights on the kinetics and mechanism of the electrochemical oxidation of diclofenac in neutral aqueous medium, *Electrochim. Acta* 199 (2016) 92–98.
- N. Miller, C. Miller, Estadística y quimiometría para química analítica, fourth ed., Prentice Hall, España, 2000.
- A.J. Bard, R.L. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 2000.
- M. Palomar-Pardavé, S. Corona-Avendano, M. Romero-Romo, G. Alarcón-Angeles, A. Merkoçic, M.T. Ramírez-Silva, Supramolecular interaction of dopamine with β -cyclodextrin: An experimental and theoretical electrochemical study, *J. Electroanal. Chem.* 717–718 (2014) 103–109.
- G.Y. Aguilar-Lira, R. Álvarez, A. Rojas-Hernández, M. Páez-Hernández, J. Rodríguez-Ávila, M. Romero-Romo, Voltammetric analysis of naproxen in graphite electrodes and its determination in pharmaceutical samples, *Electroanalysis* 26 (2014) 1573–1581.

Agradecimientos

Primero le agradezco a mis padres (Eulogio y María Luisa) por su apoyo, paciencia, tolerancia y amor que me han otorgado, han sido el principal cimiento para mi vida profesional y como persona. A mi hermano (Ángel Eduardo) por ser el ejemplo y cariño que profesa, gracias por apoyarme y aconsejarme cada que lo necesito.

A la UAEH por haberme aceptado ser parte de ella y abierto sus puertas a su seno científico, así como a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos y su apoyo para finalizar la licenciatura.

Al Dr. Giaan Álvarez, quien es mi asesor de tesis y aceptó trabajar conmigo. Gracias por confiar en mí, apoyarme, tener mucha paciencia, comprenderme e incluso reprenderme cuando era necesario. Es un ejemplo a seguir como persona y espero que sigamos en contacto.

A Lupita (Guadalupe Yoselin) porque sin ti no hubiera entendido muchas cosas. Gracias por estar conmigo en el transcurso de este proyecto, por tenerme mucha paciencia, por guiarme y explicarme las veces necesarias. Eres una gran asesora, persona y amiga, espero que en el futuro volvamos a trabajar juntos.

A mis compañeros del laboratorio 2 (Miriam, Dr. Irma, Dr. Yucundo, Gaby y demás) muchas gracias por el apoyo cuando se lo necesitaba y por hacer que le ambiente de trabajo fuera ameno.

A mis compañeros y amigos de la carrera (Manuel, Maricela, Hugo, Carlos y demás compañeros) por todos los ratos divertidos que vivimos, por su compañerismo, amistad y por su apoyo moral que me aportaron para seguir adelante en la carrera.

A Elsa, por ser una excelente amiga, a pesar de que no tenemos mucho tiempo de amistad, te he llegado a querer y apreciar mucho, me has dado hermosos momentos de apoyo, felicidad y tranquilidad. Se que nuestra amistad llegará a la posteridad.

A Maricela Silva, por los años de amistad que me has brindado, por ser mi amiga incondicional y confidente. Por tantos momentos de fiestas, risas y llantos, siempre vas a ser mi "miga".

A mis amigos (Eduardo, Rey Manuel, Belem y Brenda) gracias por estar en mis logros y en fracasos, por todas sus palabras de aliento, por toda la felicidad que me han brindado, ustedes hacen que la vida sea mejor. JB por hacerme entender que debo ser como dice José Saramago, "el frío observador que subordina la emoción al registro objetivo de los hechos".

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Propiedades del diclofenaco	6
2.2 Métodos clásicos para la determinación de diclofenaco	7
2.3 Métodos electroquímicos para determinar diclofenaco	7
2.4 Electrodo de trabajo	8
2.4.1 Grafito	8
2.4.2 Composites.....	10
2.5. Método de optimización Simplex	13
2.5.1 El método Simplex básico	13
2.5.2 El método Simplex modificado	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	21
5.1. Equipos y reactivos	22
5.2. Construcción de los electrodos y sus soportes	23
5.2.1. Construcción del electrodo de barra de grafito.....	23
5.1.2. Construcción del electrodo composite de pasta de carbono con nanotubos de carbono.....	24
5.3. Estudio voltamperométrico del diclofenaco	25
5.4. Optimización de los parámetros de la voltamperometría diferencial de pulsos usada para la cuantificación.....	27
5.5. Caracterización analítica de la metodología voltamperométrica propuesta	27
5.6. Cuantificación de diclofenaco en muestras reales	30
5.6.1. Muestras farmacéuticas.....	30
5.6.2. Muestras de orina	30
5.6.3. Validación de las metodologías propuestas	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	32
6.1. Electrodo de barra de grafito	33
6.1.1. Estudio voltamperométrico del diclofenaco	33
6.1.2. Optimización de los parámetros de la voltamperometría diferencial de pulsos	39
6.1.3. Caracterización analítica de la metodología propuesta.....	39
6.1.4. Cuantificación de diclofenaco en muestras reales	43
6.2. Electrodo de pasta de carbono con nanotubos de carbono	45
6.2.1. Estudio voltamperométrico del diclofenaco	45
6.2.2. Optimización de los parámetros de la voltamperometría diferencial de pulsos	48

6.2.3. Caracterización analítica de la metodología propuesta.....	48
6.2.4. Cuantificación de diclofenaco en muestras reales	51
7. CONCLUSIONES	53
8. ANEXOS.....	57
8.1. Celda electroquímica.....	58
8.2. Técnicas electroanalíticas	59
8.2.1. Voltamperometría	59
8.2.2. Voltamperometría cíclica	60
8.2.3 Voltamperometría diferencial de impulsos.....	64
9. REFERENCIAS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del diclofenaco	6
Figura 2. Estructura del grafito	9
Figura 3. Estructura de los nanotubos de carbono.	11
Figura 4. Simplex con dos variables de control.....	13
Figura 5. Interpretación geométrica para las dimensiones más bajas.	14
Figura 6. Ejemplo de una optimización	16
Figura 7. Movimientos que realiza el simplex.	16
Figura 8. Construcción del electrodo de barra de grafito.	24
Figura 9. Construcción del electrodo composite.	24
Figura 10. Gráfico lineal de i_p vs $v^{1/2}$ para el electrodo de grafito.....	33
Figura 11 VC's del sistema diclofenaco-fosfatos para el electrodo de grafito.....	35
Figura 12. Mecanismo de oxidación del anión diclofenaco.....	35
Figura 13. Gráfico lineal de i_p vs $v^{1/2}$ para el electrodo de barra de grafito	36
Figura 14. VC's del diclofenaco a diferentes ventanas de potencial	38
Figura 15. Estudio del pH para el electrodo de grafito	38
Figura 16. VDP y curvas de calibración con el electrodo de grafito.....	41
Figura 17. Gráfico i_p vs $v^{1/2}$ del área electroactiva del electrodo composite.....	45
Figura 18. VC's a diferentes ventanas de potencial con el electrodo composite ...	46
Figura 19. Estudio de pH con el electrodo de grafito- NTC.....	47
Figura 20. Gráfico lineal de i_p vs $v^{1/2}$ para el electrodo grafito-NTC.....	48
Figura 21. Curva de calibración para diclofenaco usando el electrodo de grafito-NTC.....	49
Figura 22 Curvas de calibración corregidas usando el área electroactiva.....	55
Figura 23. Intervalos de potencial para electrodos de diferentes materiales.	58
Figura 24. Técnicas voltamperométricas.	60
Figura 25. Señal potencial-tiempo durante la voltamperometría cíclica.....	61
Figura 26. Voltamperograma cíclico del par Fe^{2+}/Fe^{3+}	62
Figura 27. Excitación de la señal en al voltamperometría diferencial de pulsos....	66
Figura 28. Voltamperograma de la diferencial de pulsos para cloranfenicol.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades generales del diclofenaco	6
Tabla 2. Reactivos utilizados en la metodología propuesta	22
Tabla 3. Parámetros óptimos de la VDP encontrados para el electrodo de grafito	39
Tabla 4. Parámetros analíticos para el diclofenaco con el electrodo de grafito.....	41
Tabla 5. Estudio de interferentes para el electrodo de grafito.....	42
Tabla 6. Concentración de diclofenaco en muestras farmacéuticas utilizando el electrodo de grafito.....	44
Tabla 7. Concentración de diclofenaco en muestras de orina utilizando el electrodo de grafito.....	44
Tabla 8. Parámetros óptimos de la VDP con el electrodo grafito-NTC	48
Tabla 9. Parámetros analíticos para el electrodo de grafito-NTC	49
Tabla 10. Estudio de interferentes con el electrodo grafito-NTC.....	51
Tabla 11. Concentración de diclofenaco en muestras farmacéuticas usando el electrodo grafito-NTC.....	52
Tabla 12. Concentración de diclofenaco en muestras de orina usando el electrodo grafito-NTC.....	52
Tabla 13. Parámetros analíticos corregidos con respecto al área electroactiva para los electrodos propuestos.....	55
Tabla 14. Parámetros analíticos del diclofenaco con los electrodos propuestos comparados con los electrodos reportados en la literatura.	56

ABREVIATURAS

A	Área superficial del electrodo
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
C	Concentración molar
cm	Centímetro
D	Coeficiente de difusión
DFC	Diclofenaco
E	Potencial
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IL	Intervalo lineal de cuantificación
I_{pa}	Corriente de pico anódico
I_{pc}	Corriente de pico catódico
K	Kelvin
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m	Metro
M	Molar
mL	Mililitros
mm	Milímetros
ms	Milisegundos
mV	Milivolts
n	Número de electrones
nm	Nanómetros
NTC	Nanotubos de carbono
NTCMP	Nanotubos de carbono de multipared
NTCPS	Nanotubos de carbono de pared simple
R^2	Coeficiente de correlación

s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visible
v	Velocidad de barrido
VC	Voltamperometria cíclica
VDP	Voltamperometria diferencial de pulsos
W	Watt
μA	Microamperes
μm	Micrómetros
μmol	Micromol
$^{\circ}\text{C}$	Grado celsius

1. INTRODUCCIÓN

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

El diclofenaco pertenece al grupo de los fármacos analgésicos antiinflamatorios no esteroideos con propiedades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias. Se utiliza generalmente para el tratamiento de condiciones agudas o crónicas en las que están presentes el dolor y la inflamación, como es la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, lesiones deportivas. Si el paciente consume diclofenaco a largo plazo, puede causarle problemas a nivel cardiovascular, como ataques cardíacos y accidentes cerebro-vasculares, que pueden amenazar su vida. También, se sabe que su uso prolongado puede causar efectos secundarios graves al sistema digestivo, que incluyen sangrado o perforación (Carson et al., 1990). Por todo lo anterior, y al ser un fármaco de venta libre y frecuentemente prescrito, se debe contar con un método de cuantificación exacto y preciso para lograr un buen control de calidad en el producto que llega a los consumidores.

Para determinar al diclofenaco en muestras farmacéuticas, el método oficial según la Farmacopea Mexicana (2011) es determinación por HPLC y espectroscopia UV-Vis. Se han reportado otros métodos alternativos como: cromatografía de gases, espectrofotometría, cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida, fluorometría, espectrofotometría y la electroforesis capilar de zona. Todos los métodos descritos comparten la desventaja de ser procedimientos tediosos, presentan tiempos largos de análisis, en algunos casos el mantenimiento del equipo es costoso, la muestra necesita derivatización y pueden presentarse interferencias al analizar medicamentos compuestos.

Las técnicas electroquímicas han destacado en los últimos años debido a sus múltiples ventajas: son métodos simples, de bajos costos, buena selectividad, la muestra no requiere un tratamiento previo, tiempos de análisis relativamente cortos y la posibilidad de miniaturización (Devi et al., 2017). Algunos de los métodos electroquímicos reportados para la determinación de diclofenaco son la potenciometría, voltamperometría y la amperometría. Para cuantificar electroquímicamente este fármaco destacan los métodos voltamperométricos, donde se utilizan diferentes tipos de electrodos de trabajo para seguir la oxidación

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

del diclofenaco como señal analítica. Algunos electrodos son sofisticados y de alto costo, por lo que es necesario recurrir a materiales que sean de bajo costo y sean equivalentes en su respuesta a los electrodos ya reportados en la literatura. De esta forma, además de mejorar las propuestas electroanalíticas existentes, se tendría también una metodología alternativa al método oficial de la farmacopea.

Un material que puede ser una alternativa para utilizarlo como electrodo de trabajo es el grafito, ya que ofrece varias características particulares, como una buena conductividad, baja corriente de fondo y bajo costo. Existen variantes del grafito las cuales tienen propiedades muy particulares y son una buena alternativa para la construcción de electrodos de trabajo, donde destacan los nanotubos de carbono (NTC). Por sus nanoestructuras unidimensionales únicas, los nanotubos de carbono presentan fascinantes propiedades electrónicas y ópticas que son distintas de otros materiales carbonosos y nanopartículas de otros tipos. Estas propiedades hacen que los nanotubos ofrezcan ventajas al electroanálisis como la disminución en el sobrepotencial (lo que puede eliminar y/o reducir la interferencia de muchos contaminantes) y el aumento de la señal analítica que puede mejorar parámetros analíticos tales como sensibilidad y límite de detección.

Dentro de las variantes de los electrodos de trabajo, existen los electrodos *composite*. Un *composite* se construye combinando (mezclando) de manera homogénea dos o más materiales con propiedades diferentes. Se combinan las características de los dos materiales para obtener las propiedades únicas de los *composites*.

En este trabajo, se propone una metodología para la cuantificación electroquímica de diclofenaco en medio acuoso utilizando electrodos de trabajo a base de carbono. Mediante voltamperometría cíclica se realizó la caracterización electroquímica del fármaco en los electrodos propuestos, la cuantificación del fármaco se llevó a cabo mediante voltamperometría diferencial de pulsos, y los parámetros propios de esta técnica se optimizaron mediante el método Simplex-Modificado. Se realizó la caracterización analítica mediante curvas de calibración

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

además de evaluar la posible interferencia de otras especies químicas. Una vez optimizado y caracterizado todo el sistema electroanalítico, se llevó a cabo la cuantificación de diclofenaco en muestras de orina y farmacéuticas con la metodología propuesta.

2. ANTECEDENTES

2.1 Propiedades del diclofenaco

El diclofenaco pertenece al grupo de los fármacos analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) con propiedades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias (Kormosh et al., 2009). El diclofenaco se utiliza generalmente para el tratamiento de condiciones agudas o crónicas en las que están presentes el dolor y la inflamación, como es la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, lesiones deportivas (Yang et al., 2008). El diclofenaco (DFC) es un derivado fenilacético cuyo nombre químico es ácido 2-{2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil} acético y cuya fórmula molecular es $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ (Figura 1); sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la Tabla 1.

En un estudio reciente realizado a un grupo de personas que sufrieron algún problema en el sistema cardiovascular, como paros cardiacos extrahospitalarios, una parte de este grupo fue tratada con algún AINE 30 días antes del evento cardiovascular, donde se identificó que el ibuprofeno y el diclofenaco fueron los AINE más utilizados (Kathrine et al., 2017).

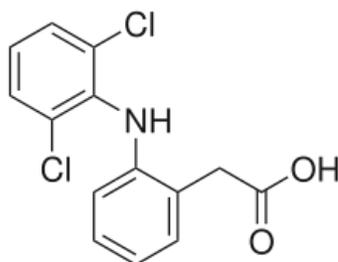


Figura 1 Estructura química del diclofenaco

Tabla 1. Propiedades generales del diclofenaco (Santos, 2006)

Peso molecular	295.1 g mol ⁻¹
Punto de fusión	287 °C
Solubilidad en agua	2.40 mg L ⁻¹
pKa	4.15

2.2 Métodos clásicos para la determinación de diclofenaco

Las técnicas oficiales para cuantificar diclofenaco que reporta la Farmacopea Mexicana (2011) son HPLC y espectroscopía UV-vis.

Para la determinación del diclofenaco mediante HPLC se usa una columna de 25 cm x 4.6 mm empaquetada con L7 (octilsilano unido a las partículas de sílice) de 5 μm , un detector de luz UV a una longitud de onda de 254 nm, una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} y como fase móvil una solución de ácido ortofosfórico /ortofosfato hidrogenado pH 2.5 y metanol (34:66) (Farmacopea Mexicana, 2011).

Para la determinación mediante espectroscopia UV-Vis las absorbancias obtenidas, de la solución de la muestra y la de referencia, son a una longitud de onda de 276 nm y se utiliza como fase amortiguadora una solución de fosfatos 0.05M, pH 7.5 (Farmacopea Mexicana, 2011).

Existen otras técnicas alternativas reportadas en la literatura como: cromatografía de gases (Degen, 1988), espectrofotometría, cromatografía en capa delgada (Bhushan et al., 2007), cromatografía líquida (Roskar, 2003), fluorometría (Daminai, 1999), espectrofotometría (García et al., 1998) y la electroforesis capilar de zona (Jin et al., 200). Estos métodos, sin embargo, pueden presentar algunas desventajas tales como: el alto costo de los equipos de trabajo, consumen mucho tiempo de análisis y las técnicas de extracción líquido-líquido o fase sólida usadas como pretratamientos de muestras son tediosas y consumen mucho tiempo.

2.3 Métodos electroquímicos para determinar diclofenaco

Las técnicas electroquímicas permiten el estudio del mecanismo de oxidación-reducción del diclofenaco sobre un electrodo de trabajo. Desde el punto de vista cuantitativo, las ventajas de estas técnicas es la sensibilidad inherente y alta selectividad lo que permite determinaciones sencillas, tanto en muestras comerciales como en fluidos biológicos.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

Para cuantificar al diclofenaco electroquímicamente, existen reportados varios métodos que utilizan técnicas potenciométricas, que se basan en el uso de electrodos selectivos a iones, como la propuesta de un electrodo de segundo tipo Pt | Hg | Hg₂(DCF)₂ | grafito (Santini et al., 2006), un sensor de membrana basado en diclofenaco sódico utilizando rodamina B como extractante en el plastificante del electrodo (Kormosh et al., 2007), una membrana selectiva plastificada de cloruro de polivinilo donde el electrodo contiene una asociación iónica de diclofenaco con rojo neutro (Kormosh et al., 2009) y un sensor selectivo basado en porfirinas de manganeso (III) (Vlascici et al., 2010).

A pesar de representar una buena propuesta, los electrodos selectivos a iones presentan desventajas como las interferencias en el sistema, vida útil corta y una posible contaminación del electrodo.

Considerando las técnicas voltamperométricas, se han propuesto varios tipos de electrodos de trabajo, como los electrodos de carbono modificados con impresión molecular (López et al., 2003), grafito pirolítico con nanotubos de carbono de pared simple (Yang et al., 2008), grafito pirolítico (Goyal et al., 2010), Cu-dopado con zeolita en grafito-epoxi (Manea et al., 2010) y níquel modificado con hidróxido de níquel (Hajjizadeh et al., 2007). Algunos de los electrodos mencionados son sofisticados, por lo que la materia prima para su construcción puede ser de elevado costo. También, al ser electrodos modificados, pueden presentar algunas desventajas como los materiales pueden ser costosos, la modificación puede involucrar una síntesis compleja y la baja estabilidad de la superficie modificada.

2.4 Electrodo de trabajo

2.4.1 Grafito

El grafito es una forma cristalina de carbono con una estructura en capas con planos u hojas basales de átomos de carbono de empaquetado compacto (Figura 2), por lo cual es un material frágil. El grafito es un material formado por el apilamiento de capas de grafeno individuales. Cada capa es una fuerte red

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

hexagonal de carbono sp^2 , mientras que las capas interactúan entre sí por fuerzas débiles de van der Waals. La conductividad térmica en el plano del grafito pirolítico altamente ordenado puede alcanzar hasta 2000 W/m K (Popilevsky et al., 2016).

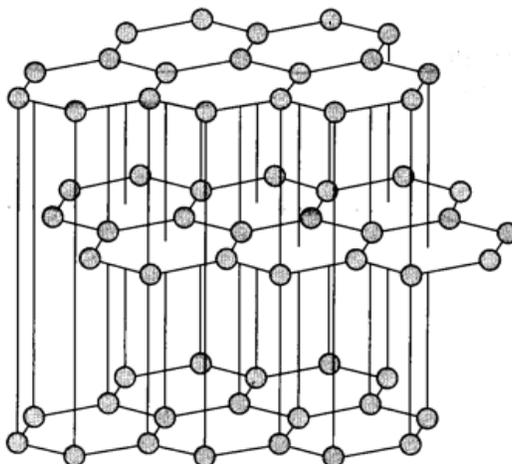


Figura 2. Estructura del grafito (Callister, 2007)

Es un material importante para aplicaciones en electrodos, elementos calefactores, escobillas para motores, dispositivos y partes de horno de alta temperatura (Senén et al., 2002). En la literatura aún no se encuentra reportada alguna metodología donde se utilice el grafito como electrodo de trabajo para la cuantificación de diclofenaco. Sin embargo, se ha utilizado para la determinación electroquímica de ácido tánico en diferentes tipos de bebidas obteniendo alta sensibilidad, excelente selectividad y reproducibilidad (Dai Long VU et al., 2015). También se ha utilizado en la determinación de niclosamida obteniendo buenos parámetros analíticos y se propone incluso la fabricación de electrodos de barra de grafito desechables de bajo coste para la determinación de compuestos farmacéuticos (Dede et al., 2014). Se desarrolló un método electroquímico usando un electrodo de barra de grafito para el análisis del fármaco de paclitaxel, que se utiliza contra el cáncer en ciertas áreas del cuerpo humano. El método electroquímico que desarrollaron mostró ciertas ventajas contra un método con

HPLC más sofisticado, dado que el procedimiento de separación no es necesario ya que los excipientes no interfieren en el análisis de la muestra farmacéutica de paclitaxel (Gowda et al., 2014).

2.4.2 Composites

Un composite se prepara mezclando de manera homogénea dos o más materiales (comunmente con propiedades diferentes) proporcionándole propiedades únicas al composite. Un electrodo composite consta de, al menos, una fase conductora y una fase aislante que sirve normalmente como soporte de la primera. Este tipo de electrodos ofrecen muchas ventajas ya que su fabricación es versátil en cuanto al tamaño y forma del material. En el análisis electroquímico, presentan mayor relación señal/ruido con respecto a un electrodo conductor puro, por lo que se puede aplicar en análisis cuantitativos logrando mejores límites de detección. Otra ventaja de este tipo de electrodos es que permiten incorporar especies que aumenten la selectividad y/o la sensibilidad del propio material, mediante la modificación química del conductor y/o del aislante antes de la fabricación del composite, o mediante incorporación física de alguna especie química dentro de la matriz del composite (Sánchez et al., 2012).

Los materiales composite han sido utilizados como parte de metodologías cuantitativas, por ejemplo, en la determinación voltamperométrica de cafeína en refrescos de cola donde se usa un electrodo composite de pasta de carbono con nanopartículas de oro (Ören et al., 2017).

2.4.2.1 Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (NTC) son formas cilíndricas con diámetros entre 1 y 50 nm, formadas por átomos de carbono. Es una estructura que se entiende como una monocapa de átomos de grafito (grafeno) que forma una red atómica hexagonal (Figura 3) con un átomo de carbono en cada vértice de los hexágonos, doblada sobre sí misma hasta formar un tubo molecular (Senén et al., 2002).

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

Los nanotubos de carbono pueden ser de pared simple (NTCPS) o de multipared (NTCMP), como se puede observar en la Figura 3. Los NTCPS sólo se componen de una sola capa de grafeno; mientras que los NTCMP se encuentran compuestos de tubos anidados de diámetros que aumentan continuamente. Pueden ir desde un tubo externo y uno interno (un nanotubo de doble pared) hasta más de 100 tubos (paredes). La principal característica de estos NTC es proporcionar una conductividad térmica excelente comparable con otras partículas metálicas. Los nanotubos de carbono poseen un potencial significativo para varios dispositivos prácticos de escala nanométrica (Rehman et al., 2017).

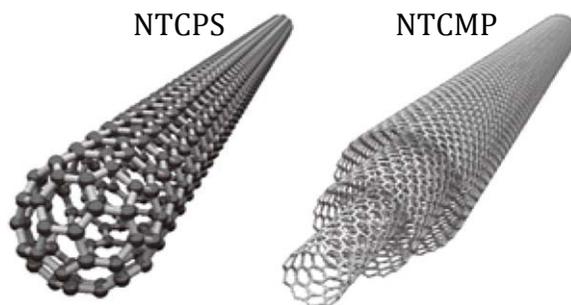


Figura 3. Estructura de los nanotubos de carbono (Cividanes et al., 2014)

Las propiedades de los nanotubos son:

- ⤴ Sistemas uni-dimensionales
- ⤴ Semiconductores o conductores eléctricos con características metálicas dependiendo de la estructura
- ⤴ Buenos conductores eléctricos
- ⤴ Densidad baja (menor que la del aluminio)
- ⤴ Propiedades mecánicas y elásticas muy favorables
- ⤴ Buena estabilidad térmica y conducción térmica

Los nanotubos de carbono en electrodos composite exhiben excelentes efectos de

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

mejora sobre la oxidación electroquímica de diclofenaco sódico (Yang et al., 2008), mejora la propiedad de adsorción y degradación del diclofenaco inducida por una diferencia de potencial sobre la superficie del electrodo (Huang et al., 2017).

Los nanotubos de carbono (NTC) se han aplicado con éxito en el desarrollo de nuevos materiales de electrodo para el electroanálisis, debido a su rápida transferencia de carga (Punbusayakul, 2012; Gooding, 2005) permiten la detección de compuestos inorgánicos y orgánicos a menores potenciales de trabajo y produciendo como resultado señales analíticas más altas (corriente y/o carga). Estas propiedades son interesantes en términos de determinación electroquímica, ya que la disminución en el sobrepotencial puede eliminar y/o reducir la interferencia de muchos contaminantes y el aumento de la señal analítica puede mejorar parámetros analíticos tales como sensibilidad analítica y límite de detección (Almeida et al., 2015). Los beneficios en el análisis electroquímico se deben principalmente al aumento del área de contacto de los NTC, ya los bordesque resultan ser sitios altamente reactivos para la electrocatálisis, ya que los NTC son efectivamente enrollados en tubos de grafito con planos basal y de borde, estos planos ayudan a que la transferencia de electrones se facilite (Xiaobo et al., 2010).

También se ha demostrado que las impurezas metálicas atrapadas en los nanotubos de carbono pueden ser responsables del aumento de la electroactividad (Xiaobo et al., 2010).

La mayoría de las metodologías reportadas en la literatura son optimizadas de manera puntual, esto quiere decir sólo se va modificando una variable de los parámetros de la técnica electroquímica utilizada y las otras se quedan estaticas. Mientras que la optimización mediante un método quimiométrico, donde se optimizan todas las variables de la técnica al mismo tiempo, esto puede mejorar los parámetros analíticos de la técnica comparados con los parametros analíticos obtenidos de manera puntual.

2.5. Método de optimización Simplex

2.5.1 El método Simplex básico

El método de optimización Simplex está basado en un algoritmo simple que busca la combinación de variables que correspondan al máximo o mínimo principales de cualquier función n-dimensional $F(x_1, x_2, \dots, x_n)$. Este método hace una búsqueda a través de un parámetro “espacial”, que puede interpretarse como una búsqueda sobre la superficie de respuesta del sistema a optimizar.

El número de experimentos iniciales es igual al número de variables de control mas uno (Figura 4). Estos ensayos iniciales forman lo que se llama “el primer simplex” o el simplex de partida.

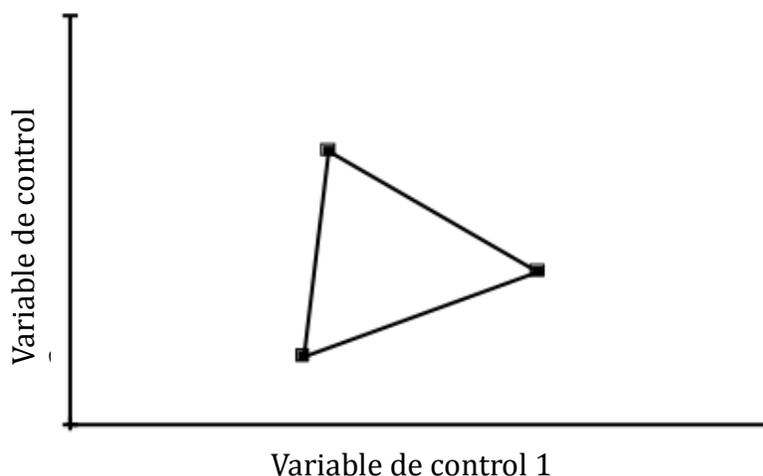


Figura 4. Simplex con dos variables de control (MultiSimplex, 2000)

La forma del simplex en el espacio de búsqueda dependerá entonces de las variables de las que depende la respuesta, para una variable el simplex será una línea, para dos variables un triángulo y para tres variables un tetraedro (Figura 5). Una interpretación geométrica es difícil con más variables, pero el enfoque matemático básico es el mismo.

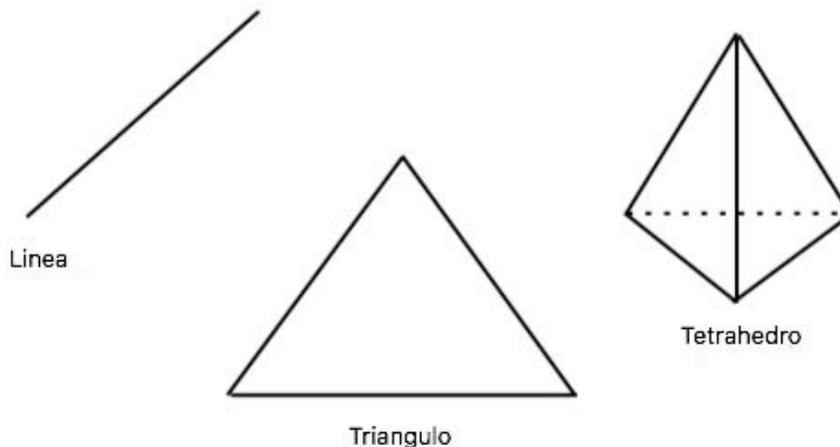


Figura 5. Interpretación geométrica para las dimensiones más bajas (MultiSimplex, 2000)

El algoritmo simplex básico sigue las siguientes reglas:

- La primera regla es rechazar el ensayo con el valor de respuesta menos favorable en el simplex actual.

Se calcula un nuevo conjunto de niveles de variables de control, por reflexión en el espacio de la variable de control opuesto al resultado indeseable. Este nuevo ensayo sustituye al ensayo menos favorable en el simplex. Esto conduce a una nueva respuesta menos favorable en el simplex que, a su vez, conduce a otro nuevo juicio, y así sucesivamente. En cada paso se aleja de las condiciones menos favorables. Por eso el simplex se moverá constantemente hacia condiciones más favorables.

- La segunda regla es nunca volver a los niveles de variables de control que han sido rechazadas.

La reflexión calculada en las variables de control también puede producir un resultado menos favorable. Sin esta segunda regla, el simplex oscilaría entre los dos niveles de las variables de control. Este problema se evita bien eligiendo la segunda condición menos favorable y alejándose de ella.

Además de estas dos reglas, dos reglas más serán usadas:

- Los intentos retenidos en el simplex por un específico número de pasos son reevaluados. La regla de la reevaluación evita que el simplex se pegue alrededor de una respuesta falsa favorable.
- No se realizan ensayos calculados fuera de los límites efectivos de las variables de control. En su lugar, se aplica una respuesta muy desfavorable, forzando al simplex a alejarse del límite.

2.5.2 El método Simplex modificado

El método simplex modificado tiene mucho en común con el método básico, pero puede ajustar su forma y tamaño dependiendo de la respuesta en cada prueba (Figura 6). Este método también se denomina método simplex de tamaño variable. Varias nuevas reglas se añaden a las reglas simplex básicas. Estas nuevas reglas hacen al simplex:

- Ampliar en una dirección de condiciones más favorables.
- Contraer si se tomó un movimiento en una dirección de condiciones menos favorables.

Los procedimientos para la expansión y la contracción permiten que el simplex modificado se acelere a lo largo de una trayectoria acertada de la mejora y, de esta manera, encontrar las condiciones óptimas. Por lo tanto, el simplex modificado normalmente alcanzará la región óptima más rápidamente que con el método básico y determinará los niveles óptimos más de cerca. Los movimientos (Figura 7) en una secuencia de optimización típica son fáciles de mostrar para dos variables de control (la respuesta se muestra por separado) (MultiSimplex, 2000).

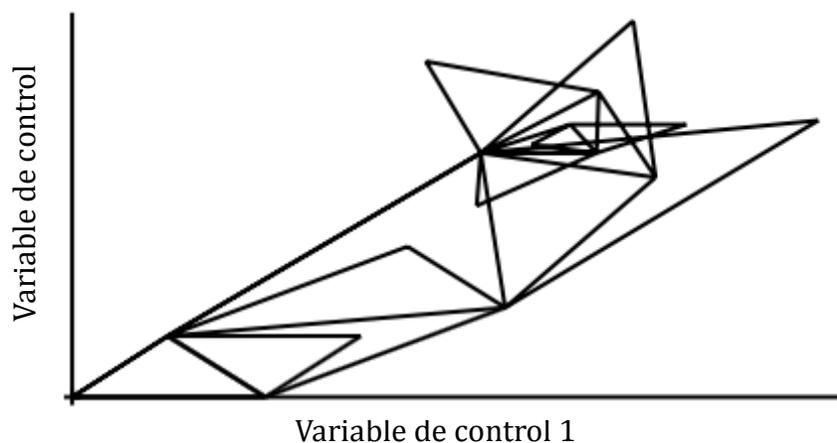


Figura 6. Ejemplo de una optimización mediante el método simplex modificado con dos variables de control (MultiSimplex, 2000)

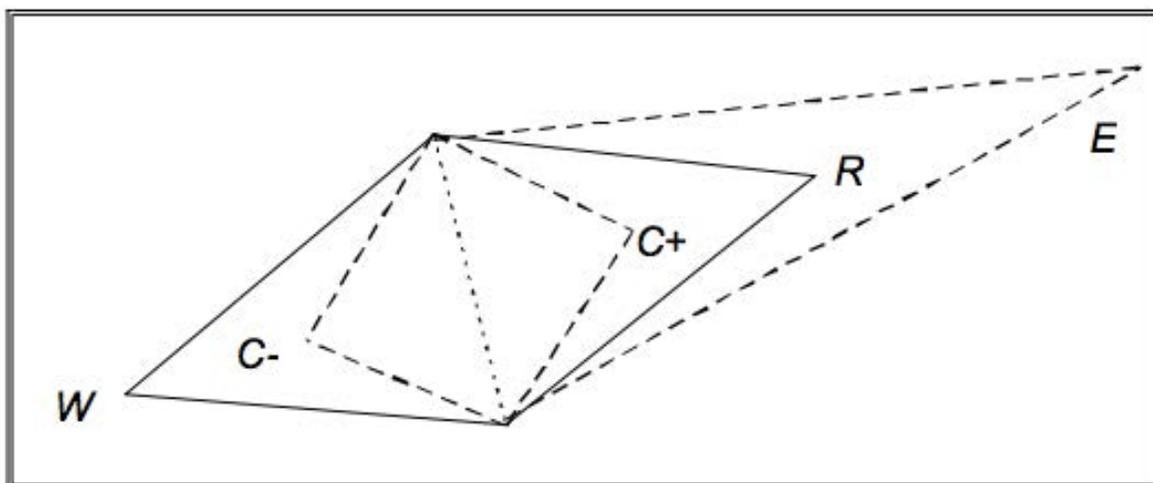


Figura 7. Movimientos que realiza el simplex. En una prueba rechazada (W), R= reflexión, E= expansión, C+= contracción positiva, C-= contracción negativa (MultiSimplex, 2000)

3. JUSTIFICACIÓN

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

El diclofenaco es importante por ser un AINE de amplia prescripción y de venta libre, por lo cual es necesario mantener un buen análisis de control de calidad en la industria farmacéutica de manera confiable y rápida. El método oficial está basado en HPLC y espectrofotometría UV-Vis, sin embargo, tienen múltiples desventajas, mientras que las técnicas electroquímicas han resultado una excelente alternativa para lograr un análisis preciso, exacto, rápido y de bajo costo.

En la literatura se mencionan algunas técnicas electroquímicas, destacando entre todas ellas las técnicas voltamperométricas, ya que son eficientes, permiten realizar análisis a un menor costo y se pueden aplicar fácilmente en campo. Estas técnicas dependen del uso de electrodos de trabajo, para el caso específico de la cuantificación de diclofenaco, se han reportado electrodos muy sofisticados con materiales novedosos que sin embargo elevan el costo del método y no lo hacen muy accesible.

Debido a lo anterior, en el presente proyecto se plantea una metodología voltamperométrica basada en la VDP y optimizada quimiométricamente para cuantificar al diclofenaco en muestras de orina y farmacéuticas, y que sea equivalente a las reportadas en la literatura así como a las establecidas en los métodos oficiales. Para ello se propone el uso de dos electrodos de trabajos diferentes: un electrodo de barra de grafito y un electrodo pasta de carbono con nanotubos de carbono incorporados, que son electrodos de bajo costo, fácil construcción y sencillos en su uso.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Establecer una metodología electroquímica optimizada para la cuantificación de diclofenaco en muestras reales mediante el uso de voltamperometría diferencial de pulsos y electrodos a base de grafito como electrodo de trabajo.

4.2 Objetivos específicos

- Construir soportes adecuados para el electrodo de grafito y el electrodo de pasta de carbono con NTC, mediante el uso de materiales de bajo costo para mantener una superficie de trabajo.
- Caracterización electroquímica del diclofenaco con los electrodos de trabajo mediante voltamperometría cíclica para poder establecer las mejores condiciones electroquímicas de cuantificación.
- Optimizar los parámetros propios de la voltamperometría diferencial de pulsos usando el método Simplex-Modificado para la obtener la máxima corriente anódica en la oxidación del diclofenaco.
- Obtención de los parámetros analíticos de los métodos voltamperométricos optimizados mediante análisis estadístico para conocer las ventajas y desventajas analíticas de los métodos propuestos.
- Cuantificar la cantidad de diclofenaco presente en muestras reales, las muestras a analizar serán de procedencia farmacéutica y orina de humano, aplicando la metodología voltamperométrica optimizada para validar contra la metodología aceptada en la Farmacopea Mexicana 2011.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1. Equipos y reactivos

Las medidas voltamperométricas se efectuaron usando un potenciostato Metrohm AUTOLAB PGSTAT302n. Se usó un sistema de tres electrodos: el electrodo de trabajo, el electrodo de referencia de Ag/AgCl saturado y como electrodo auxiliar una barra de grafito de alta pureza. Las medidas de pH fueron realizadas en un pH-metro digital Corning pH/ion meter 450. Las diversas sustancias utilizadas se pesaron en una balanza analítica Sartorius modelo CPA224S.

Reactivos

Los reactivos utilizados para todos los procedimientos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Reactivos utilizados en la metodología propuesta

Reactivo	Pureza	Casa comercial
Ácido acético	99%	Sigma-Aldrich
Ácido Ascórbico		Sigma-Aldrich
Ácido bórico	95%	Sigma-Aldrich
Ácido fosfórico	85.4%	Baker
Almidón		Sigma-Aldrich
Cloruro de potasio	99%	Sigma-Aldrich
Diclofenaco de sodio		Sigma-Aldrich
Endurecedor HY		
Ferricianuro de potasio (III)	99%	Sigma-Aldrich
Fosfato dibásico de potasio		Sigma-Aldrich
Fosfato monobásico de potasio		Sigma-Aldrich
Glucosa	99%	Baker
Lactosa		Sigma-Aldrich
Naproxeno sódico	98%	Sigma-Aldrich
Nitrato de sodio	99%	Sigma-Aldrich
NTC- multipared	95% (carbono)	Sigma-Aldrich

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

Paracetamol	98%	Sigma-Aldrich
Polvo de grafito	99%	Fluka
Povidona		Sigma-Aldrich
Resina epóxica (Araldite-506)	99%	Fluka
SDS	99%	Sigma-Aldrich

5.2. Construcción de los electrodos y sus soportes

5.2.1. Construcción del electrodo de barra de grafito

Para la construcción del electrodo de trabajo se usaron barras de grafito ultrapuro Sigma-Aldrich (6 mm de diámetro y pureza de 99.999%). Ya que se necesita tener un área constante durante los experimentos con el electrodo, se usó una barra de teflón que se perfora lo necesario para sostener dentro de ella un trozo de la mencionada barra de grafito. Posteriormente se rellenó con resina epóxica Araldit-HY y se deja curar por 12 h. Ya solidificada la resina, se pulió de forma que se expone la base de la barra de grafito (Figura 8).

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

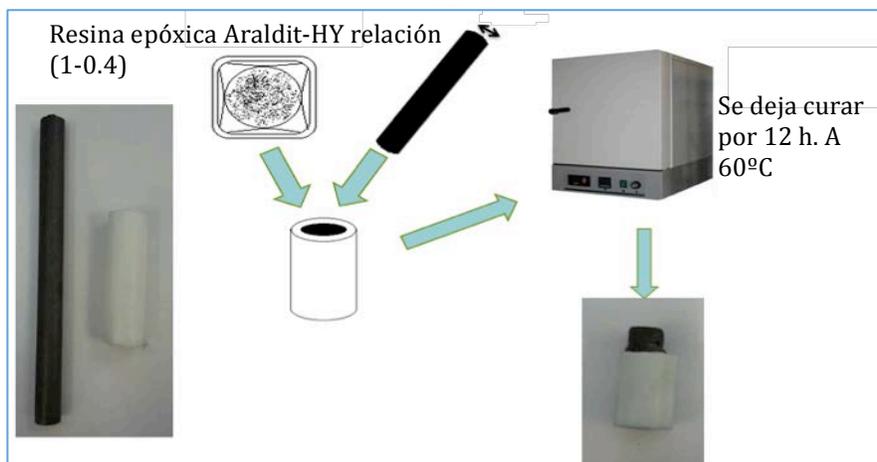


Figura 8. Construcción del electrodo de barra de grafito

5.1.2. Construcción del electrodo composite de pasta de carbono con nanotubos de carbono

La pasta para el electrodo de trabajo consiste en una mezcla de 45% de polvo de grafito, 5% de nanotubos de carbono multipared (NTCMP) y 50% de aceite mineral. La pasta obtenida se colocó con una microespátula en un tubo de jeringa de 1mL (30 mm de largo por 3 mm de ancho) y se compacta. Al final, en un extremo se colocó un contacto eléctrico de cobre con conexión tipo hembra (Figura 9).

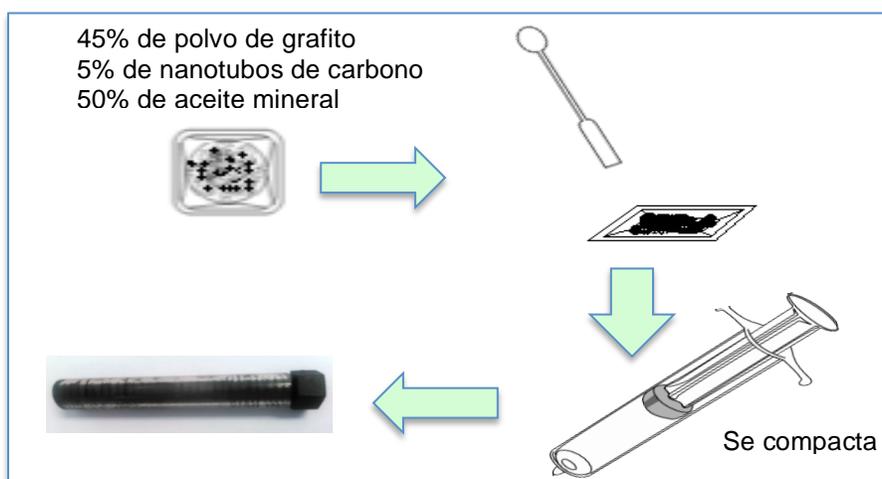


Figura 9. Construcción del electrodo composite

5.3. Estudio voltamperométrico del diclofenaco

Todos los potenciales están referidos al electrodo de referencia Ag/AgCl saturado y se usó como electrodo auxiliar una barra de grafito ultrapuro.

Se realizó una voltamperometría cíclica (VC), utilizando un potenciostato AUTOLAB, iniciando en el potencial de corriente nula, en sentido anódico, ciclando en una ventana de potencial de -1300 a 1300 mV y con una velocidad de barrido de 50 mV s⁻¹. Se analizó la solución blanco que consiste en un solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7, después se realizaron otras VC's para el sistema diclofenaco-fosfatos (1x10⁻³ M de diclofenaco). Se analizaron las ondas anódicas y catódicas encontradas a diferentes ventanas de potencial, con base en las señales podemos definir cuál señal analítica se puede utilizar para llevar a cabo la cuantificación del diclofenaco. Se realizó también el análisis de los cambios en la intensidad de la máxima corriente anódica vs la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en la señal seleccionada, ya que esto dará luz sobre el mecanismo que controla el proceso oxidativo.

El interés en el estudio del efecto que tiene el estado de la superficie del electrodo sobre la cinética electroquímica en diversas moléculas se debe a que, mediante la modificación superficial con activación electroquímica o la incorporación de nanoestructuras, pueden aumentar la reactividad en el electrodo y el cambio de las características cinéticas de transferencia electrónica en los proceso REDOX (Carrara et al., 2014).

El estudio para obtener el área electroactiva del electrodo para un proceso reversible, el cálculo del área electroactiva se realiza mediante la ecuación de Randles-Sevcik (ecuación 1). La ecuación de Randles-Sevcik, relaciona la corriente de pico con el área activa del electrodo y la velocidad de barrido.

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_o D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (1)$$

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

donde, I_p se refiere a la intensidad de corriente pico catódico o anódico, n es el número de electrones transferidos, A es el área electroactiva (cm^2), D_0 es el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), v es la velocidad de barrido (mV s^{-1}) y C_0 es la concentración de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

El área electroactiva se obtiene mediante VC's a diferentes velocidades de barrido en un solución de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Dentro del estudio de velocidades se realiza un gráfico $I_p = f(v^{0.5})$ correspondiente a los voltamperogramas cíclicos del estudio de las velocidades de barrido, donde, utilizando la ecuación 1 la ecuación de la recta corresponde a:

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2}$$

The diagram shows the equation $I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2}$ with three brackets underneath. The first bracket is under the constant term (2.69×10^5) and is labeled 'y='. The second bracket is under the product $n^{3/2} A C_0 D_0^{1/2}$ and is labeled 'm'. The third bracket is under the term $v^{1/2}$ and is labeled 'x'.

Haciendo la relación de la pendiente (m) con la ecuación de Randles-Sevcik obtenemos:

$$m = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D_0^{1/2} \quad (2)$$

Para calcular el área podemos despejarla de la ecuación 2:

$$A = \frac{m}{(2.69 \times 10^5) n^{3/2} C_0 D_0^{1/2}} \quad (3)$$

El estudio de pH se realizó por medio de DPV, para encontrar las mejores condiciones donde la intensidad de corriente aumente, en una solución amortiguadora de Britton-Robinson 0.1 M a una concentración de $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de diclofenaco, a pH's superiores de 6. Esto se debe a que la disminución del pH a valores inferiores a 4 provocaba la precipitación del diclofenaco, por tener una $k_a = 10^{-4}$, sin embargo en la literatura se ha reportado que después de pH 6 el diclofenaco permanece disuelto en la solución (Córdoba & Rodríguez, 2004).

5.4. Optimización de los parámetros de la voltamperometría diferencial de pulsos usada para la cuantificación

Se realizó la optimización de los parámetros de análisis propios de la VDP: el ancho del pulso (ms), la amplitud del pulso (mV), el paso del potencial (mV) y el periodo del pulso (ms), de forma que se obtenga la mayor corriente anódica. La optimización de la VDP se lleva a cabo mediante el método Simplex modificado con la ayuda del software MultiSimplex ® versión 2.1.

5.5. Caracterización analítica de la metodología voltamperométrica propuesta

Mediante los parámetros optimizados de la metodología propuesta se realizó la caracterización analítica, evaluando lo siguiente mediante la curva de calibración:

- A. Límites de detección (LOD): es la cantidad molar mínima de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. Se calcula la señal correspondiente al LOD con la ecuación 4:

$$LOD = y_s + 3s_{y/x} \quad (4)$$

donde el LOD está dado en las unidades de medida, y_s es el valor de la ordenada y $s_{y/x}$ es la desviación estándar de los residuales de la recta. La desviación estándar $s_{y/x}$ estima los errores aleatorios en la dirección y, utilizando la ecuación 5:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (5)$$

Para obtener el valor de la concentración del LOD realiza hallando el valor de "x" en la ecuación de la recta generada de la curva de calibración (Miller & Miller, 2002), como se muestra en la ecuación 6.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

$$x = \frac{LOD - b}{m} \quad (6)$$

Donde x es la concentración del LOD, LOD es el resultado de la ecuación 4, m es la pendiente de la curva de calibración y b el punto de intercepción en la ordenada.

- B. Límites de cuantificación (LOQ): es el límite inferior para medidas cuantitativas precisas. Se calcula la señal correspondiente al LOQ con la ecuación 7:

$$LOQ = y_s + 10s_{y/x} \quad (7)$$

donde el LOQ está dado en las unidades de medida, y_s es el valor de la ordenada y $s_{y/x}$ es la desviación estándar (Skoog, 2008).

El cálculo para obtener el valor de la concentración del LOQ se realiza de la manera semejante a la concentración del LOD, ecuación 8.

$$x = \frac{LOQ - b}{m} \quad (8)$$

Donde x es la concentración del LOQ, LOQ es el resultado de la ecuación 7, m es la pendiente de la curva de calibración y b el punto de intercepción en la ordenada.

- C. Sensibilidad: se registra la corriente máxima de pico anódico a diferentes concentraciones de diclofenaco en un intervalo de concentraciones ajustándolos a una línea recta los resultados con tendencia lineal por mínimos cuadrados para obtener la pendiente, que corresponde a la sensibilidad.

El efecto de interferentes en la respuesta se evaluó teniendo en cuenta algunas especies iónicas importantes, que normalmente se encuentran en las muestras de orina y farmacéuticas, y que pueden interferir en la respuesta del electrodo, como

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

nitratos, cloruros, ácido ascórbico, lactosa, glucosa, yoduros, povidona, almidón y SDS; de igual forma, de algunos posibles interferentes que no se encuentran en los comprimidos, como el paracetamol y el naproxeno (Aguilar-Lira et al., 2014); con el fin de evaluar si se pudiera realizar el análisis de una muestra más compleja. La interferencia se representa como el porcentaje de error de la máxima intensidad de corriente del diclofenaco respecto a la máxima intensidad de corriente del diclofenaco con el interferente, mediante la ecuación 9:

$$E = \frac{V_r - V_o}{V_r} \times 100 \quad (9)$$

donde, E es el porcentaje de error, V_r es la máxima intensidad de corriente del diclofenaco y V_o es la máxima intensidad de corriente del diclofenaco con el interferente.

El estudio se realizó a una concentración igual, 10 y 100 veces mayor del interferente respecto a la concentración usada de diclofenaco. Esto se debe a que después de 100 veces mayor es la concentración de la especie química contra la del diclofenaco, la especie química si nos interfiere, a concentraciones mayores hará lo mismo.

La reproducibilidad del método propuesto se determinó construyendo cinco electrodos de barra de grafito y se evalúa la desviación estándar relativa de las respuestas obtenidas al medir varias veces y consecutivamente la corriente anódica máxima en una misma concentración (1×10^{-3} M) de diclofenaco con los diferentes electrodos. Para el caso de la repetibilidad se midió cinco veces con un mismo electrodo la corriente anódica máxima en una solución de diclofenaco de 1×10^{-3} M y se obtuvo también las desviaciones estándar relativas.

5.6. Cuantificación de diclofenaco en muestras reales

5.6.1. Muestras farmacéuticas

Diez tabletas del fármaco de interés se trituraron hasta llegar a polvo fino y se pesó el equivalente a 275 mg del mismo. Se diluyó esta masa en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7 y se transfirió a un matraz aforado de 250 mL. La disolución se agitó en un baño de ultrasonido durante 5 min aproximadamente, después se filtró para eliminar el excipiente con un papel filtro de 42 μm de tamaño de poro, se transfirió el filtrado a un matraz aforado de 250 mL y se afora. A continuación, se tomaron 121 μL y se aforaron a su vez en un matraz volumétrico de 25 mL con el mismo electrolito soporte. Mediante adición patrón y los cálculos correspondientes se realizó la cuantificación del fármaco en la muestra. Se realizó un análisis t de student de dos colas a un nivel de confianza de 95% para descartar la diferencia significativa entre las concentraciones calculadas con la metodología propuesta, la metodología espectrofotométrica y las reportadas por los fabricantes.

5.6.2. Muestras de orina

Las muestras de orina son refrigeradas después de la recolección, 10 mL de la muestra se centrifugan por 10 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante se filtra usando un filtro de 0.45 μm y es diluido en el electrolito soporte a una relación 1:100. Posteriormente la muestra se dopa con un estándar de diclofenaco para obtener una concentración fija y poder saber la concentración real de diclofenaco en las muestras. Mediante adición patrón (para eliminar el efecto de los interferentes en la muestra) se realizó la curva de calibración y los cálculos correspondientes para la cuantificación del fármaco en la muestra. Se realizó un análisis t de student de dos colas a un nivel de confianza de 95% para descartar la diferencia significativa entre las concentraciones calculadas con la metodología propuesta y la metodología espectrofotométrica.

5.6.3. Validación de las metodologías propuestas

Mediante un estadístico t de dos colas se evaluó si existe diferencia significativa entre el valor obtenido con la metodología propuesta y lo reportado en el marbete de la muestra farmacéutica o con el reportado por un método oficial como lo marca la farmacopea mexicana 2011. El diclofenaco se determinó mediante una curva de calibración, registrando la absorbancia de las muestras y estándares a 276 nm.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Electrodo de barra de grafito

6.1.1. Estudio voltamperométrico del diclofenaco

El área electroactiva representa la superficie del electrodo en la cual se producirán las reacciones electroquímicas, al tener una mayor área electroactiva aumenta la transferencia de electrones, lo que puede mejorar los parámetros analíticos del electrodo. El área electroactiva dependerá de la naturaleza del electrodo, es por esto su cálculo forma parte importante durante la caracterización de un nuevo electrodo de trabajo.

Se realizó el estudio para determinar el área electroactiva del electrodo de grafito (Figura 10). El área geométrica del electrodo es 0.2827 cm^2 y el área electroactiva que se obtiene del estudio es de 0.1194 cm^2 por lo que el área activa del electrodo es un 42.23% del área total del electrodo. Lo anterior ayudara para realizar un comparativo entre los electrodos propuestos.

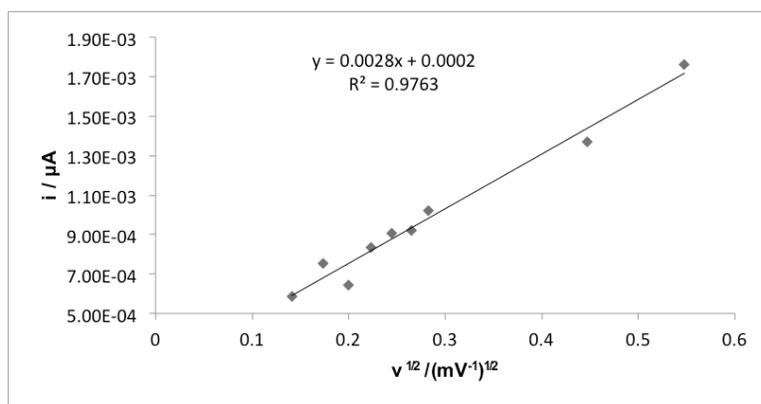


Figura 10. Gráfico lineal de i_p vs $v^{1/2}$ para el electrodo de grafito en una solución de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

Se estudió el comportamiento electroquímico del diclofenaco sobre el electrodo de trabajo propuesto. En la Figura 11 se muestran los voltamperogramas cíclicos del sistema solución amortiguadora-fosfatos (blanco) y el sistema diclofenaco-fosfatos. En sentido anódico se observan tres ondas; la primera onda (I) se asocia a un proceso del electrolito soporte, la segunda onda (II) corresponde a la

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

oxidación del diclofenaco en un potencial de máxima corriente anódica de 0.60 V, y la tercer onda (III) a un potencial de máxima corriente anódica de 0.92 V puede corresponder a un producto de la oxidación del diclofenaco (Cid-Cerón et. al, 2016).

En el voltamperograma del sistema diclofenaco-fosfatos se observan tres ondas catódicas, la onda (VI) a un potencial de mínima corriente catódica de 0.06 V se asocia a un proceso de reducción no relacionado al diclofenaco, las dos ondas restantes a los potenciales de 0.31 y 0.55 V (V y IV) se atribuyen a los procesos de reducción relacionados a los productos de oxidación, ya que la diferencia de potencial entre los picos es menor a 60 mV, esto aplica para un proceso reversible involucrando un electrón.

El mecanismo de oxidación electroquímica del diclofenaco por transferencia de un electrón y pérdida de un protón (Figura 12), el cual corresponde al pico V, (Figura 11), que normalmente se sigue en cuantificaciones de diclofenaco según en la literatura. Posteriormente se rompe la molécula a través del nitrógeno (Figura 12. C), formando dos productos: 2,6 dicloroanilina y 2- (2 hidroxiprop-2-enil) fenol (Cid-Cerón et. al, 2016).

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

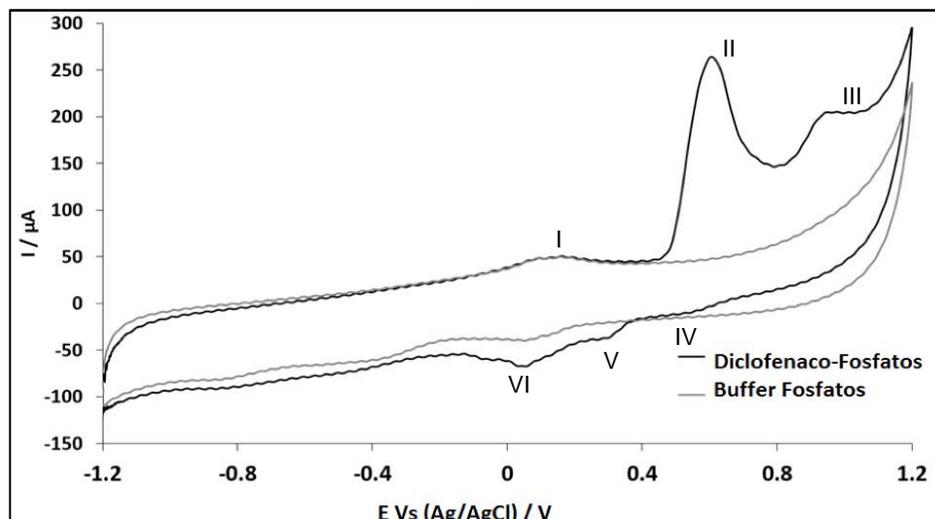


Figura 11 VC's del sistema diclofenaco-fosfatos para el electrodo de grafito. A una concentración de 1×10^{-3} M y solución amortiguadora de fosfatos a pH=7, a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1}

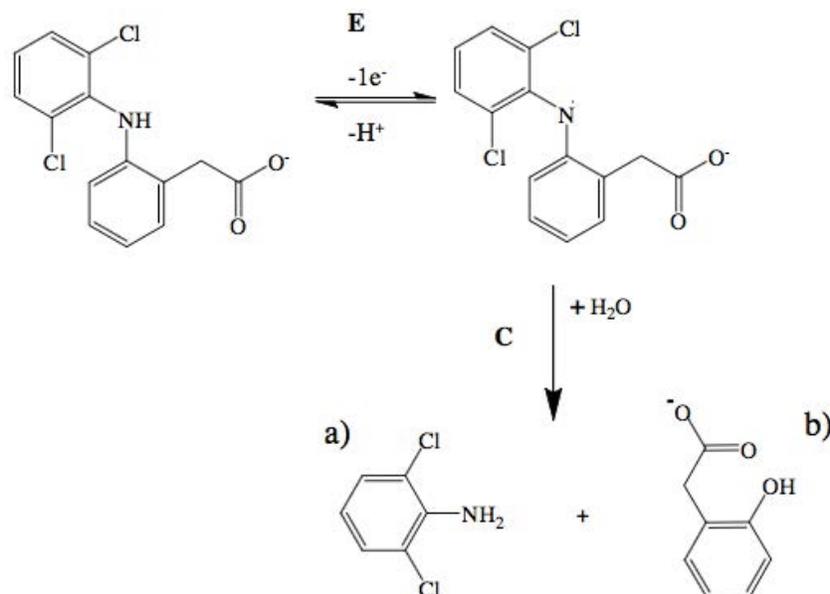


Figura 12. Mecanismo de oxidación del anión diclofenaco en medio acuoso a pH 7 utilizando un electrodo de pasta de carbono (Cid-Cerón et al., 2016)

En la Figura 13 se muestra la relación de la máxima intensidad de corriente del pico anódico relacionado a la oxidación del diclofenaco (pico II), con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, usando una concentración 1×10^{-3} M de

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

diclofenaco. Se observa una tendencia lineal en los puntos correspondientes, lo que sugiere que el proceso de oxidación está controlado por la difusión de la especie electroactiva hacia la superficie del electrodo.

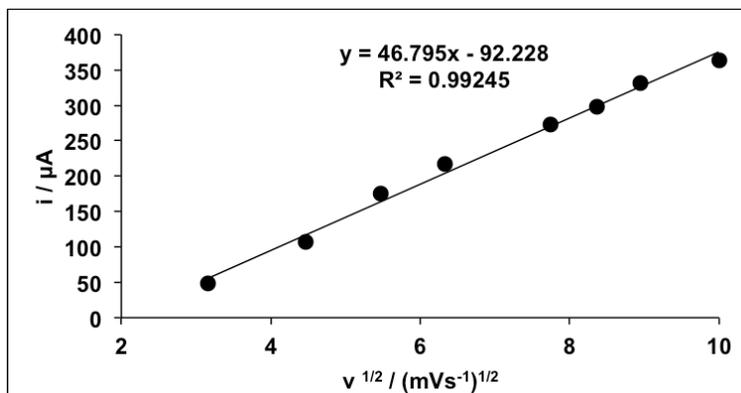


Figura 13. Gráfico lineal de i_p vs $v^{1/2}$ para el electrodo de barra de grafito

Para tener un mejor conocimiento de los procesos asociados a las ondas catódicas y anódicas registradas con el electrodo de grafito, se realizaron cuatro ciclos de VC's de manera consecutiva a diferentes ventanas de potencial, empezando los barridos en el potencial de corriente nula (Figuras 14a y 14b) y también empezando desde el potencial más catódico de la ventana (Figura 14c).

En la VC de la Figura 14a se utiliza una amplia ventana de potencial de trabajo (-1.3 a 1.3 V) y varios ciclos consecutivos en dirección anódica, donde aparecen los tres picos anódicos y dos picos catódicos observados anteriormente (Figura 11). Los dos picos anódicos que aparecen a partir del segundo barrido a potenciales cercanos a cero podrían ser útiles para fines cuantitativos, ya que al transcurrir los barridos se observa que esas ondas incrementan en corriente hasta alcanzar un valor relativamente constante, mientras que la onda que está directamente asociada a la oxidación del diclofenaco disminuye en gran medida.

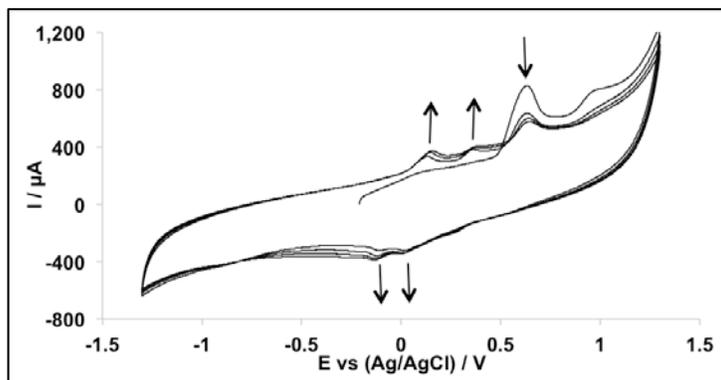
Al recortar ambas ventanas (Figura 14b), (catódica y anódica) (-0.25 a 0.9 V) el pico en 0.60 V disminuye después de cada ciclo, así como el pico a 0.33 V, que podría estar relacionado a un subproducto de la oxidación de diclofenaco, se

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

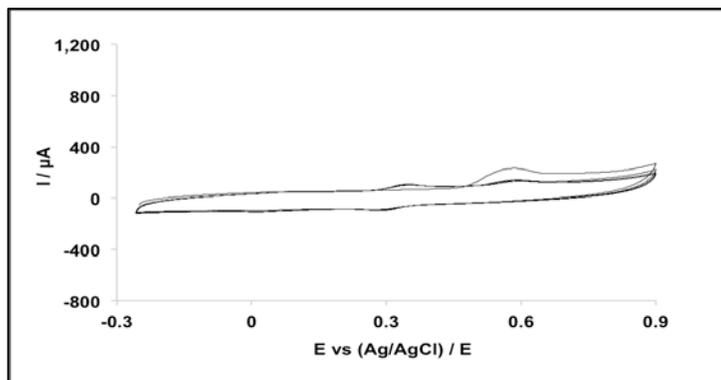
mantiene constante durante los ciclos, por lo que se selecciona como señal analítica para la posterior cuantificación indirecta de diclofenaco, en lugar de la señal anódica directa de la oxidación de la molécula.

En la Figura 14c, al recortar más la ventana de barrido, los picos catódicos y anódicos observados tienen mayor intensidad de corriente, entre el pico 1a y 3c, la forma de la onda apunta al perfil de un proceso de adsorción. El pico 3c a 0.27 V podría estar asociado a la reducción del 2- (2 hidroxiprop-2-enil) fenol. Durante el segundo barrido, un nuevo pico anódico 1a que aparece a 0.333 V, podría estar relacionado con la oxidación del producto de la reducción del 2- (2 hidroxiprop-2-enil) fenol.

a)



b)



Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

c)

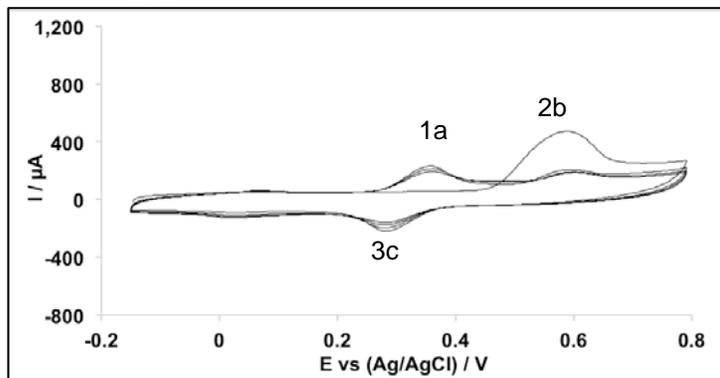


Figura 14. VC's del diclofenaco a diferentes ventanas de potencial a una concentración 1×10^{-3} M a) -1.3 a 1.3V, b) -0.25 a 0.9V, c) -0.15 a 0.8V

Se realizó un estudio a diferentes pH's para encontrar las mejores condiciones donde la intensidad de corriente se maximice, en una solución amortiguadora de Britton-Robinson 0.1 M a una concentración de 1×10^{-3} M de diclofenaco, por medio de DPV siguiendo a la señal de 0.272 V. En la Figura 15 se observa que el pH óptimo es de 7, donde se observa la máxima intensidad de corriente, por lo que los siguientes estudios se realizaron con la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.

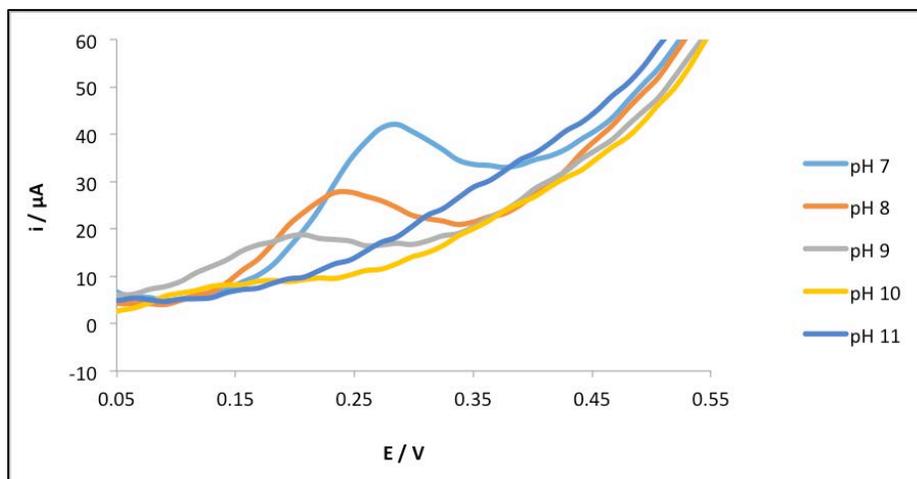


Figura 15. Estudio del pH para el electrodo de grafito en una solución amortiguadora Britton-Robinson 0.1 M en un rango de 6-11, con una $[\text{diclofenaco}] = 1 \times 10^{-3}$ M

6.1.2. Optimización de los parámetros de la voltamperometría diferencial de pulsos

Se realizó la optimización de los parámetros propios de la VDP para obtener la máxima corriente anódica mediante el método Simplex-modificado. Después de realizar 20 experimentos a una concentración 1×10^{-3} M de diclofenaco se obtienen los parámetros óptimos, los cuales están reportados en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros óptimos de la VDP encontrados para el electrodo de grafito con el Método Simplex Modificado.

Paso E (mV)	Ancho pulso (ms)	Periodo pulso (ms)	Amplitud pulso (mV)	Altura pico (μ A)
13	73	178	123	753

6.1.3. Caracterización analítica de la metodología propuesta

6.1.3.1. Límite de detección y de cuantificación

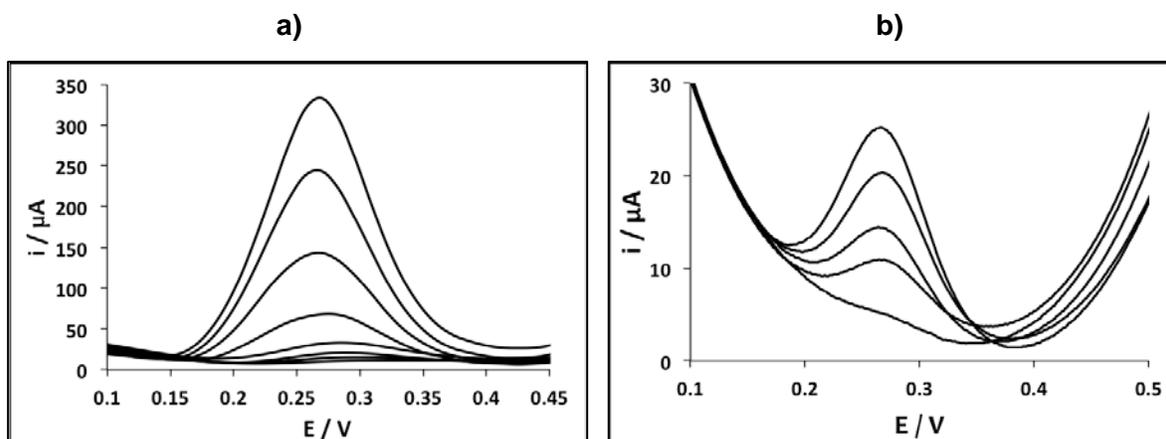
Se realizaron dos pretratamientos con el fin de aumentar la corriente anódica que servirá señal analítica, que se registra en 0.272 V, al aumentar la señal analítica se espera que la sensibilidad aumente haciendo que el método sea más sensible a los cambios de concentración en el análisis cuantitativo.

El primer pretratamiento es potenciodinámico, se efectúan dos VPD de manera consecutiva en una ventana de potencial de 0.15 V a 0.7 V, la primera para oxidar al diclofenaco y la segunda para obtener la señal analítica que sirve para la cuantificación indirecta (Figura 16a), en la Figura 16c se muestra el resultado del promedio de las tres repeticiones de las curvas de calibración.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

El segundo pretratamiento es potencioestático, se impone un potencial de 0.610 V durante 50 s, seguido de una VDP (Figura 16b) con los parámetros óptimos mostrados en la Tabla 3, en la Figura 16c se muestra el resultado del promedio de las tres repeticiones de las curvas de calibración.

Mediante ajuste por mínimos cuadrados se obtienen los parámetros analíticos correspondientes al aplicar los dos pretratamientos (Tabla 4). El pretratamiento potencioestático es el que muestra mejores valores del límite de detección, es por esto que los estudios posteriores se realizaron usando el pretratamiento potencioestático.



Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

c)

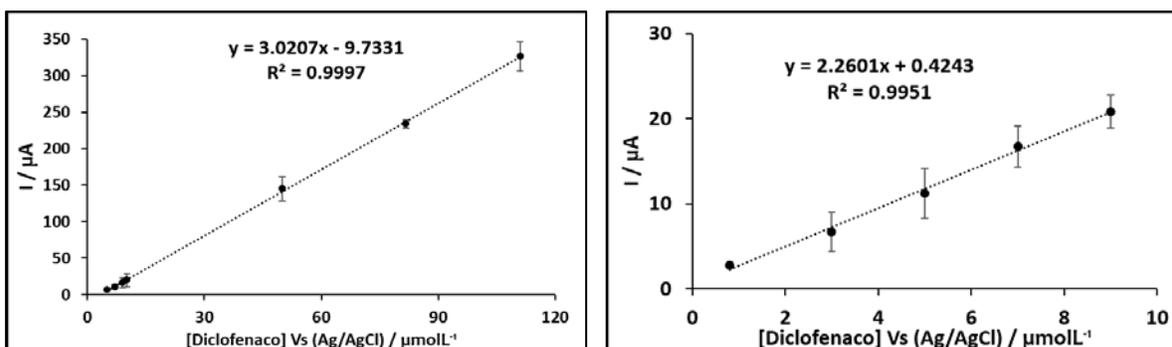


Figura 16. VDP y curvas de calibración con el electrodo de grafito a diferentes concentraciones en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. a) tratamiento potenciódinámico, b) tratamiento potencioestático, c) curva de calibración para el tratamiento potenciódinámico y potencioestático.

Tabla 4. Parámetros analíticos para el diclofenaco con el electrodo de grafito.

Parámetros analíticos	Pretratamiento potenciódinámico	Pretratamiento potencioestático
Sensibilidad ($\mu\text{A}/\mu\text{molL}^{-1}$)	3.02 ± 0.24	2.26 ± 0.53
R^2	0.999	0.995
[LOD] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2.45	0.76
[LOQ] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	8.19	2.56
IC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5.08 – 111	0.80 – 9

6.1.3.2. Reproducibilidad y repetibilidad del electrodo de barra de grafito

De acuerdo con la metodología que se describió en la sección 5.4, los resultados obtenidos presentan un porcentaje de desviación estándar menor al 10% en el estudio de reproducibilidad (9.6 %) y con el estudio de repetitividad del electrodo se obtiene una desviación estándar relativa de 6.9 %, por lo que se puede decir que el método es reproducible y repetible.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

6.1.3.4. Estudio de interferentes con el electrodo de barra de grafito

Se realizó un estudio de posibles interferentes que se encuentran en los comprimidos comerciales y de algunos que no se encuentran en los comprimidos, esto con el fin evaluar si se pudiera realizar el análisis de una muestra más compleja.

En la Tabla 5 se muestra el porcentaje de error relativo para cada interferente analizado, los principales interferentes entonces son: naproxeno, SDS, povidona, paracetamol y ácido ascórbico, ya que estos alteran la respuesta analítica incluso a una concentración igual a la del diclofenaco. Esto se debe a que las especies químicas que presentan actividad redox lo hacen a un potencial cercano a 0.272 V, mientras que las no redox pueden adsorberse en la superficie del electrodo, modificando la superficie y cambiando las características de la transferencia de carga, mejorándola o evitándola. Por esto, se sugiere que para aplicar la metodología para la cuantificación de diclofenaco, es necesario buscar un pretratamiento para separar los principales interferentes de la muestra, y/o realizar el análisis por medio de adición patrón.

Tabla 5. Estudio de interferentes para el electrodo de grafito a una concentración de diclofenaco 3×10^{-5} M.

Interferente	% error [Inter]= 3×10^{-5} M	% error [Inter]= 1×10^{-4} M	% error [Inter]= 1×10^{-3} M	% error [Inter]= 1×10^{-2} M
Ácido Ascórbico	+	+	+	+
Almidón	-	6.38	76.66	+
Cloruro	-	-	3.58	7.17
Glucosa	-	6.52	29.16	+
Lactosa	-	23.47	47.22	+

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

Naproxeno	33.3	28.45	31.26	+
Nitrato	-	-	2.81	23.13
Paracetamol	+	+	+	+
Povidona	26.66	40.41	53.88	+
SDS	55.55	+	+	+
Yoduro	-	0.47	+	+

- [-] El % de error es prácticamente cero.
- [+] El % de error es mayor al 100%

6.1.4. Cuantificación de diclofenaco en muestras reales

De acuerdo a la metodología en la sección 5.5, se comparan la metodología propuesta con la metodología espectrofotométrica, que es la aceptada en normas, realizando un estadístico t de dos colas a un nivel de confianza del 95% (Tabla 6).

Al realizar el análisis estadístico t entre la metodología propuesta y la cantidad marcada en el marbete del producto comercial, el fármaco A no muestra diferencia significativa entre el método oficial y el propuesto en cuanto a la cantidad de diclofenaco cuantificada, sin embargo, en la muestra B se observa que existe diferencia significativa comparando cada uno de los métodos en cuanto a la cantidad de diclofenaco reportada por el fabricante, esto nos sugiere que el comprimido tiene menor cantidad de diclofenaco que lo marcado en la etiqueta.

Al realizar el análisis entre la metodología propuesta y la oficial, el estadístico t, concluye que no existe diferencia significativa entre ambos métodos, sugiriéndonos que la metodología que se propone es una buena alternativa para la cuantificación del diclofenaco.

Para comprobar la utilidad del método propuesto, se utiliza una muestra más compleja, en la Tabla 7 se reporta la cuantificación de diclofenaco en una muestra de orina, al realizar el estadístico t no se encuentra diferencia significativa entre la cantidad de diclofenaco encontrada mediante el método espectrofotométrico y la metodología propuesta.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

Tabla 6. Concentración de diclofenaco en muestras farmacéuticas utilizando el electrodo de grafito

Fármaco	A	B
Cantidad en el marbete (mg)	100	100
Cantidad encontrada con la metodología propuesta (mg)	98.68±5.39	91.81±1.74
Estadístico t_{exp} [a]	0.42	8.10
Cantidad encontrada con el método espectrofotométrico (mg)	102.65±3.07	92.83±1.23
Estadístico t_{exp} [b]	1.10	0.82

[a] $n=3$; $t_{crítico, 2\ g.l.}=4.30$, 95 % de nivel de confianza

[b] $n_1=3$, $n_2=3$; $t_{crítico, 4\ g.l.}=2.78$, 95 % de nivel de confianza

Tabla 7. Concentración de diclofenaco en muestras de orina utilizando el electrodo de grafito

Muestra de orina	Concentración encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Cantidad de diclofenaco agregado	7.00
Método propuesto	7.21
Método espectroscópico	7.41
Estadístico t_{exp}	0.56

$n=3$; $t_{crítica, 2\ g.l.}=4.30$, nivel de confianza 95 %

6.2. Electrodo de pasta de carbono con nanotubos de carbono

6.2.1. Estudio voltamperométrico del diclofenaco

A comparación del electrodo de grafito, la incorporación de nanotubos de carbono al electrodo puede aumentar el área electroactiva, por el hecho de que los nanotubos de carbono tienen mayor superficie de contacto, por su forma cilíndrica, comparados con el grafito convencional, y así el electrodo al tener mayor área electroactiva puede mejorar sus parámetros analíticos.

Al realizar el estudio para conocer el área electroactiva en el electrodo de pasta de carbono con nanotubos de carbono (Figura 17), se obtuvo un valor de 0.0688 cm^2 de área electroactiva y el área geométrica del electrodo es de 0.0706 cm^2 , el cual nos da como resultado un 97.45% de área activa del electrodo.

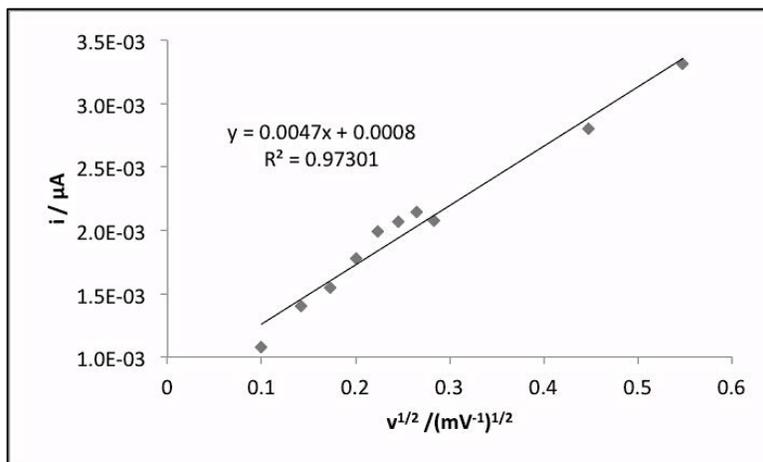


Figura 17. Gráfico i_p vs $v^{1/2}$ del área electroactiva del electrodo composite en una solución de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Se realizó el estudio voltamperométrico del comportamiento del diclofenaco sobre el electrodo de pasta de carbono con nanotubos de carbono multipared mediante voltamperometría cíclica, para esto se lleva a cabo un barrido de un ciclo, ya que se observó que al segundo barrido el electrodo no muestra señal analítica, a diferentes ventanas de potencial a una disolución de diclofenaco $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7 en sentido anódico. En la Figura 18 se

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

presentan los resultados obtenidos; en el primer segmento en sentido anódico se observa el pico de oxidación correspondiente al diclofenaco (I) y el segundo pico que corresponde a la oxidación de un subproducto de la oxidación del diclofenaco (II), el cual ya se había observado en el estudio electroquímico con el electrodo de barra de grafito. Se aprecia que conforme se va acortando la ventana catódica no se observa ningún cambio en el perfil electroquímico, por lo cual se escoge la ventana de trabajo de -0.4 a 1.3 V. En sentido catódico existe un pico que corresponde a la reducción de alguno de los productos de la oxidación del diclofenaco (III).

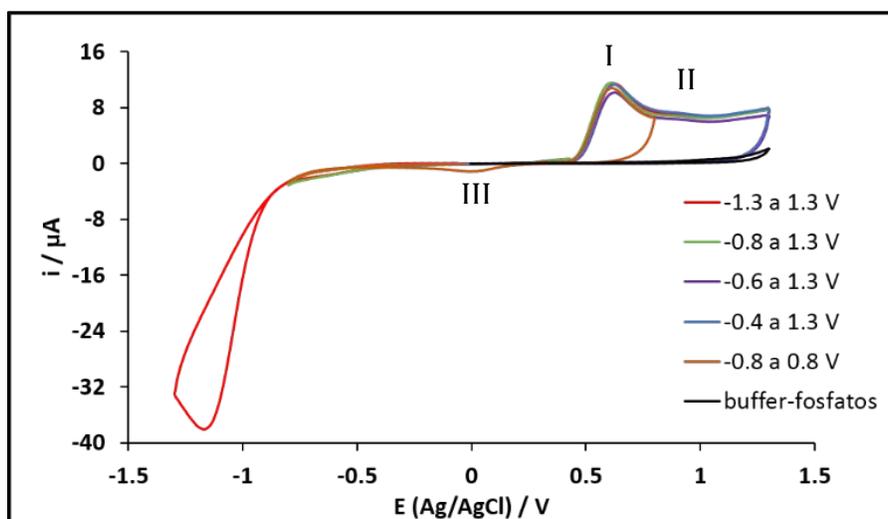


Figura 18. VC's a diferentes ventanas de potencial con el electrodo composite para diclofenaco 1×10^{-3} M en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.

Se toma como señal analítica el pico de oxidación del diclofenaco que se presenta a un potencial 0.61 V en el electrodo de trabajo. La señal analítica elegida es diferente a aquella considerada para el electrodo de grafito, debido a que con el electrodo de pasta con nanotubos de carbono no se observan las ondas anódicas registradas en el grafito a partir del segundo ciclo. Es por ello que se sigue la señal directa de oxidación y se aprovechan las características de los electrodos de pasta para renovar la superficie entre cada experimento realizado.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

Se realiza un estudio a diferentes pH's para encontrar las condiciones óptimas y obtener la mayor intensidad de corriente de la onda a 0.60 V, en una solución amortiguadora de Britton-Robinson 0.1 M, a una concentración fija de diclofenaco de 1×10^{-3} M. Como se muestra en la Figura 19, a pH 8 se obtiene la mayor intensidad de corriente y un pico definido, mientras que a pH mayores se observa que se solapa el pico de interés con el segundo pico de la oxidación consecutiva del sistema.

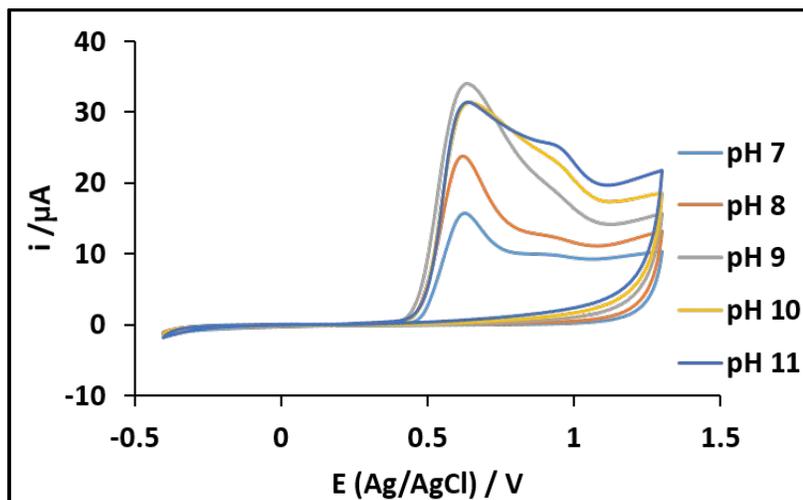


Figura 19. Estudio de pH con el electrodo de grafito- NTC en una solución amortiguadora Britton-Robinson 0.1 M, en un rango de 6-10, con una [diclofenaco]= 1×10^{-3} M

Se realizó el estudio a diferentes velocidades de barrido para conocer el comportamiento del proceso de oxidación del diclofenaco en el electrodo. En la Figura 20 se muestra la relación de la máxima intensidad de corriente del pico anódico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido del diclofenaco, donde se observa una tendencia lineal, lo que sugiere que el proceso de oxidación está controlado por la difusión de la especie electroactiva hacia la superficie del electrodo.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

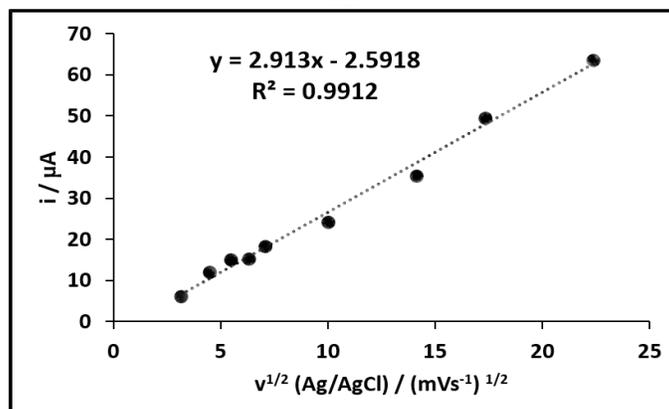


Figura 20. Gráfico lineal de i_p vs $v^{1/2}$ para el electrodo grafito-NTC

6.2.2. Optimización de los parámetros de la voltamperometría diferencial de pulsos

Se realizó la optimización, mediante el método simplex modificado, de la señal analítica de forma que se maximice la corriente de pico anódico registrada a un potencial de 0.6 V. Se realizaron 23 experimentos con el electrodo pasta de carbono-NTC donde se encontraron los parámetros óptimos para la VDP que se muestran en la Tabla 8. Para este estudio se usa una ventana de potencial de -0.4 a 1.3 V, una concentración de diclofenaco de 1×10^{-3} M en una solución amortiguadora Britton-Robison 0.1 M, pH 8 y una temperatura de 25 °C.

Tabla 8. Parámetros óptimos de la VDP con el electrodo grafito-NTC encontrados con el software Multi-Simplex

Paso E (mV)	Ancho pulso (ms)	Periodo pulso (ms)	Amplitud pulso (mV)	Respuesta (μA)
20	19	99	92	79

6.2.3. Caracterización analítica de la metodología propuesta

6.2.3.1. Límite de detección y de cuantificación

Al realizar tres curvas de calibración usando los parámetros óptimos de la DPV de la Tabla 9, se obtiene una curva promedio a diferentes intervalos de concentración, la cual se muestra en la Figura 21.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

Con el intervalo lineal, se obtuvieron los parámetros analíticos que se reportan en la Tabla 8. Se observan en general altas sensibilidades, así como límites de cuantificación y detección bajos, sin embargo, los mejores LOD y LOQ se obtienen considerando el ajuste en bajas concentraciones.

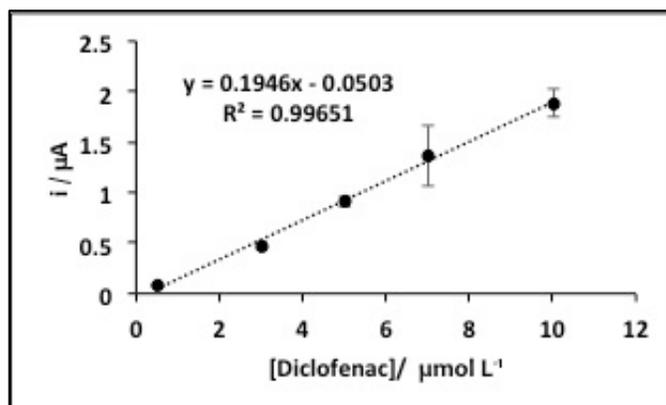


Figura 21. Curva de calibración para diclofenaco usando el electrodo de grafito-NTC, en una solución amortiguadora Britton-Robinson 0.1 M a pH 8

Tabla 9. Parámetros analíticos para el electrodo de grafito-NTC

Parámetros analíticos	Electrodo Grafito-CNT
Sensibilidad($\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.19 ± 0.005
R^2	0.996
[LOD] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.75
[LOQ] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2.50
IC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2.50 – 10.00

6.2.3.2. Reproducibilidad y repetibilidad

Al realizar el estudio de reproducibilidad del electrodo, de acuerdo a la metodología descrita en la sección 5.4, se obtiene una desviación estándar relativa de 3.58 %, lo que al ser menor al 10% se puede decir que la respuesta obtenida es reproducible, ya que con el mismo electrodo se obtienen prácticamente los mismos resultados. La repetibilidad no se calculó, esto se debe a que al realizar cada ensayo, se renovaba la superficie del electrodo de pasta, en cada que la oxidación del diclofenaco hace que el electrodo se pasive, y al renovar

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

la superficie del electrodo sería el equivalente a tener un electrodo composite nuevo.

6.2.3.3. Estudio de interferentes

Se analizó la influencia sobre la respuesta analítica de la presencia de algunas especies químicas contenidas en los excipientes de la presentación comercial del diclofenaco; también se analizaron otros interferentes con el fin de probar la metodología propuesta en muestras más complejas que los comprimidos de diclofenaco. En la Tabla 10 se muestra el porcentaje de error relativo para cada interferente analizado, de acuerdo a los resultados los principales interferentes son ácido ascórbico, paracetamol, naproxeno, povidona, SDS y almidón ya que presentan una fuerte influencia en la respuesta analítica incluso a una concentración menor a la del diclofenaco. Los interferentes con actividad redox (ácido ascórbico, paracetamol, naproxeno) lo muestran procesos a un potencial cercano a 0.6 V interfiriendo con la señal analítica principal, mientras que los no redox (povidona, almidón y SDS) se pueden adsorberse en la superficie del electrodo, modificando la misma y cambiando las características de la transferencia de carga, mejorándola o desfavoreciéndola. Por esto, se sugiere que para aplicar la metodología para la cuantificación de diclofenaco, es necesario buscar un pretratamiento para separar los principales interferentes de la muestra, y/o realizar el análisis por medio de adición patrón.

Tabla 10. Estudio de interferentes con el electrodo grafito-NTC a una concentración de diclofenaco 1.5×10^{-5} M

Interferente	% error [Inter]= 1.5×10^{-5} M	% error [Inter]= 1.5×10^{-4} M	% error [Inter]= 1.5×10^{-3} M	% error [Inter]= 1.5×10^{-2} M
Ácido Ascórbico	48.56	+	+	+
Almidón	32.70	31.98	44.36	+
Cloruro	-	-	-	4.53
Glucosa	9.06	23.46	91.36	+
Lactosa	-	7.41	37.45	+
Naproxeno	52.84	17.51	53.24	+
Nitrato	-	-	9.05	43.42
Paracetamol	33.79	+	+	+
Povidona	48.26	41.73	43.18	+
SDS	22.05	39.19	2.47	+
Yoduro	-	5.35	-	+

[-] El % de error es prácticamente cero

[+] El % de error es mayor al 100%

6.2.4. Cuantificación de diclofenaco en muestras reales

Se realiza la cuantificación de diclofenaco en muestras farmacéuticas, donde la muestra A no corresponde a la misma muestra analizada con el electrodo de barra de grafito, sin embargo la muestra B si es la misma. Después de realizar la cuantificación, se comparan la metodología propuesta con la metodología aceptada en normas mediante un estadístico t a un nivel de confianza del 95%, (Tabla 11). El estadístico t experimental es comparado con el valor crítico, así se puede concluir que no existe diferencia significativa entre los valores encontrados entre las dos metodologías.

Sin embargo, al realizar el análisis estadístico t entre la metodología propuesta y la cantidad marcada en el marbete del producto comercial, el fármaco A no muestra diferencia significativa, pero en la muestra B si hay diferencia estadística entre la

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

cantidad reportada en el marbete y ambos métodos, esto nos sugiere que el comprimido tiene menor cantidad de diclofenaco que lo marcado en la etiqueta.

Se hace la cuantificación también de una muestra de orina (Tabla 12), se observa al realizar el estadístico t que no se encuentra diferencia significativa entre la cantidad de diclofenaco encontrada mediante la metodología oficial y la metodología propuesta, por lo que la metodología basada en VDP demuestra su utilidad para usarse en muestras más complejas que las muestras farmacéuticas.

Tabla 11. Concentración de diclofenaco en muestras farmacéuticas usando el electrodo grafito-NTC

Fármaco	A	B	B
Cantidad en el membrete (mg)	100	100	100
Cantidad encontrada con la metodología propuesta (mg)	81.5	89.8	91.81±1.74
Estadístico t_{exp} [a]	1.4	4.7	8.10
Cantidad encontrada con el método espectrofotométrico (mg)	79.9	89.9	92.83±1.23
Estadístico t_{exp} [b]	0.12	0.02	0.82

[a] $n=3$; $t_{crítico, 2\ g.l.}=4.30$, 95 % de nivel de confianza
 [b] $n_1=3$, $n_2=3$; $t_{crítico, 4\ g.l.}=2.78$, 95 % de nivel de confianza

Tabla 12. Concentración de diclofenaco en muestras de orina usando el electrodo grafito-NTC.

Muestra	Concentración encontrada
Dopada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5.00
Método propuesto ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	4.65 ± 0.64
Método espectroscópico ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	4.48 ± 0.1
Estadístico t_{exp}	0.0152

$n=3$; $t_{crítico, 2\ g.l.}=4.30$, 95% de nivel de confianza

7. CONCLUSIONES

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

A partir de los resultados obtenidos, se logró la cuantificación del diclofenaco mediante una metodología optimizada usando dos tipos de electrodos de trabajo a base de grafito.

Con el electrodo de barra de grafito se realizó una cuantificación de forma indirecta siguiendo la onda anódica a un potencial de 0.298 V usando un pretratamiento potencioestático para maximizarla, mientras que en el caso del electrodo composite de pasta de carbono con nanotubos de carbono multipared, se sigue la onda anódica directa de la oxidación de diclofenaco a un potencial de 0.61 V ya que el comportamiento electroquímico en ambos electrodos es diferente, lo que evidencia que la presencia de nanotubos en el electrodo cambia completamente el comportamiento electroquímico del sistema.

En la Figura 22, se muestran las curvas de calibración considerando el área electroactiva para cada electrodo propuesto; el electrodo de grafito usando el pretratamiento potencioestático (Figura 22a) y la curva de calibración del electrodo de grafito-NTC (Figura 22a). De esta manera se puede comprar los parámetros analíticos por completo, ya que no se podía comparar la sensibilidad por la diferencia de las áreas electroactivas.

Al comparar los electrodos propuestos en este trabajo, en la Tabla 13, se observa que el electrodo de grafito-NTC ofrece límites de detección más bajos que el electrodo de grafito; sin embargo, la sensibilidad del electrodo de grafito es menor que la del electrodo de grafito-NTC, lo cual resulta ser contradictorio, ya que de acuerdo con lo que se ha reportado en la literatura, los NTCMP tendrían que incrementar el área electroactiva, y por lo tanto la sensibilidad, de un electrodo por sus propiedades estructurales.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

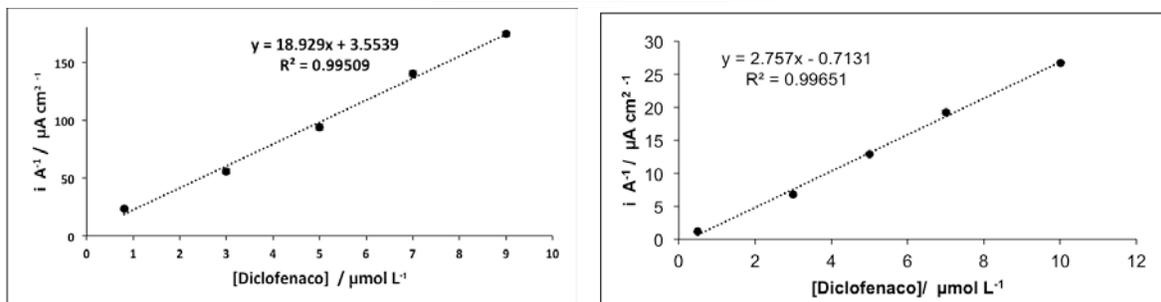


Figura 22 Curvas de calibración corregidas usando el área electroactiva. a) electrodo de grafito, b) electrodo de Grafito-NTC

Tabla 13. Parámetros analíticos corregidos con respecto al área electroactiva para los electrodos propuestos

Parámetros analíticos	Electrodo Grafito	Electrodo Grafito-CNT
Sensibilidad($\mu\text{A}/\mu\text{molL}^{-1}$)	0.19 ± 0.005	2.75 ± 0.005
R^2	0.995	0.996
[LOD] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.78	0.75
[LOQ] ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2.62	2.50
IC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2.62 – 9.00	2.50 – 10.00

Al realizar la cuantificación de diclofenaco con las metodologías propuestas con ambos electrodos, tanto en muestras farmacéuticas como de orina, no se encontraron diferencias significativas con los resultados obtenidos mediante la metodología oficial. Con esto, se puede concluir de manera segura que los métodos que se proponen en este trabajo son una alternativa viable para cuantificar diclofenaco en muestras farmacéuticas comerciales y en muestras de orina de forma exacta y precisa.

En la Tabla 14 se comparan los parámetros analíticos de la metodología propuesta, contra los reportados con otros métodos electroquímicos reportados en la literatura. El uso de los electrodos propuestos, demuestra parámetros competitivos al ser comparados con otros electrodos más sofisticados de un precio elevado y más complejos en su construcción. Incluso en algunos casos, la

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

metodología propuesta muestra mejores parámetros analíticos que en el caso de electrodos de diamante dopado con boro, electrodos selectivos a iones y la película de Bismuto.

Tabla 14. Parámetros analíticos del diclofenaco con los electrodos propuestos comparados con los electrodos reportados en la literatura

Electrodo	pH	E_{pa}(V)	Intervalo lineal (μmol L⁻¹)	Límite detección (μmol L⁻¹)	Referencia
a) Grafito	7	0.295	2.62 – 9.00	2.45	Este trabajo
Grafito-NTC	8	0.6	2.50 – 10.00	0.74	Este trabajo
Ni(OH)₂ –Níquel modificado	100 mM NaOH	0.490	196 - 2650	3.17	Hajjizadeh et al., 2007
EPPGE	7.2	0.66	0.1 - 1	0.0062	Goyal et al., 2010
NTCMP-EPPGE	7.2	0.439 y 0.854	1.0x10 ⁻³ - 500x10 ⁻³ y 2.5x10 ⁻³ - 1500x10 ⁻³	0.82x10 ⁻³ y 22.5x10 ⁻³	Goyal et al., 2010
ISE	6.0–9.0	----	10- 1000	4	Shamsipur et al., 2005
Película de Bismuto	-----	-----	6 - 50	4.3	Rodríguez et al., 2007
Boro dopado con diamante	1.0 (HClO ₄)	-----	5 - 50	0.14	Dede et al., 2014

a) Tratamiento potenciodinámico

8. ANEXOS

8.1. Celda electroquímica

Los electrodos comúnmente utilizados en la voltamperometría son pequeños discos planos de material conductor montados a presión dentro de un material inerte como el teflón y Kel-F. El material conductor puede ser un metal inerte como el grafito pirolítico, platino, semiconductores como estaño, o un metal recubierto por mercurio. Para poder usar estos electrodos a determinados potenciales estos varían según el material y la solución en la que se encuentren. Los intervalos en los que se pueden utilizar estos electrodos (Figura 23) sus límites positivos están regidos por las elevadas intensidades de corriente debido a la oxidación del agua para dar oxígeno molecular los límites negativos son por la reducción del agua para generar hidrógeno molecular (Skoog, 2008).

Figura 23. Intervalos de potencial para electrodos de diferentes materiales

El sistema para la voltamperometría se basa en un sistema de tres electrodos:

- Electrodo de referencia (ER): este electrodo se caracteriza por poseer un valor de potencial constante y conocido, por lo tanto, permite conocer a que potencial ocurre el proceso de oxidación o de reducción que se quiere estudiar.
- Electrodo de trabajo: en este electrodo ocurre la reacción de interés.

- Electrodo auxiliar o contraelectrodo: emplea solamente para hacer conexión eléctrica al electrolito, para de esta manera poder aplicar una corriente al electrodo de trabajo.

8.2. Técnicas electroanalíticas

8.2.1. Voltamperometría

Es un conjunto de técnicas basadas en la relación que existe entre corriente y voltaje durante un proceso electroquímico. Se le aplica a una celda electroquímica, que contiene un electrodo y una señal de excitación que es un potencial variable. Esta señal provoca una respuesta de intensidad de corriente característica.

La técnica más común es la de barrido lineal (voltamperometría cíclica), en donde el potencial aplicado a la celda aumenta linealmente en función al tiempo. Existen otras técnicas donde muestran señales de pulsos. Las intensidades de corriente se miden a diferentes tiempos durante la vida de estos pulsos. Estas técnicas relatadas vienen representadas en la Figura 24 (Skoog, 1997).

La voltamperometría diferencial de pulsos utiliza pequeños impulsos sobrepuestos a una rampa lineal de voltaje (Figura 24 b). Donde la altura de un pulso se llama amplitud de modulación. Esta técnica mide la corriente una vez antes de aplicar el pulso, y otra vez durante 17 últimos ms de cada impulso. El polarógrafo resta la primera corriente de la segunda, y representa esta diferencia frente al potencial aplicado (medido justo antes del impulso de voltaje).

La voltamperometría de onda cuadrada corresponde a una onda cuadrada superpuesta a una escalera de voltaje (Figura 24 c). Esta voltamperometría es más sensibles y rápidos que la voltamperometría diferencial de impulsos. Donde el impulso inverso (anódico) produce la reoxidación del producto obtenido con un impulso directo (catódico).

La voltamperometría cíclica usa la forma de onda de triangulo (Figura 24d)

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

aplicada al electrodo de trabajo. Después de aplicar una rampa lineal de voltaje entre un intervalo de tiempo, se invierte la rampa para llevar de nuevo el potencial a su valor inicial midiendo otro tiempo. Este ciclo se repite muchas veces. En los primeros tiempos consta de una corriente residual seguida de una corriente catódica. Donde la corriente disminuye al aumentar el potencial. Esta disminución tiene lugar ya que desaparece el analito en las proximidades de la superficie del electrodo, y la difusión del seno de la disolución es demasiado lenta para restituir la concentración cerca del electrodo. Después el potencial se invierte, pero continúa una corriente catódica, porque el potencial es todavía suficientemente negativo para que tenga lugar la reducción. Cuando el potencial se hace bastante menos negativo, el producto reducido se encuentra cerca de la superficie del electrodo empieza a oxidarse. Esta reacción origina una onda anódica (Harris, 2001).

Figura 24. Técnicas voltamperométricas

8.2.2. Voltamperometría cíclica

Es una técnica electroanalítica más eficiente y versátil para el estudio mecanístico de las reacciones electrónicas, y suele ser el primer experimento que se lleva a

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

cabo en un estudio electroquímico. Se sigue la misma lógica que la voltamperometría de barrido lineal, realizándose una inversión en el sentido del barrido de potencial (Figura 25).

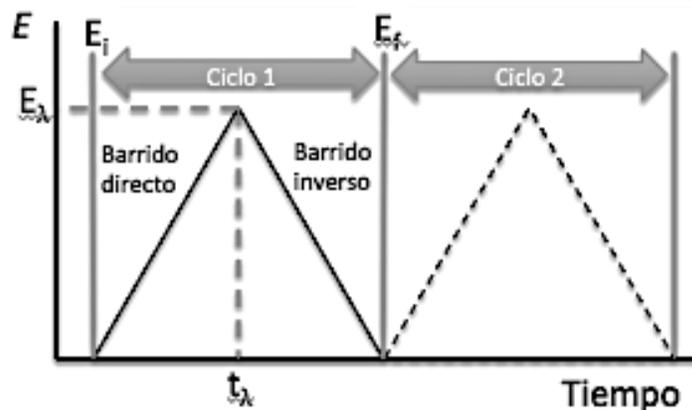


Figura 25. Señal potencial-tiempo durante la voltamperometría cíclica

El potencial se barre linealmente desde un valor inicial E_i hasta alcanzar un valor E_i , potencial de inversión, el cual se invierte la dirección del barrido hasta alcanzar un potencial final E_f . Aunque el barrido de potencial se termina al final del primer ciclo, puede continuar realizando ciclos sucesivos.

Para obtener el voltamperograma cíclico, se mide la corriente que pasa por el electrodo indicador en una disolución sin agitar durante el barrido de potencial. En el voltamperograma, Figura 26, la oxidación da lugar a una corriente anódica que aumenta rápidamente hasta que la concentración de la especie reducida, en la superficie del electrodo se aproxima a cero. La corriente decae a medida que la concentración de la especie reducida disminuya y la concentración de la especie oxidada aumente.

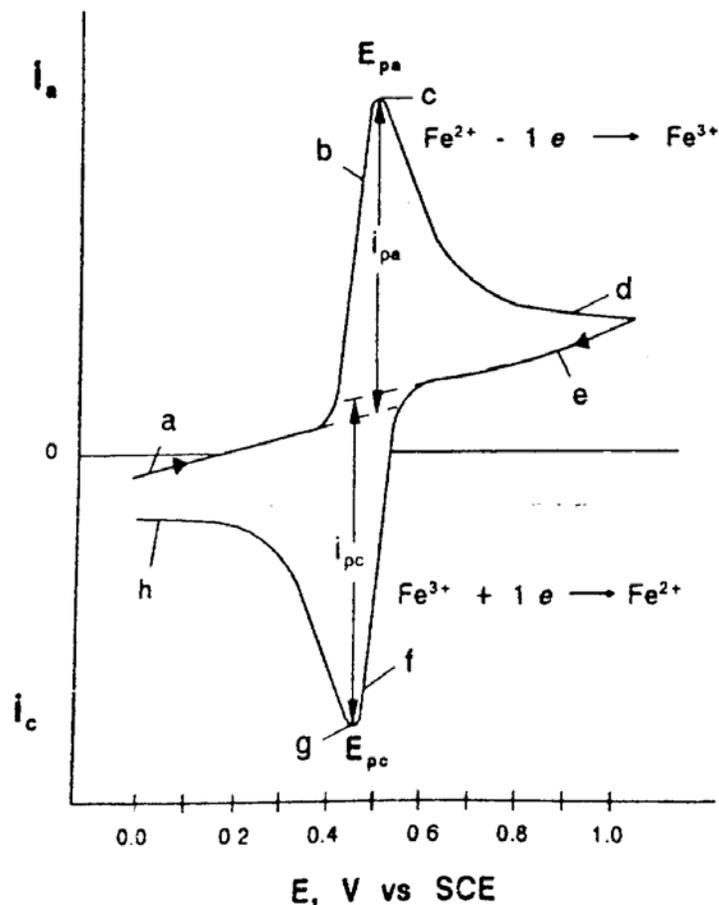


Figura 26. Voltamperograma cíclico del par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (Pingarrón y Sánchez, 2003)

Después de invertir la dirección del barrido de potencial, la oxidación prosigue hasta que el potencial aplicado sea lo suficientemente negativo para causar la reducción. Dicha reducción viene señalada por la aparición de una corriente catódica.

Los parámetros de interés en la voltamperometría cíclica son las magnitudes de corriente de pico i_{pa} e i_{pc} , o mejor aún, su relación, i_{pa}/i_{pc} , y la separación entre los potenciales de pico $E_{pa} - E_{pc}$.

Un sistema reversible con un producto de reacción electroquímica puede identificarse por voltamperometría cíclica midiendo la diferencia entre E_{pa} y E_{pc} , como se muestra en la ecuación 10.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \approx \frac{59}{n} mV \quad (10)$$

Donde n es el número de electrones transferido y E_{pa} y E_{pc} son los de pico anódico y catódico, medidos en mV. Esta separación de $59/n$ mV para ΔE_p es independiente de la velocidad de barrido de potencial para un par nernstiano, si bien es ligeramente dependiente del potencial de inversión E_λ , aunque siempre próxima a $59/n$ mV. Asimismo, cuando se lleva a cabo un ciclado repetido y se alcanza un comportamiento estacionario, $\Delta E_p = 58/n$ mV a 25°C

El potencial intermedio entre los dos potenciales de pico es el valor del potencial formal del par redox:

$$E^{o'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \quad (11)$$

Análogamente, los valores de i_{pa} e i_{pc} son iguales para un sistema reversible sin complicaciones cinéticas, es decir, en este caso, la relación $i_{pa}/i_{pc} \approx 1$, independiente de la velocidad de barrido de potencial, de E_λ (siempre y cuando sea mayor de $35/n$ mV del potencial de pico directo) y de los coeficientes de difusión.

En el caso de sistemas irreversibles y cuasirreversibles, la ecuación 11 no es aplicable y la separación entre los potenciales de pico es mayor de $59/n$ mV y depende de la velocidad de barrido. Para los sistemas irreversibles no puede observarse ningún pico en el barrido inverso, cuanto más irreversibles es el sistema, más pequeño será el valor de i_p en el barrido inverso. Esto se debe a menudo tanto a una velocidad heterogénea del sistema es menor como al hecho de que una parte significa que el producto de reacción electroquímica haya difundido desde la superficie del electrodo durante el tiempo necesario para alcanzar el pico en el barrido inverso. Debido a este tipo de complicaciones, no es adecuado deducir información cuantitativa de la relación entre las corrientes de pico para sistemas irreversibles.

Las medidas cuantitativas (de velocidades o de concentraciones) se obtienen mejor por otra técnica (cronométricas, de impulsos o hidrodinámicas). El aspecto más útil de la voltamperometría cíclica es su aplicación al diagnóstico cualitativo de las reacciones químicas en la celda electroquímica (Pingarrón y Sánchez, 2003).

8.2.3 Voltamperometría diferencial de impulsos

Existen dos tipos de corrientes en el proceso de electrólisis: las corrientes faradaicas, son las originadas por las electrólisis, y las no faradaicas, siempre que un electrodo tiene un potencial aplicado que cambia existe una corriente resultante de tener que cargar el electrodo a medida que cambia el potencial a un nuevo valor.

Para la determinación cuantitativa de muchos analitos por voltamperometría y dentro de un intervalo comprendido entre 10^{-4} y 10^{-5} M, no existe preocupación de las corrientes no farádicas; las corrientes faradaicas de la electrólisis del analito son mucho mayores y duran más tiempo. Para concentraciones menores a 10^{-6} M se debe cuidar la separación de las corrientes faradaicas de las no faradaicas y de las corrientes residuales, que están presentes simultáneamente. Para realizar esto se utilizan la voltamperometría de impulsos.

El objetivo de la utilización de métodos voltamperométricos es disminuir la influencia de las corrientes no faradaicas en las medidas. Existen dos propiedades de las corrientes faradaicas:

- A. Cuanto más rápido es el cambio de potencial, mayores serán las corrientes no faradaicas.
- B. Después de un cambio de potencial, las corrientes no faradaicas disminuyen muy rápidamente en relación con las corrientes faradaicas.

Para minimizar la interferencia de las corrientes de condensador, la corriente total se mide justo antes del impulso y de nuevo hacia el final del mismo. La primera

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

medida proporciona la línea base, y las siguientes ocurren cuando las corrientes no faradaicas disminuyen significativamente. Esta manipulación del potencial en el electrodo de trabajo y la toma de datos se realiza electrónicamente.

Para la mejora de la sensibilidad puede obtenerse midiendo con cuidado las corrientes, para separar las corrientes de condensador interferentes de las corrientes faradaicas analíticamente útiles. Sin embargo, las corrientes faradaicas residuales de la disolución, aún permanecen.

La voltamperometría diferencial de impulsos está diseñada para minimizar los efectos de las corrientes faradaicas residuales. Las corrientes residuales se miden y se restan del total de las corrientes faradaicas.

Se aplican impulsos de magnitud fija en una rampa de potencial lineal al electrodo de trabajo en un momento justo antes del final de la caída (Figura 27). La corriente se toma dos veces, justo antes de la aplicación del pulso (1) y durante la vida del pulso (después de 40 ms, 2, cuando la corriente de carga se ha decaído). La primera corriente se sustrae instrumentalmente del segundo, y esta diferencia de corriente $[\Delta i = i(t_2) - i(t_1)]$ se representa en función del potencial aplicado. El voltamograma de impulsos diferenciales resultante consiste en picos de corriente, cuya altura es directamente proporcional a la concentración de los analitos correspondientes:

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \left(\frac{1 - \sigma}{1 + \sigma} \right) \quad (12)$$

Donde $\sigma = \exp[(nF/RT)(\Delta E/2)]$ (ΔE es la amplitud del pulso). El máximo valor de $1 - \sigma / 1 + \sigma$, obtenido a lo largo de la amplitud del pulso, es la unidad.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

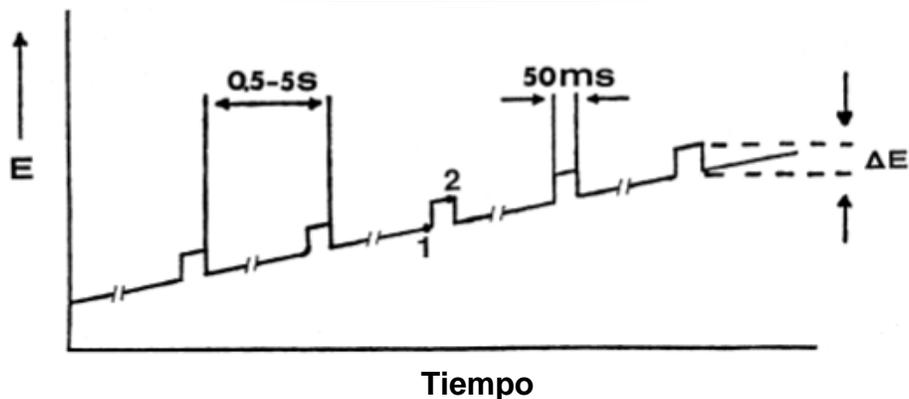


Figura 27. Excitación de la señal en al voltamperometría diferencial de pulsos

El potencial de pico (E_p) puede ser utilizado para identificar especies, ya que se produce cerca del Potencial polarográfico a la media ronda:

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E/2 \quad (13)$$

En un voltamperograma (Figura 28) la pendiente mayor es $E_{1/2}$ de la sustancia electrolizada. El área del pico, por encima de la línea base, es directamente proporcional a la concentración de las especies electroactivas que se están analizando. Por otro lado, la altura de pico puede usarse para medir la concentración, si los voltamperogramas del estándar y del analito tienen la misma forma.

En un experimento diferencial, el pico aparece en $E_{1/2}$. La voltamperometría diferencial de impulsos permite el análisis más preciso a concentraciones menores (Allen y Larry, 2001).

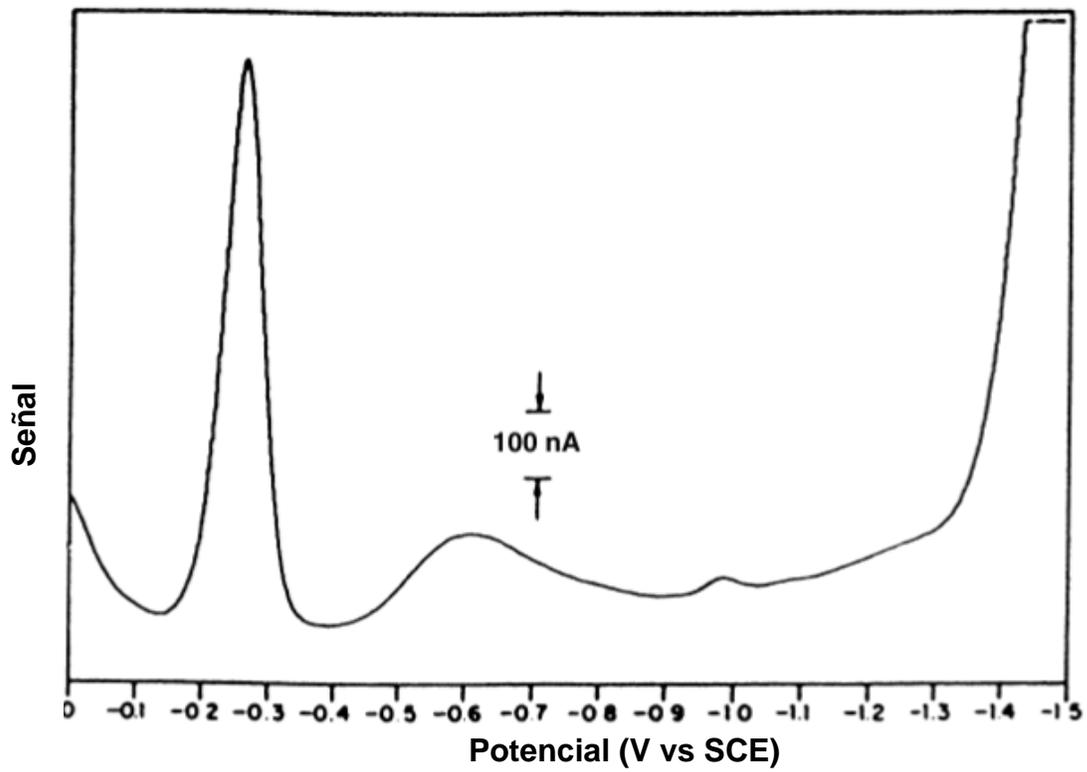


Figura 28. Voltamperograma de la diferencial de pulsos para cloranfenicol $1.3 \times 10^{-5} \text{ M}$

9. REFERENCIAS

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

1. Aguilar-Lira, G. Y., Álvarez-Romero, G. A., Rojas-Hernández, A., Rodríguez-Ávila, J. A., Páez-Hernández, M. E., & Romero-Romo, M. (2014). Voltammetric Analysis of Naproxen in Graphite Electrodes and Its Determination in Pharmaceutical Samples. *Electroanalysis*, 1573 – 1581.
2. Almeida Silva, T., Zanin, H., Campanhã Vicentini, F., Corat, E. J., & Fatibello-Filho, O. (2015). Electrochemical determination of rosuvastatin calcium in pharmaceutical and human body fluid samples using a composite of vertically aligned carbon nanotubes and graphene oxide as the electrode material. *Sensors and Actuators*, 51–59.
3. Bard A. J., & Faulkner L. R., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. (2001).1. United States of America: John Wiley & Sons, Inc.
4. Barro Ameneiro, S., & Bugarín Diz, A. (2002). *Fronteras de la computación*. Madrid, España : Edigrafos impresiones S. A.
5. Bhushan, R., Gupta, D., & Mukherjee, A. (2007). Liquid chromatographic analysis of certain commercial formulations for non-opioid analgesics. *Biomed Chromatogr.*, 1284-90.
6. Brogden, R. N., Heel, R. C., Pakes, G. E., Speight, T. M., & Avery, G. S. (1980). Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin. *Drugs*, 24-48.
7. Córdoba Insensé, A., & Rodríguez Jiménez, M. (2004). DEGRADACIÓN ELECTROQUÍMICA DEL DICLOFENACO EN DISOLUCIÓN ACUOSA. *Tesis*. Barcelona.
8. Callister, W. D. (2007). *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales* (Vol. 1). Barcelona, España: REVERTÉ.
9. Carrara, S., Baj-Rossi, C., Boero, C., & De Micheli, G. (2014). Do Carbon Nanotubes contribute to Electrochemical Biosensing. *Electrochimica Acta*, 102-112.
10. Carson, J., Notis, W. M., & Orris, E. S. (1990). Colonic ulceration and bleeding during diclofenac therapy. *N Engl J Med*, 135–7.
11. Cid-Cerón, M., Guzmán-Hernández, D., Ramírez-Silva M., Galano, A., Romero-Romo, M., & Palomar-Pardavé, M. (2000). New insights on the kinetics and mechanism of the electrochemical oxidation of diclofenac in neutral aqueous medium. *Electrochimica*, 92–98.
12. Cividanes, L. S., Simonetti, E., Moraes, M., Fernandes, F., & Thim, G. (2014). Influence of Carbon Nanotubes on Epoxy Resin Cure Reaction Using Different Techniques: A Comprehensive Review. *Polymer Engineering and Science*, 228-900.
13. Dede, E., Saglam, O., & Dilgin, Y. (2014). Sensitive Voltammetric Determination of Niclosamide at a disposable pencil graphite electrode. *Electrochimica*, 20–26.
14. Dede, E., Saglam, Ö., & Dilgin, Y. (2014). 1. Sensitive Voltammetric Determination of Niclosamide at a disposable pencil graphite electrode. *Electrochimical*, 20–26.
15. Degen, P. H. (1988). The Assay of Diclofenac and Metabolites: A Review. *Bioanalysis of Drugs and Metabolites*, 107-114.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

16. Devi, P., Jain, R., Thakur, A., Kumar, M., Labhsetwar, N., Nayak, M., y otros. (2017). A systematic review and meta-analysis of voltammetric and optical techniques for Inorganic Selenium Determination in Water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30188-7.
17. Dimiza, F., Perdiñ, F., Tangoulis, V., Turel, I., Kessissoglou, D. P., & Psomas, G. (2011). Interaction of copper (II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: Synthesis, structure, DNA and albumin-binding. *Inorganic Biochemistry*, 476–489.
18. Ensafi, A. A., & Karimi-Maleh, H. (2011). Modified multiwall carbon nanotubes paste electrode as a sensor for simultaneous determination of 6-thioguanine and folic acid using ferrocenedicarboxylic acid as a mediator. *Electroanalytical Chemistry*, 75-83.
19. Ensafi, A., Izadi, M., & Karimi-Maleh, H. (2012). Sensitive voltammetric determination of diclofenac using room-temperature ionic liquid-modified carbon nanotubes paste electrode. *Ionics*, 137–144.
20. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2011). *10a edición*, 1–2.
21. Fernandez-Llano, L., Blanco-López, M., Lobo-Castanon, M., Miranda-Ordieres, A., & Tunon-Blanco, P. (2007). Determination of Diclofenac in Urine Samples by Molecularly-Imprinted Solid-Phase Extraction and Adsorptive Differential Pulse Voltammetry. *Electroanalysis*, 1555-1561.
22. García, M., Albero, M., Sanchez-Pedreno, C., & Molina, J. (1998). Flow-injection spectrophotometric methods for the determination of tenoxicam. *J Pharm Biomed Anal*, 731-8.
23. Gooding, J. (2005). Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. *Electrochim*, 3049–3060.
24. Gowda, J., & Nandibewoor, S. (2014). Electrochemical characterization and determination of paclitaxel drug using graphite pencil electrode. *Electrochimica*, 326–333.
25. Goyal, R., Chatterjee, S., & Agrawal, B. (2010). Electrochemical investigations of diclofenac at edge plane pyrolytic graphite electrode and its determination in human urine. *Sensors and Actuators B*, 743-748.
26. Hajjizadeh, M., Jabbari, A., Heli, H., Moosavi-Movahed, A., & Haghgoo, S. (2007). Electrocatalytic oxidation of some anti-inflammatory drugs on a nickel hydroxide-modified nickel electrode. *Electrochimica*, 1766-1774.
27. Harris, D. C. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo*. España: Editorial Reverté, S.A.
28. Holler, S. W. (1997). *Fundamentos de química analítica*. Barcelona, España: Reverté.
29. Huang Q., Deng S., Shan D., Wang Y., Wang B., Huang J., y otros. (2017). Enhanced adsorption of diclofenac sodium on the carbon nanotubes-polytetrafluoroethylene electrode and subsequent degradation by electro-peroxone treatment. *Journal of Colloid and Interface Science*, 142–148.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

30. Ji X., Kadara R., Krussma J., Chen Q., & Banks C. (2010). Understanding the Physicoelectrochemical Properties of Carbon Nanotubes: Current State of the Art. *Electroanalysis*, 7–19.
31. Jin, W., & Zhang, J. (2000). Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *J. Chromatogr*, 101-107.
32. Kaphalia L., Kaphalia BS, Kumar S, Kanz MF, & Treinen-Moslen M. (2006). Efficient high performance liquid chromatography/ ultraviolet method for determination of diclofenac and 40- hydroxydiclofenac in rat serum. *Chromatogr. B*, 231–237.
33. Karimi-Maleh, H., Gupta, V., & Sadegh, R. (2014). Simultaneous Determination of Hydroxylamine, Phenol and Sulfite in Water and Waste Water Samples Using A Voltammetric Nanosensor. *Electrochemical Science*, 303 - 316.
34. Kormosh Z., Hunka I., & Bazzel Y. (2009). An ion-selective sensor for assay of diclofenac in medicines. *Pharmaceutical Chemistry*, 428-430.
35. Kormosh, Z., Hunka, I., Bazzel, Y. R., Laganovsky, A., Mazurenko, I., & Kormosh, N. (2007). Determination of diclofenac in pharmaceuticals and urine samples using a membrane sensor based on the ion associate of diclofenac with Rhodamine B. *Central European Journal of Chemistry*, 813-823.
36. Lala, L., D'Mello, P., & Naik, S. (2002). Determination of diclofenac sodium from serum. *Biomed. Anal.*, 539–544.
37. Long VU, D., ERTEK, B., DILGIN, Y., & ČERVENKA, L. (2015). Voltammetric Determination of Tannic Acid in Beverages using Pencil Graphite Electrode. *Czech J. Food Sci.*, 72–76.
38. López, M., Castañón, M., & Blanco, P. (2003). Voltammetric sensor for vanillylmandelic acid based on molecularly imprinted polymer-modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 353–362.
39. Manea, F., Ihos, M., Remes, A., Burtic, G., & Schoonmanc, J. (2010). Electrochemical Determination of Diclofenac Sodium on Aqueous Solution on Cu-Doped Zeolite- Expanded Graphite-Epoxy Electrode. *Electroanalysis*, 2058–2063.
40. Miller, J., & Miller, J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Madrid, España: Pearson Education.
41. MultiSimplex. (2000). *User's guide to MultiSimplex® 2.1*. Sendsvall, Sweden: GrabitechSolutionsAB.
42. Ören, T., & Anık, Ü. (2017). Voltammetric determination of caffeine by using gold nanoparticle-glassy carbon paste composite electrode. *Measurement*, 26-30.
43. Pingarrón Carrazón, J., & Sánchez Bataner, P. (2003). *Química Electroanalítica Fundamentos y Aplicaciones*. España : Síntesis.
44. Popilevsky, L., Skripnyuk, V., Beregovsky, M., Sezen, M., Amouyal, Y., & Rabkin, E. (2016). Tuning the thermal conductivity of hydrogenated porous magnesium hydride composites with the aid of carbonaceous additives. *International journal of hydrogen energy*, 0360-3199.
45. Punbusayakul, N. (2012). Carbon nanotubes architectures in electroanalysis. *Procedia Eng.*, 683–689.

Desarrollo y evaluación de propuestas electroanalíticas para la cuantificación de diclofenaco

46. Rehman, A. U., Mehmood, R., Nadeem, S., Akbar, N. S., & Motsa, S. S. (2017). Effects of single and multi-walled carbon nano tubes on water and engine oil based rotating fluids with internal heating. *Advanced Powder Technology*, 1991-2002.
47. Rodríguez, A., Barrado, E., Castrillejo, Y., Santos, R., & Lima, J. (2007). Validation of a tubular bismuth film amperometric detector: Determination of diclofenac sodium by multisyringe flow injection analysis. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47–53.
48. Roskar, R., & Kmetec, V. (2003). Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid. *Chromatogr*, 57–64.
49. Sánchez Obrero, G. (2012). Electroodos de pvc/ttf-tcnq modificados. aplicación como sensores y biosensores electroquímicos. *Tesis de doctorado*. 1. Cordoba, España.
50. Santini, A., Pezza, H., & Pezza, L. (2006). Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix. 636–642.
51. Santos, M. (2006). Análisis y distribución de principios activos farmacológicos en los procesos convencionales de depuración de aguas residuales urbanas. *Tesis de doctorado*. España : Departamento de Química Analítica, Universidad de Sevilla.
52. Shamsipur, M., Jalali, F., & Ershad, S. (2005). Reparation of a diclofenac potentiometric sensor and its application to pharmaceutical analysis and to drug recovery from biological fluids. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 943–947.
53. Sondergaard, K., Weeke, P., Wissenberg, M., Schjerning Olsen, A.-M., Fosbol, E., Lippert, F., y otros. (2017). Non-steroidal anti-inflammatory drug use is associated with increased risk of out-of-hospital cardiac arrest: a nationwide case–time–control study. *European Heart Journal*, 100–107.
54. Vlascici, D., Pruneanu, S., Olenic, L., Pogacean, F., Ostafe, V., Chiriac, V., y otros. (2010). Manganese (III) Porphyrin-based Potentiometric Sensors for Diclofenac Assay in Pharmaceutical Preparations. *Sensors*, 8850-8864.
55. Wang, J. (2001). *Analytical Electrochemistry*. New York: Wiley-VCH.
56. Wechter, W., Murray, E., Kantoci, D., Quiggle, D., Leipold, D., Gibson, K., y otros. (2000). Treatment and survival study in the C57BL/6J-APC(Min)/+ (Min) mouse with R-flurbiprofen. *Life sciences*, 745 - 753.
57. Yang, X., Wang, F., & Hu, S. (2008). Enhanced oxidation of diclofenac sodium at a nano-structured electrochemical sensing film constructed huy multi-wall carbon nanotubes–surfactant composite. *Mater Sci. Eng*, 188–194.