



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

ANÁLISIS DE NITROCOMPUESTOS EN MUESTRAS
FARMACÉUTICAS MEDIANTE ELECTRODOS
MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE HIERRO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTA

CÉSAR AUGUSTO SÁNCHEZ ATANACIO

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA

DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ



MINERAL DE LA REFORMA, HGO.

ABRIL, 2018



Mineral de la Reforma, Hidalgo, a 5 de abril de 2018

Número de control: ICBI-D/290/2018

Asunto: Autorización de impresión.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de Licenciatura en Química **César Augusto Sánchez Atanacio**, quien presenta el trabajo de titulación "**Electroanálisis de nitrocompuestos aromáticos en muestras farmacéuticas mediante electrodos modificados con nanopartículas de hierro**" 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:	Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
PRIMER VOCAL:	Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
SEGUNDO VOCAL:	Dra. Eva María Santos López
TERCER VOCAL:	Dra. Irais Sánchez Ortega
SECRETARIO:	Dra. María Elena Páez Hernández
PRIMER SUPLENTE:	Dra. Esmeralda Rangel Vargas
SEGUNDO SUPLENTE:	Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

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

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Óscar Rodolfo Suárez Castillo
Director del ICBI



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 2231, Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

A las personas que contribuyeron en la realización de esta tesis deseo expresar un profundo y sincero agradecimiento por todas sus aportaciones y su gran apoyo.

Doy gracias a mis padres Lourdes y Juan por ser un pilar en mi vida, por estar siempre cerca de mí, por brindarme su apoyo y amor incondicional en cada etapa de mi vida, por sus consejos, sus regaños, pero sobre todo por sus palabras de aliento que me impulsaron a seguir adelante en todo momento y fomentar el deseo de superación.

Al Dr. José Antonio Rodríguez Ávila por darme la oportunidad de trabajar con él, por su amistad, por su confianza, por cada llamada de atención, pero sobre todo por haber creído en mí, por transmitirme sus conocimientos y por todas y cada una de las oportunidades brindadas a lo largo de este tiempo.

Agradezco al comité tutorial integrado por: Dra. Eva María Santos López, Dra. María Elena Páez Hernández, Dr. Carlos Andrés Galán Vidal, Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega, Dra. Irais Sánchez Ortega, Dra. Esmeralda Rangel Vargas, por sus valiosos comentarios para el mejoramiento de este trabajo.

A mis queridos amigos Abigail, Carlos, Elsa, Limón, José Luis y Felipe, por su apoyo, buenos deseos y por compartir los buenos y malos momentos a lo largo de la carrera.

Gracias también a mis compañeros de laboratorio, que me apoyaron y me brindaron su amistad, Nancy, Ale y Ray.

A todas aquellas personas que de una u otra manera participaron en la realización de esta investigación, hago llegar mis más sinceros agradecimientos.



Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios 1, 2, 8 y HPLC del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

La investigación se realizó gracias al financiamiento del Proyecto PEI-CONACyT 2016 con clave 232271 intitulado: “Reducción de acrilamidas en proceso de botanas fritas y desarrollo de técnicas de bajo impacto ambiental para monitoreo de acrilamida y degradación de aceite”.

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

- XXX Congreso Nacional de Química Analítica (2017) con el trabajo: “Aplicación de nanopartículas de hierro en la determinación de nitroimidazoles mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica”

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	i
Índice de figuras	ii
Índice de tablas	iv
Introducción	v
1. ANTECEDENTES.....	2
1.1 Generalidades de los nitrocompuestos	2
1.2 Reducción de nitrocompuestos	4
1.3. Uso de los nitrocompuestos	5
1.4 Técnicas de análisis de nitrocompuestos aromáticos	7
1.4.1 Cromatográficas.....	8
1.4.2 Técnicas espectroscópicas	10
1.4.3 Electroquímicas.....	13
1.4.3.1 Análisis en discontinuo	15
1.4.3.2 Detección electroquímica en continuo	16
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo general	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	24
3.1 Modificación de electrodos serigrafados	24
3.2 Caracterización analítica de los electrodos modificados	25
3.2.1 Voltamperometría cíclica.....	25
3.2.2 Voltamperometría diferencial de pulsos	26
3.3 Análisis por inyección en flujo	26
3.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección amperométrica	27
3.5 Análisis de muestras farmacéuticas	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1 Caracterización del electrodo	30
4.2 Caracterización electroquímica de nitrocompuestos	33
4.2.1 Caracterización mediante voltamperometría cíclica.....	33

4.2.2	Análisis de metronidazol mediante voltamperometría diferencial de pulsos	37
4.2.3	Análisis por inyección en flujo de metronidazol y 2-metil-5-nitroimidazol con detección amperométrica	38
4.2.4	Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de nitrocompuestos aromáticos	41
4.3	Análisis de varianza a partir del análisis de muestras farmacéuticas mediante FIA-AD, HPLC-UV y HPLC-AD	44
5.	CONCLUSIONES	47
6.	REFERENCIAS	49

Lista de abreviaturas

ACN	acetonitrilo
AcOH	ácido acético
AD	detección amperométrica
ADN	ácido desoxirribonucleico
ATP	trifosfato de adenosina
bpy	bipiridina
CLC	cromatografía capilar de líquidos
CMC	carboximetilcelulosa
DAD	detector de arreglo de diodos
DFT	teoría de funcionales de la densidad
DNP	dinitrofenol
DNSA	ácido dinitrosalicílico
ECD	detector de captura de electrones
EDS	espectro de energía dispersiva
EDTA	ácido etilendiaminotetraácetico
EtOH	etanol
FeNPs	nanopartículas de hierro
FIA	análisis por inyección en flujo
GC	cromatografía de gases
HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
HS	espacio de cabeza
MeOH	metanol
MISPE	extracción en fase sólida basada en polímeros molecularmente impresos
MOGs	geles metalo-orgánicos
MS	espectrómetro de masas
NP	nitrofenol
PA	ácido pícrico
PETN	tetranitrato de pentaeritriol
pm	picómetro
RDX	1,3,5-trinitroperhidro-1,3,5-triazina
TEA	analizador termoenergético
TNT	mezcla de isómeros de trinitrotolueno
UV-Vis	espectro ultravioleta - visible

Índice de figuras

Figura 1. Estructuras químicas de a) nitroalcano, y b) alquilnitrito.	2
Figura 2. Híbrido de resonancia del grupo nitro.....	2
Figura 3. Métodos de síntesis de compuestos nitroalifáticos y nitroaromáticos [3].	3
Figura 4. Reducción catalítica de un nitrocompuesto.	4
Figura 5. Métodos de reducción de nitrocompuestos aromáticos y alifáticos.....	4
Figura 6. Etapas de la reducción electroquímica del p-nitrofenol.	5
Figura 7. Algunos ejemplos de pesticidas que contienen el grupo nitro.	6
Figura 8. Estructuras resonantes del ion fenóxido.....	12
Figura 9. Espectros de emisión de fluorescencia que muestran el abatimiento de la señal de fluorescencia de geles orgánicos con Al (a), mediante b) 4-nitrofenol, c) ácido 3,5-dinitrosalicílico, d) 2,4-dinitrofenol, e) ácido pícrico, con una concentración de 0.3 mM para cada uno de los nitrocompuestos aromáticos [23].	13
Figura 10. Celda electroquímica para estudio en discontinuo: a) electrodo de referencia, b) electrodo auxiliar y c) electrodo de trabajo [26].	14
Figura 11. Celda electroquímica para análisis en flujo, a) electrodo serigrafiado de carbono, b) celda de choque frontal de metacrilato para análisis en flujo [54].	14
Figura 12. Elementos básicos de un sistema de análisis por inyección en flujo (BP, bomba peristáltica; M, muestra; ST, solución transportadora; V, válvula de inyección; R, reactor; D, detector).	17
Figura 13. Geometrías de celdas para detección en flujo, con tres zonas particulares 1) electrodo de trabajo, 2) entrada de líquido, 3) salida de líquido.	18
Figura 14. Reacción de reducción del hierro.	24
Figura 15. Sistema de análisis electroquímico utilizado: a) detector, b) bipotenciostato y c) cable conector [54].	25
Figura 16. Esquema representativo del equipo utilizado para análisis en flujo (FIA).....	27
Figura 17. Celda de choque frontal de teflón para análisis en flujo [54].	27
Figura 18. Microscopía electrónica de barrido de la superficie del electrodo de trabajo de un electrodo serigrafiado de carbono, a) superficie del electrodo, b) espectro de energía dispersiva de la composición del electrodo.	30
Figura 19. Estructura química del Nafion.....	32
Figura 20. Microscopía electrónica de barrido de la superficie del electrodo de trabajo de un electrodo serigrafiado de carbono, a) superficie del electrodo, b) espectro de energía dispersiva de la composición del electrodo.	32

Figura 21. Voltamperogramas cíclicos obtenidos del análisis de una solución de metronidazol 1 mM en HCl 1.0 M ajustado a pH 2.0. Velocidad de barrido 50 mV s ⁻¹ usando (a) electrodo sin modificar, y (b) electrodo modificado con FeNPs. El voltamperograma (c) corresponde al análisis de una solución de 2-metil-5-nitroimidazol 1 mM bajo las mismas condiciones químicas, empleando un electrodo modificado con FeNPs.	34
Figura 22. a) Variación del potencial de reducción del metronidazol a diferentes valores de pH; b) variación de la intensidad (altura en µA) de la señal de reducción del metronidazol respecto al pH.	35
Figura 23. Perfil energético de la reacción para la formación de amina a partir de nitro con B3LYP/6-311++G**	36
Figura 24. Reducción electroquímica del metronidazol: a) obteniendo como producto la hidroxilamina; b) obteniendo como producto la amina.	36
Figura 25. Voltamperogramas obtenidos a partir del análisis de disoluciones de metronidazol.	37
Figura 26. Estudio por FIA de soluciones estándar de metronidazol en un intervalo de concentraciones de 10 a 50 mg L ⁻¹ usando como electrolito una mezcla HCl/NaCl (0.01M/1.0M) ajustada a pH=2.0, con un flujo de 0.5 mL min ⁻¹ y utilizando un electrodo serigrafiado de carbono modificado (E _{detección} = - 0.9 V).....	40
Figura 27. Cromatograma obtenido a partir del análisis de una mezcla de (A) 2-metil-5-nitroimidazol, (B) metronidazol, (C) 4-nitrofenol y (D) ácido pícrico mediante HPLC con detección a 320 nm.	42
Figura 28. Cromatograma obtenido a partir del análisis soluciones estándar de 2-metil-5-nitroimidazol (A) y metronidazol (B) mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección Amperométrica.	43
Figura 29. Estructura química de la nifuroxazida.....	44

Índice de tablas

Tabla 1. Sistemas de análisis instrumental con detección electroquímica aplicados al análisis de nitrocompuestos.	19
Tabla 2. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado: I (μA) vs [metronidazol] (μM)...	38
Tabla 3. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado: I (μA) vs [nitrocompuesto] (μM).	41
Tabla 4. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado: I (μA) vs [nitrocompuesto] (μM).	43
Tabla 5. Contenido de metronidazol en mg de dos muestras farmacéuticas mediante tres métodos de análisis.	45

Introducción

Los nitrocompuestos aromáticos son especies químicas utilizadas en la obtención de diversos productos como principios activos en medicamentos, pesticidas e incluso explosivos. Dentro de los fármacos, se encuentra un grupo de antiprotozoarios derivados del 5-nitroimidazol, siendo el metronidazol el de mayor uso en medicina humana y veterinaria. Este agente interactúa con el ADN de microorganismos anaerobios, causando su degradación. La identificación de los nitrocompuestos en muestras farmacéuticas es importante ya que representa un parámetro de calidad en la industria. Además, cabe resaltar que tanto el metronidazol como productos de degradación como el 2-metil-5-nitroimidazol, así como otros derivados del 5-nitroimidazol, han sido catalogados como una nueva clase de agentes contaminantes debido a las propiedades carcinogénicas y mutagénicas que pueden presentar en seres vivos. Por ello, se han desarrollado diversas técnicas espectroscópicas, cromatográficas y electroquímicas para su cuantificación, siendo ésta última una alternativa viable al ser aplicada al estudio de nitrocompuestos aromáticos debido a una propiedad característica de estas especies como es la reducción irreversible del grupo nitro, que genera una respuesta proporcional a la concentración del nitrocompuesto. La utilización de esta propiedad puede permitir la creación de una metodología analítica.

Este proyecto consistió en la creación y evaluación de un detector electroquímico modificado con nanopartículas de hierro para la determinación de metronidazol en sistemas de análisis en flujo, específicamente, análisis por inyección en flujo (FIA). Esta técnica representa una alternativa eficiente y versátil debido a la simplicidad de los equipos y materiales utilizados, así como los volúmenes de gasto de soluciones que, en comparación con otros métodos como HPLC, es menor. Para ello, se realizó la modificación del electrodo serigrafiado de carbono empleando soluciones de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaBH_4 y carboximetilcelulosa para la generación de las nanopartículas y se utilizó una matriz polimérica (Nafion) para la fijación del hierro y evitar su oxidación. Posteriormente, el análisis morfológico de la superficie de un electrodo sin modificar y otro modificado, evidenció la presencia de las nanopartículas dentro de la matriz polimérica. A partir de esto, se llevó a cabo el análisis del metronidazol y el 2-metil-5-nitroimidazol mediante técnicas electroquímicas en discontinuo, como voltamperometría cíclica y voltamperometría

diferencial de pulsos, así como en continuo por análisis de inyección en flujo mediante detección amperométrica (FIA-DA). Debido al comportamiento electroanalítico similar de ambas especies de nitroimidazoles mediante FIA-DA, fue necesario realizar el análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución para la detección de los analitos. En primera instancia se utilizó detección UV-Visible para comprobar la separación y posterior a esto, se acopló la celda electroquímica para llevar a cabo la determinación de los nitrocompuestos aromáticos mediante detección amperométrica (HPLC-DA). Una vez que se obtuvieron los datos correspondientes del análisis de soluciones estándar por los métodos propuestos, se calcularon los parámetros analíticos y se realizó el análisis de metronidazol en muestras farmacéuticas. Finalmente, con los datos obtenidos por FIA-DA, HPLC-UV y HPLC-DA, se compararon los métodos mediante un análisis de varianza, del que se concluye que no existen diferencias significativas entre las metodologías, por lo que si bien FIA-DA no es un método del todo selectivo, podría utilizarse como un análisis preliminar antes de recurrir a HPLC, proporcionando datos confiables.

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de los nitrocompuestos

Los nitrocompuestos son especies químicas que contienen dentro de su estructura un grupo nitro (-NO₂) que se diferencia de su isómero, el grupo nitrito (-O-N=O), en cuanto al átomo al que se enlaza la cadena hidrocarbonada (Fig. 1), ya sea por el átomo de nitrógeno o por el átomo de oxígeno respectivamente [1].



Figura 1. Estructuras químicas de a) nitroalcano, y b) alquilnitrito.

Este tipo de compuestos pueden ser clasificados en función de la cadena que se encuentra unida al grupo nitro. Los nitroalcanos presentan una cadena alifática, mientras que los nitroaromáticos contienen un anillo aromático, ya sea homocíclico o heterocíclico. Tanto en los compuestos nitro aromáticos y alifáticos, los enlaces N-O son equivalentes y presentan una longitud de enlace de 121 pm, esto debido a la contribución de dos estructuras que generan un híbrido de resonancia (Fig. 2) [2].

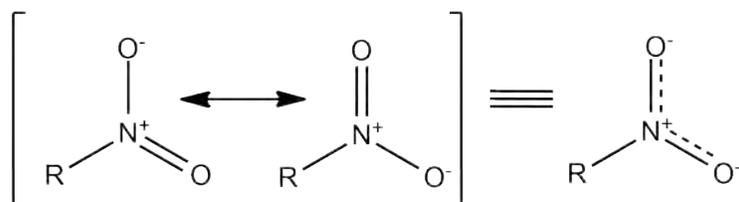


Figura 2. Híbrido de resonancia del grupo nitro.

Algunas diferencias que se presentan entre estos dos grupos de compuestos se describen a continuación. Los nitroalcanos son líquidos incoloros, en cambio, los nitroaromáticos son sólidos que presentan colores amarillos pálidos debido al grupo nitro, que es un cromóforo (presenta

transiciones electrónicas $\pi\pi^*$ y $\pi\pi^*$), además de que el color puede ser más intenso por la presencia de grupos auxocromos como el grupo hidroxilo (-OH) o el grupo amino (-NH₂) [1]. Respecto a su solubilidad en agua, los nitroalcanos son moderadamente solubles en agua, mientras que los nitrocompuestos aromáticos son poco solubles. Sin embargo, existe una gran variedad de derivados que presentan grupos afines al agua y que por lo tanto ayudan a mejorar la solubilidad en este medio.

Por otra parte, la presencia de momentos dipolo-dipolo de los nitrocompuestos en general hace que tengan puntos de ebullición más altos comparados con los hidrocarburos de pesos moleculares semejantes. La estabilidad de los nitroalcanos es alta, sin embargo, los nitroaromáticos son menos estables en presencia de calor [2].

Algunos métodos de síntesis para nitrocompuestos alifáticos y aromáticos se presentan en la Figura 3:

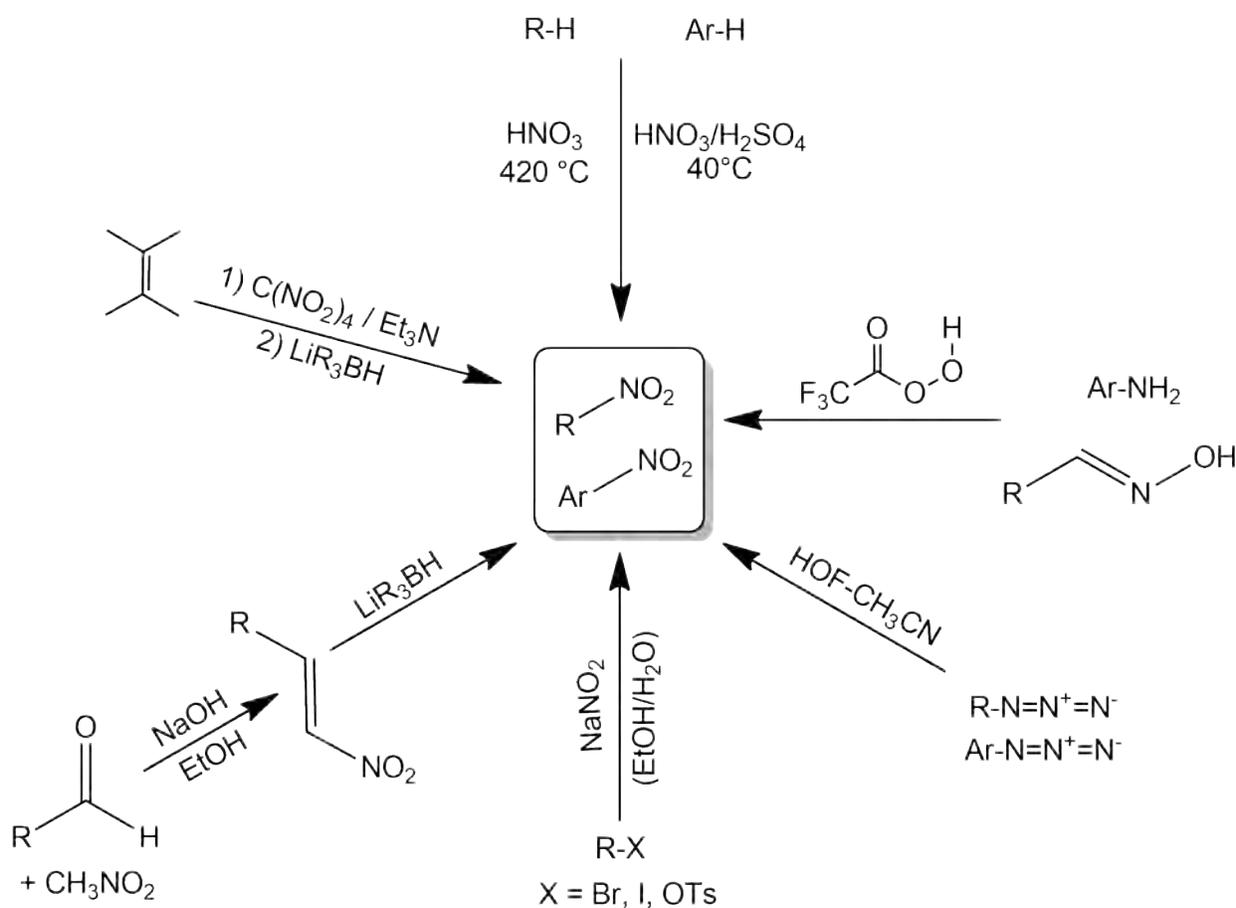


Figura 3. Métodos de síntesis de compuestos nitroalifáticos y nitroaromáticos [3].

1.2 Reducción de nitrocompuestos

Una de las reacciones de mayor importancia de los nitrocompuestos debido a la gran variedad de alternativas, es la reducción del grupo nitro, que da lugar a la formación de aminas. Dicha reacción se puede llevar a cabo químicamente a través de la reacción con H₂ y un metal (M=Ni *Raney*, Pd, Pt, entre otros), dando lugar a la formación de la amina primaria tanto en nitrocompuestos aromáticos o alifáticos (Fig. 4).

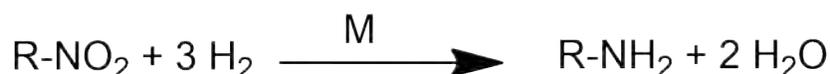


Figura 4. Reducción catalítica de un nitrocompuesto.

Otra alternativa de reducción involucra el uso de agentes reductores fuertes (Fe, Zn, Sn) en medios ácidos, neutros o básicos (Fig. 5) [4]. Dependiendo de la temperatura y tiempo de reacción se obtienen distintos compuestos que incluyen hidroxilaminas y compuestos azo.

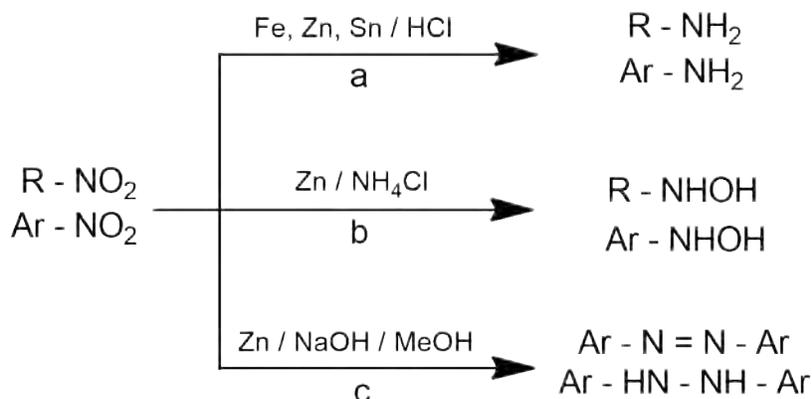


Figura 5. Métodos de reducción de nitrocompuestos aromáticos y alifáticos.

El uso de técnicas de electrosíntesis se ha descrito por Savall en 1991 [5], para la obtención de hidroxilaminas o aminas a partir de nitrocompuestos. Estas consisten en hacer pasar un flujo de electrones en una celda electroquímica, produciendo la formación de hidroxilamina o amina en el cátodo (Fig. 6). La reacción ocurre en dos etapas: en primera instancia, involucra la participación de cuatro electrones y cuatro H⁺, para formar la hidroxilamina, posteriormente, se necesitan dos H⁺ y dos electrones para obtener finalmente la amina.

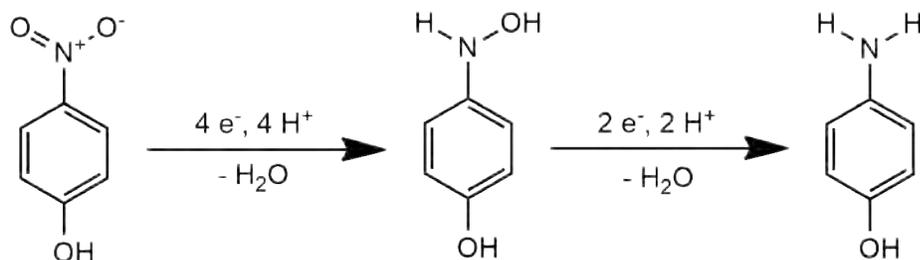


Figura 6. Etapas de la reducción electroquímica del p-nitrofenol.

Esta vía de síntesis ha sido empleada para la obtención industrial de hidroxilaminas utilizando una celda electroquímica compuesta por Cu/Zn y Pt como electrodos de trabajo y auxiliar, respectivamente, y un electrodo de calomel saturado empleado como electrodo de referencia. La síntesis se realizó en medio ácido aplicando un potencial de -0.8 V en la primera etapa, para obtener la hidroxilamina, seguido de un potencial de -1.6 V para obtener como producto final la amina.

De igual manera, la electrosíntesis de diaminotoluenos se realizó por Vélin-Prikidánovics en 1990 [6], utilizando un electrodo de aleación Devarda (Al-Cu-Zn) o Ni Raney incrustados sobre una matriz de Ni en medio básico (NaOH 0.14M/MeOH, 93:7). El potencial aplicado en esta síntesis fue de -1.4 V para llevar a cabo la reducción, que involucra la hidrogenación electrocatalítica.

1.3. Uso de los nitrocompuestos

Los nitrocompuestos son de gran importancia en la industria, ya que funcionan como materia prima o intermediarios para la producción de una gran variedad de artículos como fármacos, pesticidas e incluso explosivos.

Dentro de los fármacos, se encuentran los nitroimidazoles utilizados desde 1959 contra infecciones causadas por *Trichomonas vaginalis*. Estos compuestos son precursores para la síntesis de algunos compuestos derivados, que presentan un gran espectro de actividad contra bacterias tanto Gram-positivas como negativas y protozoos, los cuales presentan una característica en común, son microorganismos anaerobios. A partir del descubrimiento del

amplio uso de los nitroimidazoles se sintetizaron una gran serie de compuestos, dentro de ellos el metronidazol, ornidazol, tinidazol, entre otros, siendo el primero el de mayor importancia debido a su efectividad en el tratamiento de enfermedades protozoarias como amebiasis, tricomoniasis, giardiasis, entre otras causadas por microorganismos anaerobios [7].

Está demostrado que la vía de acción del metronidazol dentro de las células dañinas está determinada por la activación metabólica del fármaco, incluyendo las siguientes reacciones: a) nitroreducción, b) esterificación, c) oxidación del anillo seguida por la nitroreducción y d) oxidación del anillo seguida de la nitroreducción y esterificación. Estas reacciones sólo se llevan a cabo en sistemas que operan con la enzima ferredoxina o su equivalente, además de que el potencial de reducción del metronidazol (-0.45 V) determina la toxicidad selectiva en microorganismos anaerobios, ya que son los únicos que pueden llevar a cabo esta reacción. La reducción metabólica del grupo nitro se lleva a cabo en tres etapas: 1) reducción del grupo nitro a un grupo nitroso, 2) reducción a hidroxilamina y 3) reducción a amina primaria.

Aunque se ha sugerido que las proteínas son el sitio de acción de este fármaco, se reporta que los nitroimidazoles pueden causar la degradación del ADN, debido a la formación de una interacción de un intermediario de reducción, la hidroxilamina con el ADN causando la disociación del enlace fosfodiéster de la hélice, causando su ruptura [8].

Además de la capacidad tóxica frente a microorganismos anaerobios, los nitrocompuestos aromáticos derivados del benceno presentan actividad pesticida [9], debido al poder oxidante del grupo nitro (Fig. 7).



Figura 7. Algunos ejemplos de pesticidas que contienen el grupo nitro.

Algunos nitrocompuestos aromáticos como el 2,4-dinitrofenol, el dinitrocresol, el pentaclorofenol y otros fenoles sustituidos, usados como pesticidas presentan actividad biológica en tres aspectos: a) inhibición de la fosforilación oxidativa, b) estimulación de la oxidación y c) estimulación de la actividad del ATP. De igual manera, algunos de los efectos que afectan a la mitocondria: a) pérdida del control respiratorio, b) inhibición de algunas reacciones de intercambio catalizadas por la mitocondria, c) incremento de la actividad del ATP y d) hinchamiento de la mitocondria [9].

Por otra parte, el uso de los nitrocompuestos como explosivos se debe a la presencia de nitrógeno, oxígeno y elementos oxidables como el carbono y el hidrógeno. Al llevarse a cabo una explosión, la molécula se fragmenta en los átomos que la constituyen, para formar especies más estables con los componentes combustibles generándose CO_2 , H_2O , N_2 , etc. [10]. Durante esta reacción se libera una gran cantidad de energía acompañada del desprendimiento de gases. Los explosivos se clasifican de acuerdo con la sensibilidad y la detonación que presentan, así los nitrocompuestos se encuentran denominados como explosivos secundarios, debido a la baja sensibilidad. Dentro de los explosivos secundarios se encuentran la nitrocelulosa, la nitroglicerina, el TNT (mezcla de isómeros del trinitrotolueno), el ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol) con un poder explosivo mayor al TNT con respecto a la fuerza y a la velocidad de detonación, entre otros compuestos.

Debido a la gran variedad de productos que contienen nitrocompuestos aromáticos, así como la toxicidad que representan para los seres vivos, se han desarrollado diversas técnicas de análisis que involucran la detección y la determinación de estas especies, con la finalidad de detectar cada vez concentraciones menores y creando metodologías cada vez más selectivas. Algunas técnicas de análisis se describen brevemente en el siguiente apartado.

1.4 Técnicas de análisis de nitrocompuestos aromáticos

Debido a la importancia de los nitrocompuestos aromáticos, se han descrito técnicas de identificación y cuantificación en matrices variadas, lo que ha originado el desarrollo de

diferentes formas de análisis mediante técnicas cromatográficas [11-15], espectroscópicas [17-25], y electroquímicas [26-35].

1.4.1 Cromatográficas

El análisis de muestras de suelo, agua, alimentos o fármacos conlleva al uso de técnicas de separación debido a la complejidad que puede presentar la matriz, por lo que en algunos casos es necesario un tratamiento previo de la muestra, ya sea por extracción líquido-líquido o mediante extracción en fase sólida.

En el caso de los nitroimidazoles, se ha descrito el análisis por cromatografía capilar de líquidos (CLC) en combinación con extracción en fase sólida basada en polímeros molecularmente impresos [11]. Los autores utilizaron dicha metodología para la detección de nitroimidazoles en productos como cangrejo, salmón y camarón, donde se emplean nitroimidazoles en el control de parásitos de la industria piscícola. Para el análisis se mezclaron y trituraron 2 g de tejido muscular de cada una de las muestras y 1 mL de agua desionizada. Transcurridos 15 minutos, se adicionaron 5 mL de ACN, 0.5 g de sulfato de magnesio y se agitó mecánicamente durante 5 minutos. La fase líquida se separó mediante centrifugación, del sobrenadante se reservaron 4 mL para la evaporación del disolvente y la reconstitución del residuo en 2.5 mL de agua desionizada. La muestra se pre-concentró mediante columnas MISPE previo a su análisis por CLC-UV. La separación se realizó en una columna C₁₈, con gradiente de fase móvil H₂O/ACN empleando un flujo de 7 $\mu\text{L min}^{-1}$, alcanzando un límite de detección de 1.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para el metronidazol .

Al igual que la contaminación de tejidos animales, el ambiente se ve perjudicado por el uso de explosivos o pesticidas que contienen nitrocompuestos aromáticos. Se han descrito algunas metodologías de análisis de nitrocompuestos mediante cromatografía de gases, por ejemplo, el análisis de nitrofenoles en muestras de lluvia y nieve [12]. Para ello, se requirió de la aplicación de la extracción líquido-líquido a la muestra, por lo que el agua de lluvia se puso en contacto con CH₂Cl₂, extrayendo a la fase orgánica los nitrocompuestos y algunos interferentes. La fase orgánica se agitó con una disolución acuosa de KOH 1 M con la finalidad de separar los

compuestos básicos y neutros. La fase acuosa se diluyó, acidificó ($\text{pH} < 2$) y se re-extrajeron los nitrofenoles con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se analizó mediante cromatografía de gases acoplado con un detector de captura de electrones (GC-ECD) en una columna DB5 (J&W, 30 m x 0.32 mm, 25 μm) empleando un volumen de inyección de 1 μL (modo splitless), He, como fase móvil y un detector de captura de electrones (EDC) o de análisis de energía térmica (TEA, a una temperatura de pirolisis de 950 $^\circ\text{C}$). Los límites de detección alcanzados fueron de 0.1 y 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ con ECD y TEA, respectivamente. El análisis de muestras de nieve derretida se llevó a cabo empleando extracción líquido-líquido, HS-GC-MS usando n-pentano como disolvente orgánico, una columna DB5 (J&W, 30 m x 0.32 mm, 25 μm), un volumen de inyección de 1.5 μL (modo split), He, como fase móvil y un detector de espectrometría de masas de ionización por impacto electrónico. El límite de detección alcanzado para el p-nitrofenol fue de 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ [12].

Otro nitrocompuesto aromático analizado en muestras de agua subterránea de antiguas plantas de municiones es el ácido pícrico [13]. La separación se realizó utilizando una columna C_{18} con un régimen isocrático empleando $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (55:45) ajustada a $\text{pH}=2.3$, con un flujo de 0.5 mL min^{-1} y un detector de arreglo de diodos. La muestra de agua requirió de un proceso de limpieza mediante extracción líquido-líquido con tres porciones de 15 mL de diclorometano (CH_2Cl_2). La fase acuosa fue purgada con nitrógeno para remover el CH_2Cl_2 residual y se analizó la muestra en el sistema cromatográfico, presentando un límite de detección de 0.4 μM .

De igual manera, para el análisis de ácido pícrico pero esta vez en muestras sólidas se ha realizado su estudio en muestras de suelo con diferentes proporciones de arena, arcilla y materia orgánica [14]. Para ello, se evaluó la extracción por solvente presurizado y la extracción ultrasónica. En el primer caso se pesó la muestra de suelo, se mezcló con un desecante inerte y se extrajo empleando diferentes porciones de metanol-agua. Respecto a la extracción ultrasónica, la muestra se mezcló con una solución de agua-metanol (1:3, v:v) y se colocó en un baño ultrasónico por 20 minutos a 150 W y 35 kHz. La solución sobrenadante se separó por centrifugación y el residuo se lavó con 20 mL de la mezcla de disolventes. Las fases líquidas se mezclaron y analizaron posteriormente por HPLC. En ambos casos la separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna selectiva al análisis de explosivos (UltraSep ES

Phenol), utilizando un gradiente de fase móvil H₂O/ACN ajustado a pH=2.7 y un flujo de 0.5 mL min⁻¹ obteniendo límites de detección de 0.1 mg kg⁻¹.

Para el caso de otros compuestos utilizados como explosivos, además del ácido pícrico, se ha realizado el análisis de muestras de agua subterránea empleando HPLC aplicando detección electroquímica fotoasistida para el análisis de TNT [15]. En este trabajo, la muestra se limpió mediante extracción en fase sólida en línea para la remoción de especies electroactivas. La separación se realizó en una columna C18 a 30 °C acoplado a un reactor fotoquímico que contenía una bobina de politetrafluoroetileno con un volumen de 1.25 mL envuelto alrededor de una lámpara de baja presión de Hg. La solución eluyente se introdujo en una celda electroquímica de capa fina equipada con un electrodo de trabajo de carbón vítreo. La metodología propuesta presenta límites de detección en el intervalo de 0.004 a 0.9 µg L⁻¹ para distintos explosivos como el TNT y el ácido pícrico.

1.4.2 Técnicas espectroscópicas

Basadas en la medida de la absorción o emisión de radiación electromagnética que presenta una muestra, estas técnicas se encuentran generalmente acopladas a sistemas de separación. Sin embargo, dichas técnicas también pueden ser empleadas de manera aislada para muestras que contengan especies químicas susceptibles de presentar transiciones electrónicas, o que mediante una reacción se generen compuestos coloridos [16]. Una característica particular del grupo nitro dentro de este contexto, es que presenta un grupo cromóforo (es decir, que genera un color dentro del espectro visible) cuando se encuentra unido a anillos aromáticos, y además si dentro de la estructura química contiene grupos con comportamiento ácido-base, el color que presentan es aún más intenso [1]. Debido a esto se han implementado metodologías para el análisis de nitrocompuestos aromáticos en muestras sin tratamiento químico o mediante la generación de complejos con especies orgánicas como se describe a continuación.

Para el caso del metronidazol, se ha descrito la formación de un quelato con acetato de cobre soluble en cloroformo [17]. Dicho complejo presenta una banda de absorción de 710 nm que permite analizar muestras en un intervalo de concentraciones de 0.5 a 5.0 mg mL⁻¹. La

metodología propuesta por los autores se aplicó al análisis de muestras farmacéuticas de metronidazol y tinidazol.

De igual manera, se ha descrito el uso de p-benzoquinona y ácido cloroanílico en la detección del metronidazol en medio no acuoso en muestras farmacéuticas [18,19]. Esta técnica requiere de la reducción previa del compuesto nitroaromático con ácido clorhídrico y zinc u otros agentes reductores como el LiBH_4 o NaBH_4 , para poder formar los aductos correspondientes de color púrpura con una banda de absorbancia a 520 nm. La metodología de análisis empleando p-benzoquinona, comienza con la mezcla del compuesto nitroaromático con 5 mL de HCl 5 N y polvo de Zn en etanol. La mezcla se calentó a 90 ± 5 °C por 15 minutos, posteriormente se filtró y el residuo sólido se lavó con etanol. Las fases líquidas se colectaron y aforaron a 100 mL con etanol. La metodología presenta un intervalo lineal de concentraciones de 15 a 190 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [18]. Cuando se emplea ácido cloroanílico, el procedimiento es semejante, pero se emplea borohidruro de litio como agente reductor en presencia de ácido acético glacial y como disolvente etanol. De esta solución se tomaron alícuotas de 0.5 mL que se colocaron en una celda de 5 mL por lo que se diluyó el analito con 4.5 mL de una solución de ACN/1,4-dioxano (40:60). La curva de calibración se realizó en un intervalo de concentraciones 0.03 mM a 0.23 mM [19]. La principal desventaja de estos métodos está asociada al desconocimiento del mecanismo de esta reacción.

Existen análisis para nitrocompuestos presentes en explosivos que parten desde la simple detección por UV-Vis, como el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) tanto aislado como en mezclas con otros explosivos nitrados, empleando acetonitrilo como disolvente y detectando la señal a una $\lambda_{\text{máx}}$ de 228 nm. Este estudio se realizó para el desarrollo de una metodología de análisis de muestras comerciales de explosivos que contienen mezclas de RDX-TNT, TNT-PETN o PETN-RDX (PETN: tetranitrato de pentaeritriol; RDX: 1,3,5-trinitroperhidro-1,3,5-triazina). Los límites de detección y de cuantificación alcanzados fueron de 1.0 μM y 3.4 μM , respectivamente [20].

Por otra parte, la presencia de un grupo hidroxilo en el compuesto nitroaromático, le otorga propiedades ácido-base, las cuales se pueden aprovechar para realizar la detección en medio alcalino o mediante la combinación con extracción líquido-líquido de pares iónicos cuando se

realiza la separación en presencia de poliaminas [21]. Los isómeros del nitrofenol orto, meta y para presentan una absorbancia máxima a 430, 340 y 400 nm, respectivamente, en presencia de 3,3'-iminobispropilamina o tetraetilenpentamina disuelto en clorobenceno como disolvente. La presencia de estructuras resonantes (Fig. 8) induce a incrementar la absorción de energía, lo que se traduce en el incremento de la intensidad del color amarillo. Además, el estudio demostró que otros grupos unidos al anillo aromático como carbonilo (-C=O) o carboxilo (-COO⁻) no interfieren con este comportamiento.

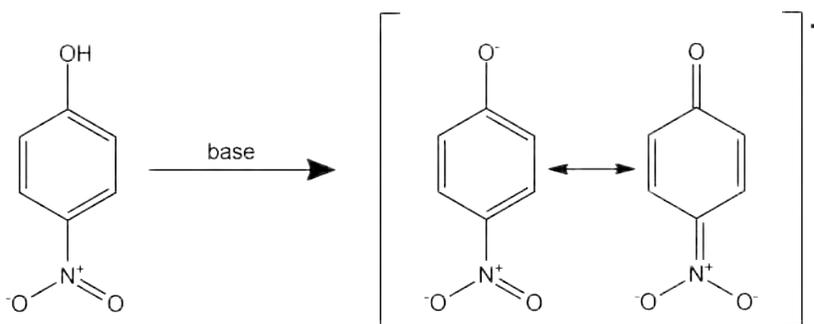


Figura 8. Estructuras resonantes del ion fenóxido.

La detección indirecta por fluorescencia también ha demostrado ser de gran utilidad debido a su selectividad con compuestos nitroaromáticos hacia fluorófonos y a la sensibilidad de estas técnicas. Para ello se han utilizado diversos compuestos, tales como derivados del ácido triazolcarboxílico, sus complejos con Cu(I) y Cu(II) [22], geles orgánico-metálicos con Al(III) [23], puntos cuánticos de carbono [24], complejo de rutenio con trisbipiridina [Ru(bpy)₃]²⁺, derivados del pireno, meso-tetra(4-sulfonatofenil)porfirina, ácido dimetilaminonaftalensulfónico o membranas de policloruro de vinilo impregnadas con curcumina [25]. En estos casos la cuantificación se basa en el abatimiento de la señal de fluorescencia en presencia de compuestos nitroaromáticos. El mecanismo de abatimiento aún no está claro, sin embargo, se asocia a las transferencias electrónicas entre los nitrocompuestos con los grupos funcionales contenidos en moléculas utilizadas como sensores (Fig. 9) [23].

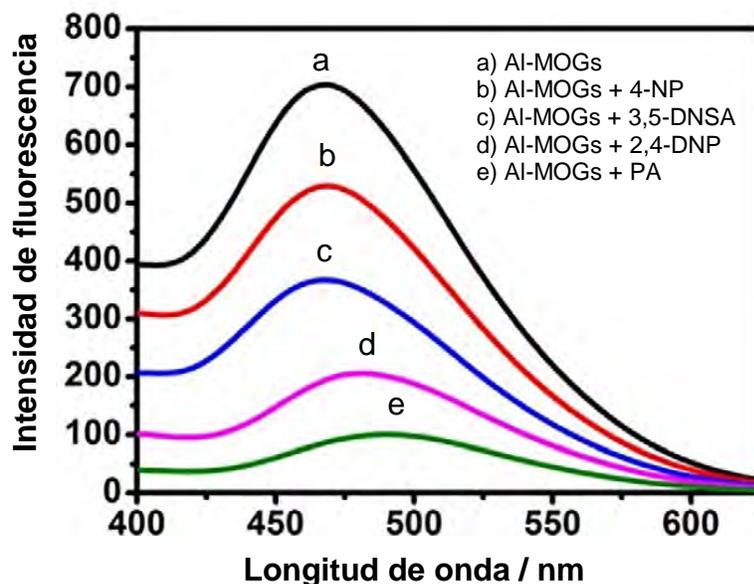


Figura 9. Espectros de emisión de fluorescencia que muestran el abatimiento de la señal de fluorescencia de geles orgánicos con Al (a), mediante b) 4-nitrofenol, c) ácido 3,5-dinitrosalicílico, d) 2,4-dinitrofenol, e) ácido pícrico, con una concentración de 0.3 mM para cada uno de los nitrocompuestos aromáticos [23].

1.4.3 Electroquímicas

El comportamiento electroquímico de la reacción de reducción de nitrocompuestos ha permitido que se desarrollen técnicas tanto en discontinuo como en flujo, utilizando en ambos casos tres electrodos: un electrodo de referencia cuya corriente es cero; un electrodo de trabajo sobre el que se aplica un voltaje y un electrodo auxiliar o contraelectrodo que cierra el circuito [16]. El análisis se puede llevar a cabo en discontinuo (Fig. 10) en una celda electroquímica sencilla, que consta de una solución problema contenida en un vaso de precipitados, en el que se sumergen los tres electrodos (constituidos de diferentes materiales, en general el electrodo de trabajo es una pasta de grafito, se utiliza un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar que consiste en un filamento de Pt). Dichos electrodos se encuentran conectados a un potencióstato que regula mediante una computadora el voltaje aplicado sobre el electrodo de trabajo.

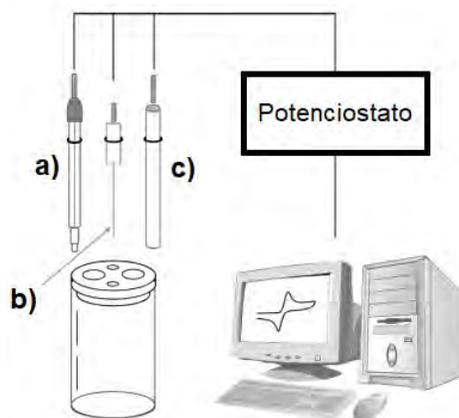
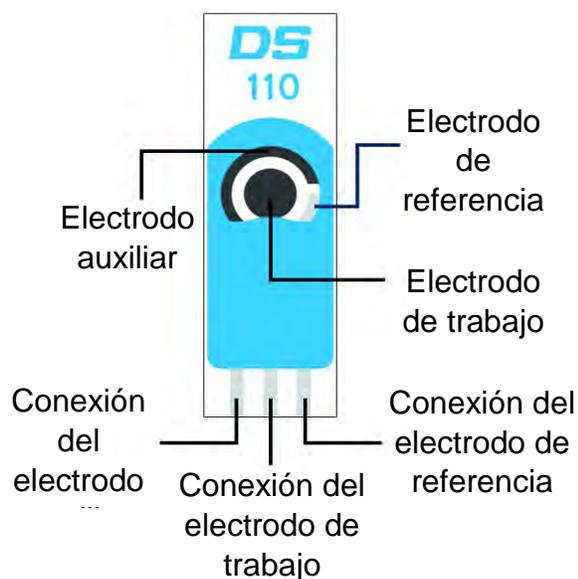


Figura 10. Celda electroquímica para estudio en discontinuo: a) electrodo de referencia, b) electrodo auxiliar y c) electrodo de trabajo [26].

Por otro lado, en un sistema en continuo, se utiliza un detector electroquímico (Fig. 11.a) que ya cuenta con los tres electrodos (en este caso tanto el electrodo de trabajo como el electrodo auxiliar están compuestos de carbono, mientras que el electrodo de referencia y las conexiones son de plata). El detector se sitúa sobre una celda (Fig. 11.b) sobre la que fluye la solución problema.



a)



b)

Figura 11. Celda electroquímica para análisis en flujo, a) electrodo serigrafiado de carbono, b) celda de choque frontal de metacrilato para análisis en flujo [54].

1.4.3.1 Análisis en discontinuo

El caso del metronidazol se ha estudiado mediante voltamperometría cíclica en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (pH 7.0), utilizando electrodos de trabajo carbón vítreo modificado con ácido poli(p-aminobencensulfónico), un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un alambre de Pt como electrodo auxiliar. Se observó la presencia de una señal de reducción del metronidazol a un potencial de -0.549 V, asociado a la reducción del grupo nitro a la hidroxilamina correspondiente. La metodología se aplicó a muestras farmacéuticas, las cuales fueron solubilizadas en el electrolito de trabajo y se analizaron mediante DPV obteniendo un límite de detección de 3.73×10^{-7} M [27].

También se utilizó la voltamperometría cíclica para el análisis de explosivos 2,4,6-trinitrotolueno y 2,4-dinitrotolueno presentes en agua de mar, usando como electrolito soporte una solución amortiguadora de boratos (pH 9.2) [28]. Se utilizó un sistema de tres electrodos: un electrodo de carbón vítreo (modificado con grafeno) como electrodo de trabajo; un electrodo auxiliar de Pt y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Los voltamperogramas cíclicos de TNT presentaron tres señales de reducción a potenciales de -0.39, -0.57 y -0.71 V en la solución del electrolito soporte y de -0.28, -0.44 y -0.56 V para las muestras de agua de mar. Posterior a la caracterización del analito, se realizó el análisis por voltamperometría diferencial de pulsos, mostrando de igual forma tres señales de reducción. El límite de detección logrado por esta metodología fue de 2.03 mg L^{-1} para las muestras de agua de mar mostrando una alta selectividad y sensibilidad debida a la interacción electrostática del analito con la película de grafeno.

Pon Saravanan y colaboradores [29] aplicaron también este tipo de análisis para la detección de TNT en muestras de suelos. Inicialmente se determinó el comportamiento químico del TNT utilizando voltamperometría cíclica mediante el análisis de soluciones 0.1 M. Como electrolito de soporte se utilizó una solución de bromuro de tetrabutilamonio 0.1 M en ACN. Los electrodos empleados fueron: un electrodo de trabajo de carbón vítreo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y un filamento de Pt como contraelectrodo. El estudio se realizó con una ventana electroquímica de -1.5 a 1.0 V y obteniendo una señal de reducción para el TNT a -0.24 V con un mecanismo difusivo. Para el análisis de muestras, se realizó una extracción sólido-líquido

empleando ACN, la fase líquida se analizó mediante voltamperometría de onda cuadrada, obteniendo un límite de detección de 10 mg L^{-1} [29].

1.4.3.2 Detección electroquímica en continuo

Los sistemas de flujo se basan en la inserción de un volumen de muestra a una corriente de líquido en movimiento que transporta la muestra a través de una serie de tuberías, en las que puede o no reaccionar. Después de un tiempo adecuado, la muestra llega al detector donde se registra continuamente la señal analítica [30].

Estos métodos presentan diversas ventajas, entre las que destacan: (1) mayor número de análisis por unidad de tiempo, (2) tiempo de respuesta bajos (con frecuencia menos de un minuto entre la inyección de la muestra y la respuesta del detector), (3) menores costos de disolventes y (4) el equipo es más simple y flexible. Es muy útil en la realización de análisis simultáneos con el mínimo de trabajo humano. A pesar de que su uso comenzó en laboratorios clínicos, se ha extendido a los laboratorios de control de procesos industriales y a la determinación rutinaria de un amplio espectro de especies en aire, agua, suelo, productos farmacéuticos y agrícolas [31].

El análisis por inyección en flujo (FIA) es un método cuyo sistema (Fig. 12) consta de manera general de una unidad de propulsión (bomba peristáltica), un sistema de inyección (válvula de 4 vías), un sistema de transporte y reacción, y un sistema de detección cuya respuesta es proporcional a la concentración inyectada.

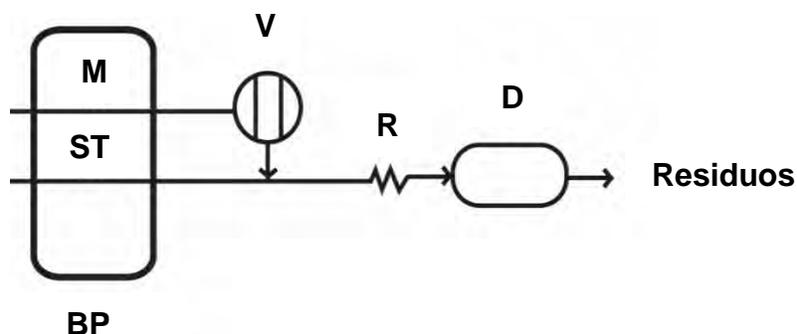
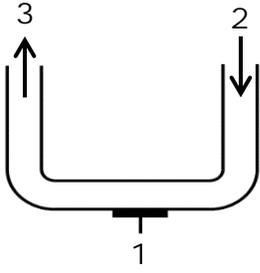
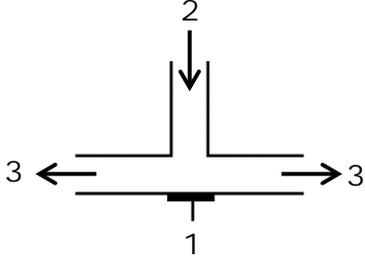
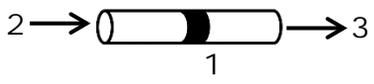


Figura 12. Elementos básicos de un sistema de análisis por inyección en flujo (BP, bomba peristáltica; M, muestra; ST, solución transportadora; V, válvula de inyección; R, reactor; D, detector).

Esta es técnica muy versátil que utiliza cantidades pequeñas tanto de reactivos y solventes, electrodos selectivos para analitos diversos y una gran sensibilidad debido al perfeccionamiento de los electrodos mediante la modificación con distintas especies químicas [31].

Existe una gran diversidad de electrodos, destinados a la medida de distintas propiedades eléctricas. Los electrodos se clasifican de acuerdo con la propiedad que se mide, potenciometría, conductimetría, amperometría y voltamperometría, siendo las últimas dos modalidades las más empleadas en sistemas de análisis de nitrocompuestos en flujo [42,44].

La geometría del electrodo de trabajo juega un papel fundamental durante la detección. Las celdas electroquímicas para detección en flujo presentan diferentes características que permiten el registro de la corriente la cual depende de distintas variables. Existen diversas geometrías de celdas para análisis en flujo, sin embargo, las más utilizadas se presentan en la Figura 13. Cada geometría presenta una corriente límite debido a la configuración de la celda y en dónde se sitúa el detector, por lo que esta se encuentra regida por distintas ecuaciones [32].

Capa delgada	Choque frontal	Tubular
		
$i_l = 1.467 n F D^{\frac{2}{3}} C^* l^{\frac{2}{3}} F_m^{\frac{1}{3}}$	$i_l = 1.15 n F D^{\frac{2}{3}} C^* v^{-\frac{5}{12}} v^{\frac{3}{4}} a R^{\frac{3}{4}}$	$i_l = 2.01 n F D^{\frac{2}{3}} C^* l^{\frac{2}{3}} v^k R^{\frac{3}{4}}$

Variables: n: número de electrones; F: constante de Faraday; D: coeficiente de difusión de la especie electroactiva; C*: concentración; l: longitud o diámetro del electrodo; Fm: velocidad de flujo: $\pi a^2 v / 4$, (donde a es el diámetro del tubo y v la velocidad del líquido); v: viscosidad cinemática; R: radio del electrodo, k=0.33 (para flujo laminar), k=1.0 (para flujo turbulento).

Figura 13. Geometrías de celdas para detección en flujo, con tres zonas particulares 1) electrodo de trabajo, 2) entrada de líquido, 3) salida de líquido.

Los detectores electroquímicos han sido acoplados a otros sistemas instrumentales como HPLC o electroforesis capilar y en sistemas FIA, generando instrumentos selectivos para diversos analitos electroactivos. Los nitrocompuestos no son la excepción, existen estudios en los que se utilizan las tres clases de geometrías de electrodos de trabajo como se describe en la Tabla 1. Cabe destacar que el estudio electroquímico de los nitrocompuestos mediante análisis en flujo se suele realizar mediante detección amperométrica.

ANTECEDENTES

Tabla 1. Sistemas de análisis instrumental con detección electroquímica aplicados al análisis de nitrocompuestos.

Analito(s)	Técnica de análisis	Geometría del electrodo de trabajo	Condiciones de trabajo y límites de detección	Referencia
Nimesulida	FIA-detección amperométrica	Tubular de Carbón vítreo.	Electrolito Britton-Robinson pH=6.1, flujo de 2 mL min ⁻¹ , E _{detector} = 1.2 V, V _{inyección} = 50 µL. Límite de detección 3.1 µM	[33]
1-nitropireno 2-nitrofluoreno 3-nitrofluoroanteno 5-nitroquinolina	HPLC-detección amperométrica	Choque frontal de amalgama de Ag/Hg	Electrolito de fosfatos 0.01 M en MeOH (15:85 v/v); flujo de 1 mL min ⁻¹ ; V _{inyección} : 20 µL; E _{detector} : -1.5 V; Límites de detección: 0.84 µM, 0.83 µM, 1.1 µM, 0.66 µM	[34]
Ácido Pícrico TNT 2,4-dinitrotolueno	HPLC-detección amperométrica	Capa delgada de amalgama de Au/Hg	Electrolito de acetatos 0.03 M y EDTA 0.001 M, etanol, 1-propanol (78:5:17 v/v) pH 3.5; flujo de 1.7 mL min ⁻¹ , V _{inyección} : 20 µL; E _{detección} : -1.0 V; Límites de detección de 0.7 mM, 1.6 mM y 1.4 mM respectivamente.	[35]

De la tabla anterior se puede observar que existe una gran variedad de detectores, desde los de uso general como los electrodos de carbón vítreo o los electrodos serigrafiados de carbono, hasta los detectores que son modificados mediante diferentes métodos, como por ejemplo la electrodeposición de metales sobre el electrodo de trabajo o con la aplicación de membranas sobre la superficie de este. El objetivo de la modificación es mejorar la respuesta electroquímica de los analitos en términos de selectividad y sensibilidad, ya que en la actualidad se busca generar metodologías eficientes que presenten límites de detección cada vez menores a los ya reportados en la literatura. La alteración de la superficie de los electrodos de trabajo permite que se generen interacciones específicas con las especies químicas en estudio, aunado a ello, el área de contacto generalmente aumenta favoreciendo la reactividad del electrodo por lo que la respuesta será mayor en comparación con la obtenida con un electrodo sin modificar [36].

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes alternativas para la reducción del grupo nitro, una de ellas utilizando agentes reductores fuertes como el hierro o el cobre, y también electroquímicamente [2, 5], así que con el objetivo de aplicar simultáneamente ambas técnicas, este proyecto consiste en la modificación de la superficie de un electrodo serigrafiado de carbono sobre la que se depositarán nanopartículas de hierro, obteniendo las nanopartículas a partir de reactivos muy accesibles, además de que la aplicación en sistemas en flujo representa una alternativa eficiente y sencilla de análisis.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Diseñar y evaluar un detector electroquímico para el análisis de nitrocompuestos aromáticos en muestras farmacéuticas empleando electrodos serigrafados de carbón modificados con nanopartículas de hierro.

2.2 Objetivos específicos

1. Modificar y caracterizar electrodos serigrafados de carbón con nanopartículas de hierro para el análisis de metronidazol y 2-metil-5-nitroimidazol.
2. Caracterizar el comportamiento analítico obtenido de la integración del electrodo modificado como detector en sistemas de análisis por inyección en flujo y cromatografía de líquidos durante el análisis de metronidazol y 2-metil-5-nitroimidazol.
3. Aplicar las metodologías diseñadas al análisis de muestras farmacéuticas comerciales.

PARTE
EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

Todas las disoluciones fueron preparadas disolviendo el respectivo reactivo de grado analítico en agua desionizada con una conductividad específica menor de $0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$.

3.1 Modificación de electrodos serigrafiados

En una primera etapa se obtuvieron las nanopartículas de hierro (FeNPs) a partir de la reducción de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con NaBH_4 (Fig. 14) [37], utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como agente dispersante. Se preparó una solución de CMC al 0.5% la cual se mantuvo en agitación durante 40 minutos. La relación molar del hierro y el borohidruro fue 1:6 por lo que 7 mg (0.0252 mmol) de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 2 mL de CMC al 0.5%. Posteriormente 5.7 mg (0.15 mmol) de NaBH_4 se disolvieron en 2 mL de agua desionizada y se adicionaron a la mezcla Fe(II)-CMC, obteniéndose una suspensión de color negro correspondiente a las FeNPs, finalmente se aforó la solución a 5 mL con agua desionizada.

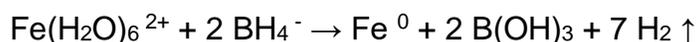


Figura 14. Reacción de reducción del hierro.

Posteriormente se preparó una mezcla de 20 μL de la solución de FeNPs y 20 μL de Nafion al 5%, de la cual se tomaron 10 μL que se colocaron sobre el electrodo de trabajo serigrafiado de carbono del detector, y se dejó secar a temperatura ambiente durante 2 h. Los electrodos modificados fueron empleados en análisis en discontinuo (voltamperometría) y como detectores amperométricos en sistemas FIA y HPLC.

Se realizó el análisis morfológico de la superficie de un electrodo no modificado y un electrodo modificado mediante microscopia de barrido electrónico (SEM) con un equipo JEOL JSM-820 (JEOL, Japón), y se obtuvieron los espectros de energía dispersivas de cada uno (análisis llevado a cabo en la Universidad de Valladolid).

3.2 Caracterización analítica de los electrodos modificados

El sistema de análisis electroquímico está compuesto por tres elementos principales (Fig. 15): el electrodo serigrafiado de carbono (DropSens 110), el bipotenciostato modelo μ STAT 200 DropSens controlado con el software DropView 1.3, y un cable conector para electrodos serigrafiados.

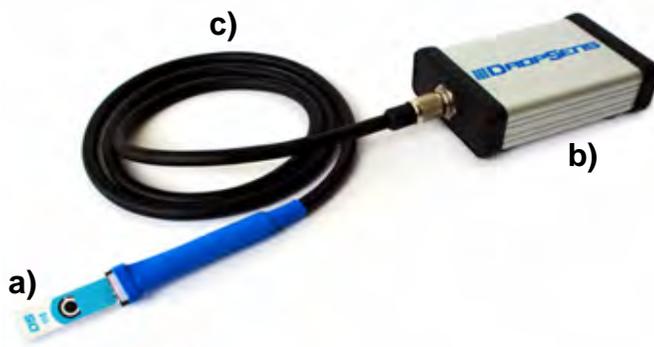


Figura 15. Sistema de análisis electroquímico utilizado: a) detector, b) bipotenciostato y c) cable conector [54].

Inicialmente se realizó la caracterización de dos nitrocompuestos aromáticos, el metronidazol y el 2-metil-5-nitroimidazol. Posteriormente, con la finalidad de evaluar diferentes estrategias de análisis se determinaron los parámetros analíticos de los electrodos mediante voltamperometría diferencia de pulsos (DPV), FIA y HPLC. Las condiciones de análisis se describen a continuación:

3.2.1 Voltamperometría cíclica

Se llevó a cabo la caracterización de dos nitrocompuestos aromáticos, el metronidazol y el 2-metil-5-nitroimidazol, un compuesto intermediario en la síntesis del metronidazol [38], mediante voltamperometría cíclica para registrar los potenciales de reducción de cada uno de los analitos, así como para observar si existía diferencia al utilizar un electrodo sencillo y otro modificado con las nanopartículas de hierro. Para esto, se prepararon soluciones de 10 mL de cada uno de los compuestos, a una concentración de 1 mM en HCl y se realizaron los barridos en una

ventana electroquímica de -0.2 V a -1.2 V iniciando en sentido catódico, a una velocidad de 50 mV s⁻¹.

3.2.2 Voltamperometría diferencial de pulsos

Se colocaron 10 mL de solución de electrolito soporte (NaCl 1.0 M/HCl 0.01 M) en una celda electroquímica y se realizaron adiciones consecutivas de 100 µL de solución estándar de metronidazol (100 mg L⁻¹). El estudio electroquímico se llevó a cabo en sentido catódico bajo las siguientes condiciones: ventana electroquímica de -0.1 a -1.0 V, velocidad de 50 mV s⁻¹, un E_{puls} de 50 mV y un t_{puls} de 1 ms.

3.3 Análisis por inyección en flujo

Los electrodos modificados fueron evaluados en un sistema FIA de baja dispersión que se muestra en la Figura 16 y que se compone de una bomba peristáltica para mantener un flujo de trabajo de 0.5 mL min⁻¹, una válvula de seis vías con un volumen de inyección de 100 µL, un reactor de 60 cm (equivalente a 300 µL de capacidad), en el que sólo se lleva a cabo la homogeneización de la muestra con la solución acarreadora previo a su paso por el detector, el cual se colocó dentro de una celda de metacrilato. Como electrolito de trabajo (solución acarreadora) se utilizó NaCl 1.0 M/HCl 0.01 M ajustada a pH 2.0 como solución. Se prepararon soluciones estándar de 10 a 50 mg L⁻¹ de metronidazol para evaluar los parámetros analíticos, y se aplicó un potencial de -0.9 V para la detección amperométrica. Los datos se obtuvieron y analizaron a través del software DropView Versión 1.3 de DropSens.

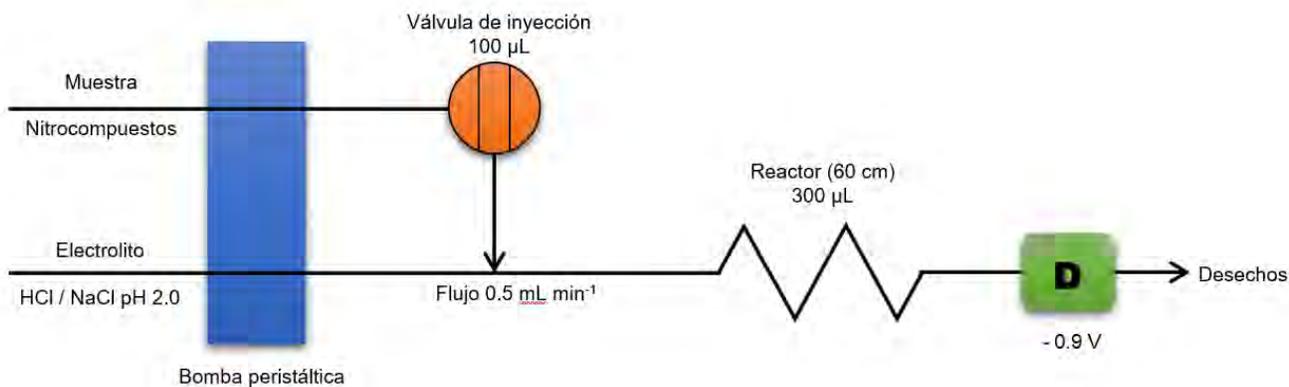


Figura 16. Esquema representativo del equipo utilizado para análisis en flujo (FIA).

3.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección amperométrica

Las determinaciones mediante HPLC se realizaron usando un equipo Agilent 1200 Infinity Series (Agilent Technologies, CA, Estados Unidos de América) conectado a un inyector manual con un bucle externo de 20 µL equipado con detectores DAD. La separación de metronidazol y el 2-metil-5-nitroimidazol se realizó mediante cromatografía de líquidos en fase inversa con una columna ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (5 µm, 4.6 x 150 mm), empleando como fase móvil ácido acético al 1% (v/v) y metanol en una proporción 90:10 con un flujo de 0.8 mL min⁻¹ a temperatura constante de 25 °C. Los datos obtenidos fueron adquiridos y analizados mediante el software Lab Advisor Versión B.02.04. La detección de los analitos se realizó a una longitud de onda de 320 nm en DAD y a -0.9 V mediante detección amperométrica, empleando una celda de choque frontal construida con teflón (Fig. 17) y un electrodo modificado con las nanopartículas de hierro.



Figura 17. Celda de choque frontal de teflón para análisis en flujo [54].

3.5 Análisis de muestras farmacéuticas

Una vez evaluados los parámetros analíticos se analizaron dos muestras de tabletas farmacéuticas (con contenidos de 250 mg y 600 mg de metronidazol respectivamente) mediante FIA y HPLC. De la primera muestra se pesaron 20 mg de tabletas pulverizadas y se disolvieron en 5.0 mL de agua desionizada. La mezcla se aforó a 10.0 mL con agua desionizada y posteriormente se hizo pasar a través de una membrana de filtro 0.45 μm . Posteriormente, del filtrado se tomaron alícuotas consecutivas de 100 μL , desde 100 μL hasta 500 μL y se aforó cada una a 10.0 mL con agua desionizada. De la segunda muestra se pesaron 14 mg del contenido de una tableta, y se realizó el procedimiento descrito.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización del electrodo

Se realizó el estudio de dos electrodos serigrafados de carbono con distintas superficies: una sin modificar, y un electrodo al que se le añadieron nanopartículas de hierro y Nafion. La Figura 18 muestra la micrografía y el espectro de energía dispersiva (EDS) obtenida del análisis de la superficie del electrodo de trabajo sin modificar. En la micrografía (Fig. 18.a) se logra apreciar la superficie irregular del electrodo de trabajo correspondiente a aglomeraciones de grafito, corroborado por EDS (Fig. 18.b). Esta morfología es típica en electrodos serigrafados, dichas irregularidades funcionan como microelectrodos independientes, por lo que se tiene una elevada área de contacto en la que se llevan a cabo las reacciones electroquímicas, lo que conlleva una mejora en la respuesta analítica en comparación con otro tipo de electrodos, como el de pasta de carbono y carbón vítreo. Además, se ha descrito que, debido a la disposición de estos microelectrodos, se obtiene un alto rendimiento en cuanto a la transferencia de electrones, es por ello, que su comportamiento electroquímico los hace viables para análisis en flujo como FIA y HPLC [39].

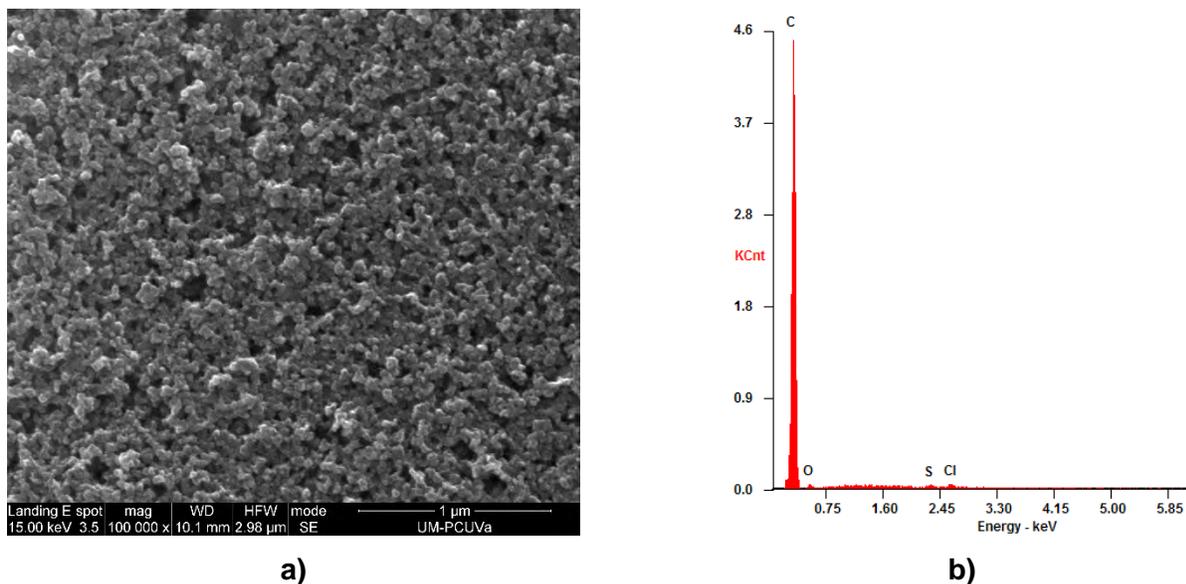


Figura 18. Microscopía electrónica de barrido de la superficie del electrodo de trabajo de un electrodo serigrafado de carbono, a) superficie del electrodo, b) espectro de energía dispersiva de la composición del electrodo.

La ventaja que presentan este tipo de electrodos combinado con el uso de nanopartículas metálicas es que representan una alternativa adecuada para mejorar el comportamiento analítico. Ejemplo de ello es la electrodeposición de nanopartículas de oro y plata sobre electrodos serigrafiados de carbono para la determinación de Cromo (VI) mediante voltamperometría diferencial de pulsos [36].

En el caso de los nitrocompuestos aromáticos, la reducción se puede llevar a cabo química o electroquímicamente, la primera mediante el uso de agentes reductores fuertes como el hierro, y la segunda a través de la reducción electroquímica. Debido a la versatilidad de los electrodos serigrafiados para ser modificados, se optó por realizar la aplicación de nanopartículas de hierro sobre el electrodo para comprobar la viabilidad de la combinación simultánea de estas dos técnicas (catalítica y electroquímica) en la reducción del grupo nitro.

En un inicio, la aplicación de la solución de nanopartículas directamente sobre la superficie del electrodo de trabajo no resultó idónea, ya que se observaba la formación de un sólido color amarillento asociado a la formación de óxido de hierro obtenido por reacción de las nanopartículas con el oxígeno atmosférico. Es por ello que fue necesario mantener aisladas a las nanopartículas de la atmósfera oxidante del ambiente, pero manteniendo una superficie que permita el paso de los analitos para llevar a cabo las reacciones de reducción. Para evitar este problema, se utilizó un compuesto llamado Nafion, el cual es un copolímero de intercambio catiónico (debido a la presencia del grupo sulfonato dentro de su estructura, como se aprecia en la Fig. 19) y es usado para crear membranas selectivas en análisis electroquímicos de compuestos orgánicos. Esta característica ha permitido su uso como agente dispersante de nanotubos de carbono, para la modificación de electrodos serigrafiados de oro en el análisis de azul de metileno y dopamina en medios ácidos mediante voltamperometría cíclica [40]. Dentro de las aplicaciones de electrodos serigrafiados de carbono modificados con Nafion también se encuentra la inmovilización de enzimas para el análisis de inhibidores de xantina oxidasa de plantas medicinales mediante detección amperométrica [41].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

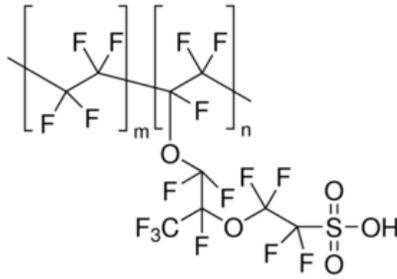


Figura 19. Estructura química del Nafion.

La Figura 20.a muestra la micrografía del análisis del electrodo de trabajo modificado con Nafion y las nanopartículas de hierro. Se observa el recubrimiento polimérico debido a la ausencia de rugosidad que se observa en la Figura 18.a, además es posible observar una agrupación de partículas dentro de la fase polimérica, las cuales están constituidas por hierro de acuerdo con el EDS obtenido (Fig. 20.b) que confirma la presencia de flúor, procedente del polímero usado (Nafion), así como azufre, proveniente del $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ usado en la preparación de las nanopartículas de hierro. De igual manera la presencia de sodio viene dada por el uso de NaBH_4 utilizado como agente reductor.

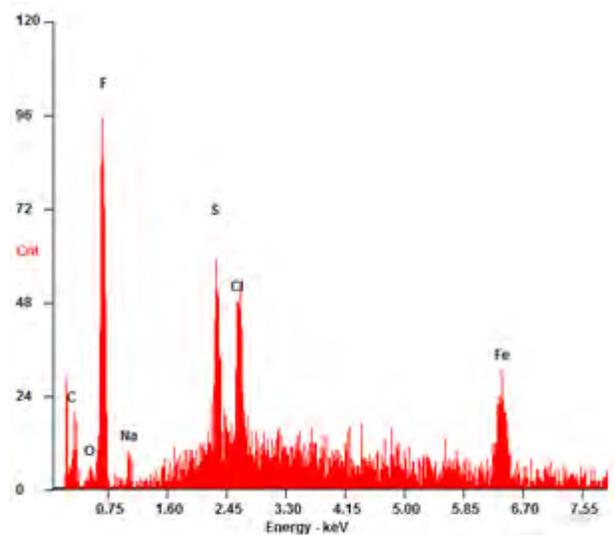
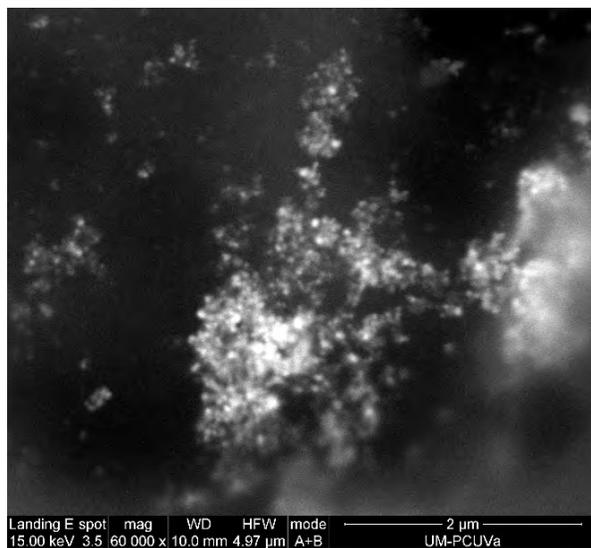


Figura 20. Microscopía electrónica de barrido de la superficie del electrodo de trabajo de un electrodo serigrafiado de carbono, a) superficie del electrodo, b) espectro de energía dispersiva de la composición del electrodo.

A partir de las características del Nafion y su amplio uso en técnicas electroquímicas resulta viable su aplicación como agente dispersante de las nanopartículas de hierro colocadas sobre el electrodo para poder llevar a cabo el análisis en flujo aplicando detección amperométrica en la detección de nitrocompuestos aromáticos. Su uso ayuda a la mejora de la selectividad debido a la imposición de un pH ácido que permite el transporte de moléculas con carga positiva, disminuyendo las interferencias y posible anclaje al electrodo de trabajo de aniones y macromoléculas orgánicas.

4.2 Caracterización electroquímica de nitrocompuestos

4.2.1 Caracterización mediante voltamperometría cíclica

Se evaluó el comportamiento electroquímico de dos especies aromáticas que contienen al grupo nitro en su estructura química, como son metronidazol (1-(2-hidroxi-etil)-2-metil-5-nitroimidazol) y 2-metil-5-nitroimidazol. La Figura 21.b muestra que el uso de las nanopartículas de hierro sobre el electrodo modificado evidencia una mejora en la respuesta de la señal catódica del metronidazol, presentándose a valores de potencial mayores con una mayor intensidad de la señal en comparación al análisis realizado empleando un electrodo sin modificar (Fig. 21.a). Además, se puede observar que los voltamperogramas tanto del metronidazol (Fig. 21.b) como del 2-metil-5-nitroimidazol (Fig. 21.c) presentan un comportamiento similar, con señales de reducción a potenciales muy cercanos entre sí (a -0.49 V y -0.52 V respectivamente), por lo que el análisis electroquímico de cada analito se realizó de manera independiente, debido a que las señales podrían llegar a traslaparse, impidiendo la identificación de los nitrocompuestos.

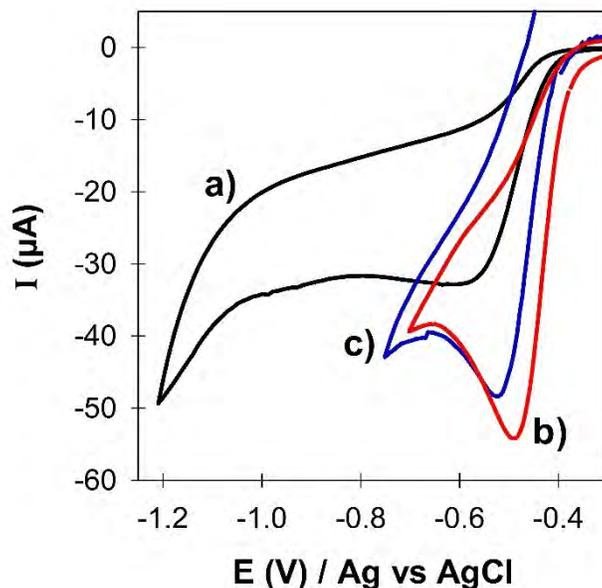


Figura 21. Voltamperogramas cíclicos obtenidos del análisis de una solución de metronidazol 1 mM en HCl 1.0 M ajustado a pH 2.0. Velocidad de barrido 50 mV s^{-1} usando (a) electrodo sin modificar, y (b) electrodo modificado con FeNPs. El voltamperograma (c) corresponde al análisis de una solución de 2-metil-5-nitroimidazol 1 mM bajo las mismas condiciones químicas, empleando un electrodo modificado con FeNPs.

El estudio por voltamperometría cíclica de la reducción de nitrocompuestos describe que el proceso es irreversible ya que sólo se observa una señal catódica [37]. Se analizó metronidazol mediante voltamperometría cíclica a diferentes valores de pH (0.0-2.0), observando la variación del potencial de reducción. Los datos obtenidos presentan una tendencia lineal (Fig. 22.a) que se ajusta a la ecuación $E(V) = -0.434 - 0.062 \text{ pH}$, corroborando que el proceso electroquímico involucra el mismo número de electrones que de protones. Al analizar el comportamiento de la intensidad de la señal con respecto a la variación de pH, se observa que ésta disminuye a medida que el pH aumenta, sin embargo, a pesar de que la señal observada a valores de pH de 0.0 presenta una mayor intensidad, se observó un desplazamiento de la barrera catódica hacia potenciales mayores (Fig. 22.b), lo que puede favorecer la formación de H_2 , modificando la precisión del detector amperométrico propuesto. Debido a lo anterior el pH de trabajo seleccionado es de 2.0. Para ello se empleó una solución de cloruro de sodio 1.0 M que funge como electrolito y se ajusta a un valor de pH de 2.0 adicionando ácido clorhídrico 0.1 M.

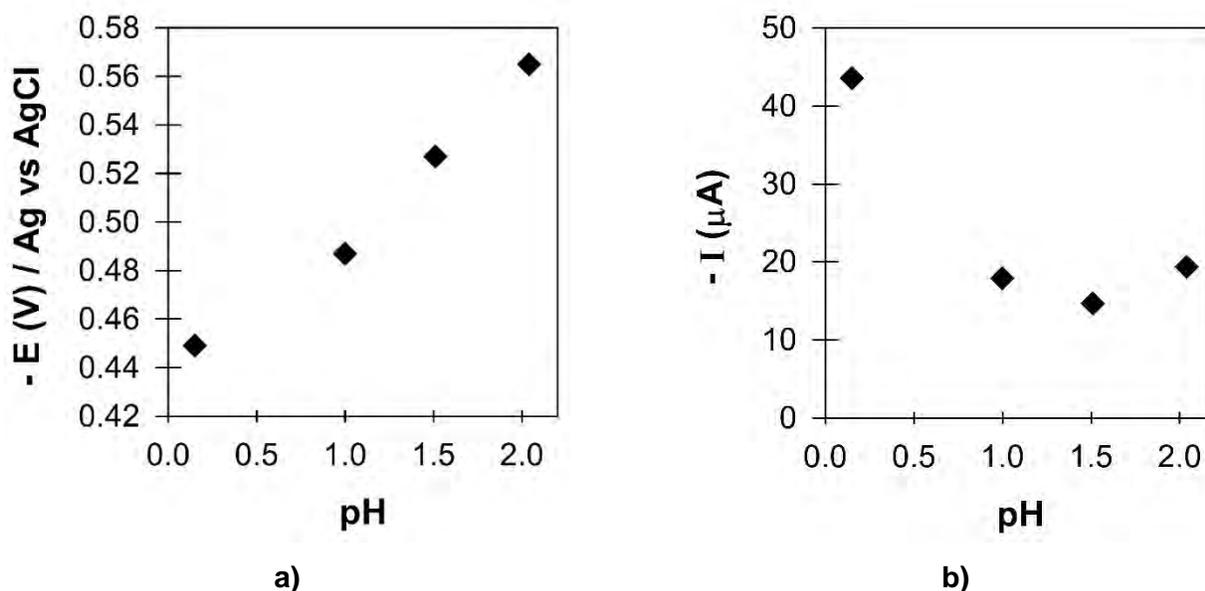


Figura 22. a) Variación del potencial de reducción del metronidazol a diferentes valores de pH; b) variación de la intensidad (altura en μA) de la señal de reducción del metronidazol respecto al pH.

La reacción de reducción de un nitrocompuesto tanto química como electroquímica, involucra la generación de intermediarios como hidroxilaminas y compuestos nitrosos [4,5], por lo que se realizó un estudio del perfil energético de la reducción del 2-metil-5-nitroimidazol en medio ácido con la presencia de hierro, para evaluar la espontaneidad de la reacción mediante cálculos teóricos utilizando la teoría de funcionales de la densidad (DFT), de lo cual se obtuvo que la reacción es espontánea y exotérmica generándose como producto final la amina correspondiente (Fig. 23).

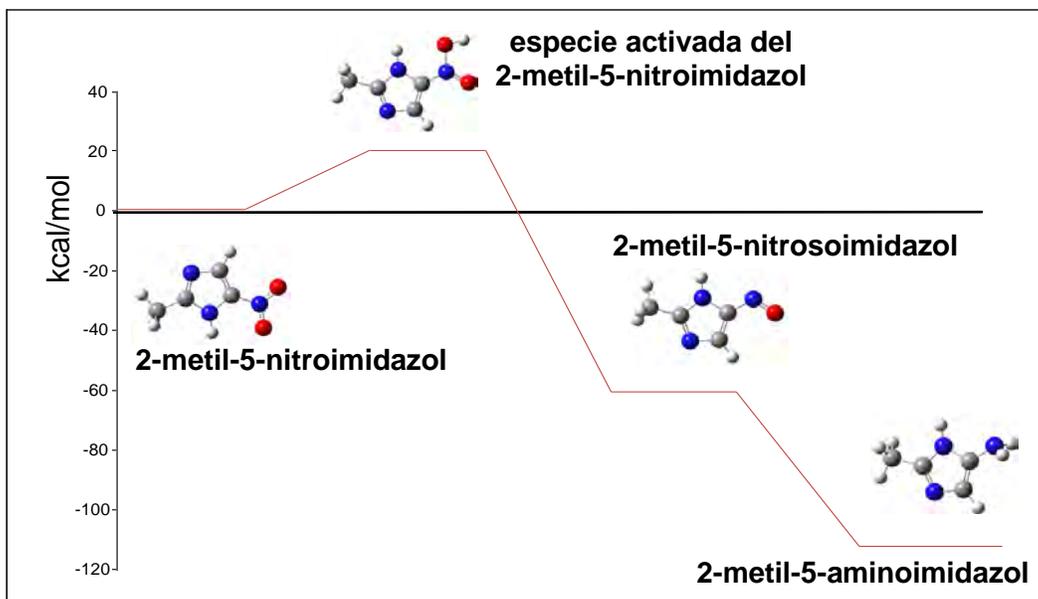


Figura 23. Perfil energético de la reacción para la formación de amina a partir de nitro con B3LYP/6-311++G**.

Sin embargo, este estudio teórico debe ser comprobado mediante estudios de electrólisis a potencial controlado con la correspondiente evaluación de los productos formados mediante técnicas espectroscópicas. Esto debido a que, si bien se lleva a cabo la reducción, el número tanto de protones como de electrones involucrados en la reacción es el mismo, por lo que no es posible determinar si el producto se reduce a la hidroxilamina (Fig. 24.a) o a la amina (Fig. 24.b) correspondientes.

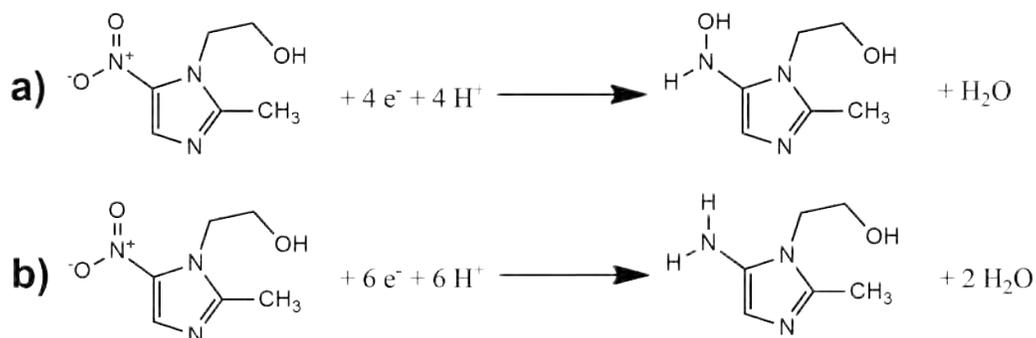


Figura 24. Reducción electroquímica del metronidazol: a) obteniendo como producto la hidroxilamina; b) obteniendo como producto la amina.

4.2.2 Análisis de metronidazol mediante voltamperometría diferencial de pulsos

Una vez evaluado su comportamiento electroquímico, se determinaron las propiedades analíticas empleando DPV a través de la construcción de la línea de calibrado para metronidazol empleando el electrolito soporte descrito anteriormente. La Figura 25 muestra los voltamperogramas obtenidos del análisis de disoluciones de metronidazol en un intervalo de concentraciones de 6.0 a 60.0 μM . La altura de pico catódico obtenido (μA) fue medido por triplicado, construyéndose las líneas de calibrado a partir de las alturas medias. Las líneas de calibrado muestran una dependencia lineal entre la intensidad de pico catódico medio y la concentración de metronidazol presente en la solución estándar. Los parámetros de regresión de las líneas de calibrado se muestran en la Tabla 2.

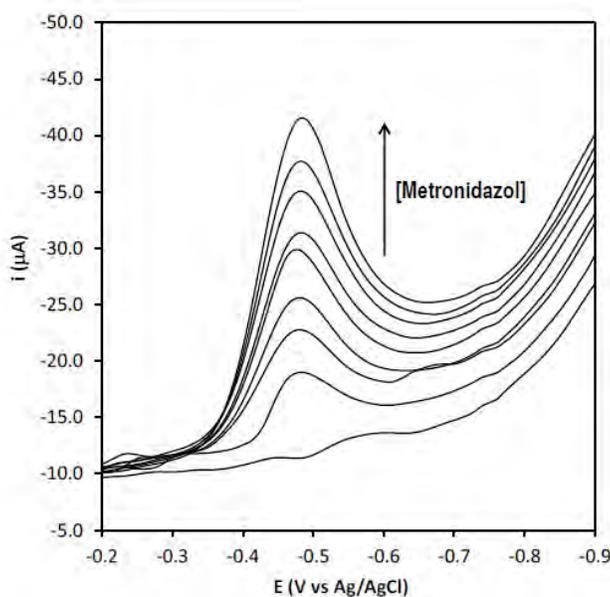


Figura 25. Voltamperogramas obtenidos a partir del análisis de disoluciones de metronidazol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado: I (μA) vs [metronidazol] (μM).

Parámetro	Valor
Coefficiente de determinación, r^2	0.999
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$ (μA)	0.061 ± 0.557
Sensibilidad analítica, $b_1 \pm ts(b_1)$ ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.557 ± 0.014
Reproducibilidad (%DER, $n=5$, $10 \mu\text{M}$)	3.5
Repetitividad (%DER, $n=5$, $10 \mu\text{M}$)	2.6
Intervalo lineal (μM)	6.0 - 60.0
Límite de detección (μM)	2.0

El límite de detección alcanzado mediante esta técnica se encuentra dentro del orden μM , pero es mayor al reportado por Saglikoglu en 2014 [27], quien realizó el análisis de metronidazol empleando un electrodo de carbón vítreo modificado con ácido poli(p-aminobencensulfónico) logrando un límite de detección de $0.373 \mu\text{M}$.

4.2.3 Análisis por inyección en flujo de metronidazol y 2-metil-5-nitroimidazol con detección amperométrica

Comprobada la capacidad electroactiva del metronidazol mediante voltamperometría cíclica y voltamperometría diferencial de pulsos se optó por realizar la determinación de este nitrocompuesto aromático en muestras farmacéuticas. Para ello se aplicó análisis en flujo con detección amperométrica siendo este método ideal para especies con propiedades electroquímicas, aunado a una alta sensibilidad, una alta frecuencia de muestreo, así como límites de detección del orden μM , utilizando poca instrumentación y reactivos [42].

Dentro del análisis por inyección en flujo existen algunos parámetros que influyen directamente sobre la sensibilidad del detector, por lo que resulta importante la selección de cada uno de ellos, por lo que a continuación se describirán los valores elegidos en el análisis del metronidazol y del 2-metil-5-nitroimidazol.

Es evidente que el volumen de inyección debe ser el adecuado debido a la dispersión del analito al momento de entrar en contacto con la solución acarreadora, ya que además de crearse una mezcla homogénea, la muestra se diluye influyendo en la concentración del analito y por consiguiente en la sensibilidad del detector [43]. Se han descrito volúmenes de inyección en un intervalo de 40 μL a 0.5 mL en diferentes análisis por FIA como la determinación de: ácido pícrico [44], cocaína [45], cefalosporinas [46] y carbofuranos [47], todos ellos empleando detección amperométrica, por lo que se seleccionó un volumen del bucle de inyección de 100 μL .

Debido a la gran aplicación del análisis por inyección en flujo y la fácil modificación del sistema ya sea para llevar a cabo reacciones en línea o en dado caso preconcentrar una muestra, se ha desarrollado una gran diversidad de configuraciones, en las que es necesario verificar tanto el flujo de la solución acarreadora como el volumen en el que se dispersará la muestra, es decir, la longitud de las tuberías utilizadas en el sistema [48]. Particularmente en el caso de FIA con detección amperométrica un intervalo general de valores de velocidad de flujo oscila entre 0.5 mL min^{-1} y 4.0 mL min^{-1} . Si bien un flujo alto ($> 5 \text{ mL min}^{-1}$) es importante para mejorar la sensibilidad del ensayo, limpiar la superficie del electrodo y reducir el tiempo de análisis, da como resultado un mayor consumo de solución acarreadora y mayor dispersión en las señales [49]. En cuanto a la longitud del reactor (el tubo en espiral en el cual se homogeneiza la muestra con la solución acarreadora) es común el uso de volúmenes dentro del intervalo de 100 μL a 1 mL. Teniendo en consideración los parámetros generales para sistemas FIA con detección amperométrica, para el presente análisis de nitrocompuestos aromáticos se aplicó una velocidad de flujo de 0.5 mL min^{-1} y se utilizó un reactor de homogeneización de radio interno de 0.4 mm y un reactor de 300 μL .

Se realizó el análisis en flujo por separado de estándares de metronidazol y 2-metil-5-nitroimidazol (intermediario en la síntesis de metronidazol [38, 50]) en un intervalo de concentraciones de 10 a 50 mg L^{-1} , empleando una solución de cloruro de sodio 1.0 M ajustada a pH 2.0 con ácido clorhídrico, como solución transportadora. Se empleó una celda de metacrilato para colocar el electrodo serigrafiado de carbono modificado con nanopartículas de hierro, usado como detector amperométrico. Debido a que como lo indicaron los voltamperogramas cíclicos, el potencial de reducción del metronidazol fue de -0.565 V utilizando

un electrodo sin modificar, y de -0.482 V con un electrodo modificado, el potencial seleccionado para la detección amperométrica fue más negativo, siendo de -0.9 V, con el fin de asegurar la reducción de los nitrocompuestos.

La Figura 26 muestra un FIagrama característico obtenido del análisis de metronidazol mediante la técnica propuesta. Se puede observar que el ritmo de muestreo alcanzado fue superior a 30 muestras h^{-1} , dicho valor evidencia la cinética de reacción. Valores por debajo de 10 muestras h^{-1} se consideran sistemas cinéticamente bajos [51].

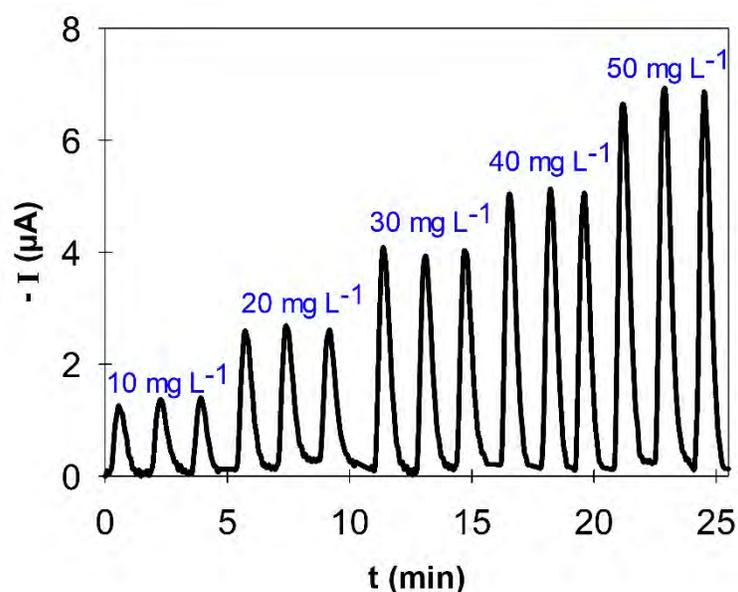


Figura 26. Estudio por FIA de soluciones estándar de metronidazol en un intervalo de concentraciones de 10 a 50 mg L^{-1} usando como electrolito una mezcla HCl/NaCl (0.01M/1.0M) ajustada a $\text{pH}=2.0$, con un flujo de 0.5 mL min^{-1} y utilizando un electrodo serigrafiado de carbono modificado ($E_{\text{detección}} = -0.9 \text{ V}$).

A partir de los FIagramas obtenidos para metronidazol y 2-metil-5-nitroimidazol, se obtuvieron las líneas de calibrado correspondientes a partir de la altura (en μA) de las señales, obteniéndose los siguientes parámetros de desempeño:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado: I (μA) vs [nitrocompuesto] (μM).

Parámetro	Valor	
	Metronidazol	2-metil-5-nitroimidazol
Coefficiente de determinación, r^2	0.999	0.999
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$ (μA)	-0.049 ± 0.016	0.141 ± 0.055
Sensibilidad analítica, $b_1 \pm ts(b_1)$ ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.022 ± 0.001	0.026 ± 0.002
Repetitividad (%DER, $n=3$, $175 \mu\text{M}$)	2.1	1.4
Intervalo lineal (μM)	6.1 – 292.1	18.4 – 393.4
Límite de detección (μM)	2.0	6.1
Velocidad de muestreo (mtra h^{-1})		36

Como se puede observar, la sensibilidad analítica para ambos compuestos es similar, por lo que el detector no es selectivo. Debido a la falta de especificidad analítica mediante FIA respecto a las especies en estudio fue necesario realizar la separación previa de los compuestos por cromatografía de líquidos de alta resolución para poder ser analizados empleando detección amperométrica.

4.2.4 Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de nitrocompuestos aromáticos

El estudio por HPLC aplicado a nitrocompuestos aromáticos es amplio, debido a que se han analizado desde explosivos como el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) o su homólogo el 2,4,6-trinitrofenol (ácido pícrico) en municiones o suelos contaminados, hasta medicamentos de la familia de los nitroimidazoles y sus metabolitos, en fluidos corporales o en muestras farmacéuticas [20-22, 24].

Con la finalidad de encontrar las condiciones de separación, se planteó el análisis de una mezcla de cuatro nitrocompuestos (ácido pícrico, 4-nitrofenol, metronidazol y 2-metil-5-nitroimidazol) haciendo uso de una columna C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 150 \text{ mm}$), aplicando un gradiente de ácido acético al 1% (v/v) y metanol, a un flujo de 0.8 mL min^{-1} , inyectando un volumen de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

muestra de 25 μL y detección UV-Vis a 320 nm, considerándose las condiciones establecidas en la farmacopea española [52]. A pesar de que la separación fue satisfactoria (Fig. 27), el acoplamiento del detector electroquímico no fue satisfactorio ya que se requirió de la aplicación de un régimen isocrático (AcOH 1% (v/v)/MeOH, 90:10) pues el aumento de la cantidad de disolvente orgánico modifica la conductividad y con ello la respuesta amperométrica.

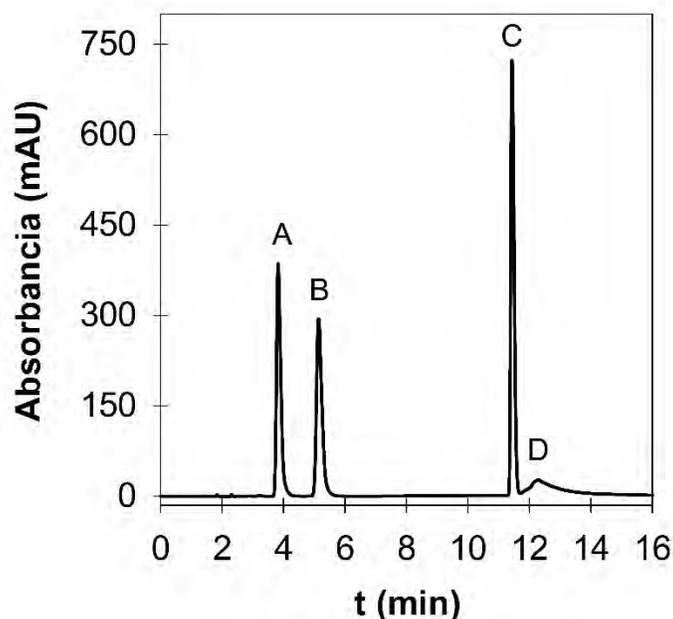


Figura 27. Cromatograma obtenido a partir del análisis de una mezcla de (A) 2-metil-5-nitroimidazol, (B) metronidazol, (C) 4-nitrofenol y (D) ácido pícrico mediante HPLC con detección a 320 nm.

Como se mencionó anteriormente, al utilizar un régimen isocrático para separar los nitrocompuestos aromáticos se logró su detección electroquímica aplicando un potencial de -0.9 V. Sin embargo, también fue necesario utilizar estándares con concentraciones en un intervalo de 50 a 250 mg L^{-1} , ya que además de inyectar un volumen pequeño, la muestra se diluye en la fase móvil afectando la sensibilidad analítica. En la Figura 28 se muestra los cromatogramas obtenidos del análisis mediante HPC-AD y cuyos parámetros analíticos se resumen en la Tabla 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

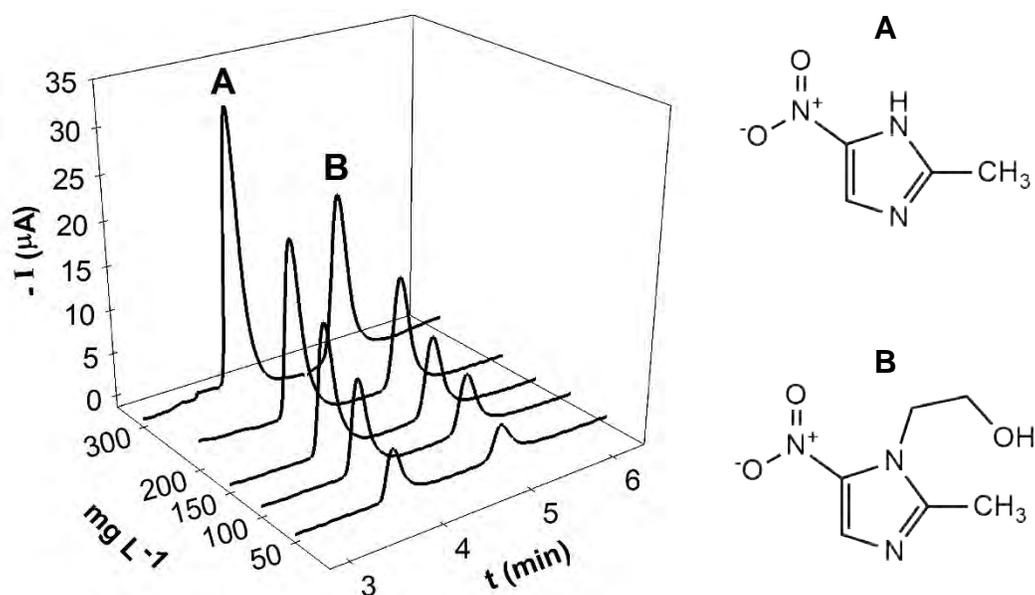


Figura 28. Cromatograma obtenido a partir del análisis soluciones estándar de 2-metil-5-nitroimidazol (A) y metronidazol (B) mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección Amperométrica.

Tabla 4. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado: I (μA) vs [nitrocompuesto] (μM).

Parámetro	Valor	
	Metronidazol	2-metil-5-nitroimidazol
Coefficiente de determinación, r^2	0.998	0.998
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$ (μA)	0.160 ± 0.370	-0.116 ± 0.706
Sensibilidad analítica, $b_1 \pm ts(b_1)$ ($\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$)	0.0110 ± 0.003	0.0131 ± 0.005
Repetitividad (%DER, $n=3$, $875 \mu\text{M}$)	3.26	3.78
Intervalo lineal (μM)	320.5 – 1752.8	512.8 – 2360.4
Límite de detección (μM)	106.8	170.9

Entre los tres métodos electroquímicos por los cuales se realizaron líneas de calibrado, el que mayor sensibilidad posee es la voltamperometría diferencial de pulsos, en cambio, cuando el estudio se lleva a cabo por análisis en flujo, ya sea por FIA o HPLC, la sensibilidad disminuye debido a la dispersión de la muestra en la solución transportadora por lo que los límites de detección son mayores. Otro aspecto por destacar es que, en estos dos últimos métodos, las

sensibilidades del metronidazol y del 2-metil-5-nitroimidazol son similares, por lo que en FIA las señales se traslaparían al realizar el análisis de una muestra que contuviera ambos analitos. En cambio, por HPLC, debido al proceso de separación previo a la detección amperométrica esto no sucede, aun así, las sensibilidades para los dos nitrocompuestos también son similares, y además es la menor de entre los tres métodos, debido a la dilución a la que se ve sometida la muestra por todo el proceso de separación.

4.3 Análisis de varianza a partir del análisis de muestras farmacéuticas mediante FIA-AD, HPLC-UV y HPLC-AD

Empleando los métodos propuestos se realizó la determinación de metronidazol en dos muestras farmacéuticas comerciales, cada una de ellas por triplicado, mediante FIA-AD, HPLC-UV y HPLC-AD con las condiciones descritas anteriormente. Cabe señalar que una de las muestras contenía nifuroxazida (hidrazida del ácido 4-hidroxibenzoico[(5-nitro-2-furanil)metileno]), un nitrocompuesto aromático cuya estructura se muestra en la Figura 29. Al igual que el metronidazol, la nifuroxazida posee actividad antibacterial y antimicrobiana en el tratamiento de enfermedades intestinales, de la piel o de las vías urinarias. Este compuesto fue analizado por voltamperometría cíclica en una solución amortiguadora Britton-Robinson 0.1 M/NaCl 0.1 M ajustado a pH 2.0, empleando electrodos serigrafados de carbono obteniendo una señal catódica a -0.28 V correspondiente a la reducción del grupo nitro [53].

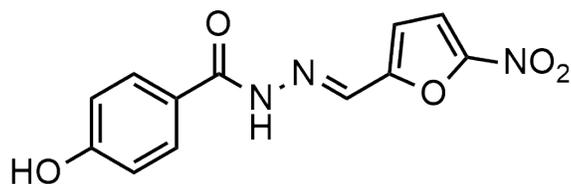


Figura 29. Estructura química de la nifuroxazida.

Aun cuando esta especie presenta también dentro de su estructura el grupo nitro con propiedades electroquímicas, no afecta la respuesta del metronidazol ni del 2-metil-5-nitroimidazol, así como los excipientes de ambas formulaciones tanto en la detección

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

amperométrica tanto por FIA como por HPLC como por HPLC-UV, por lo que se evidencia con los parámetros establecidos que estos métodos son selectivos para metronidazol en comparación con este nitrocompuesto, debido al posible impedimento de la molécula al pasar a través de la membrana de Nafion.

Los resultados obtenidos por las tres metodologías se presentan en la Tabla 5. A partir de estos datos se realizó el análisis de varianza que se presenta a continuación, del cual se concluye, por tanto, que no existen diferencias significativas entre los resultados que proporcionan los métodos aplicados.

Tabla 5. Contenido de metronidazol en mg de dos muestras farmacéuticas mediante tres métodos de análisis.

Muestra	Contenido de metronidazol (mg tableta ⁻¹)			
	FIA-AD	HPLC-UV	HPLC-AD	Marbete
1	247.8 ± 4.6	230.9 ± 2.8	260.3 ± 10.8	250
2	566.7 ± 5.7	591.7 ± 5.5	624.2 ± 16.8	600

$$F_{calculada} = 0.06 \quad ; \quad F_{crítica} = 3.68$$

$$F_{calculada} < F_{crítica}$$

Los tres métodos son adecuados para el análisis de metronidazol ya que FIA-DA es eficiente gracias al uso de equipos y reactivos sencillos, aunado a una velocidad de muestreo razonable, sin embargo, para el caso de muestras complejas resultaría necesario el empleo de HPLC ya sea por UV o DA.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- Se modificó exitosamente el electrodo serigrafiado de carbono mediante la aplicación de una matriz polimérica de Nafion que fija dentro de su estructura a las nanopartículas de hierro, e impide su oxidación. Además, esta película funge como una membrana catiónica debido a la presencia del grupo sulfonato en el Nafion, adecuado para llevar a cabo el análisis electroquímico de nitrocompuestos aromáticos en medio ácido.
- La caracterización del metronidazol se realizó mediante voltamperometría cíclica y voltamperometría diferencial de pulsos obteniendo una señal de reducción que además evidencia el comportamiento irreversible de esta reacción. Al aplicar las nanopartículas de hierro sobre los electrodos se obtuvo una mejora en la señal catódica observando un incremento en la intensidad, así como su desplazamiento hacia potenciales más altos.
- Se llevó a cabo el estudio de metronidazol en sistemas de análisis por inyección en flujo utilizando los electrodos modificados con nanopartículas de hierro, con una velocidad de muestreo de 36 mtras hr⁻¹ con repetitibilidades <5%.
- Después de proceder con la separación de los nitrocompuestos aromáticos mediante cromatografía de líquidos se acopló una celda electroquímica al equipo para realizar la detección amperométrica, sin embargo, debido a la dilución de la muestra durante la separación, se requirió del uso de soluciones con concentraciones mayores de metronidazol y 2-metil-5-nitroimidazol.
- A partir de la determinación de metronidazol en muestras farmacéuticas por las tres metodologías descritas utilizando electrodos serigrafiados de carbono modificados con nanopartículas de hierro, se demuestra que no existen diferencias significativas entre ellas, por lo que el detector electroquímico propuesto representa una alternativa sencilla y eficiente para la detección de metronidazol comparado con la metodología oficial de análisis. Además, se evidenció que no se presentan interferencias por parte de los excipientes u otras especies contenidas en muestras farmacéuticas.

REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

- [1] Sharma, B. (2005). Instrumental methods of chemical analysis. 24th ed. Meerut, India: GOEL Publishing House, pp.125, 126.
- [2] Verma, N., Khanna, S. y Kapila, B. (2006). Comprehensive chemistry class XII. 15th ed. New Delhi: LAXMI Publications, pp.1361, 1362, 1367-1371, 1373, 1375.
- [3] Ono, N. (2003). The nitro group in organic synthesis. New York: Wiley-VCH.
- [4] Agrawal, A. and Tratnyek, P. (1996). Reduction of nitro aromatic compounds by zero-valent iron metal. *Environmental Science & Technology*, 30(1), pp.153-160.
- [5] Savall, A., Quesado, J., Rignon, M. y Malafosse, J. (1991). Amino-alcohol electrosynthesis. modelling of a set-up for producing amino-2-methyl-2-propanediol-1.3. *Journal of Applied Electrochemistry*, 21(9), pp.805-815.
- [6] Vélin-Prikidánovics, A. y Lessard, J. (1990). An efficient electrosynthesis of 2,4- and 2,6-diaminotoluenes. *Journal of Applied Electrochemistry*, 20(3), pp.527-528.
- [7] Vogt, R., Rahman, S. y Crespo-Hernández, C. (2009). Structure–activity relationships in nitro-aromatic compounds. in: practical aspects of computational chemistry. Springer Science, pp.217-226.
- [8] Edwards, D. (1980). Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *Sexually Transmitted Infections*, 56(5), pp.285-290.
- [9] Wayland J. Hayes, Jr., Edward R. Laws, Jr. (1991) *Classes of pesticides*. Elsevier, pp.1191-1192.
- [10] Akhavan, J. (1998). *Chemistry of explosives*. The Royal Society of Chemistry Publishing, pp.18-43.
- [11] Hernández-Mesa, M., Moreno-González, D., Cruces-Blanco, C. y García-Campaña, A. (2017). Evaluation of a selective approach for the determination of 5-Nitroimidazoles in aquaculture products by capillary liquid chromatography using molecularly imprinted solid-phase extraction. *Food Analytical Methods*, 10(11), pp.3647-3657.
- [12] Alber, M., Böhm, H., Brodesser, J., Feltes, J., Levsen, K. y Schöler, H. (1989). Determination of nitrophenols in rain and snow. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 334(6), pp.540-545.

- [13] Godejohann, M., Preiß, A., Levsen, K. y Wünsch, G. (1996). Determination of nitrophenols, nitrobenzoic acids and polar explosives by HPLC-diode array detection in ground water samples of former ammunition plants. *Chromatographia*, 43(11-12), pp.612-618.
- [14] Schmalz, L., Weber, A. y Tränckner, S. (2010). Determination of polar nitroaromatic compounds in soils and the impact of the soil properties on the extraction results. *Analytica Chimica Acta*, 678(2), pp.189-194.
- [15] Marple, R. y LaCourse, W. (2005). Application of photoassisted electrochemical detection to explosive-containing environmental samples. *Analytical Chemistry*, 77(20), pp.6709-6714.
- [16] Skoog, D., Holler, F. and Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. 6ta ed. Ciudad de México, pp.131 - 144; 716 - 746.
- [17] Zheltvai, O., Zheltvai, I., Spinul, V. y Antonovich, V. (2013). Spectrophotometry determination of metronidazole and tinidazole by their complexation with copper(II). *Journal of Analytical Chemistry*, 68(7), pp.600-605.
- [18] Atta-ur-Rehman, Ijaz, A. y Raza, A. (2005). Spectrophotometric determination of metronidazole in pharmaceutical pure and dosage forms using p-benzoquinone. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2(3), pp.197-202.
- [19] Adegoke, O., Umoh, O. y Soyinka, J. (2010). Spectrophotometric determination of metronidazole and tinidazole via charge transfer complexation using chloranilic acid. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 7(2), pp.359-370.
- [20] Lu, T., Wen, Z., Wang, L., He, X., Yuan, Y., Wang, M., Zhao, Y., Li, M., Pu, X. y Xu, T. (2015). Quantitative determination on binary-component polymer bonded explosives: A joint study of ultraviolet spectrophotometry and multivariate calibration methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 147, pp.131-138.
- [21] Schrier, M., Fono, A. y Ma, T. (1967). Microanalysis of nitro compounds. II. *Microchimica Acta*, 55(2), pp.218-222.
- [22] Yan, J., Ni, J., Zhao, J., Sun, L., Bai, F., Shi, Z. y Xing, Y. (2017). The nitro aromatic compounds detection by triazole carboxylic acid and its complex with the fluorescent property. *Tetrahedron*, 73(18), pp.2682-2689.
- [23] Guo, M., Yang, L., Jiang, Z., Peng, Z. y Li, Y. (2017). Al-based metal-organic gels for selective fluorescence recognition of hydroxyl nitro aromatic compounds. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 187, pp.43-48.

- [24] Ahmed, G., Laíño, R., Calzón, J. y García, M. (2014). Highly fluorescent carbon dots as nanoprobes for sensitive and selective determination of 4-nitrophenol in surface waters. *Microchimica Acta*, 182(1-2), pp.51-59.
- [25] Meaney, M. y McGuffin, V. (2008). Luminescence-based methods for sensing and detection of explosives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(7), pp.2557-2576.
- [26] Ivarez-Lueje, A., Prez, M. and Zapat, C. (2012). Electrochemical methods for the in vitro assessment of drug metabolism. *Topics on Drug Metabolism*.
- [27] Saglikoglu, G. y Yilmaz, S. (2015). Voltammetric sensitive determination of metronidazole at poly(p-aminobenzene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrode. *Russian Journal of Electrochemistry*, 51(9), pp.862-866.
- [28] Yew, Y., Ambrosi, A. y Pumera, M. (2016). Nitroaromatic explosives detection using electrochemically exfoliated graphene. *Scientific Reports*, 6(1).
- [29] Pon Saravanan, N., Venugopalan, S., Senthilkumar, N., Santhosh, P., Kavita, B. y Gurumalleshrabu, H. (2006). Voltammetric determination of nitroaromatic and nitramine explosives contamination in soil. *Talanta*, 69(3), pp.656-662.
- [30] Ruzicka, J. y Hansen, E. (1988). *Flow injection analysis*. 2nd ed. John Wiley & Sons, p.15.
- [31] Cañizares Macías, M. (2002). Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46(2), pp.167-174.
- [32] Pingarrón, J. y Sánchez, P. (2003). *Química electroanalítica*. Madrid: Editorial Síntesis, pp.311-324.
- [33] Catarino, R. (2003). Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(4), pp.571-580.
- [34] Yosypchuk, O., Karásek, J., Vyskočil, V., Barek, J. y Pecková, K. (2012). The use of silver solid amalgam electrodes for voltammetric and amperometric determination of nitrated polyaromatic compounds used as markers of incomplete combustion. *The Scientific World Journal*, 2012, pp.1-12.
- [35] Bratin, K., Kissinger, P., Briner, R. y Bruntlett, C. (1981). Determination of nitro aromatic, nitramine, and nitrate ester explosive compounds in explosive mixtures and gunshot residue by liquid chromatography and reductive electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 130(2), pp.295-311.

- [36] Domínguez, O., Ruiz, L., García, N. y Arcos, M. (2008). Electrochemical determination of chromium(VI) using metallic nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes. *Talanta*, 76(4), pp.854-858.
- [37] Chen, J., Qiu, X., Fang, Z., Yang, M., Pokeung, T., Gu, F., Cheng, W. y Lan, B. (2012). Removal mechanism of antibiotic metronidazole from aquatic solutions by using nanoscale zero-valent iron particles. *Chemical Engineering Journal*, 181-182, pp.113-119.
- [38] Kraft, M., Kochergin, P., Tsyganova, A. and Shlikhunova, V. (1989). Synthesis of metronidazole from ethylenediamine. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 23(10), pp.861-863.
- [39] Fanjul-Bolado, P., Hernández-Santos, D., Lamas-Ardisana, P., Martín-Pernía, A. y Costa-García, A. (2008). Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochimica Acta*, 53(10), pp.3635-3642.
- [40] García-González, R., Fernández-Abedul, M. y Costa-García, A. (2013). Nafion® modified-screen printed gold electrodes and their carbon nanostructuring for electrochemical sensors applications. *Talanta*, 107, pp.376-381.
- [41] El Harrad, L. y Amine, A. (2016). Amperometric biosensor based on prussian blue and nafion modified screen-printed electrode for screening of potential xanthine oxidase inhibitors from medicinal plants. *Enzyme and Microbial Technology*, 85, pp.57-63.
- [42] Felix, F. y Angnes, L. (2010). Fast and accurate analysis of drugs using amperometry associated with flow injection analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(12), pp.4784-4804.
- [43] Kolev, S. ed., (2008). Chapter 3 Theoretical basis of flow injection analysis. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 54. Elsevier, pp.47-75.
- [44] Junqueira, J., de Araujo, W., Salles, M. y Paixão, T. (2013). Flow injection analysis of picric acid explosive using a copper electrode as electrochemical detector. *Talanta*, 104, pp.162-168.
- [45] Fernández-Abedul, M. y Costa-García, A. (1996). Flow injection analysis with amperometric detection of cocaine in confiscated samples. *Analytica Chimica Acta*, 328(1), pp.67-71.
- [46] Al-Momani, I. (2001). Spectrophotometric determination of selected cephalosporins in drug formulations using flow injection analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(5-6), pp.751-757.
- [47] Amatongchai, M., Sroysee, W., Jarujamrus, P., Nacapricha, D. y Lieberzeit, P. (2018). Selective amperometric flow-injection analysis of carbofuran using a molecularly-imprinted

polymer and gold-coated-magnetite modified carbon nanotube-paste electrode. *Talanta*, 179, pp.700-709.

[48] Polášek, M., (2008). Chapter 20 Pharmaceutical applications. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 54. Elsevier, pp.591-613.

[49] Fanjul-Bolado, P., Lamas-Ardisana, P., Hernández-Santos, D. y Costa-García, A. (2009). Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes. *Analytica Chimica Acta*, 638(2), pp.133-138.

[50] Lindberg R., Jarnheimer P., Olsen B., Johansson M. y Tysklind M., (2004). Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*, 57(10), pp. 1479-1488.

[51] P. Hernández, J.A. Rodríguez, C.A. Galán, Y. Castrillejo, y E. Barrado, Amperometric flow system for blood glucose determination using an immobilized enzyme magnetic reactor, *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 244-248, (2013).

[52] Real Farmacopea Española. (2003). 2da ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, pp. 1926-1927.

[53] Mozo, J., Carbajo, J., Sturm, J., Núñez-Vergara, L., Salgado, P. y Squella, J. (2012). Determination of nifuroxazide by flow injection linear adsorptive stripping voltammetry on a screen-printed carbon nanofiber modified electrode. *Electroanalysis*, 24(3), pp.676-682.

[54] Recuperado de la página oficial de DropSens: www.dropsens.com Fecha de recuperación: 26 de marzo de 2018.