

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ  
ESCUELA DE POSGRADO



DESARROLLO DE UN ELECTRODO MODIFICADO POR  
ELECTROPOLIMERIZACIÓN DE AZUL DE METILENO Y SU  
APLICACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE DIPIRONA

Tesis para optar el grado de Magistra en Química que presenta  
RUDDY LUCIA MESA LANDEO

Dirigido por:  
Dr. Maynard J. Kong Moreno

San Miguel, 2017



*Dedicado a mis queridos padres Julia y Cleberht*

## Agradecimientos

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la colaboración de muchas personas, e instituciones a quienes quisiera mencionar.

A mi asesor Dr. Maynard Kong Moreno por su apoyo intelectual y moral, quien fue mi guía en la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado, Dra. Patricia Morales Bueno y Dra. Mariela Matos Reyes por sus recomendaciones para la mejora de este trabajo.

A todos los profesores de la Maestría en Química, por su esfuerzo y dedicación en la enseñanza de los cursos.

Al Dr. Adolfo La Rosa Toro director de la escuela de química y del laboratorio de electroquímica de la UNI por su apoyo para la realización de las pruebas de espectroscopía de impedancia electroquímica.

A CIENCIA ACTIVA DE CONCYTEC con el Programa de Maestría en Universidades Peruanas, por haber financiado mis estudios en la Maestría en Química de la PUCP.

## RESUMEN

En la presente tesis se describe la preparación, caracterización y uso del electrodo modificado poli(azul de metileno)/electrodo de carbón vítreo para la cuantificación de dipirona en solución acuosa. La modificación del electrodo con polímero de azul de metileno se desarrolló por electropolimerización en el rango potencial de -0.75 hasta 1V vs. SCE por 30 ciclos. El film polimérico depositado en la superficie del electrodo fue estudiado por técnicas como voltametría cíclica, microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). El electrodo modificado poli(azul de metileno)/electrodo de carbón vítreo mostró buena respuesta electrocatalítica para el fármaco dipirona en comparación a un electrodo sin modificar, con el incremento de su corriente de oxidación que se emplea para su cuantificación en soluciones acuosas. Bajo condiciones óptimas, el rango lineal de análisis fue de  $2 \times 10^{-4}$  mol/L hasta  $5 \times 10^{-3}$  mol/L concentración de dipirona y el límite de detección fue de  $1 \times 10^{-4}$  mol/L de dipirona.

**Palabras clave:** azul de metileno, electropolimerización, electrodo modificado, dipirona

## ABSTRACT

The present thesis describes the preparation, characterization, and use of poly (methylene blue)/glassy carbon electrode for the detection of dipyrone in aqueous solutions. Modification of the electrode with methylene blue polymer was developed for electropolymerization in the potential range from -0.75 to 1.0 V vs. SCE for 30 scans. The properties of poly (methylene blue)/glassy carbon electrode was studied by different methods such as scanning electron microscopy (SEM), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry. The modified electrode showed good electrocatalytic response to dipyrone in comparison to an unmodified electrode. Under optimal conditions, the proposed method showed a linear response for dipyrone concentrations in the range  $2 \times 10^{-4}$  mol/L to  $5 \times 10^{-3}$  mol/L of dipyrone and the detection limit was  $1 \times 10^{-4}$  mol/L of dipyrone.

**Keywords:** methylene blue, electropolymerization, modified electrode, dipyrone

## ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	9
2. Antecedentes.....	9
2.1 Dipirona.....	9
2.2 Métodos electroquímicos.....	10
2.3 Polímeros conductores.....	12
2.4 Azul de metileno.....	12
3. Problema y justificación.....	13
4. Objetivos.....	13
4.1 Objetivo general.....	13
4.2 Objetivos específicos.....	13
5. Marco teórico.....	14
5.1 Electroodos modificados químicamente por técnicas electroanalíticas.....	14
5.1.1 Electrodo de carbón vítreo.....	14
5.1.1.1 Generalidades.....	14
5.1.1.2 Estructura del carbón vítreo.....	15
5.1.2 Electroodos modificados químicamente .....	16
5.1.2.1 Generalidades.....	16
5.1.2.2 Polímeros conductores.....	16
5.1.2.3 Principio de electropolimerización.....	17
5.1.2.4 Electrocatálisis.....	18
5.1.3 Química del azul de metileno y su polimerización.....	18
5.1.3.1 Estructura y propiedades del monómero.....	18
5.1.3.2 Polimerización del azul de metileno.....	20
5.2 Estudio Voltamétrico.....	21
5.2.1 Componentes de la celda electroquímica de tres electrodos.....	22
5.2.1.1 Electrodo de trabajo.....	22
5.2.1.2 Electrodo de referencia.....	23
5.2.1.3 Contraelectrodo.....	23
5.2.1.4 Electrolito soporte.....	24
5.2.2 Técnicas electroquímicas.....	24
5.2.2.1 Voltametría cíclica.....	24
5.2.2.2 Voltametría de onda cuadrada.....	26
5.3 Técnicas de caracterización de electrodos.....	27
5.3.1 Ley de Faraday.....	27
5.3.2 Microscopia electrónica de barrido.....	28
5.3.3 Espectroscopia de impedancia electroquímica.....	29
5.4 Pruebas analíticas.....	30
5.4.1 Linealidad.....	31
5.4.2 Límites.....	32
5.4.2.1 Límite de detección (LOD).....	32
5.4.2.2 Límite de cuantificación (LOQ).....	32
5.4.3 Precisión.....	33
5.4.3.1 Repetibilidad.....	33
5.4.3.2 Reproducibilidad.....	33
5.4.4 Veracidad.....	34
6. Metodología.....	35

6.1	Reactivos y materiales.....	35
6.2	Equipos.....	36
6.3	Procedimientos.....	36
6.3.1	Pretratamiento y modificación de los electrodos.....	36
6.3.2	Caracterización del film polimérico formado en la superficie del electrodo.....	37
6.3.3	Evaluación del comportamiento electroquímico de la dipirona en el electrodo modificado.....	38
6.3.4	Optimización de las condiciones de trabajo empleando la técnica voltametría cíclica.....	38
6.3.4.1	Evaluación del efecto del pH.....	38
6.3.4.2	Evaluación del efecto de la velocidad de barrido.....	39
6.3.4.3	Evaluación del efecto de la concentración.....	39
6.3.5	Caracterización de variables analíticas.....	39
6.3.5.1	Evaluación del parámetro linealidad.....	39
6.3.5.2	Determinación de límites.....	39
6.3.5.3	Evaluación del parámetro selectividad.....	40
6.3.5.4	Evaluación de los parámetros repetibilidad y reproducibilidad.....	40
6.3.5.5	Evaluación de la veracidad del método.....	41
7.	Resultados.....	41
7.1	Preparación de los electrodos modificados electroquímicamente poli (azul de metileno) /carbón vítreo.....	41
7.2	Caracterización de los electrodos modificados poli (azul de metileno) /carbón vítreo.....	42
7.2.1	Estimación de la cantidad de poli(azul de metileno) en la superficie del electrodo.....	42
7.2.2	Caracterización de la morfología del electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo por microscopía electrónica de barrido.....	43
7.2.3	Caracterización de la impedancia del electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo por espectroscopia de impedancia electroquímica.....	43
7.3	Evaluación del comportamiento electroquímico de la dipirona en el electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo.....	44
7.4	Optimización de las condiciones de trabajo para la técnica CV .....	45
7.4.1	Efecto del pH.....	45
7.4.2	Efecto de la velocidad de barrido.....	46
7.4.3	Efecto de la concentración.....	48
7.5	Evaluación de parámetros de validación del método para la cuantificación de dipirona.....	48
7.5.1	Linealidad.....	48
7.5.2	Límites.....	50
7.5.3	Repetibilidad.....	51
7.5.4	Reproducibilidad.....	52
7.5.5	Selectividad.....	53
7.5.6	Veracidad.....	54
8.	Discusión de resultados.....	55
8.1	Preparación de los electrodos modificados electroquímicamente poli (azul de metileno) /carbón vítreo.....	55
8.2	Caracterización de los electrodos modificados poli (azul de metileno) /carbón vítreo.....	55
8.2.1	Estimación de la cantidad de poli(azul de metileno) en la superficie del electrodo.....	55
8.2.2	Caracterización de la morfología del electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo por microscopía electrónica de barrido.....	56
8.2.3	Caracterización de la impedancia del electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo por espectroscopia de impedancia electroquímica.....	57
8.3	Evaluación del comportamiento electroquímico de la dipirona en el electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo.....	57

8.4 Optimización de las condiciones de trabajo para la técnica CV.....	59
8.4.1 Efecto del pH.....	59
8.4.2 Efecto de la velocidad de barrido.....	59
8.4.3 Efecto de la concentración.....	60
8.5 Evaluación de parámetros de validación del método para la cuantificación de dipirona.....	60
8.5.1 Linealidad.....	60
8.5.2 Límites.....	61
8.5.3 Repetibilidad.....	62
8.5.4 Reproducibilidad.....	62
8.5.5 Selectividad.....	62
8.5.6 Veracidad.....	63
9. Conclusiones.....	64

Bibliografía

Anexos



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la dipirona.....	10
Figura 2. Carbón vítreo.....	14
Figura 3. Modelo estructural del carbón vítreo.....	15
Figura 4. Modelo de la estructura del carbón vítreo de alta temperatura que contiene elementos de tipo fullereno.....	15
Figura 5. Polímeros conductores.....	17
Figura 6. Electrosíntesis de un polímero conductor.....	17
Figura 7. Electrocatálisis mediada por una película de polímero redox.....	18
Figura 8. Azul de metileno.....	19
Figura 9. Electropolimerización del azul de metileno a pH bajos y altos.....	19
Figura 10. Polimerización del azul de metileno.....	20
Figura 11. Estructura hipotética del polímero de azul de metileno.....	21
Figura 12. Circuito de medición simplificado para la realización de voltametría cíclica.....	22
Figura 13. Señal de excitación de voltametría cíclica.....	24
Figura 14. Voltamograma cíclico de una solución 6mM de $K_3Fe(CN)_6$ y 1M de $KNO_3$ .....	25
Figura 15. Señal de excitación de la voltametría de onda cuadrada.....	26
Figura 16. Respuesta de corriente de una reacción reversible a la señal de excitación.....	27
Figura 17. Esquema del microscopio electrónico de barrido.....	29
Figura 18. Circuito de Randles: equivalente a una reacción redox simple.....	30
Figura 19. Diagrama de Nyquist: respuesta de espectroscopia de impedancia electroquímica para un circuito equivalente tipo Randles.....	30
Figura 20. Relación gráfica de la concentración vs. Respuesta.....	31
Figura 21. Curva de calibrado.....	31
Figura 22. Celda de tres electrodos.....	37
Figura 23. Voltamograma de electropolimerización del colorante azul de metileno para un electrodo modificado, obtenido por la técnica voltametría cíclica.....	42
Figura 24. Micrografías SEM del electrodo de carbón vítreo (a) y poli (azul de metileno)/carbón vítreo (b).....	43
Figura 25. Espectro de impedancia del electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo y electrodo sin modificar de carbón vítreo, técnica empleada espectroscopia de impedancia electroquímica.....	44
Figura 26. Voltamograma cíclico de $1 \times 10^{-3}$ mol/L de dipirona en una solución de KCl 0.1M en un electrodo sin modificar.....	44
Figura 27. Voltamograma cíclico de $1 \times 10^{-3}$ mol/L de dipirona en una solución de KCl 0.1M en un electrodo modificado.....	45
Figura 28. Efecto del pH en la corriente, $I_a$ , al oxidar $1 \times 10^{-3}$ M de dipirona.....	45
Figura 29. Efecto del pH en la intensidad de corriente anódica, $I_a$ , de $1 \times 10^{-3}$ M de dipirona.....	46

Figura 30. Efecto de la velocidad de barrido en la oxidación de la dipirona.....	47
Figura 31. Gráfico de la corriente de pico anódica ( $I_a$ ) vs. la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $V^{1/2}$ ).....	47
Figura 32. Voltamograma cíclico de la dipirona a diferentes concentraciones: (a) $5 \times 10^{-3}$ ; (b) $2 \times 10^{-3}$ ; (c) $1 \times 10^{-3}$ ; (d) $5 \times 10^{-4}$ ; (e) $2 \times 10^{-4}$ mol/L; (f) $1 \times 10^{-4}$ mol/L; (g) blanco.....	48
Figura 33. Curva de calibración.....	49
Figura 34. Grafica de normalidad de los residuos realizado en el software Minitab 15.....	49
Figura 35. Superposición de los voltamogramas de las soluciones con dipirona: (a) blanco; (b) $1 \times 10^{-4}$ M; (c) $2 \times 10^{-4}$ M.....	50
Figura 36. Resultados de la prueba t-Student 1 muestra. Software MINITAB.....	51
Figura 37. Prueba de selectividad del método: (verde) blanco que contiene $1 \times 10^{-3}$ M de L-ácido ascórbico; (azul) estándar que contiene $1 \times 10^{-3}$ M de L-ácido ascórbico y $1 \times 10^{-3}$ M de dipirona.....	53
Figura 38. Posible degradación de la dipirona.....	58
Figura 39. Representación del proceso que ocurre en la interface electrolito/electrodo y dentro del film polimérico de azul de metileno por oxidación de la dipirona. Adaptación de mecanismo de oxidación de la dipirona.....	59

#### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos desarrollados recientes para la determinación de dipirona y sus aportes.....	11
Tabla 2 .Tabla de variables obtenidas de los voltamogramas de pH.....	46
Tabla 3. Tabla de resultados de la curva de calibración.....	49
Tabla 4. Datos para la determinación de límites.....	50
Tabla 5. Resumen de las medidas de concentración de dipirona para prueba de repetibilidad.....	51
Tabla 6. Tabla de estadísticos de la repetibilidad en base al coeficiente de variación de Horwitz.....	52
Tabla 7. Resumen de las medidas de concentración de dipirona para prueba de reproducibilidad.....	52
Tabla 8. Tabla de estadísticos de la reproducibilidad en base al coeficiente de variación de Horwitz.....	53
Tabla 9. Datos para la selectividad de dipirona $1 \times 10^{-3}$ M.....	54
Tabla 10. Comparación de los valores obtenidos de dipirona en muestras de agua por adición usando el método voltamétrico propuesto y el método de referencia.....	54
Tabla 11. Cantidad de moles de monómero de azul de metileno obtenido por voltametría cíclica.....	56
Tabla 12. Caracterización analítica del método voltamétrico empleando el electrodo modificado con poli(azul de metileno)/carbón vítreo en comparación con otros trabajos.....	61

## 1. Introducción

Los productos farmacéuticos, en su mayoría compuestos polares, son fácilmente solubles en agua y transportados a través del ciclo del agua. El uso generalizado de los productos farmacéuticos ha dado lugar a una descarga continua de estos productos y sus metabolitos en las aguas residuales. En la actualidad, la contaminación del agua por productos farmacéuticos es reconocida como una preocupación ambiental en varios países (Fatta-Kassinos 2011:251-275). Esto ha llevado a desarrollar áreas de investigación que incluyen identificación, cuantificación, tratamiento para su remoción y evaluación de efectos biológicos (Nikolaou 2013: 1-12).

Según Nikolaou, los productos farmacéuticos son considerados como contaminantes emergentes ya que se encuentran en circulación en el medio ambiente sin haber sido regulados. La razón que impide su regulación es la falta de información de su ocurrencia, toxicidad y la falta de métodos analíticos apropiados para su determinación (2013: 1-12).

Estos compuestos han sido detectados en una gran variedad de muestras de agua que incluye a las aguas residuales, superficiales y subterráneas a bajas concentraciones. La cuantificación precisa de productos farmacéuticos, especialmente en muestras ambientales es considerado un desafío analítico, por la complejidad de la matriz y los bajos niveles de incidencia. En la actualidad, las técnicas de cromatografía de gases y líquida en combinación con detectores apropiados provee la oportunidad de cuantificar compuestos farmacéuticos en concentraciones hasta de ng/L (Vieno 2007: 5077-5084).

El presente trabajo está enfocado en desarrollar un método electroquímico para la detección de la dipirona o más conocida como antalgina que es un fármaco cuya incidencia en el agua podría ser un riesgo para la salud humana.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Dipirona

La dipirona o metamizol, (sal de sodio de 1-fenil-2,3-dimetil-4-metil aminometanosulfonato-5-pirazol), ver en la figura 1, es de origen alemán comercializado desde 1920 y ampliamente utilizado en todo el mundo como analgésico, antipirético y antiespasmódico (Andrade 2016: 459-477). Una de las principales ventajas del metamizol es que permite el control del dolor y la fiebre a bajo costo (Arcila 2004: 99-101). Sin embargo, el balance entre beneficios y

daños es controversial ya que es posible causa de agranulocitosis y otras discrasias sanguíneas (Buitrago 2014:173-195). A partir de los años 70 su uso fue restringido en Estados Unidos y en varios países de Europa. Sin embargo, el metamizol sigue utilizándose de forma libre en algunos países de Europa, Sudamérica y Asia, sobre todo en países en vías de desarrollo (Andrade 2016: 459-477). En Perú sigue siendo uno de los analgésicos más usados.

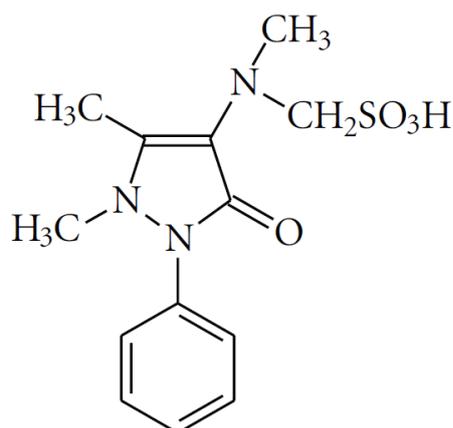


Figura 1. Estructura de la dipirona (Gopu y sus col., 2011)

Los métodos comunes para la determinación de dipirona en productos farmacéuticos son titrimétricos en medios acuosos (Srivastava 1985:735-737), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detector UV (British Pharmacopoeia: 2015) y espectrofotométricos (Lima 2003: 1011-1017)(Japanese Pharmacopoeia: 2016). También han sido reportados métodos electroquímicos con electrodos modificados para análisis de dipirona (Pauliukaite 2010:590-598) (Dadamos 2012: 267-273).

## 2.2 Métodos electroquímicos

Los métodos electroquímicos, en especial los métodos voltamétricos se caracterizan por ser exactos, precisos, simples, de bajo costo y no requieren del tedioso pretratamiento de muestra. Por tanto, son utilizados para control de calidad rutinario de productos farmacéuticos que contienen dipirona y que también podrían ser aplicados para el monitoreo de fármacos de bajas concentraciones en plantas de tratamiento de aguas. En la tabla 1 se presenta métodos electroquímicos recientes desarrollados para la determinación de dipirona.

Tabla 1. Métodos desarrollados recientes para la determinación de dipirona y sus aportes

Año	Autores	Tema	Técnica de medición	Rango lineal de concentración de dipirona
2009	Muralidharan, B. y otros	Determinación de analgésicos en formulaciones farmacéuticas y muestras de orina usando un electrodo de carbón vítreo modificado con polipirrol	Voltametría diferencial de pulsos	100-400 ng/mL
2010	Tesfaye, Alemu	Estudio voltamétrico de la dipirona usando electrodos de carbón vítreo	- Voltametría cíclica - Voltametría diferencial de pulsos - Voltametría de onda cuadrada	$1.5 \times 10^{-5}$ hasta $1.5 \times 10^{-3}$ mol/L
2011	Boni, Ana y otros	Desarrollo de un sensor biomimético para la determinación de la dipirona, que fue preparado por modificación de un electrodo de pasta de carbono con cobalto ftalocianina(CoPc)	Amperometría acoplado a un sistema de inyección en flujo (FIA)	$5 \times 10^{-6}$ hasta $6.3 \times 10^{-3}$ mol/L
2011	Gopu, Gopalakrishnan y otros	Modificación de un electrodo de carbón vítreo con nanorivoflavina para analizar el comportamiento de 3 analgésicos:  - acetaminofeno - ácido acetilsalicílico - dipirona	Voltametría de onda cuadrada	0.025 hasta 0.4 $\mu$ g/mL
2012	Dadamos, Tony y otros	Modificación de un electrodo de pasta de carbono con Niobato de estroncio potásico dopado con níquel ( $KSr_2Ni_{0.75}Nb_{4.25}O_{15}$ ) para la determinación de dipirona en muestras farmacéuticas	Cronoamperometría	$3.5 \times 10^{-5}$ hasta $3.1 \times 10^{-4}$ mol/L
2015	Ghica, M. Emilia y otros	Modificación de electrodos de película de carbono con polímero de tionina y nanotubos de carbono para la determinación de dipirona y paracetamol	Voltametría diferencial de pulsos  Amperometría	$2.5 \times 10^{-4}$ hasta $2.5 \times 10^{-3}$ mol/L

### 2.3 Polímeros conductores

Los polímeros conductores presentan gran aplicabilidad para la modificación de electrodos, los cuales pueden ser preparados por electropolimerización, ya que provee un mejor control de películas delgadas y morfología, además de obtener polímeros más limpios comparados con la oxidación química. La electropolimerización se realiza sobre el ánodo de una celda electroquímica que contiene un disolvente y una sal. Esto permite el paso de corriente y favorece la formación del polímero. La técnica más empleada para lograr la electropolimerización es la voltametría cíclica que permite controlar el crecimiento del film polimérico.

La conductividad eléctrica en un film polimérico se logra por oxidación (p-dopaje) o reducción (n-dopaje), seguida por la inserción de especies aniónicas o catiónicas. Debido a los dobles enlaces alternados, las especies cargadas formadas en el dopaje son capaces de moverse a lo largo de la cadena de carbonos permitiendo el transporte de electrones (Montiel 2013: 24-25).

### 2.4 Azul de metileno

La modificación de la superficie de electrodos usando azul de metileno ha sido estudiada en años recientes (Costa 2012:8-14), (Kaplan 2010: 2694 – 2701). El azul de metileno es un colorante redox del grupo de las azinas con 2 grupos amino terciarios que puede ser polimerizado en la superficie de un electrodo por voltametría cíclica. Según investigaciones previas, a pH básico se favorece la formación del polímero electroactivo. El film polimérico del azul de metileno actúa como un catalizador inmovilizado en la superficie del electrodo y permite el decrecimiento del sobrepotencial de alguna reacción deseada (Karyakin 1998: 149-155).

### 3. Problema y justificación

Debido a los efectos adversos de drogas comunes como la dipirona en baja o alta concentración y que es considerado un contaminante emergente de las aguas, es necesario el desarrollo de técnicas analíticas alternativas en contraste con las técnicas comunes que son generalmente caras, generan desechos contaminantes y requieren largo tiempo de análisis. El problema radica en desarrollar un método analítico que permita la determinación de la dipirona de manera sencilla y con una prometedora aplicación en matrices acuosas.

### 4. Objetivos:

#### 4.1 Objetivo General:

El propósito de este trabajo consiste en desarrollar un método electroanalítico empleando un electrodo modificado con polímero de azul de metileno que mejore sus propiedades electroquímicas para la determinación de dipirona.

#### 4.2 Objetivos específicos:

- Preparar del electrodo modificado por electropolimerización del azul de metileno usando la técnica de voltametría cíclica
- Caracterizar el electrodo modificado usando las técnicas CV, SEM-EDS y EIS
- Evaluar el comportamiento electroquímico de la dipirona en el electrodo modificado mediante la técnica CV
- Optimizar la determinación de la dipirona empleando la técnica CV evaluando variables como pH, velocidad de barrido y concentración
- Caracterizar variables analíticas como: linealidad, límite de detección (LOD) , límite de cuantificación (LOQ), repetibilidad, reproducibilidad, selectividad.

## 5. Marco teórico

### 5.1 Electroodos modificados químicamente por técnicas electroanalíticas

#### 5.1.1 Electrodo de carbón vítreo

##### 5.1.1.1 Generalidades

En la década de 1960 en Reino Unido se obtuvo por primera vez carbón vítreo a partir de celulosa como material precursor, pocos años después en Japón produjeron un material similar a partir de resinas fenólicas. El método común de obtención de carbón vítreo es la pirólisis de precursores poliméricos. El material es preparado por medio de un tratamiento de calefacción controlado a temperaturas hasta de 3000°C en atmósfera inerte, el cual asegura la eliminación de oxígeno (O), nitrógeno (N) e hidrógeno (H). Dichos carbones obtenidos se consideran no grafitizados y son de tipo amorfo. Se caracterizan por ser térmicamente estables, resistentes a ataques ácidos e impermeables a líquidos y gases (Wang 2006:131),(Harris 1997: 206-218).

El carbón vítreo, figura 2, es una clase de carbono no grafitizado de alta densidad y baja porosidad, que es usado ampliamente como material para electrodos en electroquímica. El electrodo de carbón vítreo presenta excelentes propiedades eléctricas, mecánicas, amplia ventana potencial, es químicamente inerte, reproducible y de bajo costo (Wang 2006:131). No obstante, requiere de pretratamiento de su superficie para crear actividad y reproducibilidad en los electrodos. El pretratamiento físico de pulido con alúmina y lavado con agua desionizada en ultrasonido ayuda a remover las impurezas de la superficie, además de pretratamientos químicos, electroquímicos en medios ácidos, con calor, con láser son utilizados para mejorar el rendimiento de los electrodos, incrementando la corriente de fondo y los intercambios iónicos con la solución en contacto (Vettorazzi 1994: 155-159).



Figura 2. Carbón vítreo

### 5.1.1.2 Estructura del carbón vítreo

Los primeros estudios de la estructura del carbón vítreo asumen que presenta enlaces  $sp^2$  y  $sp^3$ , tal vez unidos por puentes oxígeno. A tratamientos de temperatura mayor a  $2000^\circ\text{C}$  no se presentan enlaces tetraédricos  $sp^3$ . Otro modelo presentado por Jenkins y Kawamura en 1972, asume que la orientación molecular del precursor polimérico se conserva hasta después de la carbonización, por lo tanto, la estructura tiene cierta semejanza con la de un polímero, en las que se observa cintas curvadas y entrecruzadas de carbono gráfico. Este modelo fue aceptado, sin embargo, presentaba deficiencias. Por ejemplo, en la figura 3, se observan muchos microporos unidos, se esperaba que sea permeable a gases, sin embargo, se conoce que el carbón vítreo es altamente impermeable (Harris 1997: 206-218). Estudios más recientes realizados por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) han revelado la presencia de elementos similares a los fullerenos, figura 4, lo cual sería consistente con la baja reactividad del carbón vítreo. El modelo relacionado con los fullerenos proporciona una explicación más realista para la baja reactividad, dureza y permeabilidad del carbón vítreo (Harris 2005: 235-253).

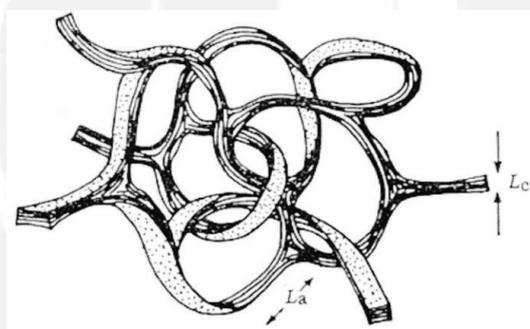


Figura 3. Modelo estructural del carbón vítreo (Jenkins y Kawamura, 1972)

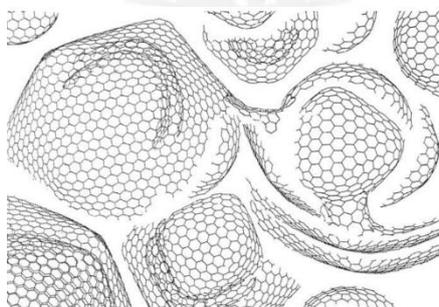


Figura 4. Modelo de la estructura del carbón vítreo de alta temperatura que contiene elementos de tipo fullereno (Harris, 2005)

## 5.1.2 Electrodo modificado químicamente

### 5.1.2.1 Generalidades

Los electrodos experimentan fenómenos específicos que reducen su aplicabilidad analítica y sintética. La principal es el ensuciamiento del electrodo por procesos de precipitación o adsorción de analitos no deseados y la velocidad de reacción electroquímica lenta de algunas especies que requieren la aplicación de un sobrepotencial para producir la reacción deseada (Bard 1983: 302-304). Estos fenómenos pueden ser controlados manipulando la naturaleza química de la superficie del electrodo. El concepto de electrodo modificado químicamente nació de la frustración de los electroquímicos por controlar la naturaleza química de la superficie del electrodo. (Murray 1987: 379-390). Si se eligen los reactivos adecuados, pueden obtenerse propiedades deseables como catálisis de reacciones electroquímicas, ausencia de efectos de adsorción y características ópticas especiales (Leena 2012).

Se entiende por electrodo modificado químicamente a un electrodo hecho de un material conductor o semiconductor que es recubierto por un film monomolecular, polimolecular, iónico o polimérico, por medio de reacciones faradaicas (transferencia de carga), que exhibe propiedades químicas, electroquímicas y ópticas en el film (Durst 1997: 1317-1323).

La modificación de la superficie de los electrodos está ganando atención en los últimos años. Comparado con los electrodos convencionales, la inmovilización de un film polimérico transfiere propiedades electroquímicas a la superficie del electrodo. Este proceso imparte alto grado de sensibilidad y selectividad al electrodo.

### 5.1.2.2 Polímeros conductores

Los polímeros conjugados en los que el electrón puede deslocalizarse a través de la cadena principal se definen como polímeros conductores. Poliacetileno, polifenileno, polipirrol, politiofeno, etc; presentan enlaces  $\pi$  conjugados y son ejemplos de polímeros conductores (figura 5). Se pueden sintetizar por polimerización química de monómeros apropiados. Por otro lado, la polimerización electroquímica de compuestos aromáticos o heteroaromáticos es un método fácil y eficiente para producir películas de polímeros conductores en el electrodo (Qin 2011: 187-198).

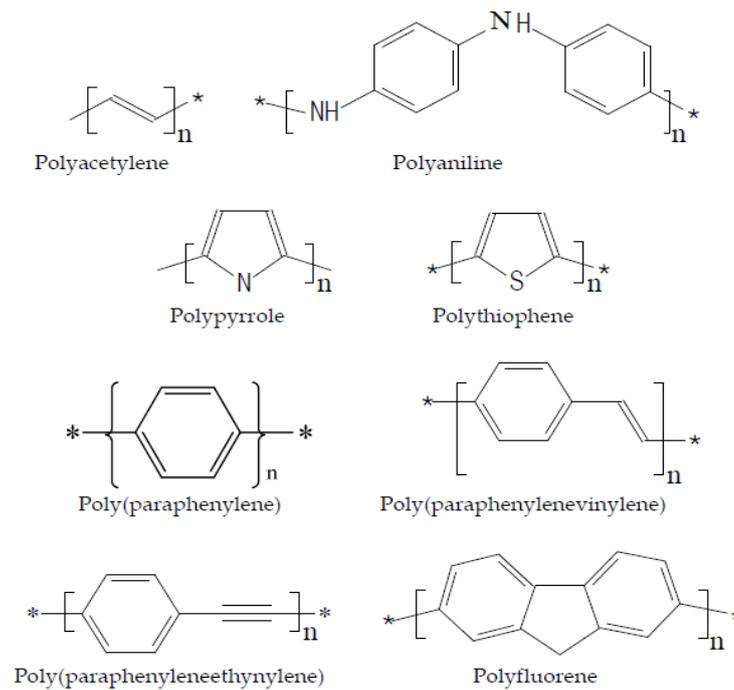


Figura 5. Polímeros conductores (Qin, 2011)

### 5.1.2.3 Principio de electropolimerización

Muchos polímeros conductores pueden ser sintetizados electroquímicamente, para ello se requiere que el monómero pueda ser oxidado en un sistema de solvente adecuado. Los monómeros disueltos en un electrolito se oxidan electroquímicamente a un potencial generando radicales catiónicos, estos se absorben en la superficie del electrodo, se acoplan y se desprotonan formando un dímero neutro. La posterior oxidación secuencial del dímero y posterior acoplamiento de los radicales da como resultado la formación del polímero en la superficie del electrodo (figura 6). La técnica de voltametría cíclica suele ser la más eficiente para la electropolimerización. También se utilizan electrolisis potencioestática (potencial constante) y electrolisis galvanostática (corriente constante) (Inagi 2014: 801-803), (Qin 2011: 187-198).

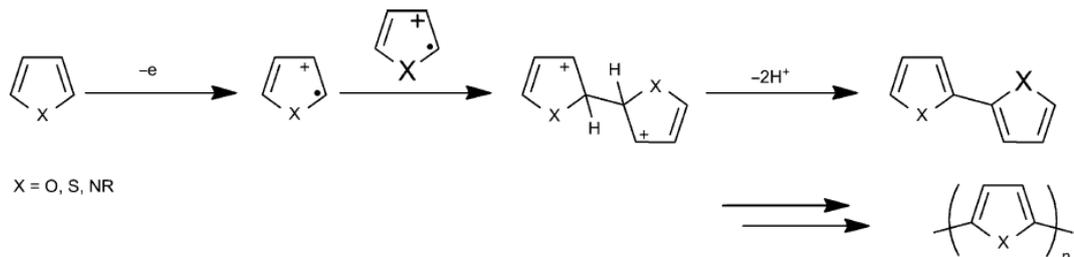


Figura 6. Electrosíntesis de un polímero conductor (Qin, 2011)

#### 5.1.2.4 Electrocatálisis

Los polímeros conductores son ampliamente utilizados como electrocatalizadores. Una importante motivación para la modificación de electrodos con polímeros conductores es cuando un analito de interés presenta una cinética de reacción muy lenta en un electrodo desnudo, por tanto, las reacciones de oxidación o reducción ocurren a potenciales muy positivos o muy negativos, es lo que se conoce como sobrepotencial (Zhou 2016: 2868–2876).

En la figura 7 se ilustra la idea de disminución del sobrepotencial acelerando la reacción deseada con un polímero conductor inmovilizado que actúa como catalizador. La forma oxidada del catalizador “o” es rápidamente reducida en el electrodo, y luego su forma reducida “●” reacciona con el analito en la solución (Murray 1987: 379-390). Los electrodos de trabajo modificados presentan una mejora en la reversibilidad y la cinética de los procesos en el electrodo en comparación con los electrodos de trabajo sin modificar.

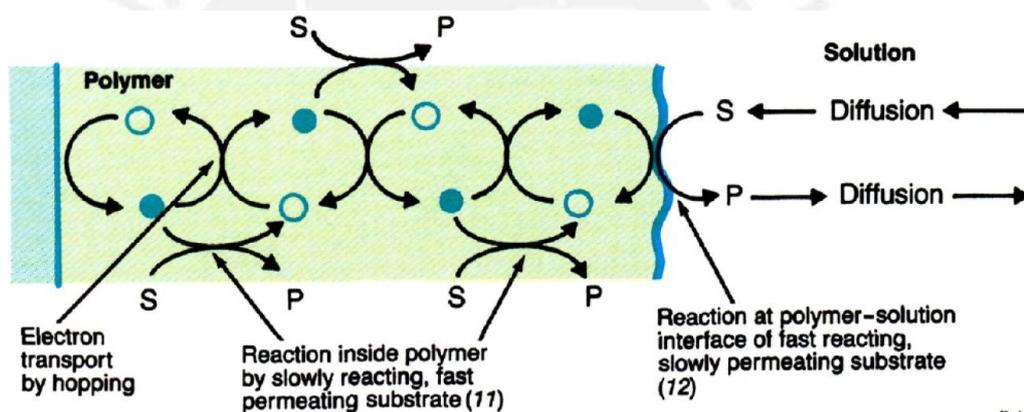


Figura 7. Electrocatálisis mediada por una película de polímero redox (Murray 1987)

#### 5.1.3 Química del azul de metileno y su polimerización

La modificación de la superficie del electrodo puede llevarse a cabo utilizando colorantes orgánicos ya que los colorantes redox son capaces de someterse a electropolimerización.

##### 5.1.3.1 Estructura y propiedades del monómero

El azul de metileno (AM) es un colorante orgánico de fórmula molecular  $C_{16}H_{18}ClN_3S$ , masa molar 319.85g/mol y nombre químico 3,7-bis (dimetilamino)- cloruro de fenazationio o cloruro de tetrametilitionina (figura 8). El azul de metileno pertenece a la familia de la tiazina con dos grupos amino terciarios y es ampliamente utilizado como indicador redox con

potencial formal en el rango de -0.1 a -0.4 (vs. SCE) a pH 4-11. En solución acuosa es de color azul intenso debido a fuerte absorbancia de luz y su forma reducida es incolora (Ju 1994: 1165-1170), (Bard 2012: 588-589).

Estudios de voltametría cíclica indican que el número de e- transferidos en el proceso de reacción del electrodo para azul de metileno es 2, así el número de H<sup>+</sup> participando es 3 a pH<5.4; 2 a pH 5.4-6 y 1 a pH>6, (figura 9). Además, con el incremento de pH del medio, los potenciales de pico de oxidación y reducción se desplazan en dirección negativa y la diferencia de potenciales de pico es menor cuando se incrementa el pH (Ju 1994: 1165-1170).

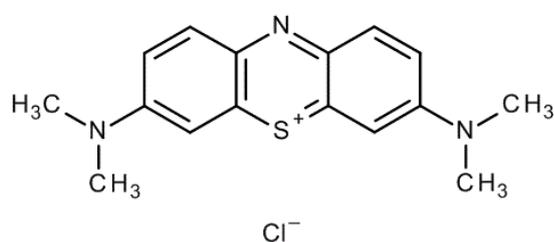
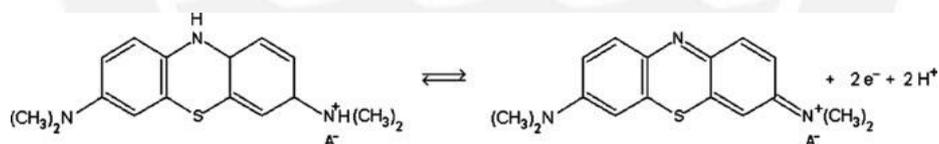


Figura 8. Azul de metileno

A valores de pH bajos:



A valores de pH altos:

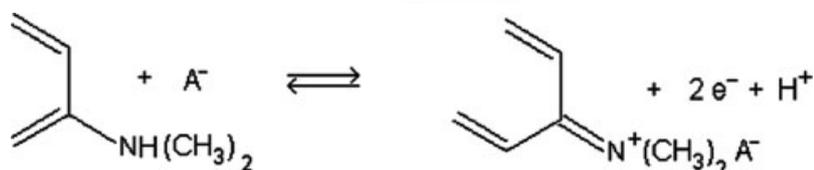


Figura 9. Electropolimerización del azul de metileno a pH bajos y altos (Inzelt 2012: 37-38).

### 5.1.3.2 Polimerización del azul de metileno

La electropolimerización es una de las técnicas más comunes para obtener películas delgadas de polímeros de colorantes. La principal ventaja de la electropolimerización del azul de metileno radica en la estabilidad a largo plazo del polímero obtenido.

La descripción de cómo se lleva a cabo la polimerización del monómero azul de metileno por el proceso de electrólisis, es controversial. El esquema de la figura 10 es sugerido por Liu y sus col.(1999: 159-165), quienes a partir de espectros Raman del monómero y polímero del azul de metileno, sugirieron que el proceso de polimerización tiene lugar en los grupos amino  $-N(CH_3)_2$ .

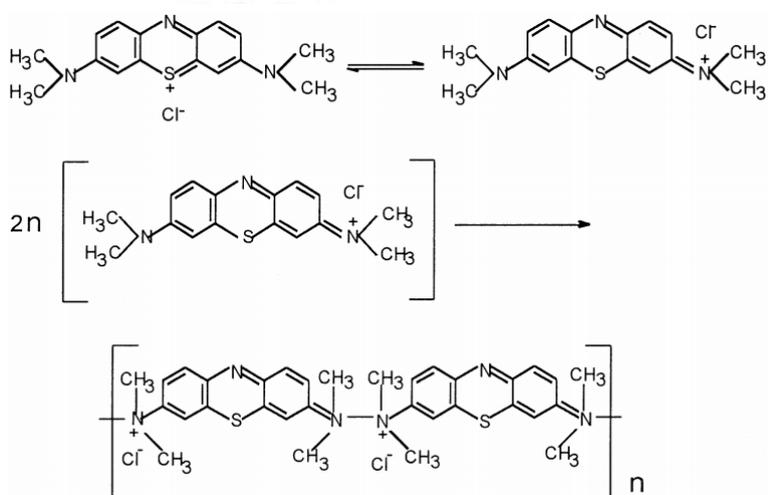


Figura 10. Polimerización del azul de metileno (Liu y sus col, 1999)

Por otro lado, Karyakin y sus col. (1998: 149-155) investigaron la electropolimerización de las azinas y a partir de voltamogramas cíclicos y espectros visible e IR, elucidaron la estructura del polímero de azul de metileno (figura 11). Según su estructura propuesta, el polímero presenta acoplamiento anillo-anillo y también sugieren que hay enlaces entre monómeros por puentes amino.

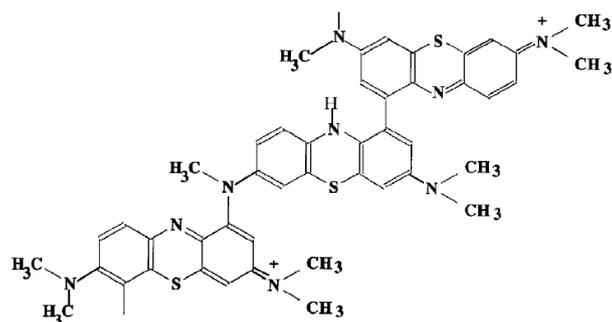


Figura 11. Estructura hipotética del polímero de azul de metileno (Karyakin y sus col., 1998)

## 5.2 Estudio voltamétrico

La voltametría tuvo su origen con la polarografía en 1922 con el trabajo del químico checo llamado Jaroslav-Heyrovsky, quien introdujo el electrodo de gota de mercurio y que recibió el Premio Nobel en química en 1959. El término voltametría refiere a una clase de técnica electroanalítica que se basa en la medición de la corriente que se desarrolla en una celda electroquímica en condiciones de polarización de la concentración. La celda electroquímica consta de tres electrodos: electrodo de trabajo, electrodo auxiliar y electrodo de referencia. La relación se explica cuando se aplica un rango de potencial al electrodo de trabajo y la corriente resultante fluye a través de la celda y queda registrada. El control del potencial aplicado al electrodo de trabajo sirve como fuerza motriz para la reacción, y las especies químicas en la solución son oxidadas o reducidas en la superficie del electrodo (Farghaly 2014: 3287 – 3318).

La voltametría es una técnica versátil para la investigación. Permite la determinación cuantitativa de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos. Además de estudios fundamentales de oxidación y reducción en varios medios, procesos de adsorción en superficies, mecanismos de reacción y estudios cinéticos de las reacciones. Los métodos voltamétricos son aplicados para la determinación de compuestos farmacéuticos de interés cuando son acoplados a un HPLC, por lo que se convierten en una herramienta efectiva para análisis de mezclas complejas (Kounaves : 709-725).

### 5.2.1 Componentes de la celda electroquímica de tres electrodos

Los componentes básicos de un sistema electroanalítico moderno para voltimetría son un potencióstato, una computadora y una celda electroquímica para 3 electrodos (electrodo de trabajo, electrodo de referencia, contraelectrodo). Un potencial de excitación proveniente de la fuente de voltaje es aplicado entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, cambiando su potencial relativo con respecto al potencial fijo del electrodo de referencia que es medido por el voltímetro. La corriente resultante entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo es medida con el amperímetro. Véase en la figura 12. Diferentes materiales han sido usados como electrodos de referencia, contraelectrodos y electrodos de trabajo (Tektronic 2015),(Tesfaye 2011).

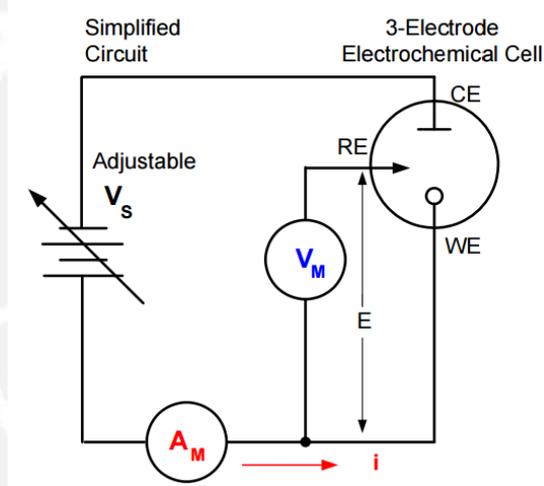


Figura 12. Circuito de medición simplificado para la realización de voltimetría cíclica (Tektronic ,2015)

#### 5.2.1.1 Electrodo de trabajo

La selección del material del electrodo de trabajo es un paso crítico para un experimento exitoso. Entre los factores que hay que considerar: el material debe exhibir favorable comportamiento redox con el analito, reproducibilidad en la transferencia de electrones sin ensuciamiento del electrodo, amplia ventana de potencial, la conductividad eléctrica, las propiedades mecánicas, el costo, la disponibilidad y la toxicidad.

Los electrodos de trabajo están hechos de metales electroquímicamente inertes en un amplio rango de potenciales. Los más usados son mercurio, platino, oro y varias formas de carbono como carbón vítreo y pasta de carbono. Entre estos, el electrodo de platino

es el favorito ya que presenta buena inercia electroquímica, amplio rango de potencial y se puede fabricar de muchas formas. La desventaja radica en el alto costo (Skoog 2008: 3973-3982).

Los electrodos de oro son aún más inertes que el platino, pero su potencial es limitado en el rango positivo debido a la oxidación de este (Harris 2003:317).

Los electrodos de carbono permiten escanear potenciales más negativos que el platino o el oro. La forma más común es el carbón vítreo que es relativamente costoso, sin embargo, presenta comportamiento reproducible. Por otro lado, los electrodos de pasta de carbono están hechos de carbono granulado mezclado con un aceite como el nujol y empacados dentro de una cavidad inerte, los cuales tienen la desventaja de sufrir daños mecánicos durante su uso. (Tsfaye 2011: 7)

#### 5.2.1.2 Electrodo de referencia

Un electrodo de referencia es aquel que tiene un potencial estable y definido. En varias mediciones electroquímicas es necesario mantener uno de los electrodos de la celda a potencial constante. El electrodo de referencia permite controlar el potencial de un electrodo de trabajo. Los electrodos de referencia deben tener un potencial estable en el tiempo, con la temperatura y no debe ser polarizable, es decir, que su potencial no se vea alterado como consecuencia de los cambios en la interfase, debido al paso de una corriente apreciable.

Los electrodos de referencia más comunes para soluciones acuosas son el electrodo saturado de calomel ( $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}$ ), el electrodo de plata cloruro de plata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ). El valor potencial del electrodo de calomel SCE es 0.242V vs el electrodo normal de hidrógeno (NHE), mientras para el electrodo  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  es 0.197V vs. NHE (Skoog 2008: 3973-3982).

#### 5.2.1.3 Contraelectrodo

El contraelectrodo o electrodo auxiliar proporciona una ruta alternativa para el flujo de corriente, por tanto, sólo una insignificante cantidad de corriente llega al electrodo de referencia. En la mayoría de las técnicas voltamétricas, las reacciones en la superficie del electrodo auxiliar ocurren en cortos periodos de tiempo y raramente producen un cambio apreciable de las concentraciones de especies oxidadas o reducidas. Así el aislamiento del contraelectrodo de la muestra no es necesario. La mayoría de electrodos auxiliares consisten de un material conductor químicamente inerte como platino, oro y grafito (Harris 2003:378), (Montero 2003:300).

#### 5.2.1.4 Electrolito soporte

Las mediciones electroquímicas son comúnmente llevadas a cabo en un solvente que contiene un electrolito soporte. El agua es el solvente más utilizado y una de las mejores opciones de electrolito soporte es el nitrato de potasio  $\text{KNO}_3$  que es soluble y electroquímicamente inerte. El cloruro de potasio  $\text{KCl}$  también es una buena opción, aunque el ión cloruro es susceptible a oxidación a potenciales positivos. Entre los solventes no acuosos y usados con frecuencia está el acetonitrilo, propileno, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO). Los sistemas buffer como el acetato o fosfato son usados cuando es necesario el control pH. El electrolito soporte presente en la solución incrementa la conductividad. Esto ayuda a eliminar efectos de electromigración. En la práctica, la concentración del electrolito soporte va entre 0.1M y 1M, mientras que la concentración del analito raramente excede 0.01M en experimentos de voltametría. (Tesfaye 2011:10)

### 5.2.2 Técnicas electroquímicas

#### 5.2.2.1 Voltametría cíclica (CV)

En voltametría cíclica, una señal de potencial de forma de onda triangular produce la respuesta de corriente en un electrodo de trabajo sumergido en una solución no agitada. En la figura 13, los voltajes externos a los cuales tiene lugar la inversión (-0.2 y +0.8V) se llaman potenciales de inversión. A menudo el ciclo de excitación se repite varias veces. El intervalo de potenciales de inversión elegido para un experimento es aquel en que tiene lugar la oxidación o reducción de uno o más analitos controlados por difusión (Skoog, 2008: 737).

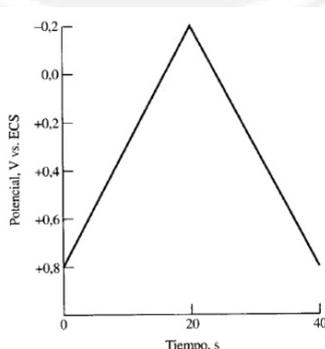
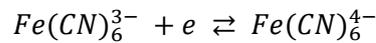


Figura 13. Señal de excitación de voltametría cíclica (Skoog 2008:737)

La figura 14 muestra la respuesta de la corriente cuando una solución 6mM de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  y 1M de  $\text{KNO}_3$  se somete a una señal de excitación cíclica. Cuando el potencial alcanza valores menos positivos que +0.4V, se empieza a formar una corriente catódica debido

a la reducción del ión hexacianoferrato(III) al ión hexacianoferrato(II) (Skoog 2008: 3973-3982).



Cuando alcanza el punto A, tiene un rápido descenso de la corriente a medida que la concentración superficial de  $Fe(CN)_6^{3-}$  se hace cada vez menor. En el punto B se invierte la dirección de barrido, pero la corriente sigue siendo catódica hasta que el potencial se hace cada vez más positivo y la corriente cae a cero, entonces llega a ser anódica. La corriente anódica resulta de la reoxidación de  $Fe(CN)_6^{4-}$  que se ha acumulado cerca de la superficie del electrodo. Esta corriente alcanza un máximo en C y después disminuye a medida que  $Fe(CN)_6^{4-}$  se consume en la reacción anódica (Skoog 2008: 738).

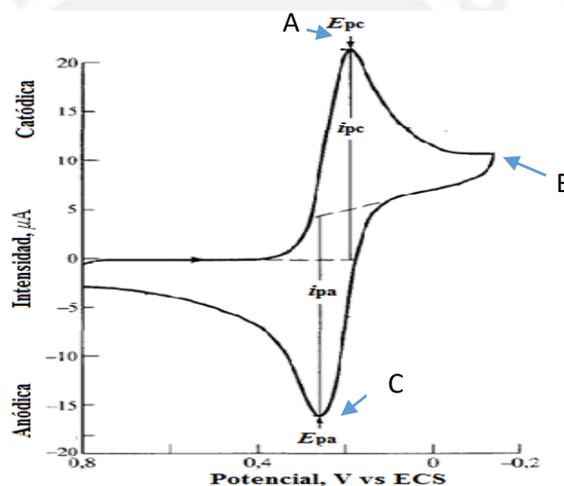


Figura 14. Voltamograma cíclico de una solución 6mM de  $K_3Fe(CN)_6$  y 1M de  $KNO_3$  (Skoog 2008: 738)

Los parámetros importantes en un voltamograma cíclico son:

- El potencial de pico catódico  $E_{pc}$
- El potencial de pico anódico  $E_{pa}$
- La corriente de pico catódico  $I_{pc}$
- La corriente de pico anódico  $I_{pa}$

Para una reacción de tipo reversible las  $I_{pa}$  y  $I_{pc}$  son aproximadamente iguales, pero de signo opuesto y la diferencia de  $E_{pa}$  y  $E_{pc}$  es  $0.0592/n$ , donde  $n$  es el número de electrones que participan en la semireacción (Skoog 2008: 739).

### 5.2.2.2 Voltametría de onda cuadrada (VOC)

La voltametría de onda cuadrada es un tipo de voltametría de pulsos que se caracteriza por su sensibilidad y rapidez. En la figura 15 se muestra la señal de excitación que se obtiene al superponer una onda cuadrada en un tipo de escalera. La corriente es medida durante intervalos de tiempo cortos, en la parte final de la onda positiva al tiempo  $t_{i1}$ , y en la parte final de la onda negativa al tiempo  $t_{i2}$  de cada onda cuadrada. Trabajando a estas condiciones, que corresponde a una frecuencia de impulsos de 200Hz, un barrido de 1V se hace en 0.5s. En una reacción de reducción reversible, la diferencia de intensidades de corriente se registra en función del potencial en escalón y el voltamograma obtenido es directamente proporcional a la concentración. Durante cada impulso catódico, llega un aporte brusco de analito que se reduce en la superficie del electrodo y durante el impulso anódico, el analito que acababa de reducirse se reoxida. De esta manera cada impulso anódico suministra una alta concentración de analito en la superficie del electrodo dispuesta al siguiente pulso catódico (Harris 2003: 372-406), (Alves 2009: 185-188).

La VOC en relación a VC es más rápida y presenta mayor sensibilidad ya que la intensidad de corriente global resulta de la suma de 2 corrientes: anódica (fase positiva del impulso) y catódica (fase negativa del impulso), véase en la figura 16. Los límites de detección publicados de voltametría de onda cuadrada están entre  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  (Skoog 2001: 471-505)

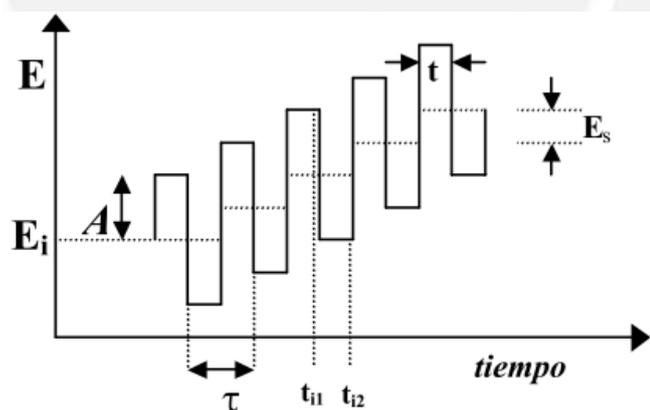


Figura 15. Señal de excitación de la voltametría de onda cuadrada (Alves ,2009)

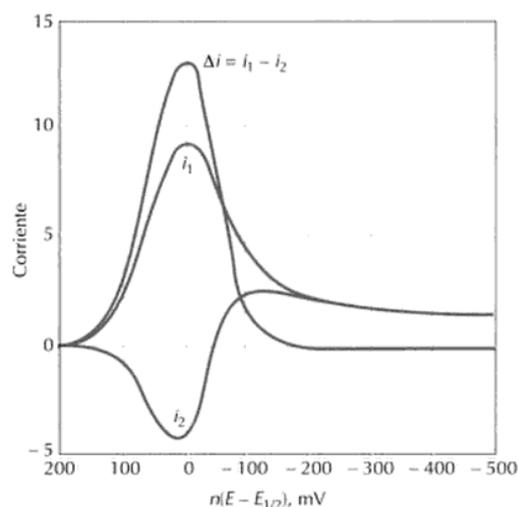


Figura 16. Respuesta de corriente de una reacción reversible a la señal de excitación (Skoog y otros, 2001)

### 5.3 Técnicas de caracterización de electrodos

#### 5.3.1 Ley de Faraday

La ley de Faraday o ley de la electrólisis menciona que el total de carga  $Q$  (coulomb) que pasa a través de la celda es proporcional a la masa  $N$  (mol) depositada en el electrodo de área  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) durante la electrólisis. Donde  $F$  es la constante de Faraday  $F = 96485.3 \text{ C/mol}$ , y  $n$  es el número de electrones transferidos por mol del producto. La ley de Faraday puede utilizarse en varias aplicaciones, como en electrogravimetría para encontrar la cantidad de sustancia depositada en el electrodo, y en coulometría para encontrar la cantidad de electricidad requerida para completar la electrólisis de un compuesto (Zoski 2007: 11)

$$Q = nFA \quad \text{ecuación 1}$$

Tomando como ejemplo los cálculos de Costa Marinho, M. y sus col. (2012: 8-14), se calculó la cantidad de polímero electroactivo depositado por electropolimerización usando la ley de Faraday. De acuerdo a la ecuación 1,  $N$  se calcula a partir de la carga  $Q$  envuelta en la electropolimerización,  $A$  es el área geométrica del electrodo de trabajo ( $0.18 \text{ cm}^2$ ) y se considera que 2 e- se transfieren en la reacción redox.

$$N = \frac{Q}{nFA}$$

El valor de Q es obtenido por integración del pico voltamétrico desde donde inicia hasta donde termina la oxidación a cierta velocidad de barrido.

$$Q = \frac{13.752 \times 10^{-6} (A)(mV)}{50 mVs^{-1}} = 275 \mu C$$

Así reemplazando en la ecuación, se obtiene  $7.9 \times 10^{-9} \text{ mol/cm}^2$  de film polimérico en la superficie del electrodo.

$$N = \frac{275 \mu C}{(2) \left( 96485.3 \frac{C}{mol} \right) (0.18 cm^2)} = 7.9 \times 10^{-9} \text{ mol/cm}^2$$

### 5.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDS)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica versátil que ha sido utilizada para caracterizar y comparar la morfología de diferentes electrodos modificados. El principio de esta técnica consiste en que si se hace incidir sobre la muestra un haz de electrones de alta energía finamente enfocado, emite una señal que puede registrarse con un detector apropiado. La muestra emite rayos x, los cuales pueden ser analizados para obtener información sobre su composición. También emite electrones retrodispersados, electrones secundarios, entre otros.

El SEM se compone principalmente de 4 partes: (1) el sistema óptico de electrones que incluye la pistola de electrones, lentes electrónicas, bobinas de exploración; (2) la cámara; (3) el detector de señales, procesamiento y visualización del sistema; y (4) el sistema de vacío. Véase la estructura básica del SEM en la figura 17 (Chen Li 2015: 1768–1778).

El detector de rayos X (EDS) es el que recibe los rayos X procedentes de cada uno de los puntos de la superficie sobre los que pasa el haz de electrones. Como la energía de cada rayo X es característica de cada elemento, podemos obtener información cualitativa y cuantitativa de las muestras.

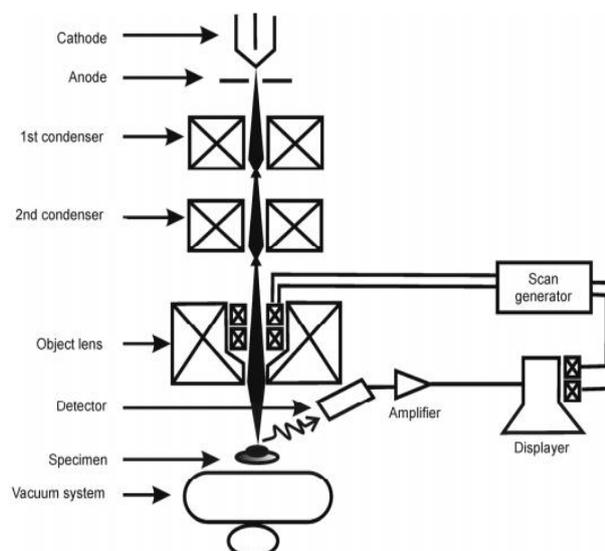


Figura 17. Esquema del microscopio electrónico de barrido (Chen y Xu, 2015)

### 5.3.3 Espectroscopia de impedancia electroquímica(EIS)

La espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés) es una técnica eficiente para investigar la resistencia de los electrodos modificados. EIS se basa en aplicar una perturbación sinusoidal a un electrodo como una función de la frecuencia a potencial constante y medir la respuesta en forma de corriente sinusoidal. Así el potencióstato usado procesa las mediciones y da como resultado una serie de valores de impedancia en función de la frecuencia que se denomina espectro de impedancias (Ortiz 2017), (Lasia 2014:1-5).

EIS emplea el circuito de Randles que es equivalente a una reacción electroquímica simple para estudiar parámetros como la resistencia a la solución ( $R_s$ ), resistencia a la transferencia de carga ( $R_{tc}$ ), resistencia de la difusión ( $Z_w$ ), capacitancia de la doble capa ( $C_{dl}$ ) de los electrodos modificados. Ver en la figura 18, (Ortiz, 2017).

Para la representación de los datos de impedancia se emplea los gráficos de Nyquist y de Bode. En el caso del gráfico de Nyquist representa la impedancia imaginaria ( $Z''$ ) vs. la impedancia real ( $Z'$ ). Ver en la figura 19, (Ortiz, 2017).

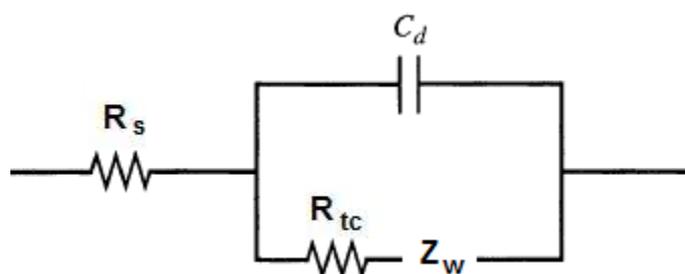


Figura 18. Circuito de Randles: equivalente a una reacción redox simple (Ortiz 2017)

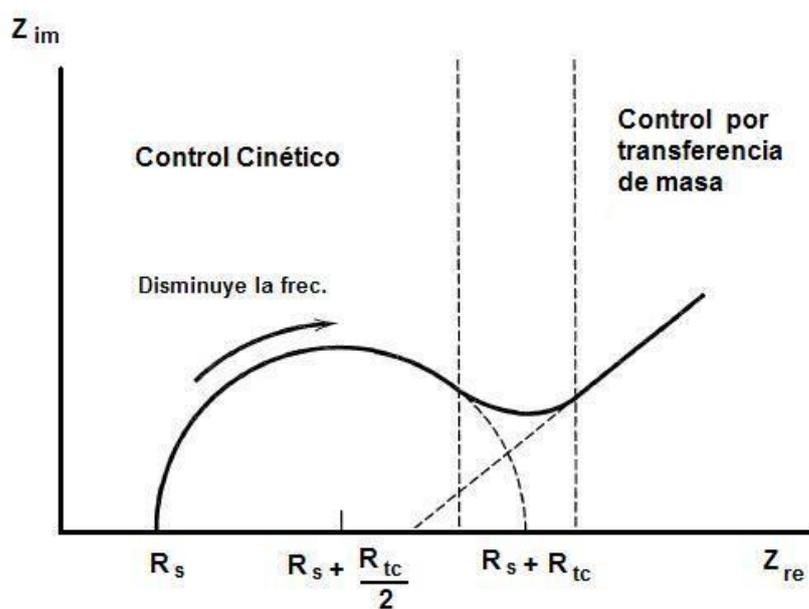


Figura 19. Diagrama de Nyquist: respuesta de espectroscopia de impedancia electroquímica para un circuito equivalente tipo Randles (Ortiz, 2017)

#### 5.4 Pruebas analíticas

El desarrollo de un nuevo método analítico para la cuantificación de un analito de interés va acompañado a un proceso de validación que asegure la confiabilidad de los resultados. Como es el caso de la determinación de dipirona en solución acuosa por un

método voltamétrico con el uso de un electrodo modificado, es necesario desarrollar algunas pruebas de validación para confirmar que el método es apto para su uso.

#### 5.4.1 Linealidad

Se define como la relación lineal entre la señal y la concentración del analito, ya que es necesario conocer el rango de concentraciones del analito en el que el método puede ser aplicado. Es recomendable abarcar valores cercanos a cero y valores superiores al LMP o al valor de interés. Ver figura 20, (Duffau y otros 2010: 21-49), (Crubellati y otros 2009: 15-29).

Luego de realizar el gráfico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el rango lineal para luego mediante el método de regresión simple obtener la curva de calibrado o de trabajo. Ver figura 21.

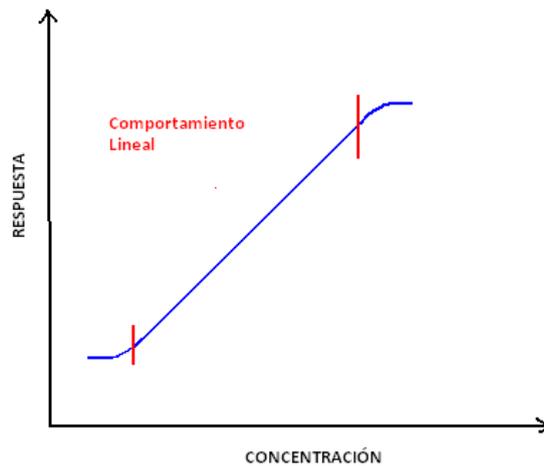


Figura 20. Relación gráfica de la concentración vs. Respuesta (Duffau y otros ,2010)

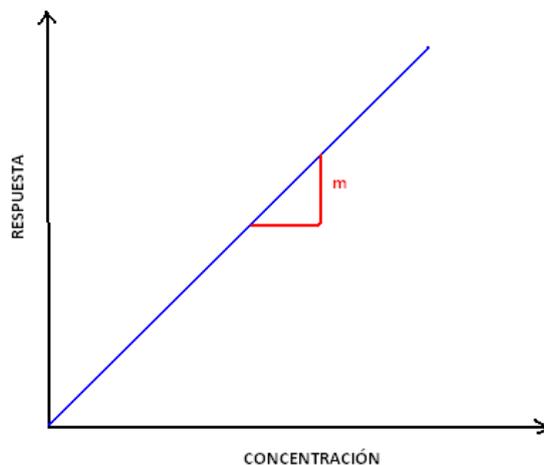


Figura 21. Curva de calibrado (Duffau y otros ,2010)

Criterios de aceptación:

- Ecuación de la recta:  $y = bX + a$  (ecuación 2)
- Coeficiente de correlación lineal:  $r \geq 0.99$
- Coeficiente de correlación al cuadrado:  $r^2 \geq 0.98$
- Evaluación estadística de prueba t-Student

## 5.4.2 Límites

### 5.4.2.1 Límite de detección (LOD)

Es el límite inferior del analito o propiedad que puede ser detectado con certeza por el método. Para fines de validación es suficiente la indicación del nivel a partir del cual la detección se vuelve problemática. Para calcularlo se analizan 6 muestras del blanco o blanco fortificado y se evalúa la desviación estándar (Duffau y otros 2010: 21-49), (Crubellati y otros 2009: 15-29).

Para el cálculo de LOD se considera:

- Cuando el método detecta la señal del blanco, LOD se calcula:  
 $LOD = B + 3.3 S_b$  (ecuación 3)
- Cuando no hay señal, se utiliza un blanco fortificado (en baja concentración), LOD se calcula:  
 $LOD = 0 + 3.3 S_{bf}$  (ecuación 4)

### 5.4.2.2 Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación se conoce como la menor concentración de analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de repetibilidad y exactitud. Su significado práctico es que en la región de LOD la magnitud de la incertidumbre asociada es comparable al resultado real (Duffau y otros 2010: 21-49), (Crubellati y otros 2009: 15-29).

El LOD se calcula por multiplicar 3.04 veces al límite de detección LOD.

Criterio de aceptación para límites:  $LOD \ll LOQ < LMP$ .

### 5.4.3 Precisión

La precisión es la medida de dispersión de los resultados unos de otros. Se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa, ya que la varianza es el mejor indicador de la dispersión. Las formas más comunes de la precisión son la repetibilidad y la reproducibilidad (Duffau y otros 2010: 21-49), (Crubellati y otros 2009: 15-29).

#### 5.4.3.1 Repetibilidad

Es la precisión bajo condiciones de repetibilidad, en donde los resultados de análisis de un analito en un material de referencia se obtienen con el mismo método, el mismo laboratorio, el mismo operador dentro de intervalos cortos de tiempo. Se puede determinar registrando al menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones. Se calcula la desviación estándar ( $S_r$ ) y el porcentaje de coeficiente de variación (Duffau 2010: 21-49), (Crubellati 2009: 15-29).

Ecuaciones:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{ecuación 5})$$

$$CV_r \% = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100\% \quad (\text{ecuación 6})$$

El criterio de aceptabilidad para la repetibilidad y la reproducibilidad será en base a coeficiente de variación de Horwitz.

$$CV_h \% = 2^{(1-0.5 \text{Log} C)} \quad (\text{ecuación 7})$$

En donde:

C= valor nominal del analito expresado en potencia de 10

- Criterio de aceptación para la repetibilidad:  $CV_r \% < (CV_h \% / 2)$ .

#### 5.4.3.2 Reproducibilidad

Es el grado de precisión en donde los resultados de análisis se obtienen con el mismo método, pero en condiciones diferentes como laboratorio, diferentes analistas, usando distintos equipos, distintos materiales, entre otros. Para determinar la reproducibilidad intralaboratorio (dentro del laboratorio), se sugiere realizar 3 mediciones del material de

referencia una vez por cada semana. También, se puede determinar registrando al menos 10 mediciones en días distintos, o en un mismo día, cambiando al menos una condición analítica (por ejemplo: el electrodo de trabajo). Se calcula la desviación estándar ( $S_{ri}$ ) y el porcentaje de coeficiente de variación ( $CV_{ri}\%$ ) (Duffau y otros 2010: 21-49), (Crubellati y otros 2009: 15-29).

El criterio de aceptabilidad para la repetibilidad y la reproducibilidad será en base a coeficiente de variación de Horwitz.

$$CV_h\% = 2^{(1-0.5\text{Log}C)}$$

En donde:

C= valor nominal del analito expresado en potencia de 10

- Criterio de aceptación para la reproducibilidad intralaboratorio:

$$CV_{ri}\% < (2CV_h\%/3).$$

#### 5.4.4 Veracidad

Establece el grado de cercanía de la media de un conjunto de resultados con el valor verdadero. La veracidad se puede expresar en términos de sesgo o recuperación. La veracidad en términos de sesgo, efectúa la comparación de la media de los resultados del método contra un valor de referencia con materiales de referencia certificados o con los resultados obtenidos por un método estándar.

Otra forma de demostrar la veracidad es mediante recuperación que consiste añadir un material de referencia certificado (MRC) a una muestra en cualquier etapa de un análisis químico, para verificar la respuesta del sistema de medición. El porcentaje de recuperación es un componente de la veracidad. Los límites en general son de 95-105% de recuperación aceptable (Duffau y otros 2010: 21-49), (Crubellati y otros 2009: 15-29).

## 6. Metodología

### 6.1 Reactivos y materiales

- Azul de metileno, grado p.a., marca Merck
- Dipirona monohidratada, estándar analítico, marca Sigma-Aldrich
- Sodio bifosfato anhidro, grado p.a., marca Merck
- Sodio fosfato monobásico monohidratado, grado p.a., marca Merck
- Hidróxido de sodio, grado p.a., marca Merck
- Ácido clorhídrico 37%(cc), grado p.a., marca JT Baker
- Ácido sulfúrico 98% (cc), grado p.a., marca JT Baker
- Cloruro de potasio, grado p.a., marca Merck
- Agar-agar, pureza 99.99%, marca Merck
- Alúmina granulada, pureza 99.99%, marca Merck
- Gas nitrógeno, grado UHP-5.0, marca Linde Gas
- Etanol, grado p.a., marca Merck
- Acetona, grado p.a., marca JT Baker
- Tiras indicadoras de pH (escala 0-14 Merck)
- Electrodo de carbón vítreo (diámetro 3mm)
- Electrodo de calomelanos saturado (SCE, de sus siglas en inglés)
- Alambre de platino
- Celda electroquímica de vidrio para 3 electrodos
- Vasos precipitados de 50 y 100mL
- Fiolas de 50, 100,250 y 500mL
- Pipetas de 5,10 y de 25mL
- Imanes para agitación
- baguetas

## 6.2 Equipos

- Balanza analítica Ohaus Adventurer, capacidad máxima 210 g, sensibilidad de 0,0001 g., proporcionado por el Laboratorio de Investigación 3 de la Sección Química De La PUCP
- Potenciostato, marca CH Instruments, modelo 1242B, proporcionado por el Laboratorio de Investigación 3 de la Sección Química De La PUCP
- Agitador magnético, marca Thermo Scientific, modelo Nuova SP18420
- Microscopio Electrónico - Quanta 650 - FEI, con detector (EDS) EDAX Team, proporcionado por el Centro de Caracterización de Materiales de la PUCP
- Sonicador Laboratory Equipment Manufacturer modelo DCG-200H
- Portable electrochemical Interface & Impedance Analyser, marca IVIUM TECHNOLOGIES y software IVIUMSOFT, proporcionado por el Laboratorio de Electroquímica de la UNI

## 6.3 Procedimientos

### 6.3.1 Pretratamiento y modificación de los electrodos.

Se realizó el pretratamiento físico a los electrodos de carbón vítreo que consiste en pulido de la superficie plana del electrodo con alúmina hasta obtener una superficie lisa y brillante. Luego un lavado con metanol, acetona y agua en ultrasonido por 2 minutos cada uno, para remover las partículas que hayan quedado adheridas. Por último, se realizó un tratamiento electroquímico al electrodo, que consiste en: (i) polarización potencioestática a 1.2V por 10 minutos en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y (ii) aplicación de un barrido de potencial cíclico (-0.4V hasta 1.2V) a velocidad 1v/s por 10 minutos en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M.

Para realizar la electropolimerización se utilizó una celda de tres electrodos como se ve en la figura 22: barra de carbón vítreo como electrodo de trabajo, lámina de platino como contraelectrodo y electrodo de calomelanos saturado (SCE) como electrodo de referencia.

La solución electrolítica estaba compuesta por: buffer fosfato 0.1M (pH8) y 0.1M de KCl, conteniendo 1x10<sup>-4</sup>M de azul de metileno. Se burbujeó con nitrógeno por 2 minutos previos a la electropolimerización.

Se empleó la técnica de voltametría cíclica bajo los siguientes parámetros:

Rango de voltaje: -0.75 hasta 1V vs. SCE

Velocidad de barrido: 0.05v/s

Cantidad de ciclos: 30



Figura 22. Celda de tres electrodos

#### 6.3.2 Caracterización del film polimérico formado en la superficie del electrodo.

- Se calculó la cantidad de polímero electroactivo depositado en la superficie del electrodo a partir de la Ley de Faraday (ecuación 1).
- Se caracterizó la morfología de un electrodo modificado y de un electrodo sin modificar, mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM) y un análisis de la composición elemental del film mediante la espectroscopía de energía dispersada de rayos X (EDS). El voltaje de aceleración utilizado fue de 30 kV.
- Se evaluó la impedancia o resistencia de los electrodos modificados y los electrodos sin modificar mediante la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS, de sus siglas en inglés) en una solución de 0.1M de KCl que contenía el par redox 1.0 mmol/L  $K_4Fe(CN)_6$  y 1.0 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$  bajo los siguientes parámetros:
  - Voltaje aplicado constante: 2.0V (vs. SCE)
  - Amplitud de perturbación: 0.01V

- Barrido de frecuencias: 0.1 – 1000 Hz
- Número de frecuencias: 36
- Décadas: 7

### 6.3.3 Evaluación del comportamiento electroquímico de la dipirona en el electrodo modificado.

Se estudió por medio de la técnica de voltametría cíclica el comportamiento electroquímico de la dipirona en el electrodo modificado y en un electrodo sin modificar de carbón vítreo.

Se empleó una celda de 3 electrodos con capacidad de 50mL. Los electrodos de carbón vítreo modificados y no modificados fueron empleados como electrodos de trabajo, una lámina de platino fue empleada como contraelectrodo y el electrodo de calomelanos SCE fue empleado como electrodo de referencia.

#### Condiciones de trabajo

- Concentración de dipirona:  $1 \times 10^{-3}$  M
- Electrolito soporte: Solución de KCl 0.1M, aproximadamente 20mL
- Rango de voltaje: -1 hasta 1.2V vs. SCE
- Velocidad de barrido: 0.05V/s

Se burbujeó la solución con nitrógeno por 2 minutos previos a las mediciones

### 6.3.4 Optimización de las condiciones de trabajo empleando la técnica voltametría cíclica

#### 6.3.4.1 Evaluación del efecto del pH

Se estudió el efecto del pH en un rango (2 a 7) para la oxidación electroquímica de la dipirona, para ello se preparó una disolución de KCl 0.1M conteniendo  $1 \times 10^{-3}$ M de dipirona y el pH de las soluciones se ajustó añadiendo gotas de HCl 1M. Finalmente se burbujeó la solución con nitrógeno por 2 minutos previos a las mediciones.

#### 6.3.4.2 Evaluación del efecto de la velocidad de barrido

Se analizó los voltamogramas cíclicos de la dipirona a diferentes velocidades de barrido (0.05 – 0.2 V/s).

Se preparó una disolución de KCl 0.1M conteniendo  $1 \times 10^{-3}$ M de dipirona y se ajustó a pH 4 añadiendo gotas de HCl 1M.

Se burbujeó la solución con nitrógeno por 2 minutos previos a las mediciones

#### 6.3.4.3 Evaluación del efecto de la concentración

Se evaluó el efecto de la concentración, se midió la intensidad de corriente del pico de oxidación de la dipirona usando voltametría cíclica a concentraciones desde  $8 \times 10^{-5}$  hasta  $5 \times 10^{-3}$  mol/L disueltos en KCl 0.1M a pH 4. Se realizó 3 lecturas de cada concentración.

Condiciones de trabajo:

- Rango de voltaje: -0.7 hasta 1V vs. SCE
- Velocidad de barrido: 0.05V/s

#### 6.3.5 Caracterización de variables analíticas

##### 6.3.5.1 Evaluación del parámetro linealidad

A partir de los datos anteriores se determinó el rango lineal y se construyó la curva de calibración. Se determinó la ecuación de la recta y se evaluó la linealidad de los datos mediante el coeficiente de correlación que para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor a 0.99 (DUFFAU, Boris 2010:21-49).

Se realizó la prueba de normalidad de los residuos de la curva de calibrado empleando el software Minitab 15.

##### 6.3.5.2 Determinación de límites

El límite de detección y el de cuantificación se determinaron experimentalmente.

Se evaluó el porcentaje de recuperación obtenida de los puntos más bajos de la curva de calibración. De acuerdo a los valores obtenidos, se eligió el valor mínimo detectable y el mínimo cuantificable con porcentaje de recuperación dentro del rango 80-120%.

Se realizó 6 mediciones del valor mínimo detectable y se calculó el límite de detección (LOD) y 6 mediciones del valor mínimo cuantificable y se calculó el límite de cuantificación (LOQ). Como criterio de aceptación es adecuado:  $LOD < LOQ$ .

Se realizó pruebas de t-Student 1 muestra en el software Minitab que permite probar que la media poblacional del conjunto de datos es igual al valor de referencia.

#### 6.3.5.3 Evaluación del parámetro selectividad

Para la prueba de selectividad se preparó 3 blancos que contenían concentraciones conocidas de interferentes y 3 estándares de concentración conocida de interferentes y dipirona.

Se compararon las respuestas obtenidas y se determinó que el pico obtenido corresponde a la dipirona.

#### 6.3.5.4 Evaluación de los parámetros repetibilidad y reproducibilidad

Para la repetibilidad se realizaron mediciones de un material de referencia de dipirona de concentración  $1 \times 10^{-3} M$  bajo las mismas condiciones (en un mismo electrodo modificado) durante 5 días continuos. Se calculó la desviación estándar ( $S_r$ ) y el porcentaje de coeficiente de variación ( $CV_r\%$ ).

Para la reproducibilidad, 5 electrodos diferentes fueron modificados bajo el mismo procedimiento en días distintos y se determinó la concentración de un material de referencia de dipirona en cada uno de ellos. Se calculó la desviación estándar ( $S_{ri}$ ) el porcentaje de coeficiente de variación ( $CV_{ri}\%$ ).

El criterio de aceptabilidad para la repetibilidad y la reproducibilidad será en base a coeficiente de variación de Horwitz.

$$CV_h\% = 2^{(1-0.5\text{Log}C)}$$

En donde:

C= valor nominal del analito expresado en potencia de 10

Para la repetibilidad:  $CV_r\% < (CV_h\%/2)$ .

Para la reproducibilidad:  $CV_{ri}\% < (2CV_h\%/3)$ .

#### 6.3.5.5 Evaluación de la veracidad del método

Para verificar la veracidad del método se compararon los resultados obtenidos por el método propuesto con los resultados de un método espectrofotométrico uv-vis estandarizado para la determinación de dipirona o también llamado sulpirina en la farmacopea japonesa (Japanese Pharmacopoeia 2016: 1444-1445).

Se prepararon 2 muestras con agua destilada enriquecidos con dipirona a concentraciones  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  y  $5 \times 10^{-4} \text{M}$ , estas fueron analizadas con el sensor propuesto y con el método espectrofotométrico uv-vis de referencia. El detalle del método de referencia se puede ver en el anexo 3.

Se realizó el análisis t de Student para muestras independientes en el software Minitab a un nivel de confianza de 95% para descartar la existencia de diferencias significativas entre las concentraciones calculadas por cada método. El criterio de aceptación es que el p-value de la prueba t para 2 muestras sea  $>0.05$ .

## 7. Resultados

### 7.1. Preparación de los electrodos modificados electroquímicamente poli (azul de metileno) /carbón vítreo

Luego del pretratamiento de los electrodos de carbón vítreo, estos fueron modificados mediante la técnica de voltametría cíclica en buffer fosfato  $0.1 \text{M}$  (pH8) y  $0.1 \text{M}$  de KCl, conteniendo  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  de azul de metileno en el rango de voltaje  $-0.75$  hasta  $1 \text{V}$  vs. SCE a velocidad de barrido:  $0.05 \text{V/s}$  por 30 ciclos. Algunas variables como velocidad de barrido, rango de potencial, electrolito soporte y solución buffer fueron elegidos de acuerdo a estudios previos (Barsan 2008, 3973-3982), (Zhao, 2009, 158-163).

El voltamograma se muestra en la figura 23.

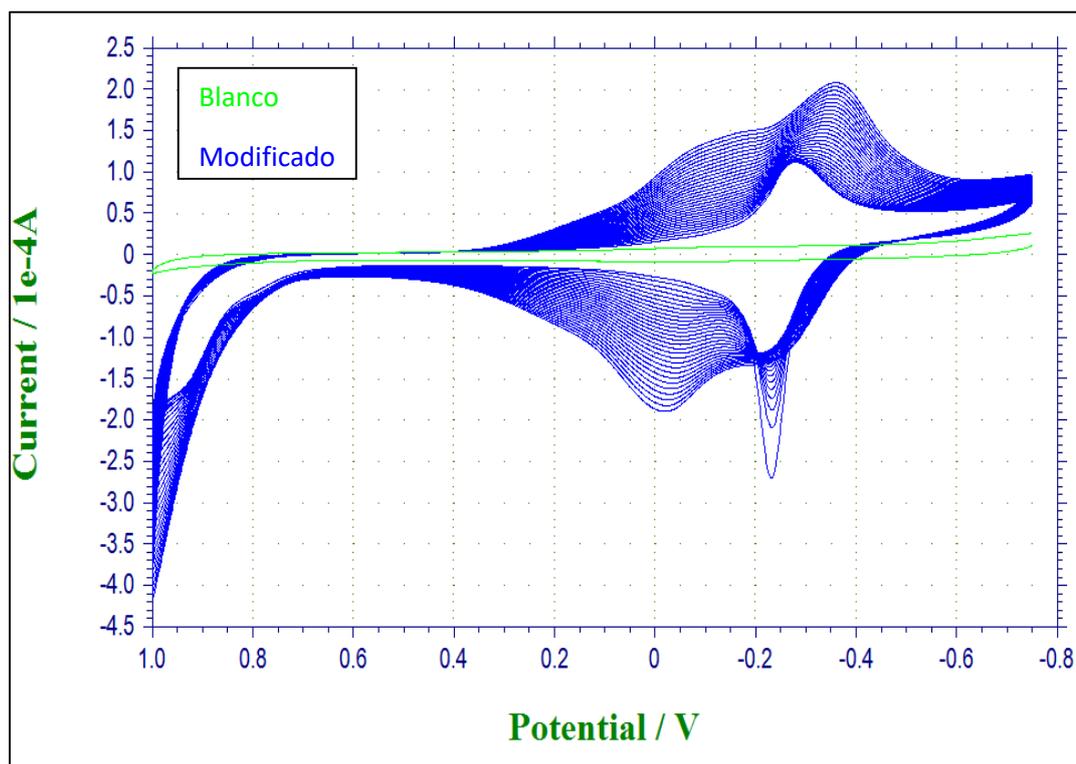


Figura 23. Voltamograma de electropolimerización del colorante azul de metileno para un electrodo modificado, obtenido por la técnica voltametría cíclica.

## 7.2. Caracterización de los electrodos modificados poli (azul de metileno) /carbón vítreo

### 7.2.1 Estimación de la cantidad de poli(azul de metileno) en la superficie del electrodo

Se calculó la cantidad de polímero electroactivo depositado por electropolimerización a pH básico. El cálculo se realizó usando la Ley de Faraday (ecuación 1) considerando que se transfieren  $2e^-$  en la reacción redox ver figura 9, y que el área geométrica del electrodo de trabajo es  $0.18\text{cm}^2$ .

$$N = \frac{Q}{nFA}$$

Cálculo

-  $Q = 2.811 \times 10^{-4} \text{C}$

-  $n = 2e^-$

- $A = 0.18\text{cm}^2$
- $F = 96500\text{ C/mol}$

$$N = \frac{2.811 \times 10^{-4} \text{ C}}{(2)(96500 \frac{\text{C}}{\text{mol}})(0.18 \text{ cm}^2)} = 8.09 \frac{\text{nmol}}{\text{cm}^2}$$

### 7.2.2 Caracterización de la morfología del electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo por microscopía electrónica de barrido

Se realizó la microscopía electrónica de barrido del electrodo modificado y del electrodo sin modificar. El electrodo sin modificar no presenta ningún tratamiento previo, mientras que el electrodo modificado presenta todos los tratamientos del punto 6.3.1. Además, se realizó el análisis de la composición elemental de las superficies mediante la espectroscopía de energía dispersada de rayos X (EDS), ver anexo 1 y 2.

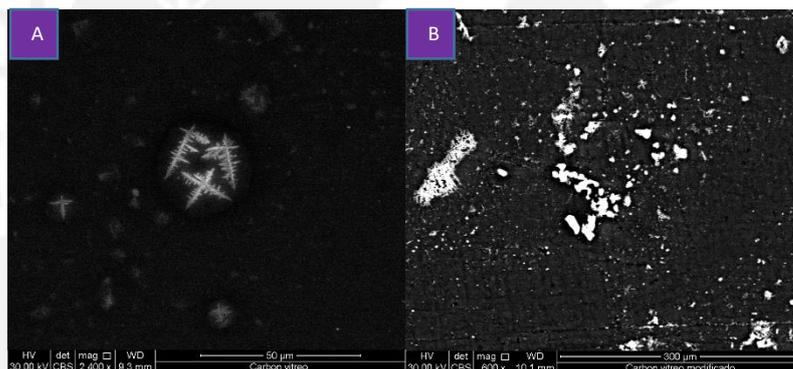


Figura 24. Micrografías SEM del electrodo de carbón vítreo (a) y poli (azul de metileno)/carbón vítreo (b)

### 7.2.3 Caracterización de la impedancia del electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo por espectroscopia de impedancia electroquímica

La impedancia o resistencia del electrodo modificado fue estudiado por espectroscopia de impedancia electroquímica en 0.1mol/L de KCl conteniendo 1.0 mmol/L  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  y 1.0 mmol/L  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . La figura 25 muestra un gráfico comparativo de Nyquist de un electrodo sin modificar de carbón vítreo y de un electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo.

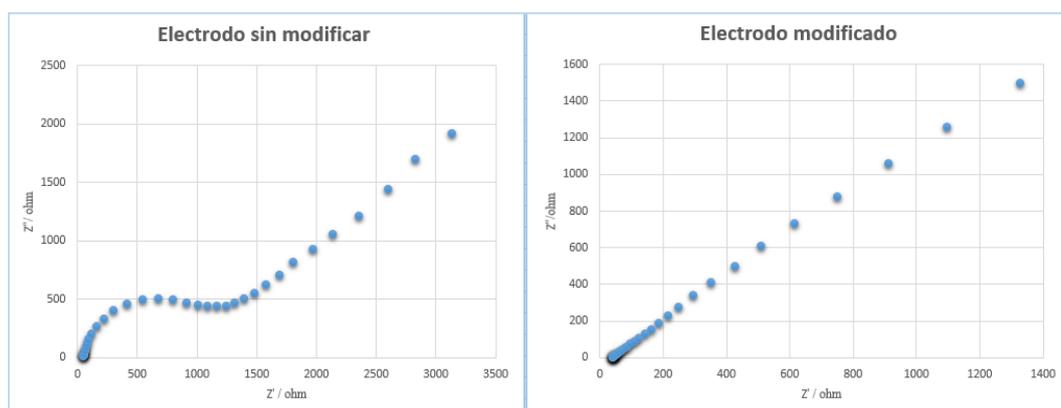


Figura 25. Espectro de impedancia del electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo y electrodo sin modificar de carbón vítreo, técnica empleada espectroscopia de impedancia electroquímica

### 7.3. Evaluación del comportamiento electroquímico de la dipirona en el electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo

La oxidación de la dipirona fue estudiada por voltametría cíclica para elucidar su comportamiento electroquímico. Las figuras 26 y 27 muestran los voltamogramas de un electrodo sin modificar y uno modificado en presencia de  $1 \times 10^{-3}$  mol/L de dipirona respectivamente.

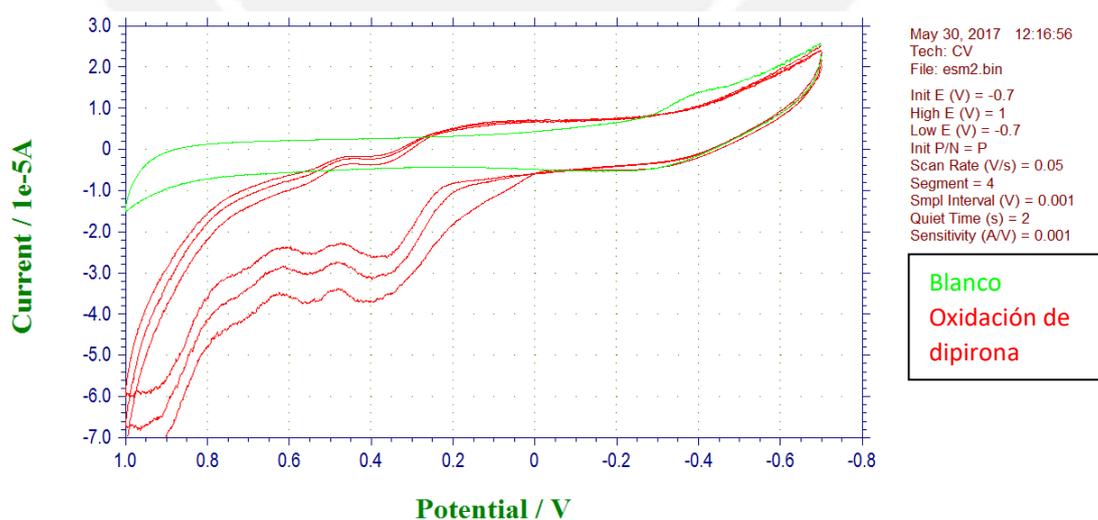


Figura 26. Voltamograma cíclico de  $1 \times 10^{-3}$  mol/L de dipirona en una solución de KCl 0.1M en un electrodo sin modificar

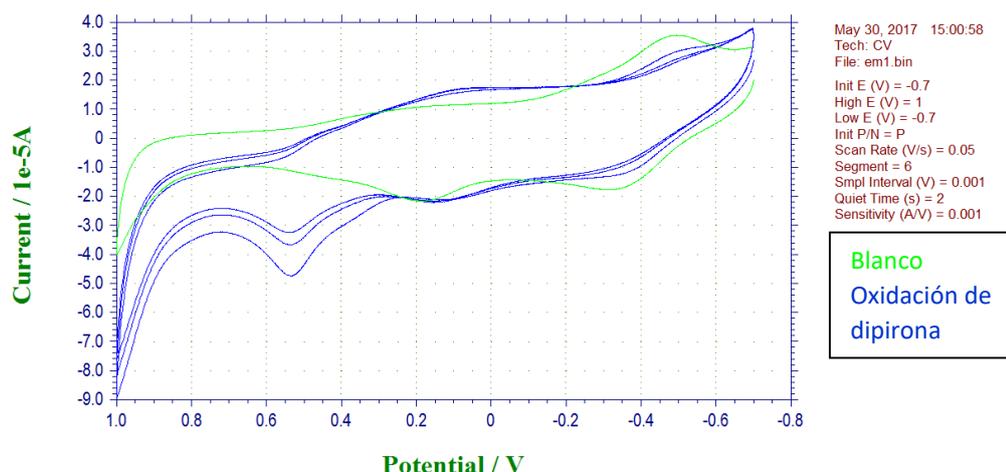


Figura 27. Voltamograma cíclico de  $1 \times 10^{-3}$  mol/L de dipirona en una solución de KCl 0.1M en un electrodo modificado

#### 7.4 Optimización de las condiciones de trabajo para la técnica CV

##### 7.4.1 Efecto del pH

En la figura 28 se presenta los voltamogramas cíclicos de  $1 \times 10^{-3}$  M de dipirona disuelto en electrolito 0.1M de KCl, variando el pH de 2 a 7. Los voltamogramas a pH más básicos se omitieron porque no presentaban señales de corriente significativas.

La tabla 2 muestra variables obtenidas de los voltamogramas para cada pH: potencial de oxidación  $E_o$  e intensidad de corriente anódica  $I_a$ .

La figura 29 muestra el efecto del pH en la  $I_a$ .

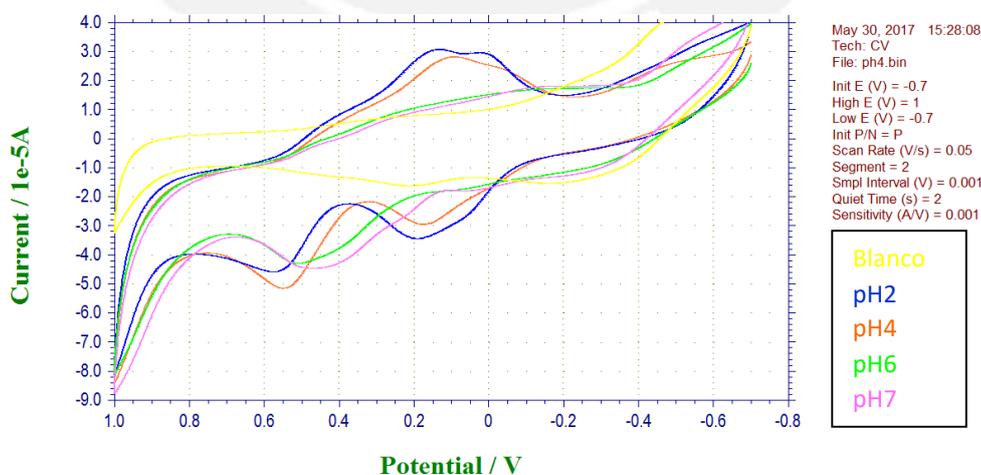


Figura 28. Efecto del pH en la corriente,  $I_a$ , al oxidar  $1 \times 10^{-3}$  M de dipirona

Tabla 2 .Variables obtenidas de los voltamogramas de pH

pH	$E_o$ (V)	$I_a$ (A)
2	0.57	$2.33 \times 10^{-5}$
4	0.55	$2.98 \times 10^{-5}$
6	0.50	$1.54 \times 10^{-5}$
7	0.43	$1.75 \times 10^{-5}$

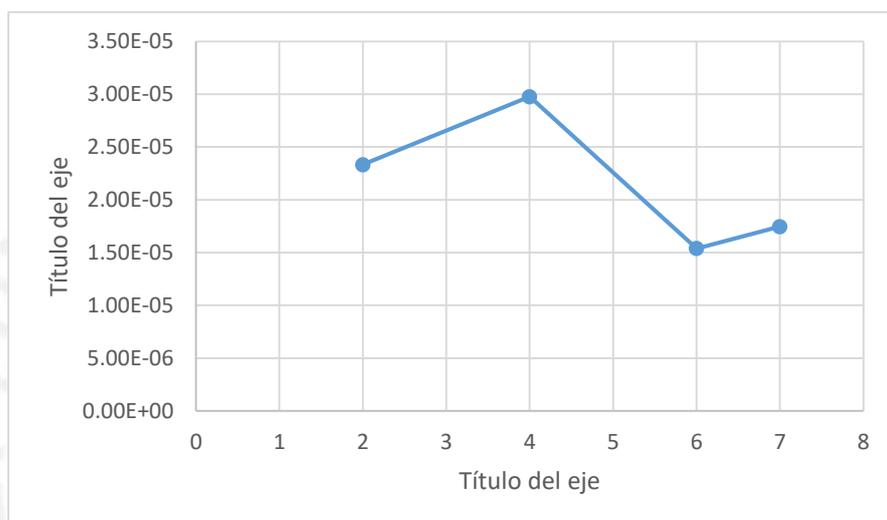


Figura 29. Efecto del pH en la intensidad de corriente anódica,  $I_a$ , de  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  de dipirona

#### 7.4.2 Efecto de la velocidad de barrido

En la figura 30 se presenta los voltamogramas cíclicos de  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  de dipirona disuelto en electrolito 0.1M de KCl a pH 4, variando la velocidad de barrido (0.05 hasta 0.2 V/s). Como se puede observar, la corriente de pico anódico de la dipirona incrementa con la velocidad de barrido, sin embargo, ésta no afecta el potencial de oxidación.

La figura 31 fue construida con los valores de intensidad de corriente anódica  $I_a$  para cada velocidad de barrido, en donde se aprecia una relación lineal entre  $I_a$  y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido  $v^{1/2}$  ( $r^2=0.9647$ ).

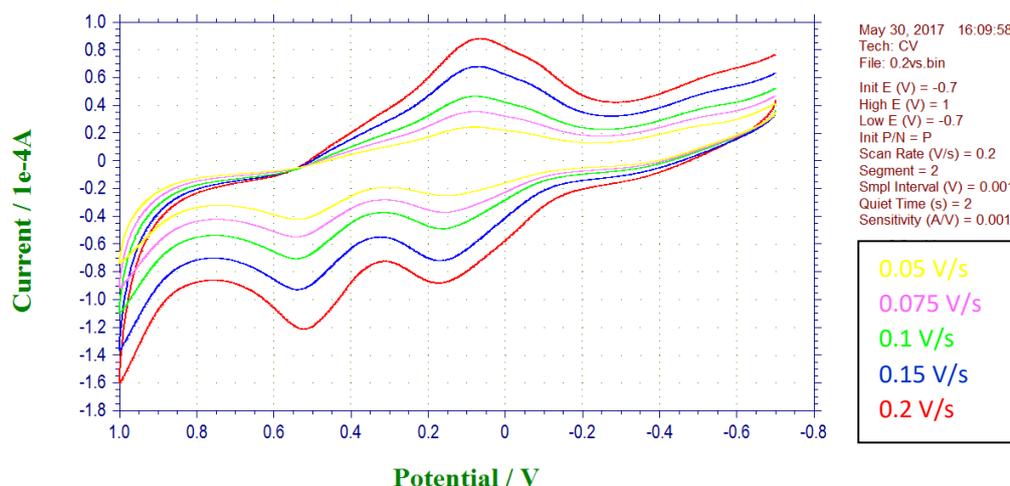


Figura 30. Efecto de la velocidad de barrido en la oxidación de la dipirona

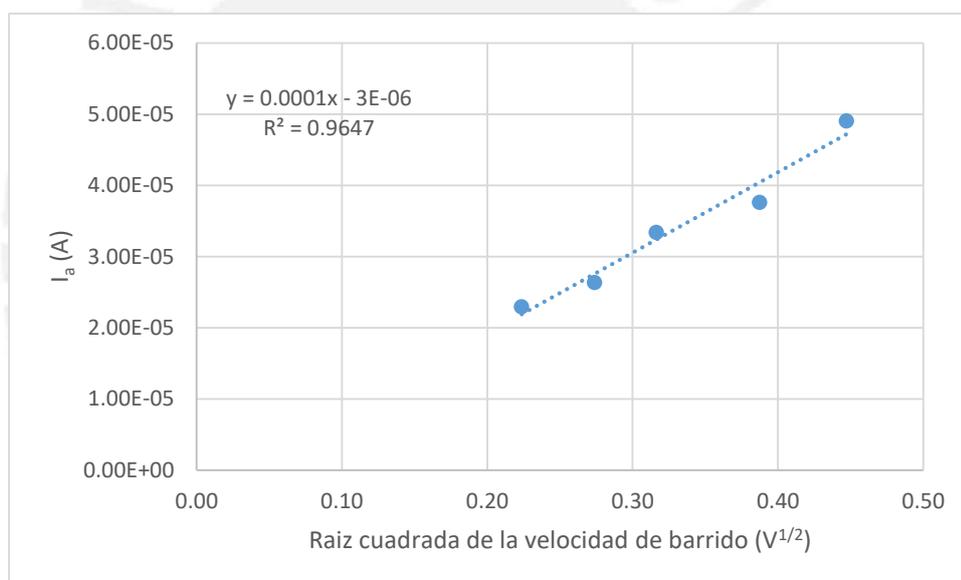


Figura 31. Gráfico de la corriente de pico anódica ( $I_a$ ) vs. la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $V^{1/2}$ )

#### 7.4.3 Efecto de la concentración

Mediante la técnica de voltametría cíclica se evaluó la intensidad de la corriente anódica de la dipirona a diferentes concentraciones ( $8 \times 10^{-5}$  hasta  $5 \times 10^{-3}$  mol/L), ver figura 32. Se observó un comportamiento lineal entre la concentración y la corriente anódica a potencial constante cercano a 0.54V. La mínima concentración que fue detectada en el voltamograma fue  $1 \times 10^{-4}$  mol/L.

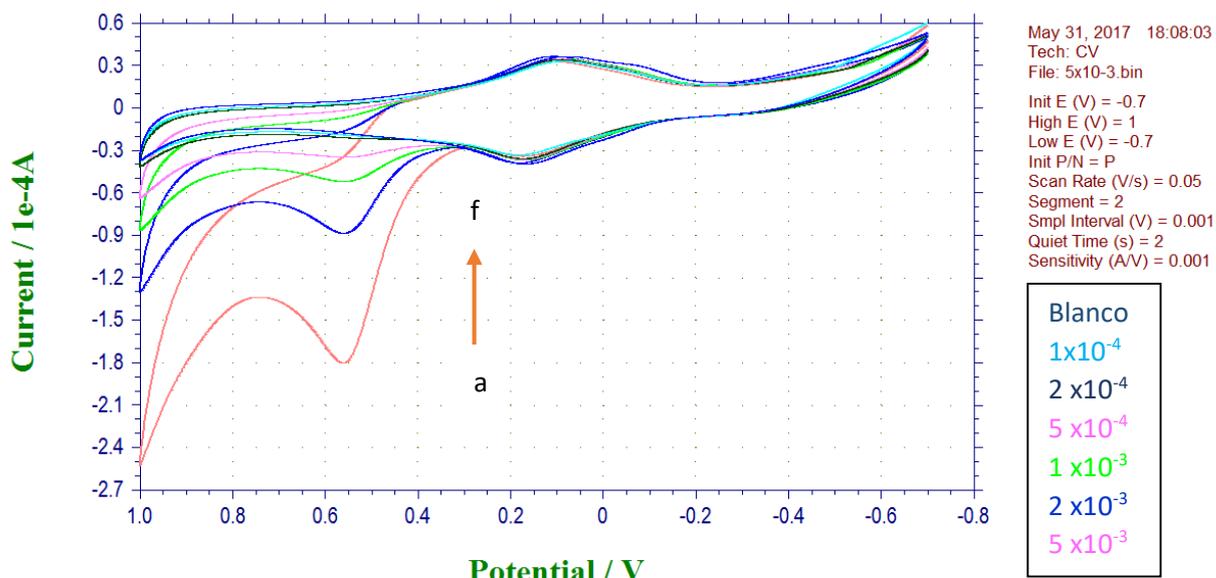


Figura 32. Voltamograma cíclico de la dipirona a diferentes concentraciones: (a)  $5 \times 10^{-3}$ ; (b)  $2 \times 10^{-3}$ ; (c)  $1 \times 10^{-3}$ ; (d)  $5 \times 10^{-4}$ ; (e)  $2 \times 10^{-4}$  mol/L; (f)  $1 \times 10^{-4}$  mol/L; (g) blanco

## 7.5 Evaluación de parámetros de validación del método para la cuantificación de dipirona

### 7.5.1 Linealidad

La tabla 3 se construyó a partir de los datos obtenidos de la figura 32, como potencial de oxidación  $E_o$  e intensidad de corriente anódica  $I_a$ . Además, se calculó el porcentaje de recuperación R% para cada concentración. A partir de estos datos se definió el rango lineal entre  $2 \times 10^{-4}$  -  $5 \times 10^{-3}$  M.

La figura 33 muestra la curva de calibración, la ecuación de la recta  $y = 0.026x - 4 \times 10^{-6}$  y el coeficiente de correlación ( $r^2=0.9994$ ).

La figura 34 muestra el análisis de normalidad para los residuos en donde la hipótesis nula es que los datos provienen de una distribución normal, el cual se corrobora con un p-value mayor a 0.05.

Tabla 3. Resultados de la curva de calibración

$E_o(V)$	$C \text{ mol/L}$	$I (A)$	R%
0.56	$5 \times 10^{-3}$	$1.26 \times 10^{-4}$	100.2
0.56	$1 \times 10^{-3}$	$2.44 \times 10^{-5}$	109.3
0.55	$5 \times 10^{-4}$	$8.15 \times 10^{-6}$	93.5
0.54	$2 \times 10^{-4}$	$1.28 \times 10^{-6}$	101.5
0.53	$1 \times 10^{-4}$	$8.82 \times 10^{-7}$	187.8

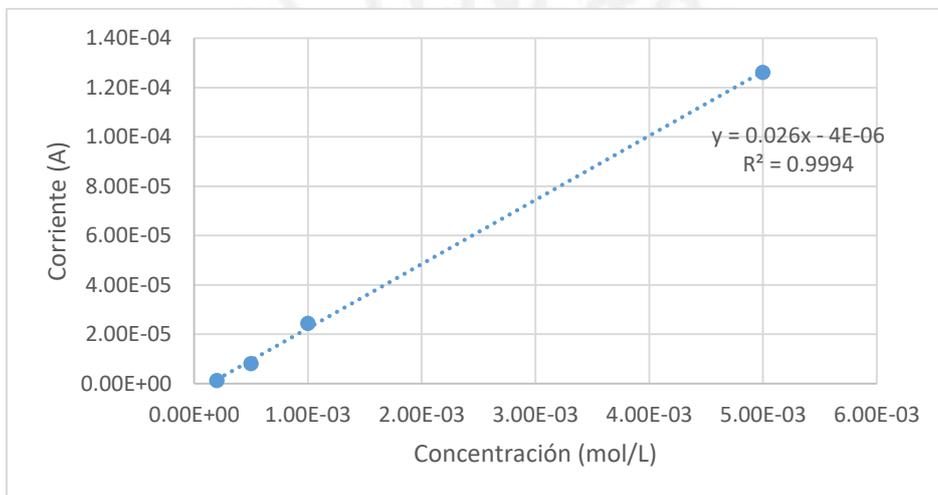


Figura 33. Curva de calibración

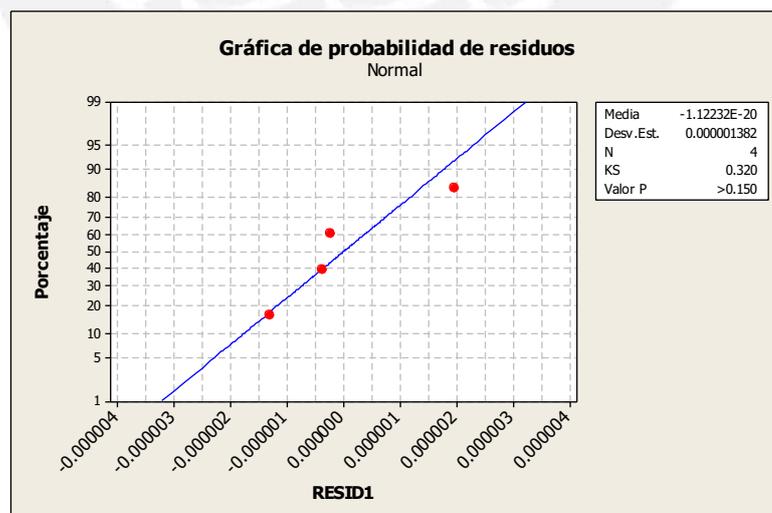


Figura 34. Gráfica de normalidad de los residuos realizado en el software Minitab 15

### 7.5.2 Límites

La figura 35 muestra los voltamogramas superpuestos para las concentraciones más bajas de dipirona, en donde se observa los picos alrededor de 0.54V muy cercanos al voltamograma del blanco.

Debido a que el blanco no puede ser medido, experimentalmente se definió el límite de detección y el límite de cuantificación.

la tabla 4 presenta 6 mediciones de las concentraciones más bajas de dipirona: ( $2 \times 10^{-4} \text{M}$  y  $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ). Adicionalmente se calculó el porcentaje de recuperación R%.

La figura 36 muestra los resultados de la prueba t-Student para una muestra con respecto al valor nominal de las concentraciones  $2 \times 10^{-4} \text{M}$  y  $1 \times 10^{-4} \text{M}$ .

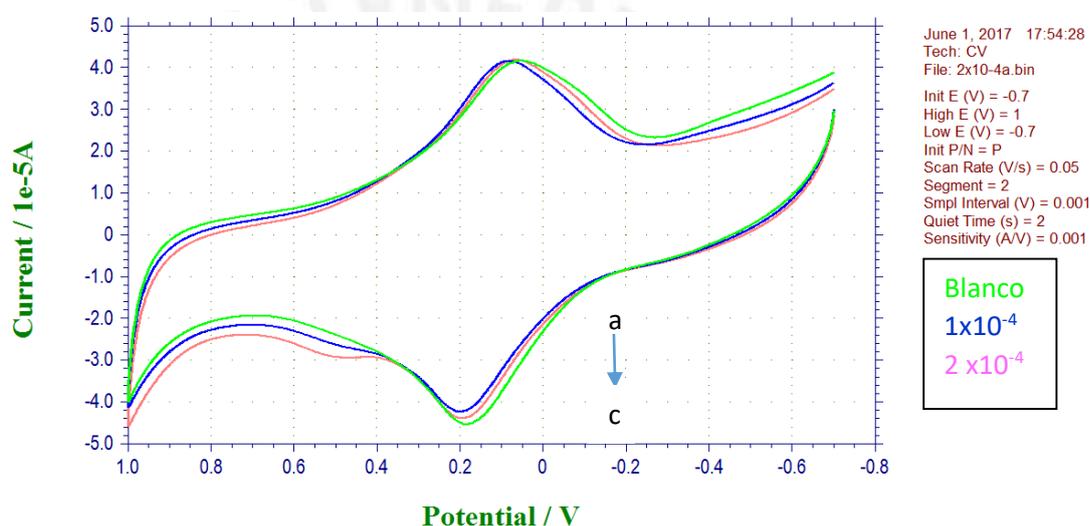


Figura 35. Superposición de los voltamogramas de las soluciones con dipirona:

(a)blanco; (b)  $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ; (c)  $2 \times 10^{-4} \text{M}$

Tabla 4. Datos para la determinación de límites

Medida	$2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$		$1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$	
	Concentración (mol/L)	Recuperación (%)	Concentración (mol/L)	Recuperación (%)
1	$1.85 \times 10^{-4}$	92.7	$1.76 \times 10^{-4}$	175.6
2	$2.03 \times 10^{-4}$	101.3	$1.74 \times 10^{-4}$	174.2
3	$2.22 \times 10^{-4}$	111.1	$1.76 \times 10^{-4}$	176.2
4	$2.26 \times 10^{-4}$	113.1	$1.74 \times 10^{-4}$	174.3
5	$2.25 \times 10^{-4}$	112.3	$1.75 \times 10^{-4}$	174.7
6	$1.95 \times 10^{-4}$	97.4	$1.74 \times 10^{-4}$	173.5

Variable	N	Media	Desv.Est.	Media del Error estándar	IC de 95%	T	P
$2 \times 10^{-4}$	6	0.000209	0.000017	0.000007	(0.000191, 0.000228)	1.32	<b>0.245</b>
Variable	N	Media	Desv.Est.	Media del Error estándar	IC de 95%	T	P
$1 \times 10^{-4}$	6	0.000175	0.000001	0.000000	(0.000174, 0.000176)	185.58	<b>0.000</b>

Figura 36. Resultados de la prueba t-Student 1 muestra. Software MINITAB

### 7.5.3 Repetibilidad

Se realizaron 5 mediciones diarias de  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  empleando un mismo electrodo, se tomaron los valores de intensidad de corriente anódica a potencial 0.54V. La tabla 5 resume los valores promedios por cada día de análisis.

La tabla 6 presenta los estadísticos de la repetibilidad en base a el coeficiente de variación de Horwitz.

Tabla 5. Resumen de las medidas de concentración de dipirona para prueba de repetibilidad

	Concentración real (mol/L)	R (%)
Día 1	$1.07 \times 10^{-3}$	107.0
Día 2	$9.98 \times 10^{-4}$	99.8
Día 3	$1.03 \times 10^{-3}$	103.0
Día 4	$1.02 \times 10^{-3}$	102.0
Día 5	$9.97 \times 10^{-4}$	99.7

Tabla 6. Estadísticos de la repetibilidad en base al coeficiente de variación de Horwitz

media	$1.02 \times 10^{-3}$ mol/L
$S_r$	$2.99 \times 10^{-5}$ mol/L
$CV_r\%$	2.92%
$CV_h\%$	6.62%

#### 7.5.4 Reproducibilidad

Se modificaron cinco electrodos de carbón vítreo con el mismo procedimiento que se indica en el punto 6.3.1.

Se determinó la concentración de un material de referencia de dipirona ( $1 \times 10^{-3}$ M), para ello, se tomaron los valores de intensidad de corriente anódica a potencial cercano a 0.54V. La tabla 7 resume los valores promedios por cada electrodo.

La tabla 8 presenta los estadísticos de la reproducibilidad en base a el coeficiente de variación de Horwitz.

Tabla 7. Resumen de las medidas de concentración de dipirona para prueba de reproducibilidad

	Concentración real (mol/L)	R (%)
Electrodo 1	$1.10 \times 10^{-3}$	110.0
Electrodo 2	$9.92 \times 10^{-4}$	99.2
Electrodo 3	$1.03 \times 10^{-3}$	103.0
Electrodo 4	$1.05 \times 10^{-3}$	105.0
Electrodo 5	$9.94 \times 10^{-4}$	99.4

Tabla 8. Estadísticos de la reproducibilidad en base al coeficiente de variación de Horwitz

Media	$1.03 \times 10^{-3}$ mol/L
$S_r$	$4.47 \times 10^{-5}$ mol/L
$CV_r\%$	4.33
$CV_h\%$	6.62

### 7.5.5 Selectividad

Se realizó la prueba de selectividad de la dipirona en presencia de un interferente (L-ácido ascórbico). Se analizó 3 blancos que contenían  $1 \times 10^{-3}$ M de L-ácido ascórbico y 3 tres estándares que contenían  $1 \times 10^{-3}$ M de L-ácido ascórbico y  $1 \times 10^{-3}$ M de dipirona.

La figura 37 muestra los voltamogramas superpuestos del blanco que contiene  $1 \times 10^{-3}$ M de L-ácido ascórbico y del estándar que contiene  $1 \times 10^{-3}$ M de L-ácido ascórbico y  $1 \times 10^{-3}$ M de dipirona, de color verde y azul respectivamente.

La tabla 9 presenta las concentraciones calculadas de dipirona en presencia del interferente y su porcentaje de recuperación R%.

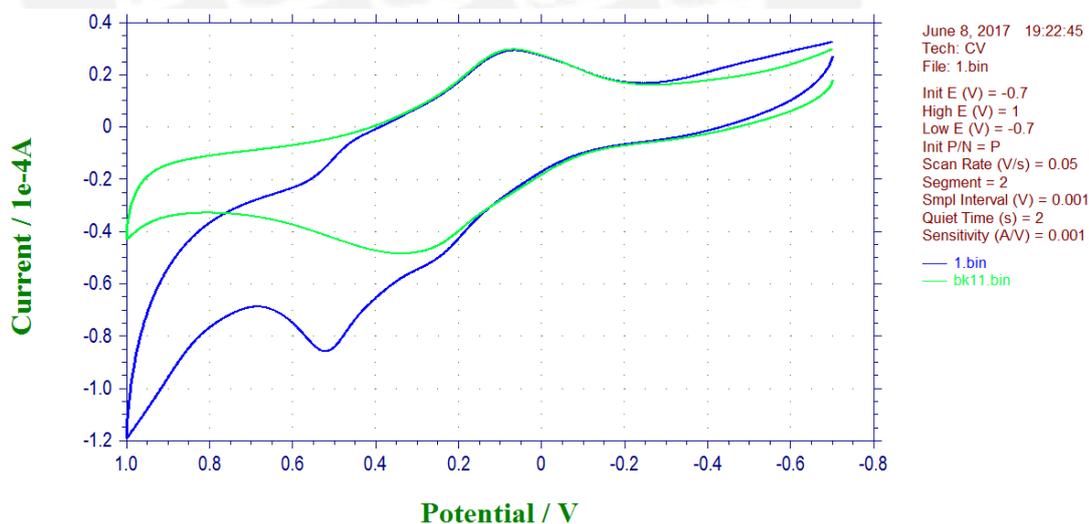


Figura 37. Prueba de selectividad del método: (verde) blanco que contiene  $1 \times 10^{-3}$ M de L-ácido ascórbico; (azul) estándar que contiene  $1 \times 10^{-3}$ M de L-ácido ascórbico y  $1 \times 10^{-3}$ M de dipirona

Tabla 9. Datos para la selectividad de dipirona  $1 \times 10^{-3} \text{M}$

Medida	$1 \times 10^{-3} \text{mol/L}$	
	Concentración (mol/L)	Recuperación( %)
1	$6.86 \times 10^{-4}$	68.6
2	$7.63 \times 10^{-4}$	76.3
3	$7.24 \times 10^{-4}$	72.4

#### 7.5.6 Veracidad

La veracidad del método se verificó comparando los resultados obtenidos por el método propuesto con el sensor poli(azul de metileno)/carbón vítreo y el método espectrofotométrico uv-vis para la detección de dipirona de la farmacopea japonesa (ver anexo 3).

Se prepararon 2 muestras de agua destilada que contenían  $1 \times 10^{-3}$  y  $5 \times 10^{-4}$  M de dipirona.

La tabla 10 muestra los promedios de los resultados obtenidos por cada método y los p-value de la prueba estadística t-Student para 2 muestras independientes.

Tabla 10. Comparación de los valores obtenidos de dipirona en muestras de agua por adición usando el método voltamétrico propuesto y el método de referencia

Concentración nominal de las muestras que contienen dipirona	Método voltamétrico propuesto (mol/L)	Método uv vis estandarizado (mol/L)	p-value
$1 \times 10^{-3}$ mol/L	$9.62 \times 10^{-4}$	$9.65 \times 10^{-4}$	0.397
$5 \times 10^{-4}$ mol/L	$4.72 \times 10^{-4}$	$4.70 \times 10^{-4}$	0.666

\*Las mediciones para cada método se realizaron por triplicado

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 8.1 Preparación de los electrodos modificados electroquímicamente poli (azul de metileno) /carbón vítreo

En la figura 23 se presenta el perfil voltamétrico del polímero del azul de metileno. Para el primer ciclo se observó 2 picos bien definidos correspondientes a la oxidación y reducción del azul de metileno a -0.23V y -0.27V respectivamente, que con el incremento de ciclos fue disminuyendo su intensidad, además un nuevo par de picos redox apareció alrededor de -0.02V (oxidación) y -0.36V (reducción) haciéndose cada vez más irreversible.

El primer pico de oxidación que apareció corresponde a la oxidación del monómero (-0.23V) y el segundo pico de oxidación que apareció corresponde a la formación del polímero (-0.02V). Adicionalmente, se observa un pico en la región alrededor de 1.0 V que corresponde a la formación de las especies catiónicas radicalarias según como reportan otros autores (Karyakin 1998, 149-155), (Barsan 2008, 3973-3982).

Los resultados indican que se formó un film polimérico de azul de metileno en la superficie del electrodo y que el grosor aumenta con el número de ciclos, mientras que físicamente la superficie del electrodo cambió de un color negro opaco del carbón vítreo a un color negro brillante característico del polímero.

De acuerdo a la referencia (KARYAKIN 1998, 149-155), la electropolimerización del azul de metileno se debe a la condensación oxidativa de los fragmentos aromáticos de fenotiazina y la desmetilación parcial de los grupos laterales dimetilamino, ver figura 11.

### 8.2. Caracterización de los electrodos modificados poli (azul de metileno) /carbón vítreo

#### 8.2.1. Estimación de la cantidad de poli(azul de metileno) en la superficie del electrodo

La cantidad aproximada de polímero electroactivo depositado fue de 8.09nmol/cm<sup>2</sup> como fue calculado en el punto 7.2.1, este valor fue contrastado con otros trabajos en donde electropolimerizan azul de metileno en diferentes solventes de pH básico como se muestra en la tabla 11. Revela una buena película de poli(azul de metileno) sobre la superficie del electrodo. Por tanto, se podría predecir una buena estabilidad química y física durante las mediciones electroquímicas.

Tabla 11. Cantidad de moles de monómero de azul de metileno obtenido por voltametría cíclica

Autores	Solvente	Cantidad de poli(azul de metileno) depositado
Costa Marinho, María y otros	buffer fosfato 0.05M y NaNO <sub>3</sub> 0.1M (pH8)	7.9 nmol/cm <sup>2</sup>
Barsan, Madalina M. y otros	0.025M borato y 0.1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH9.2)	10.5 nmol/cm <sup>2</sup>
Este trabajo	buffer fosfato 0.1M y 0.1M de KCl (pH8)	8.09nmol/cm <sup>2</sup>

### 8.2.2. Caracterización de la morfología del electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo por microscopía electrónica de barrido

Microscopía electrónica de barrido (SEM) fue usada para caracterizar y comparar la morfología de los electrodos de carbón vítreo y poli (azul de metileno) /carbón vítreo como se aprecia en la figura 24.

En la figura (24a) se aprecia una superficie uniforme y cristales en forma de dendritas distribuidos aleatoriamente. Según la información elemental obtenida de los espectros del EDS, las zonas negras están compuestas por carbono al 100% y las dendritas de color blanco estarían compuestas en su mayoría por C y en menor proporción O, cloro (Cl), sodio (Na) y potasio (K) que serían impurezas de la fabricación, ver anexo 1.

En la figura (24b) se muestran el SEM del electrodo modificado poli (azul de metileno)/carbón vítreo de diferente textura al electrodo de carbón vítreo que se debe a los pretratamientos de pulido y acumulaciones blancas dispersas en toda la superficie que representa al poli( azul de metileno), esto se comprueba con los espectros EDS, que para las manchas blancas se obtiene carbono (C) y O en mayor proporción y azufre (S) en menor proporción, según la figura 8 del azul de metileno contiene S en su composición elemental, lo que indica que el azul de metileno se habría electropolimerizado en la superficie del electrodo de carbón vítreo, ver anexo 2.

### 8.2.3. Caracterización de la impedancia del electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo por espectroscopia de impedancia electroquímica

Las características interfaciales del electrodo modificado Poli(azul de metileno) fueron estudiadas por espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) en una solución de KCl 0.1M que contenía 0.1mmol de  $K_4Fe(CN)_6$  y  $K_3Fe(CN)_6$  a potencial aplicado de 0.2V (vs. SCE). La amplitud de perturbación fue 0.01V y el rango de frecuencias fue 0.1 – 1000 Hz. En EIS el diámetro del semicírculo representa la resistencia a la transferencia de electrones ( $R_{et}$ ), que está relacionada a la cinética de transferencia de electrones del par redox en solución. La figura 25 muestra el espectro de impedancia de un electrodo de carbón vítreo sin modificar y de un electrodo modificado poli(azul de metileno)/ECV. Para el electrodo sin modificar se aprecia un semicírculo con un valor de  $R_{et}$  1000 ohm a altas frecuencias, por tanto, se infiere que la transferencia de electrones es difícil en la superficie electrodo/solución. Mientras que para el electrodo modificado poli(azul de metileno)/ECV se observa una línea recta, por tanto se infiere que el proceso de transferencia de electrones es bueno y que está controlado por difusión a bajas frecuencias. Los resultados mostraron que el film poli(azul de metileno) exhibe buena conductividad y capacidad de transferencia de electrones en la superficie electrodo/solución.

### **8.3. Evaluación del comportamiento electroquímico de la dipirona en el electrodo modificado poli (azul de metileno) /carbón vítreo**

En la figura 26 se aprecia la oxidación electroquímica de la dipirona  $1 \times 10^{-3}M$  en el electrodo sin modificar en una solución de KCl 0.1M y está representado por los picos anódicos irreversibles a 0.40V (pico1), 0.56V (pico 2) y un tercer pico a 0.72V casi invisible vs. SCE, y con el incremento de ciclos, la corriente de oxidación fue disminuyendo. Estos picos de oxidación se deben a los productos de degradación de la dipirona como se muestra en la figura 38. La etapa de oxidación más fácil es la pérdida del grupo sulfito y la etapa siguiente es la oxidación del grupo metilo del nitrógeno del metil amino y su oxidación a un metil metanal o a una reducción a una amina simple (Pauliukaite 2010: 590-598).

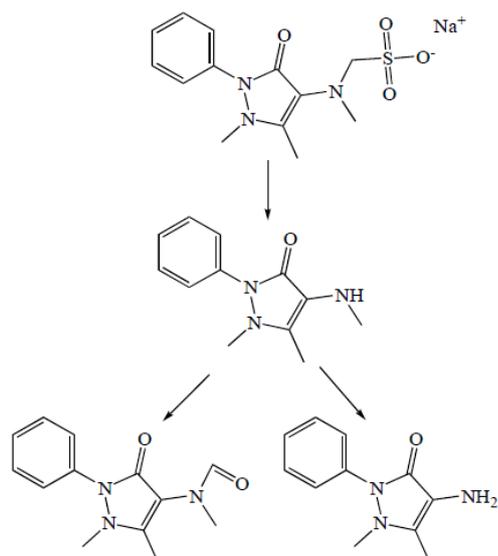


Figura 38. Posible degradación de la dipirona (Pauliukaite 2010: 590-598)

Por otro lado, la figura 27 muestra la oxidación electroquímica de la dipirona  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  en el electrodo modificado. Se observa un solo pico de oxidación a  $0.54 \text{V vs. SCE}$  que con el incremento de los ciclos la intensidad de corriente de oxidación fue disminuyendo. La presencia de solo un pico de oxidación podría deberse a que el electrodo no es suficientemente sensible para capturar diferencias en la estructura de la dipirona y sus productos de oxidación. Sin embargo, presenta un pico de oxidación más definido que corresponde a la oxidación total de la dipirona en solución.

En la figura 39 se muestra el proceso que ocurre en la interfase electrolito/electrodo y dentro del film polimérico de azul de metileno por oxidación de la dipirona. La dipirona difunde hasta la superficie del electrodo y se oxida transfiriendo 2 electrones al polímero de azul de metileno que se obtuvo electroquímicamente. El polímero de azul de metileno se oxida y transfiere los 2 electrones al electrodo de carbón vítreo.

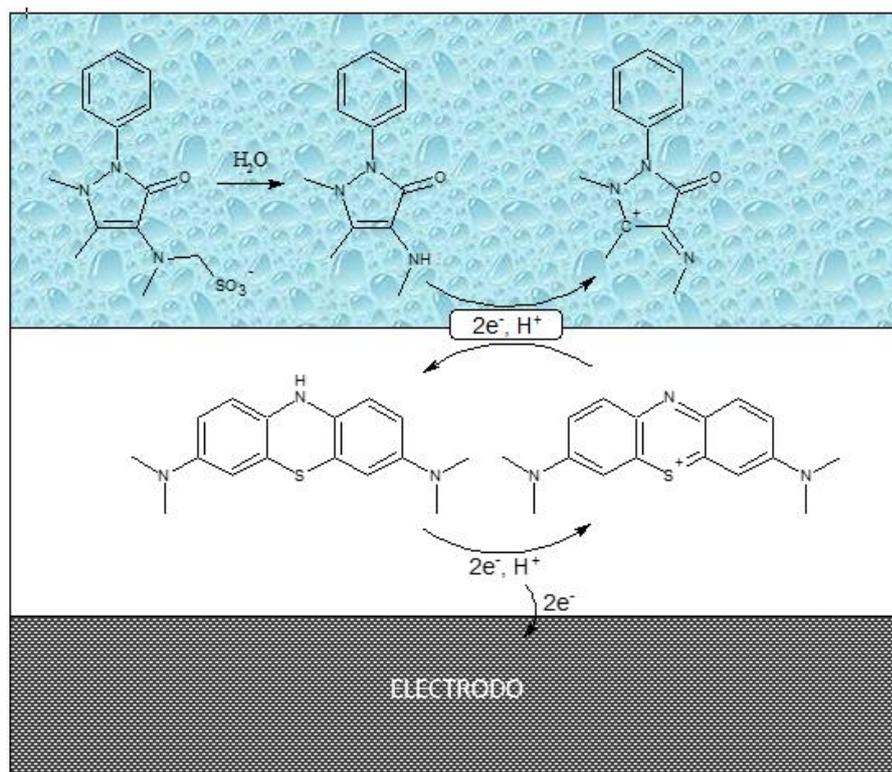


Figura 39. Representación del proceso que ocurre en la interfase electrolito/electrodo y dentro del film polimérico de azul de metileno por oxidación de la dipirona. Adaptación de mecanismo de oxidación de la dipirona. (2012: Buoro, Rafael y otros)

#### 8.4. Optimización de las condiciones de trabajo para la técnica CV

##### 8.4.1. Efecto del pH

El efecto del pH en la corriente de oxidación de la dipirona fue estudiado en el rango pH 2-7 manteniendo constante la velocidad de barrido en 0.05mV/s y la concentración a  $1 \times 10^{-3} \text{M}$ . Como se aprecia en la figura 28, la intensidad de corriente de pico anódico de la dipirona es afectado por la variación del pH, por lo tanto debe ser controlado ya que afecta la sensibilidad y la conductividad del poli(azul de metileno) en las mediciones. En la tabla 2 se observa que el potencial de pico se desplaza a valores más negativos mientras aumenta el pH.

En la figura 29, se observa que la máxima corriente de pico fue a pH 4 y fue seleccionado para los siguientes experimentos.

##### 8.4.2. Efecto de la velocidad de barrido

En la figura 30 se observa el voltamograma cíclico de la dipirona a diferentes velocidades de barrido (0.05 hasta 0.2 V/s), se mantuvo constante los parámetros de pH 4 y concentración de

dipirona  $1 \times 10^{-3} \text{M}$ . La corriente de pico anódico incrementa proporcionalmente con la velocidad de barrido y además no afecta al potencial de oxidación que se mantiene alrededor de 0.54V.

En la figura 31 se construyó una gráfica corriente de pico anódico vs. la raíz de la velocidad de barrido, se observa que mantienen una relación lineal con un coeficiente de correlación ( $r^2=0.96$ ). Este resultado indica que la reacción de oxidación de la dipirona usando el electrodo modificado poli(azul de metileno)/ECV se da por un proceso de difusión (Skoog 2008: 716-757).

#### 8.4.3. Efecto de la concentración

La figura 32 muestra el efecto de la concentración de la dipirona sobre la intensidad de corriente anódica empleando la técnica voltametría cíclica, en ella se aprecia un comportamiento lineal entre la concentración y la corriente anódica a potencial constante cercano a 0.54V.

### 8.5. Evaluación de parámetros de validación del método para la cuantificación de dipirona

#### 8.5.1. Linealidad

Bajo condiciones óptimas de trabajo se empleó la técnica voltametría cíclica para la determinación de dipirona. El método propuesto mantiene linealidad desde  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  hasta  $5 \times 10^{-3} \text{M}$ , pero se define como rango de trabajo desde  $2 \times 10^{-4} \text{M}$  hasta  $5 \times 10^{-3} \text{M}$ , debido a que el porcentaje de recuperación para concentraciones inferiores a  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  presentan valores muy altos, ver tabla 3.

La gráfica de calibración se muestra en la figura 33, en donde se observa la linealidad de la concentración de la dipirona vs. la intensidad de corriente de oxidación de la dipirona. El coeficiente de correlación es 0.9994 y la concentración de la dipirona es determinada por la ecuación  $I_{pa} = 0.026C_{dip} - 4 \times 10^{-6}$

La figura 34 muestra la prueba de normalidad de los residuos de la curva de calibrado en donde el p-value fue 0.15, por lo tanto, no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula. Los datos provienen de una distribución normal.

### 8.5.2.Límites

En la figura 35 se muestra el voltamograma comparativo de las concentraciones  $1 \times 10^{-4}$  M y  $2 \times 10^{-4}$  M. Presentan intensidades de corriente de oxidación muy cercanas al blanco. En la tabla 4, se fijó el valor mínimo detectable en  $1 \times 10^{-4}$  M debido a que presentaba porcentaje de recuperación fuera del rango de recuperación 80-120% y como mínimo valor cuantificable se fijó a  $2 \times 10^{-4}$  M con porcentaje de recuperación dentro del rango aceptable.

Adicionalmente se realizó la prueba de t-Student de una muestra para contrastar que la media de los datos para ambas concentraciones es igual a su valor de referencia. La figura 36 muestra los resultados obtenidos de la prueba t-Student en donde se observa que el p-value para la concentración  $2 \times 10^{-4}$  M (0.245) es mayor que el nivel de significancia (0.05), entonces se concluye que el promedio de los datos es  $2 \times 10^{-4}$  M al 95% de confianza. Por otro lado, para la concentración  $1 \times 10^{-4}$  M el p-value está por debajo del nivel de significancia y por lo tanto el promedio de datos no es igual a su valor nominal.

Los valores seleccionados cumplen con el criterio de aceptación:  $LOD < LOQ$

Finalmente, los límites quedaron fijados en los siguientes valores:

- Límite de detección LOD:  $1 \times 10^{-4}$  M
- Límite de cuantificación LOQ:  $2 \times 10^{-4}$  M

Tabla 12. Caracterización analítica del método voltamétrico empleando el electrodo modificado con poli(azul de metileno)/carbón vítreo en comparación con otros trabajos

	Electrodo modificado con poli(azul de metileno)/carbón vítreo (este trabajo)	Electrodo de carbón vítreo. <sup>54</sup>	Electrodo de pasta de carbono con niobato de estroncio potásico dopado con níquel ( $KSr_2Ni_{0.75}Nb_{4.25}O_{15}$ ). <sup>15</sup>	Electrodos de película de carbono con polímero de tionina y nanotubos de carbono. <sup>21</sup>
$r^2$	0.9994	0.993	0.9994	-
Límite de detección (M)	$1 \times 10^{-4}$	$8.1 \times 10^{-6}$	$5.1 \times 10^{-6}$	$13.4 \times 10^{-6}$
Rango lineal (M)	$2 \times 10^{-4} / 5 \times 10^{-3}$	$1.5 \times 10^{-5} / 1.5 \times 10^{-3}$	$3.5 \times 10^{-5} / 3.1 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^{-4} / 2.5 \times 10^{-3}$

Los resultados obtenidos de las pruebas de validación hasta el momento se resumen en la tabla 12, en donde se aprecia que el método propuesto con el electrodo modificado con poli(azul de metileno)/carbón vítreo presenta buena correlación lineal, sin embargo, el límite de detección no es muy bajo en comparación con otros trabajos, esto se puede deber a que la técnica de voltametría cíclica no es muy recomendable para cuantificación ya que no es una técnica tan sensible como la voltametría de onda cuadrada o diferencial de pulsos.

#### 8.5.3.Repetibilidad

Para las pruebas de repetibilidad se realizaron 5 medidas de  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  de dipirona en días distintos. Se calculó su valor medio, desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación  $CV_r\%$  y  $CV_h\%$  como se indica en las ecuaciones 5,6 y 7.

Se estableció como criterio de aceptación  $CV_r\% < (CV_h\%/2)$ , según como se aprecia en la tabla 6, se cumple que el  $CV_r\%$  es menor que la mitad de  $CV_h\%$  y que los valores están dentro del rango de recuperación establecido 80-120%. Por tanto, se concluye que los valores son homogéneos.

#### 8.5.4.Reproducibilidad

Para las pruebas de reproducibilidad se prepararon cinco electrodos modificados y se midió la concentración  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  de dipirona en cada uno de ellos. Se calculó su valor medio, desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación  $CV_{ri}\%$  y  $CV_h\%$ .

Se estableció como criterio de aceptación  $CV_r\% < (2CV_h\%/3)$ , según como se aprecia en la tabla 8, se cumple que el  $CV_r\%$  es menor que los dos tercios de  $CV_h\%$  y que los valores están dentro del rango de recuperación establecido 80-120%. Por tanto, se demostró la reproducibilidad de la respuesta analítica.

#### 8.5.5.Selectividad

Para la prueba de selectividad, en la figura 37 se puede observar el pico de oxidación de la dipirona en 0.52V de color azul y un pico de menor intensidad a 0.3V correspondiente a la oxidación del L-ascórbico. En la tabla 9 a se aprecia que los porcentajes de recuperación de la dipirona están un poco fuera del rango establecido alrededor de 72%, así se deduce que el

método determina dipirona, sin embargo, en presencia de otro fármaco de igual concentración el rendimiento puede verse disminuido.

Con las pruebas de repetibilidad, reproducibilidad y selectividad realizadas se puede inferir que el método propuesto con el electrodo modificado con poli(azul de metileno)/carbón vítreo presenta alta estabilidad por largo tiempo, sin embargo, es de baja selectividad para la dipirona ya que puede identificar señales de otros compuestos redox como es el caso de l-ácido ascórbico.

#### 8.5.6.Veracidad

Para verificar la veracidad se comparó los resultados obtenidos del método voltamétrico propuesto con el electrodo modificado poli(azul de metileno)/carbón vítreo y el método espectrofotométrico de la farmacopea japonesa para la determinación de dipirona (ver anexo 3).

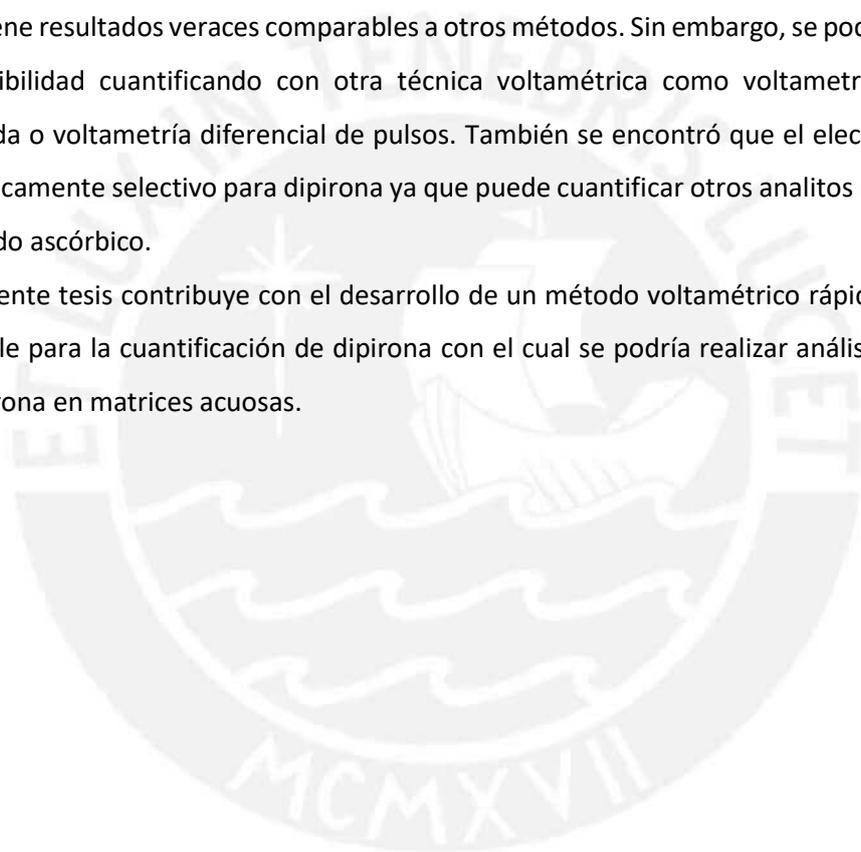
La tabla 10 resume las concentraciones de dipirona calculadas para cada método y se puede apreciar que son bastante cercanas entre ellas y al valor nominal de las muestras  $1 \times 10^{-3}$  y  $5 \times 10^{-4}$  M. En el software Minitab se evaluó la prueba t-Student para dos muestras independientes considerando como hipótesis nula que no hay diferencia significativa entre las medias de los resultados de los dos métodos. El criterio de aceptación es que el p-value obtenido sea mayor del nivel de significancia 0.05, en donde para las muestras de concentración  $1 \times 10^{-3}$  M fue 0.397 y para  $5 \times 10^{-4}$  M fue 0.666, por ende, se acepta la hipótesis nula. En resumen, el método propuesto presenta resultados veraces.

## 9. Conclusiones

La modificación del electrodo de carbón vítreo con polímero electroactivo de azul de metileno mejoró la intensidad de corriente de oxidación de dipirona para su cuantificación, ya que en los espectros de voltametría cíclica, la electrólisis de la dipirona se mostró como un pico intenso de oxidación a 0.54V irreversible, mientras que en un electrodo sin modificar se obtuvieron varios picos oxidación de la dipirona con presencia de ruido y de baja intensidad de corriente. Además, con las pruebas de EIS se pudo apreciar que el polímero de azul de metileno mejora la conductividad en la superficie del electrodo.

La presente propuesta metodológica para la cuantificación de dipirona empleando un electrodo modificado poli(azul de metileno)/carbón vítreo es reproducible, de bajo costo y se obtiene resultados veraces comparables a otros métodos. Sin embargo, se podría mejorar la sensibilidad cuantificando con otra técnica voltamétrica como voltametría de onda cuadrada o voltametría diferencial de pulsos. También se encontró que el electrodo no es específicamente selectivo para dipirona ya que puede cuantificar otros analitos redox como el L-ácido ascórbico.

La presente tesis contribuye con el desarrollo de un método voltamétrico rápido, simple y confiable para la cuantificación de dipirona con el cual se podría realizar análisis de trazas de dipirona en matrices acuosas.



## Bibliografía

- (1) ALVES, María A.  
2009. Técnicas electroquímicas para la determinación y especiación de arsénico en aguas. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos. Argentina: Editorial CYTED, pp.185-188
- (2) ANDRADE, S. y otros.  
2016. "Safety of metamizole: a systematic review of the literatura". Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. Vol. 41, pp. 459-477. Consulta: 30 de agosto del 2016.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcpt.12422/abstract>
- (3) ARCILA, Heriberto y otros  
2004. "Consenso de un grupo de expertos mexicanos. Eficacia y seguridad del Metamizol (Dipirona)". Gaceta médica de México. Vol. 144, número 1, pp. 99-101. Consulta: 24 de junio del 2016  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0016-38132004000100019](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132004000100019)
- (4) BARD, Allen J.  
1983. "Chemical Modification of Electrodes". Journal of Chemical Education. Vol. 13, pp. 302-304. Consulta: 11 de julio del 2016  
<http://bard.cm.utexas.edu/resources/Bard-Reprint/291.pdf>
- (5) BARD, Allen  
2012. Electrochemical Dictionary. 2 da edición. Berlin: Springer, pp. 588-589
- (6) BARSAN, Madalina M. y otros  
2008. "Electrosynthesis and electrochemical characterisation of phenazine polymers for application in biosensors". Electrochimica Acta. Vol. 53, pp.3973-3982.
- (7) BERGAMINI, Márcio F. y otros  
2003. "Flow injection amperometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode". IL FARMACO Journal. Vol. 58, pp. 999-1004. Consulta: 21 de junio del 2016  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014827X03001824>
- (8) BONI, Ana y otros  
2011. "Cobalt phthalocyanine as a biomimetic catalyst in the amperometric quantification of dipyrone using FIA". Talanta. Vol. 85, número 4, pp. 2067-2073. Consulta: 09 de mayo del 2016.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011006138>
- (9) BRITISH PHARMACOPOEIA  
2015. "Metamizole Sodium Monohydrate", Ph. Eur. monograph 1346
- (10) BUITRAGO, Tatiana y otros  
2014. "Dipirona: ¿Beneficios subestimados o riesgos sobredimensionados? Revisión de la literatura". Revista colombiana de ciencias químico-farmacéuticas. Vol.43, número 1, pp. 173-195. Consulta: 24 de junio del 2016 <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/45472/46900>
- (11) BUORO, Rafael y otros  
2012. "Mechanism of Electro-Oxidation of Metamizole using Cyclic Voltammetry at a Glassy Carbon Electrode". ECS Transactions library. Vol.43, número 1, pp. 251-258. Consulta : 1 de setiembre del 2016  
<http://ecst.ecsdl.org/content/43/1/251.abstract>

- (12) CHEN, Li y otros  
2015. "Applications of scanning electron microscopy in earth sciences". Science China Press and Springer. Vol. 58, núm.10, pp. 1768–1778. Consulta: 12 de Enero del 2017  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11430-015-5172-9>
- (13) COSTA MARINHO, Maria y otros  
2012. "Is the poly (methylene blue)-modified glassy carbon electrode an adequate electrode for the simple detection of thiols and amino acid-based molecules?". Journal of Electroanalytical Chemistry. Vol. 685, pp. 8-14.
- (14) CRUBELLATI, Ricardo O. y otros  
2009. Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas. Red Iberoamericana de Laboratorios de Calidad de Aguas. Buenos Aires. Programa CYTEC, pp. 15-29
- (15) DADAMOS, Tony y otros  
2012." Electrochemical characterization of the paste carbon modified electrode with  $\text{KSr}_2\text{Ni}_{0.75}\text{Nb}_{4.25}\text{O}_{15}$  solid in catalytic oxidation of the dipyrone". Sensors and Actuators B: Chemical. Vol. 169, pp. 267-273. Consulta: 21 de junio del 2016. <http://www.bv.fapesp.br/en/publicacao/55200/electrochemical-characterization-of-the-paste-carbon-modifie/>
- (16) DUFFAU, Boris y otros  
2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre: Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago de Chile. Instituto de salud pública de Chile, pp. 21-49
- (17) DURST, R.A. y otros  
1997. Chemically modified electrodes: recommended terminology and definitions. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Vol.69, número 6, pp. 1317-1323. Consulta: 12 de julio del 2016  
<http://old.iupac.org/publications/pac/1997/pdf/6906x1317.pdf>
- (18) FATTA-KASSINOS, Despo y otros.  
2011. "Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research". Analytical and Bioanalytical Chemistry Journal. Vol. 399, pp. 251-275. Consulta: 28 de junio del 2016  
<http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-010-4300-9>
- (19) FARGHALY, O.A. y otros  
2014. "Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques". International Journal of ELECTROCHEMICAL SCIENCE. Vol.9, pp. 3287 – 3318
- (20) FRANK SETTLE(EDITOR)  
Voltammetric Techniques. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. New Jersey, Precision Graphic Services, Inc, pp.709-725
- (21) GHICA, M. Emilia y otros  
2015. Poly(thionine)-carbon nanotube modified carbon film electrodes and application to the simultaneous determination of acetaminophen and dipyrone. J Solid State Electrochem . Vol. 19, pp. 2869–2881
- (22) GOPU, Gopalakrishnan y otros  
2011. "Stripping Voltammetric Determination of Analgesics in Their Pharmaceuticals Using Nano-Riboflavin-Modified Glassy Carbon Electrode". International Journal of Electrochemistry. Vol.2011, pp.1-11. Consulta 10 de agosto del 2016  
<https://www.hindawi.com/journals/ijelc/2011/269452/abs/>

- (23) GYÖRGY INZELT  
2012." Classification of Electrochemically Active Polymers". Conducting Polymers: A New Era in Electrochemistry. Berlin: Springer, pp. 37-38
- (24) HARRIS, Peter J.F.  
1997. "Structure of non-graphitising carbons". International Materials Reviews. Vol. 42, número 5, pp. 206-218. Consulta : 01 de setiembre del 2016  
<http://www.personal.rdg.ac.uk/~scsharip/IMR2.pdf>
- (25) HARRIS, Peter J.F.  
2005. "New Perspectives on the Structure of Graphitic Carbons". Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences. Vol. 30, pp. 235-253. Consulta : 01 de setiembre del 2016  
[http://www.physics.usyd.edu.au/~powles/PDFs/Harris\\_2005.pdf](http://www.physics.usyd.edu.au/~powles/PDFs/Harris_2005.pdf)
- (26) HARRIS, Daniel C.  
2003. Electroodos y potenciometría. Análisis químico cuantitativo. California: Editorial Reverté, pp.314-346
- (27) HARRIS, Daniel C.  
2003. Tecnicas electroanalíticas. Análisis químico cuantitativo. California: Editorial Reverté, pp.372-406
- (28) INAGI, Shinsuke  
2014. Electrosynthesis of Conducting Polymer. Gerhard Kreysa (editor). Encyclopedia of Applied Electrochemistry. Springer New York, pp. 801-803
- (29) JAPANESE PHARMACOPOEIA  
2016. monografía: "Sulpyrine Injection", edición N°16. Pp.1444-1445
- (30) JU, Huangxian y otros  
1994. "The electrochemical behavior of Methylene Blue at a microcylinder carbon fiber electrode". Electroanalysis. Vol. 7, número 12, pp. 1165-1170. Consulta: 20 de enero del 2017  
<http://sklac.nju.edu.cn/hxju/lunwenlunzhu/paperbefore1995/2%20EA%20H%20Ju.pdf>
- (31) KAPLAN, İbrahim Hakkı y otros  
2010. "Nucleation and growth mechanism of electropolymerization of methylene blue: the effect of preparation potential on poly(methylene blue) structure". Electroanalysis journal. Vol. 22, número 22, pp. 2694 – 2701.
- (32) KARYAKIN, Arkady A. y otros  
1998. "Electropolymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers". Electroanalysis journal. Vol.11, número 3, pp. 149-155.
- (33) LEENA, R.  
2012. Chemically modified glassy carbon electrode as sensors for various pharmaceuticals. Tesis para optar al grado de doctor en Química. Kochi: Cochin University of Science and Technology, Department of Applied Chemistry. Consultado: 12 de julio del 2016  
<https://dyuthi.cusat.ac.in/jspui/bitstream/purl/3829/1/Dyuthi-T1760.pdf>
- (34) LENTZ, C.M. y otros  
2011. "Synthesis and Characterization of Glassy Carbon Nanowires". Journal of Nanomaterials. Vol. 2011, pp. 1-8. Consulta: 01 de setiembre del 2016  
<https://www.hindawi.com/journals/jnm/2011/129298/>

- (35) LIMA, José y otros  
2003. "Multi-pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 32, número 4-5, pp. 1011-1017. Consulta: 22 de junio del 2016.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708503002036>
- (36) LIU, Jincui  
1999. "The electrochemical polymerization of methylene blue and properties of polymethylene blue". Vol. 107, número 3, pp.159-165. Consultado: 05 de setiembre del 2016.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379677999001460>
- (37) MONTERO, L.  
2003. Métodos experimentales de estudio de los procesos electroquímicos. Laminas delgadas y recubrimientos. Madrid: Editorial Consejo superior de investigaciones científicas, pp.300
- (38) MONTIEL, Juan Manuel  
2013. Desarrollo de un método de análisis voltamperométrico para la cuantificación de acetaminofén empleando electrodos modificados con polipirrol. Tesis de maestría en Química. México D.F.: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías, Área académica de Química.
- (39) MURRAY, Royce W. y otros  
1987. "Chemically Modified Electrodes :Molecular Design for Electroanalysis". American Chemical Society. Vol. 59, número 5, pp. 379-390.
- (40) NIKOLAOU, Anastasia.  
2013. "Pharmaceuticals and related compounds as emerging pollutants In water: analytical aspects". Global NEST Journal. Vol. 15, número 1, pp. 1-12. Consulta: 20 de junio del 2016  
[http://journal.gnest.org/sites/default/files/Journal%20Papers/1-12\\_969\\_Nikolaou\\_15-1.pdf](http://journal.gnest.org/sites/default/files/Journal%20Papers/1-12_969_Nikolaou_15-1.pdf)
- (41) Organización Mundial de la Salud (OMS)  
Productos farmacéuticos en el agua potable. Consulta: 13 de agosto del 2016  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/info\\_sheet\\_pharmaceuticals/es/](http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/info_sheet_pharmaceuticals/es/)
- (42) ORTIZ FRADE, Luis A.  
2017. Espectroscopia de impedancia electroquímica. Ponencia presentada en el curso: Principios de electroquímica y sus aplicaciones en el campo de la investigación. Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, enero del 2017
- (43) PAULIUKAITE, Rasa y otros  
2010. "Graphite-epoxy electrodes modified with functionalised carbon nanotubes and chitosan for the rapid electrochemical determination of dipyrone". Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. Vol. 13, pp. 590-598. Consulta: 21 de julio del 2016.  
<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cchts/2010/00000013/00000007/art00005>
- (44) QIN, XU y otros  
2011. Electrochemical Sensors Based on Electropolymerized Films. Ewa Schab-Balcerzak (editor). Electropolymerization. República popular China: InTech, pp. 187-198
- (45) RUI-JUN ZHAO y otros  
2009. Electropolymerization of methylene blue on carbon ionic liquid electrode and its electrocatalysis to 3,4-dihydroxybenzoic acid. Journal of the Chinese Chemical Society. Vol. 56, número 1, pp. 158-163.
- (46) SAKIARA, Kelly y otros  
1999. "Spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations by using chromotropic acid". Il Farmaco. Vol. 54, número 9, pp. 629-635. Consulta: 21 de junio del 2016.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014827X99000737>

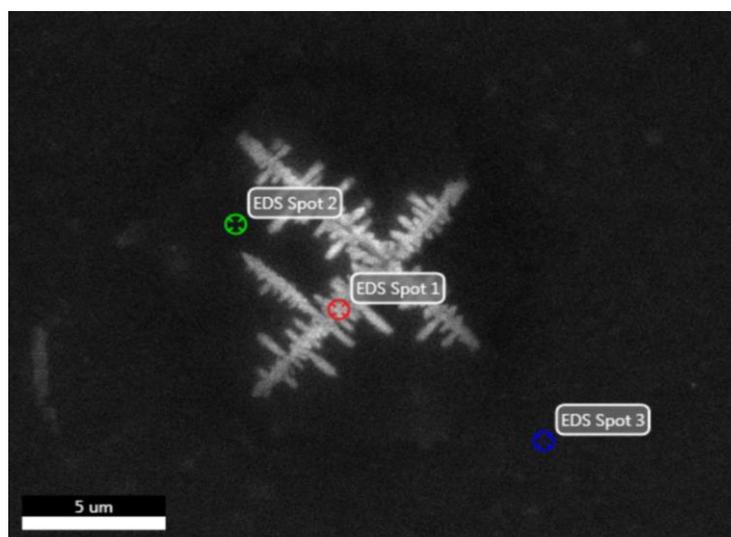
- (47) SKOOG, Douglas A. y otros  
2008. Voltametría. Principios de Análisis Instrumental. México: Cengage Learning , pp. 716-757
- (48) SKOOG, Douglas A. y otros  
2015. Voltametría. Fundamentos de Química Analítica. Novena edición. Santa Fe: Editorial Reverté, pp. 471-505
- (49) SORRIBES, Jorge  
Metamizol en el mundo, Spain is different. Consulta: 24 de junio del 2016  
<http://ww2.castello.san.gva.es/Urgencias/index.php/novedades-en-medicina-de-urgencias/394-metamizol-en-el-mundo-spain-is-different>
- (50) SRIVASTAVA, Ninu y otros  
1985. "Titrimetric determination of dipyron and paracetamol with potassium hexacyanoferrate(III) in an acidic médium". TheAnalyst. Vol. 110, número 6, pp. 735-737. Consulta: 22 de junio del 2016.  
<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1985/an/an9851000735#!divAbstract>
- (51) TEIXEIRA, Marcos F.S. y otros  
2004. Voltammetric Determination of Dipyron Using a N,N'-ethylenebis(salicylideneaminato)oxovanadium(IV) Modified Carbon-Paste Electrode. Sociedade Química de Brasil. Vol.15, número 6, pp.803-808
- (52) TEIXEIRA, Marcos y otros  
2009. "An electrochemical sensor for dipyron determination based on nickel-salen film modified electrode". Procedia Chemistry. Vol. 1, número 1, pp. 297-300. Consulta: 20 de junio del 2016.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876619609000758>
- (53) TEKTRONIC  
2015. Performing Cyclic Voltammetry Measurements Using Model 2450 or 2460 SourceMeter® SMU Instruments. Consultado: 12 de julio del 2016  
<http://www.tek.com/sites/tek.com/files/media/document/resources/CyclicVoltammery%20EChem%20A pp%20Note%201KW-60116-0.pdf>
- (54) TESFAYE, Alemu y Sergawie, Assefa  
2011. "Voltametric study of dipyron using glassy carbón electrode". LAP LAMBERT Academic publishing.
- (55) VETTORAZZI, N. y otros  
1994. "Controlled electrochemical pretreatment of glassy carbón electrodes. Its performance on the electro-oxidation of aromatic amines". Sociedade Química de Brasil. Vol.5, número 3, pp. 155-159. Consulta 30 de agosto del 2016  
<http://jbcbs.s bq.org.br/imagebank/pdf/v5n3-07.pdf>
- (56) VIENO, NIINA M. y otros.  
2007. "Occurrence of pharmaceuticals in river water and their elimination in a pilot-scale drinking water treatment plant". Environmental Science & Technology. Vol.41, número 14, pp. 5077-5084. Consulta: 13 de agosto del 2016  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es062720x>
- (57) WANG, Joseph  
2006. "Practical Considerations". Analytical Electrochemistry. New Jersey: John Wiley & Sons PUBLICATIONS, pp. 131. Consulta: 30 de agosto del 2016  
<https://books.google.com.pe/books?id=ZgUa4WbLMkKc&pg=PA131&dq=glassy+carbon+electrode&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewj-huK6lpDQAhUJLmMKHVItC7wQ6AEILDAA#v=onepage&q=glassy%20carbon%20electrode&f=false>

- (58) ZHOU, Qinqin y SHI, Gaoquan  
2016. "Conducting Polymer-Based Catalysts". Journal of the American Chemical Society. Vol. 138, pp. 2868–2876. Consulta: 12 de Julio del 2016  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.5b12474?journalCode=jacsat>
- (59) ZOSKI, Cynthia G.  
2007. Fundamentos. Handbook of Electrochemistry. Las Cruces : Editorial Elsevier, pp.11



ANEXO 1

SEM- ELECTRODO DE CARBON VÍTREO SIN MODIFICAR



EDS-Spot 1:

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
C K	64.13	75.09	12.1	11.71
O K	18.95	16.66	3.06	20.05
NaK	7.89	4.83	6.37	17.17
ClK	4.79	1.9	15.98	10.39
KK	4.24	1.52	12.47	11.71

EDS-Spot 2:

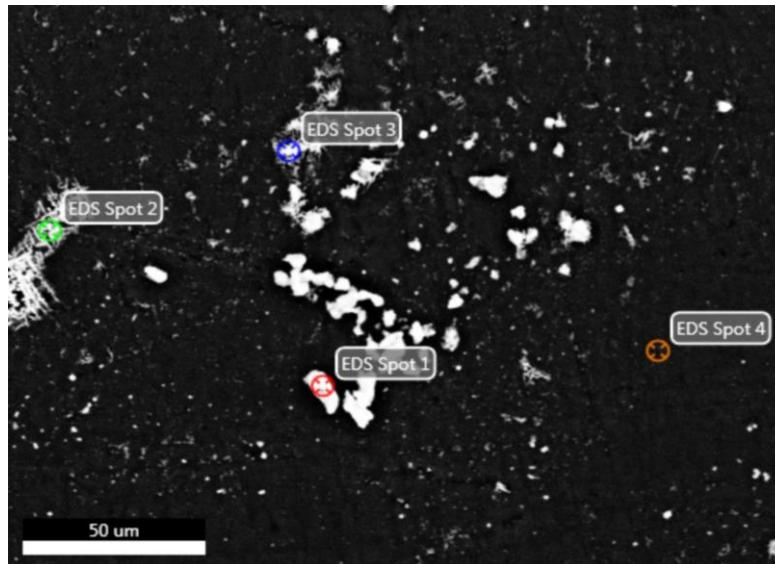
Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
C K	73.84	79.82	27.6	7.14
O K	21.9	17.77	3.94	18.67
NaK	4.25	2.4	3.64	21.13

EDS-Spot 3:

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
C K	100	100	86.23	2.2

ANEXO 2

SEM- ELECTRODO DE CARBON VÍTREO MODIFICADO



EDS-Spot 1:

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
C K	30.13	42.75	13.6	14.85
O K	41.07	43.74	25.8	14.62
NaK	0	0	0	8.63
P K	0	0	0	2.92
S K	11.93	6.34	137.63	8.14
ClK	0	0	0	2.85
K K	0	0	0	1.56
CaK	16.86	7.17	147.96	7.14

EDS-Spot 2:

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
C K	16.34	24.69	4.96	19.48
O K	39.8	45.15	38.37	11.31
NaK	26.08	20.59	61.65	10.23
P K	9.21	5.4	63.23	7.17
ClK	4.09	2.1	32.17	11.31
K K	4.48	2.08	35.46	9.01

EDS- Spot 3:

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
C K	24.49	34.58	17.34	14.01
O K	40.4	42.83	75.43	10.61
NaK	17.06	12.58	81.09	9.95
AlK	4.73	2.97	48.84	10.02
SiK	3.93	2.37	52.69	9.52
P K	4.45	2.44	59.16	8.73
ClK	2.22	1.06	36.89	11.21
K K	1.75	0.76	29.87	10.69
CaK	0.96	0.41	14.89	15.67

EDS-Spot 4:

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Error %
C K	100	100	154.76	1.8

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DAPIRONA O  
SULPIRINA EN INYECTABLES DE LA FARMACOEPA JAPONESA 16

## Sulpyrine Injection

スルピリン注射液

Sulpyrine Injection is an aqueous solution for injection.

It contains not less than 95.0% and not more than 105.0% of the labeled amount of sulpyrine hydrate ( $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S \cdot H_2O$ : 351.35).

**Method of preparation** Prepare as directed under Injections, with Sulpyrine Hydrate.

**Description** Sulpyrine Injection is a clear, colorless or pale yellow liquid.

pH: 5.0 – 8.5

**Identification (1)** To a volume of Sulpyrine Injection, equivalent to 0.2 g of Sulpyrine Hydrate according to the labeled amount, add water to make 3 mL, then add 2 drops of dilute sulfuric acid and 1 mL of chlorinated lime TS: a deep blue color develops at first, and the color immediately turns red and gradually changes to yellow.

**(2)** To a volume of Sulpyrine Injection, equivalent to 0.2 g of Sulpyrine Hydrate according to the labeled amount, add water to make 5 mL, and boil this solution with 3 mL of dilute hydrochloric acid: the odor of sulfur dioxide is perceptible at first, and on further boiling the odor of formaldehyde is perceptible.

**Extractable volume <6.05>** It meets the requirement.

**Foreign insoluble matter <6.06>** Perform the test according to Method 1: it meets the requirement.

**Insoluble particulate matter <6.07>** It meets the requirement.

**Sterility <4.06>** Perform the test according to the Membrane filtration method: it meets the requirement.

**Assay** Pipet 2 mL of Sulpyrine Injection, dilute with water to exactly 100 mL. Measure exactly a volume ( $V$  mL) of this solution, equivalent to about 50 mg of sulpyrine hydrate ( $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S \cdot H_2O$ ), and add water to make exactly 100

mL. Pipet 5 mL of this solution, add water to exactly 100 mL, and use this solution as the sample solution. Weigh accurately about 50 mg of sulpyrine for assay (previously determine the loss on drying <2.41> in the same conditions as Sulpyrine Hydrate), and dissolve in water to make exactly 100 mL. Pipet 5 mL of this solution, add water to exactly 100 mL, and use this solution as the standard solution. Pipet 2 mL each of the sample solution and standard solution into separate 25-mL volumetric flasks, add 5 mL of ethanol (95), 2 mL of a solution of 4-dimethylaminocinnamaldehyde in ethanol (95) (1 in 250) and 2 mL of acetic acid (100) to each of these solutions, shake well, allow to stand for 15 minutes, and add water to exactly 25 mL. Perform the test with these solutions as directed under Ultraviolet-visible Spectrophotometry <2.24>, using a solution prepared with 2 mL of water in the same manner as the blank. Determine the absorbances,  $A_T$  and  $A_S$ , of the subsequent solutions of the sample solution and the standard solution at 510 nm.

Amount (mg) of sulpyrine hydrate ( $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S \cdot H_2O$ )  
in 1 mL of Sulpyrine Injection

$$= M_S \times A_T / A_S \times 50 / V \times 1.054$$

$M_S$ : Amount (mg) of sulpyrine for assay, calculated  
on the dried basis

**Containers and storage** Containers—Hermetic containers,  
and colored containers may be used.

Storage—Light-resistant, and under nitrogen atmosphere.

