



UNIVERSIDAD DE BURGOS

*Departamento de Química
Área de Química Analítica*

*Puesta a punto de un biosensor para
la determinación de analitos de
interés en el tratamiento de trastornos
depresivos*

***DETECCION ELECTROQUIMICA DE
IMIPRAMINA***

Autora: SARA SANCHO QUEROL

Tutora: OLGA DOMÍNGUEZ RENEDO

Julio 2014



Universidad de Burgos
Facultad de Ciencias

AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DEI TRABAJO FIN DE
GRADO ⁽¹⁾

GRADO EN: QUÍMICA

CURSO: 2013/2014

Dña. Olga Domínguez Renedo Directora del Trabajo Fin de Grado de Dña. Sara Sancho Querol, que lleva por título Puesta a punto de un biosensor para la determinación de analitos de interés en el tratamiento de trastornos depresivos

Autoriza

No autoriza

A presentar la Memoria adjunta y defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, a de de

Fdo.: Olga Domínguez Renedo

(1). Para la presentación del Trabajo Fin de Grado el alumno deberá tener superados 222 créditos ECTS en el Grado en Química o 228 créditos ECTS en el Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. (Regulación de las Prácticas Externas y del Trabajo Fin de Grado de la Facultad de Ciencias, aprobado en Junta de Facultad de 15/06/2010).

D. Jefe del Negociado o Administrador de la Secretaría de Alumnos, certifica que el alumno arriba mencionado tiene superado 222/228 créditos correspondientes al Grado en.....

Burgos, a de de

Fdo.:

INDICE

1. ABSTRACT.....	4
2. INTRODUCTION.....	4
3. STATE OF THE ART.....	5
3.1. IMIPRAMINE.....	5
3.2. ANALYTICAL DETERMINATION OF IMIPRAMINE.....	6
3.3. SCREEN-PRINTED ELECTRODES.....	7
3.4. NANOMATERIALS.....	8
4. OBJECTIVE.....	8
5. EXPERIMENTAL.....	8
5.1. REAGENTS.....	8
5.2. APPARATUS AND SOFTWARE.....	9
5.3. EXPERIMENTAL PROCEDURE.....	9
6. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN.....	9
6.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE LA IMIPRAMINA MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO.....	9
6.2. DETERMINACIÓN DE IMIPRAMINA MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO.....	11
6.2.1. SELECCIÓN DEL pH DE MEDIDA.....	13
6.2.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	14
6.3. DETERMINACIÓN DE IMIPRAMINA MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS EMPLEANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO.....	20
6.3.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	20
7. CONCLUSIONES.....	24
8. BIBLIOGRAFÍA.....	25

1. ABSTRACT

This work reports the development of two different sensors using screen-printed carbon electrodes (SPCEs) for the determination of imipramine (IMP) by differential pulse voltammetry. On one hand, a bare SPCE has been successfully applied to the determination of this compound and, on the other hand, the modification of this SPCE with metallic gold nanoparticles (AuNPs/SPCE) have led to an increase in the sensitivity of IMP determination. Both sensors have been characterized obtaining good capability of detection (14.1 μM and 0.28 μM for SPCE and AuNPs/SPCE, respectively) and reproducibility (4.75 % and 6.87 % for SPCE and AuNPs/SPCE, respectively) values. The specificity of both sensors towards different compounds has been also analyzed and, the developed electrochemical systems have been successfully applied in the determination of IMP in commercial pharmaceutical preparations.

2. INTRODUCTION

Depression is a serious medical illness characterized by physical and organic alterations that affect the way in which a person looks at reality. Generally, antidepressants are prescribed to treat such symptoms and a great variety of drugs are in use worldwide. Among them, tricyclic antidepressants (TCAs) have been used for the treatment of depression for over 30 years, being imipramine (IMP) one of the most commonly prescribed TCAs for the treatment of psychiatric patients suffering from various forms of depression.

The therapeutic response of drugs such as IMP is usually associated with the concentration of the compound in plasma more than with its dosage. Moreover, there is an optimal therapeutic concentration range within most patients experiment clinical benefit at minimum toxicity and side-effects. Therefore, selective and sensitive detection of IMP is preciously important for its clinical applications.

Various analytical methods have been reported for the determination of IMP, such as spectrophotometry, spectrofluorometry, liquid chromatography, capillary electrophoresis, chemiluminescence. Although the entire reported methods are very sensitive, they are considered tedious and time consuming. In this way, electrochemical sensors are presented as an interesting alternative in the determination of IMP due to their important advantages including ease of use, portability and low cost.

Most of the described electrochemical sensors for the determination of IMP involve the use of classic solid electrodes. The replacement of this kind of electrodes by transducers such as screen-printed carbon electrodes (SPCEs) offers further advantages related to their reduced dimensions and disposable characteristics. Moreover, these disposable systems present a great versatility, which lies in the wide range of possible methods of modification, including the incorporation of metallic nanoparticles on the electrode surface.

In this work, a simple electrochemical method for the determination of IMP has been developed. The method is based on the utilization of bare SPCEs and SPCEs modified with gold nanoparticles (AuNPs). Thus, two different sensors have been developed, SPCEs and AuNPs/SPCEs, for the determination of this drug.

The first step in this work has been the optimization of the experimental variables, which present a high influence in the analytical response. In this way, an optimization of the pH value was performed. The analysis of the possible interferences in the determination of IMP has been also carried out for both sensors and, they were also applied in the determination of IMP in a pharmaceutical sample.

3. STATE OF THE ART

3.1. IMIPRAMINE

Imipramine is a member of the dibenzazepine group of compounds which have been frequently used in the treatment of depression. The chemical structure of this antidepressant molecule can be seen in figure 1 [1].

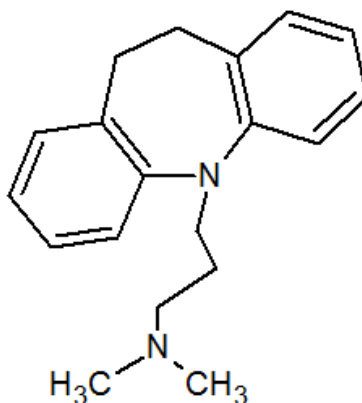


Figure 1. Chemical structure of Imipramine

The transmission of nerve impulses, from a nerve cell to another one requires the presence of neuronal transmitters such as serotonin, noradrenalin or dopamine into the synaptic space. These transmitters (blue circles in figure 2) are released into the synaptic space thanks to the presence of calcium channels. These channels are opened to let the ion enter into the nerve cell and to get free the neurotransmitters. The presence of an excess of neurotransmitters is fixed by the enzyme monoamine oxidase by means of a reuptake system, which involves leading transmitters to a departure point where they are destroyed by the enzyme.

Depression implies the presence of a low amount to neurotransmitters into the synaptic space. Then, IMP (green circles in figure 2) acts like a barrier against that reuptake of transmitters until the point of departure. Consequently, the amount of transmitters increases in the synaptic space thus stimulating the transmission of nerve impulses and making the depressive symptom vanish [2].

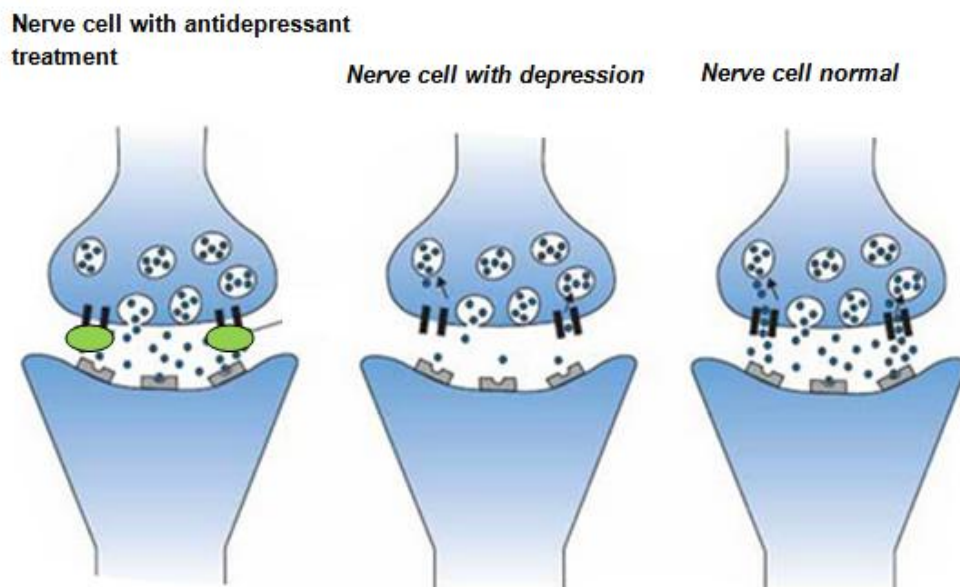


Figure 2. Nerve cell with antidepressant treatment, nerve cell with depression effects, nerve cell normal.

3.2. ANALYTICAL DETERMINATION OF IMIPRAMINE

The most common techniques for the determination of TCAs in the commercial dosage form have been based on capillary electrophoresis, high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography. These methods are time consuming, involve intensive solvent usage, are laborious, and require expensive devices and maintenance. Electrochemical methods, on the other hand, are extremely sensitive, selective and moreover, have the added advantage of no preliminary separation [3-6].

Several methods have been developed for the determination of TCAs employing electrochemical techniques, being comparable in quickness, sensitivity and selectivity with HPLC when combining modified electrodes with voltammetric pulse techniques. Table 1 resumes the different electrochemical systems described in the literature for the determination of IMP using different electrodes. In this table, it can be observed that the electrochemical determination of IMP is normally carried out using modified classic solid electrodes.

As it has been described above, the performance of electrochemical methods can be improved by the employment of screen-printed electrodes (SPEs). Thus, these have been the selected electrochemical systems in this work.

Table 1. Electrochemical methods for the determination of IMP

Ref.	Electrode	RSD (%)	Capability of detection
		Reproducibility	
3	<i>Indium tin oxide electrode modified with gold nanoparticles and a molecularly imprinted film</i>	2.5	1.0 nM
4	<i>Glassy carbon electrode modified with Amberlite XAD2 and titanium dioxide nanoparticles</i>	2.97	0.4 nM
5	<i>Carbon paste electrode modified with poly(N-vinylimidazole)</i>	-	60 μ M
6	<i>Carbon paste electrode modified with fatty acids</i>	4.3	1.0 nM

3.3. SCREEN-PRINTED ELECTRODES

SPEs are devices that are produced by printing different inks on various types of plastic or ceramic substrates. Polyester screens are generally used for printing with patterns designed by the analyst in accordance with the analytical purpose in mind. In this work SPCEs have been used for the determination of IMP consisted of three different electrodes. A carbon working electrode, a Ag/AgCl reference electrode and a carbon auxiliary electrode (Figure 3).

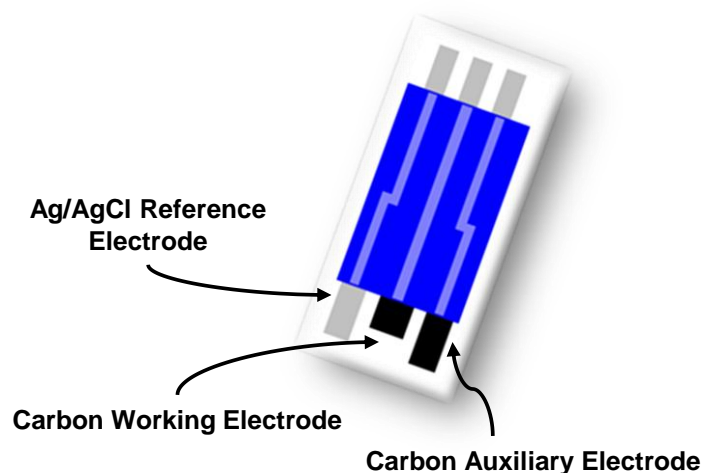


Figure 3. Scheme of the SPCEs system.

The composition of the various inks used for printing on the electrodes determines the selectivity and sensitivity required for each analysis. In this way the modification of the working electrode surface with different nanomaterials can improve the performance of the system.

3.4. NANOMATERIALS

The design of new nanoscale materials has acquired ever greater importance in recent years since they present wide-ranging applications in various fields. Among these materials, metallic nanoparticles are of great interest. Due to their reduced size, metallic nanoparticles exhibit important physical and electrical properties that made them very useful for the construction of more sensitive electrochemical biosensors [7].

In this work the modification of the SPCEs with metallic nanoparticles has been carried out in order to increase the effective surface area of the working electrode, which improves mass transport and, therefore increases the sensitivity and, in some cases, the catalytic properties of nanoparticles may reduce the working potential or even improve the reversibility of some redox processes [8]. Thus, the modification of SPEs with metallic nanoparticles increases the already well-known performance of these kinds of disposable electrodes.

4. OBJECTIVE

The main goal of this work is to develop sensitive electrochemical sensors for the determination of IMP in pharmaceutical preparations.

5. EXPERIMENTAL

5.1. REAGENTS

- All the reagents used were of analytical grade and Milli Q water (Millipore, Bedford, USA) was employed for preparing all solutions.
- Britton-Robinson solutions were used as supporting electrolyte in electrochemical measurements. A 0.04 M Britton-Robinson buffer solution with respect to o-boric, o-phosphoric and acetic acids was prepared using Merk (Darmstadt, Germany) analytical-grade reagents. From this, solutions of different pH values were prepared by additions of 2 M sodium hydroxide (Merk, Darmstadt, Germany).
- Stock standard solutions of IMP were prepared by dissolving the adequate amount of IMP purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) in Britton-Robinson buffer solution.
- Hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate (HAuCl_4), used in the generation of AuNPs, was purchased from Sigma-Aldrich (analytical-reagent grade, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Commercial tablets of Tofranil® from Geigy were also analyzed.

5.2. APPARATUS AND SOFTWARE

- Electrochemical measurements were performed using a μ Autolab type III electrochemical system with GPES software (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) using a SPCE system.
- The pH of the solutions was measured with a Crison Model 2002 (Barcelona, Spain) pHmeter.
- Centrifugation of samples was performed using an Angular 6 centrifuge (Selecta, Barcelona, Spain).
- Data analysis was processed with PROGRESS [9] for robust regressions and DETARCHI [10] for the capability of detection.

5.3. EXPERIMENTAL PROCEDURE

Cyclic voltammetric analysis of IMP was performed at room temperature in an electrochemical cell containing 10 mL of a Britton-Robinson pH 6 solution. Cyclic voltammetric scans were carried out from +0.7 V to +1.2 V at a scan rate of 100 mV/s.

Differential pulse voltammetric measurements of IMP were achieved at room temperature in an electrochemical cell containing 10 mL of a Britton-Robinson pH 6 solution. Successive additions of an IMP stock solution were made. The voltammogram was then recorded by making an anodic scan from +0.4 V to +1.0 V. Other main experimental parameters used were as follows: modulation amplitude, 50 mV; step potential, 6 mV and interval time, 0.6 s.

The electrochemical deposition of AuNPs was performed in a 100 μ L drop of 0.1 mM HAuCl₄, prepared in 0.5 M H₂SO₄, applying a potential of +0.18 V vs Ag/AgCl SPE during 15 s. The AuNPs modified SPCEs (AuNPs-SPCEs) were then washed with Milli-Q water.

6. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSIÓN

Las experiencias llevadas a cabo durante la realización del trabajo presentado en esta memoria demuestran que es posible llevar a cabo la determinación de IMP mediante DPV empleando electrodos serigrafados. El proceso electroquímico seguido para realizar dicha determinación se basa en un fenómeno de oxidación electroquímica del compuesto analizado. Con el objetivo de caracterizar dicho proceso electroquímico se llevó a cabo un estudio del comportamiento de la IMP mediante voltamperometría cíclica.

6.1 ESTUDIO DE LA RESPUESTA ELECTROQUÍMICA DE LA IMIPRAMINA MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO

El análisis de IMP mediante voltamperometría cíclica con SPCEs se llevó a cabo empleando tampón Britton-Robinson pH 6 como electrolito soporte siguiendo un

procedimiento similar al empleado por otros autores con electrodos sólidos convencionales [4].

En la figura 4 se muestran los voltamperogramas obtenidos para la IMP cuando se realizan dos ciclos voltamperométricos sucesivos. En dicha figura es posible observar la aparición de dos picos voltamperométricos de oxidación (O1 y O2) y un pico de reducción (R2). El pico de oxidación O1, que aparece a un potencial próximo a +0.6 V está relacionado con la oxidación electroquímica de la IMP. Este proceso de oxidación tiene lugar en el átomo de nitrógeno del anillo de ciclohexano de la molécula de IMP dando lugar a la formación de un radical (Figura 5) [4].

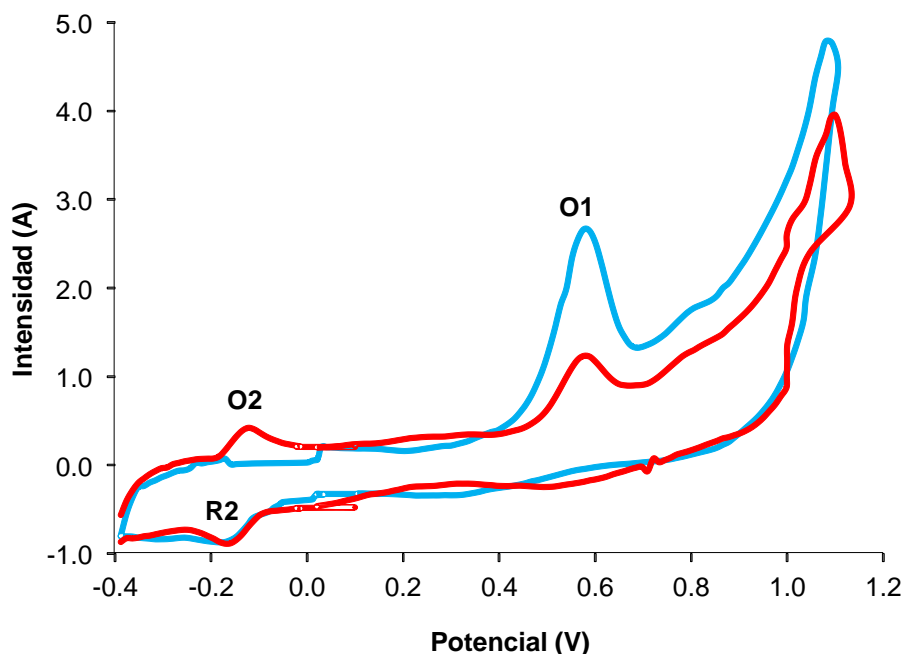


Figura 4. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para una concentración de IMP $20 \mu\text{M}$ en tampón Britton-Robinson (pH 6) — Primer ciclo — Segundo ciclo (Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

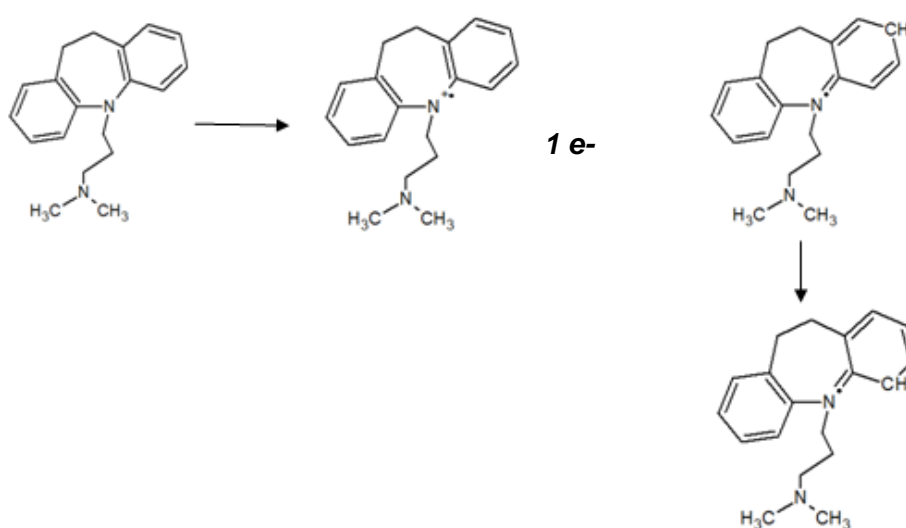


Figura 5. Esquema de formación del radical de la IMP.

El pico de reducción R2 observado a un potencial aproximado de -0.2 V se debe a la formación de un dímero, que es finalmente oxidado a un potencial aproximado de -0.1 V (O_2) en el segundo barrido cíclico. Este proceso de oxidación-reducción se describe en la figura 6.

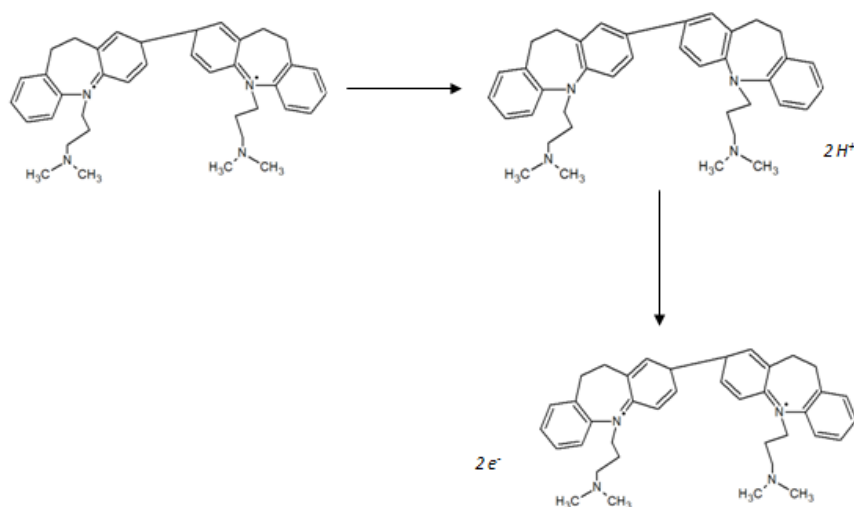


Figura 6. Formación y oxidación del dímero.

Una vez realizado el estudio electroquímico de la molécula de IMP se decide llevar a cabo la determinación de la misma empleando una técnica electroquímica más sensible, la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV), siguiendo el proceso de oxidación O1.

6.2. DETERMINACIÓN DE IMIPRAMINA MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO

En la figura 7 puede verse como efectivamente es posible obtener una respuesta voltamperométrica mediante DPV, relacionada con la oxidación de la IMP a un potencial de $+0.5$ V utilizando SPCEs.

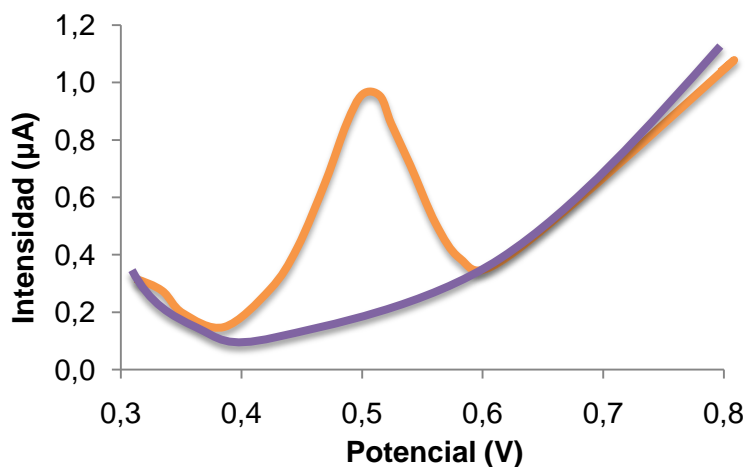


Figura 7. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un SPCE: — blanco; — [IMP], $6 \mu M$ (pH, 7 tampón Britton-Robinson; Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

Durante las experiencias llevadas a cabo en el laboratorio pudo observarse que existía una pérdida de sensibilidad de la medida voltamperométrica de la IMP cuando el electrodo de trabajo era utilizado repetitivamente. En la figura 8 puede verse como la intensidad de la respuesta voltamperométrica de la IMP disminuye para réplicas sucesivas de la misma disolución utilizando el mismo electrodo. Esta disminución en la respuesta voltamperométrica puede asociarse a una acumulación del producto de oxidación electroquímica sobre la superficie electródica, que impide la realización de medidas posteriores de manera adecuada.

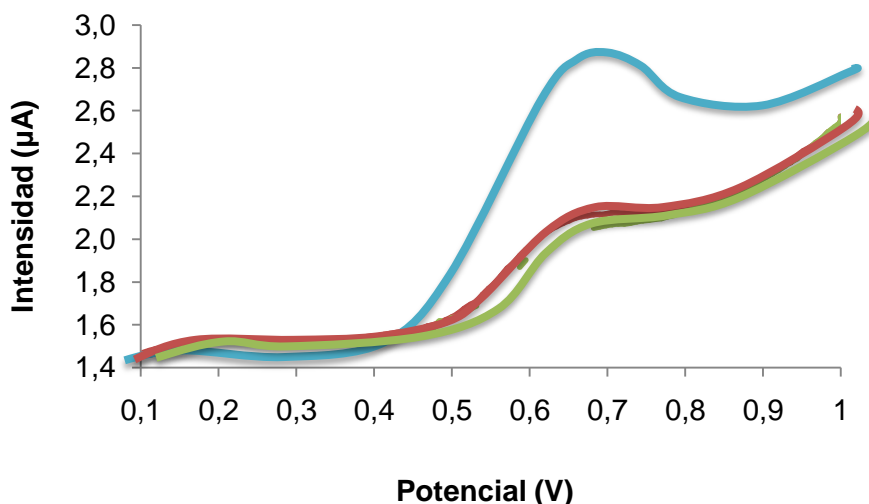


Figura 8. Voltamperogramas relacionados con réplicas sucesivas obtenidas mediante DPV empleando un SPCE para una concentración de IMP de $2 \mu\text{M}$: — Réplica 1; — Réplica 2; — Réplica 3 (pH 7, tampón Britton-Robinson; Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

Por lo tanto, se debe realizar una limpieza del electrodo de trabajo para eliminar cualquier impureza adherida sobre el electrodo, entre medida y medida, realizando un barrido de reducción entre +1 V y 0 V. En la figura 9 puede verse que este proceso de limpieza permite obtener medidas más reproducibles.

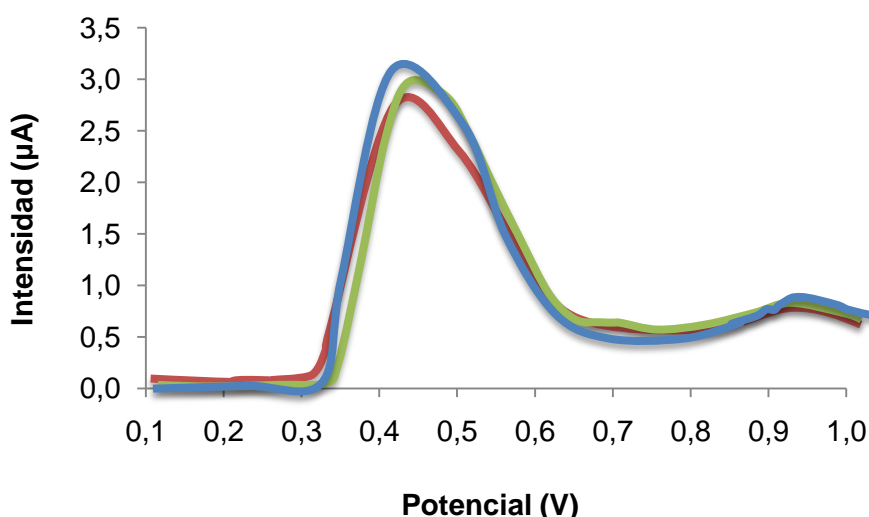


Figura 9. Voltamperogramas relacionados con réplicas sucesivas obtenidas mediante DPV empleando un SPCE sometido a un proceso de limpieza, para una concentración de IMP de $2 \mu\text{M}$: — Réplica 1; — Réplica 2; — Réplica 3 (pH 7, tampón Britton-Robinson; Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

6.2.1. SELECCIÓN DEL pH DE MEDIDA

Una etapa importante de todo procedimiento analítico es la optimización de los parámetros experimentales que influyen en el valor de la variable respuesta. En el caso de la determinación de IMP mediante DPV, el pico de oxidación del compuesto se ve notablemente influenciado por el valor del pH del medio. Por ello, se llevó a cabo un estudio de la variación de la intensidad de dicho pico con el valor del pH. Concretamente, se estudió la influencia del pH en el pico de oxidación de la IMP en el intervalo de valores de pH comprendidos entre 2 y 12.

Las figuras 10 y 11 recogen las diferentes experiencias realizadas mediante DPV a diferentes valores de pH con SPCEs. En dichas figuras se observa que es posible obtener una respuesta voltamperométrica para la IMP de calidad analítica para valores de pH comprendidos entre 2 y 9. Sin embargo, para el caso de valores de pH muy básicos, la señal electroquímica obtenida para la IMP no resulta adecuada para llevar a cabo el análisis de este compuesto debido a la precipitación de éste en un medio tan básico.

La respuesta voltamperométrica obtenida para la IMP presentó un valor de intensidad de corriente mayor en las experiencias realizadas en Britton-Robinson pH 6. Este mayor valor de intensidad se observa con mayor claridad en la figura 12, donde se ha representado la variación de la intensidad de oxidación del pico de la IMP a diferentes valores de pH. Por lo tanto, este fue el valor de pH seleccionado para llevar a cabo la determinación cuantitativa de IMP mediante DPV.

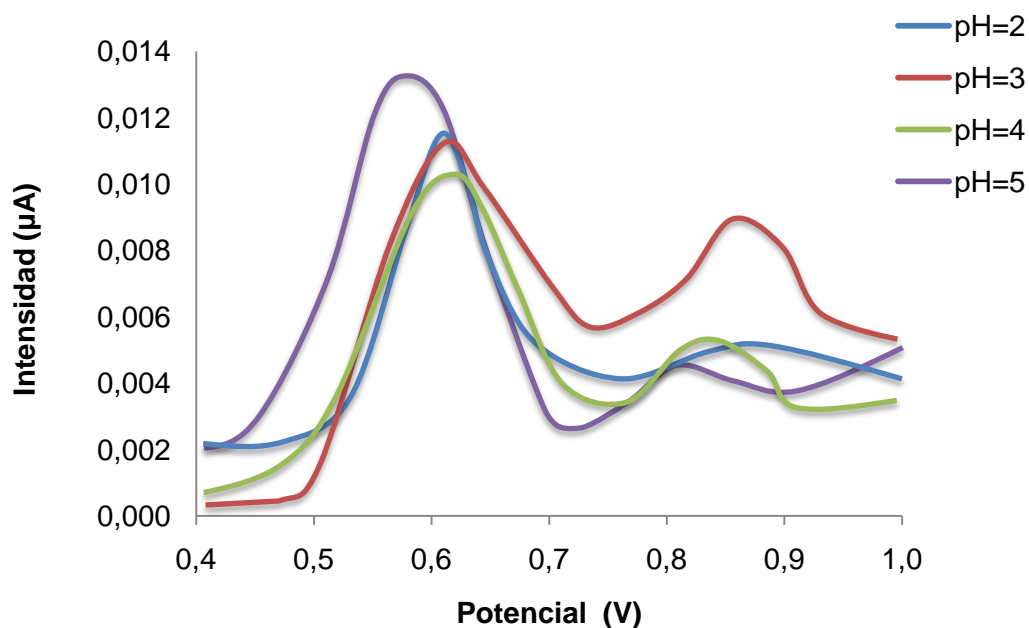


Figura 10. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV utilizando SPCEs para una concentración de IMP $19.6 \mu\text{M}$ para valores de pH comprendidos entre 2 y 5 (Britton-Robinson; Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

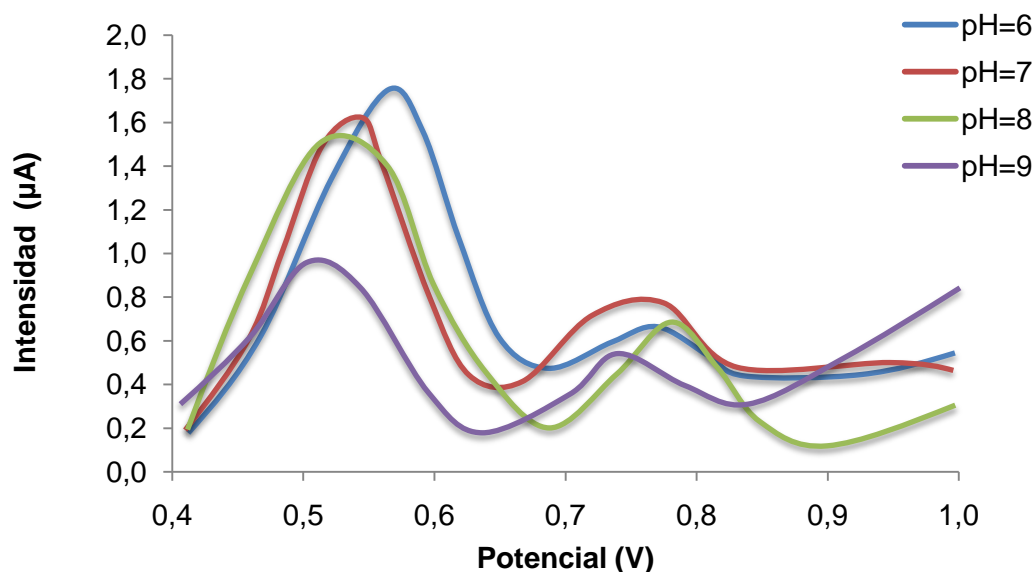


Figura 11. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV utilizando SPCEs para una concentración de IMP 19.6 µM para valores de pH comprendidos entre 6 y 9 (Britton-Robinson; Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

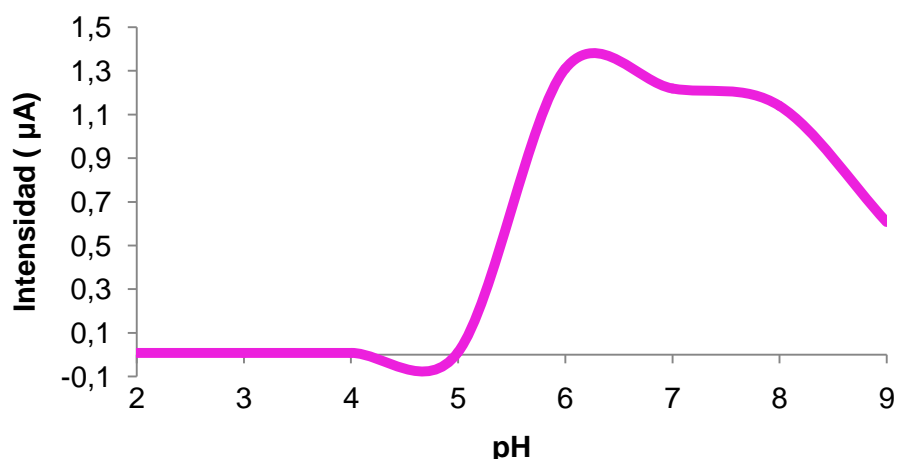


Figura 12. Efecto del pH sobre Intensidad, de una solución de IMP 19.6 µM en tampón Britton-Robinson.

6.2.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Con la finalidad de caracterizar un procedimiento analítico y asegurar su calidad es importante validar dicho procedimiento mediante el cálculo de parámetros analíticos como la precisión en términos de reproducibilidad y, la capacidad de detección. Por lo tanto, una vez optimizadas las variables experimentales que influyen en el método de determinación, se procedió al cálculo de dichos parámetros.

PRECISIÓN

La precisión del método analítico se determinó en términos de reproducibilidad. Para la determinación de la reproducibilidad del método desarrollado, se llevaron a cabo tres calibrados de IMP en las condiciones determinadas anteriormente utilizando tres sistemas electródicos diferentes. En todos los casos se realizaron adiciones 50 μL de una disolución de IMP 10^{-3} M, anotando la intensidad obtenida para cada una de estas adiciones. Se eligió un método de regresión robusta, la regresión mediante mínima mediana de cuadrados (LMS) que permite detectar puntos anómalos tanto de carácter "outlier" (puntos alejados en el eje de ordenadas) como "leverage" (puntos alejados en el eje de abscisas) [9].

Una vez detectados y eliminados los puntos anómalos se procedió a realizar una regresión por mínimos cuadrados con el resto de los puntos para lograr estimar la sensibilidad y el término independiente. En la figura 13 se muestran las curvas de calibración obtenidas para los diferentes electrodos una vez eliminados los datos anómalos.

Una vez construidas las rectas de calibración, la reproducibilidad del método fue calculada en términos del valor de desviación estándar relativa (RSD) asociado a las pendientes de dichas rectas. El valor obtenido para dicho parámetro fue de 4.75 % ($n=3$), que indica que el método desarrollado permite el análisis de IMP con una buena precisión.

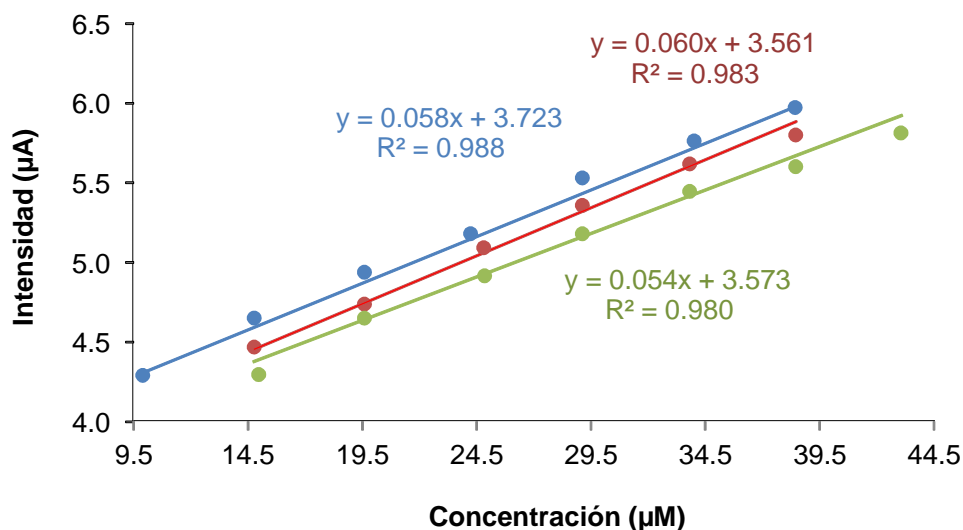


Figura 13. Curvas de calibrado para adiciones crecientes de 50 μL de una disolución de IMP 10^{-3} M con tampón Britton-Robinson pH,6

CAPACIDAD DE DETECCIÓN

El método electroquímico desarrollado para la determinación analítica de IMP ha sido también caracterizado mediante el cálculo de su capacidad de detección, teniendo en cuenta la probabilidad de falso positivo (α) y falso negativo (β) para lo que se utilizó el programa DETARCHI [10]. El valor de capacidad de detección obtenido fue 14.1 ± 1.7 μM ($n = 3$, $\alpha = \beta = 0.05$).

ANÁLISIS DE INTERFERENTES

En las etapas anteriores se ha demostrado que es posible llevar a cabo la determinación de IMP en muestras acuosas sintéticas. El objetivo final del trabajo es poder aplicar el método desarrollado a muestras de interés analítico como son los fármacos comerciales. En este tipo de muestras, pueden existir otras especies susceptibles de oxidarse a potenciales próximos al de la IMP y por lo tanto, crear interferencia.

Entre los interferentes más comunes, descritos en bibliografía, para la IMP se encuentran el ácido ascórbico, la dopamina, el ácido cítrico, la glucosa y el ácido úrico [4,6]. Por ello fueron seleccionados para llevar a cabo el estudio de la selectividad del sensor desarrollado.

El efecto de otras especies en la determinación de IMP mediante DPV fue estudiado mediante la adición de diferentes concentraciones de cada interferente citado, sobre la celda electroquímica que contenía 10 mL de una disolución tampón Britton-Robinson pH 6 de concentración 9.9 μM de IMP. El intervalo de concentraciones analizado para cada una de las posibles especies interferentes fue el comprendido entre 2.0 μM y 1.0 mM.

En las figuras 14, 15, 16, 17 y 18 se muestran de forma resumida los diferentes resultados obtenidos para las diferentes posibles especies interferentes. En dichas figuras se observa que la respuesta voltamperométrica para la IMP no se ve considerablemente afectada por la presencia de las especies dopamina y ácido úrico en ninguno de los niveles de concentración analizados. La glucosa, el ácido ascórbico y el ácido cítrico parecen influir en la señal analítica de la IMP para concentraciones elevadas. Sin embargo, el resto de especies analizadas no mostraron influencia en la intensidad del pico voltamperométrico de la IMP.

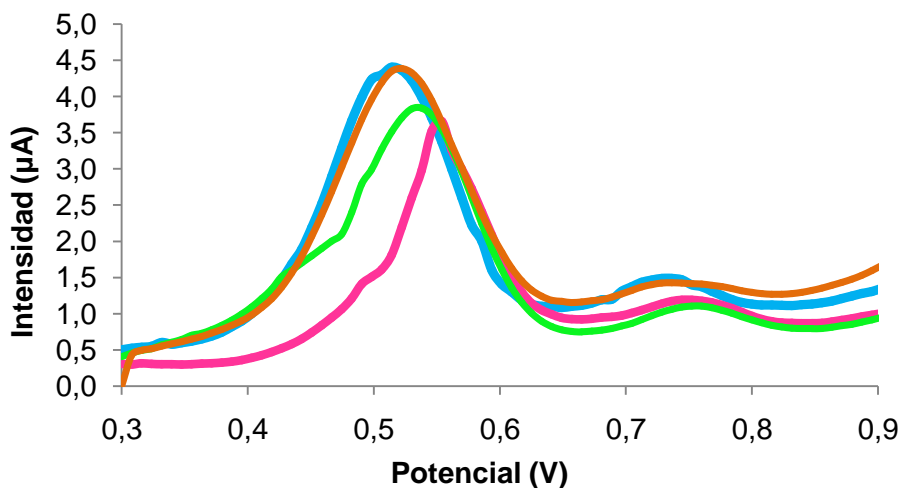


Figura 14. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un SPCE para una concentración de IMP de 9.9 μM : — [Glucosa] = 0; — [Glucosa] = 0.19 μM ; — [Glucosa] = 2.91 μM ; — [Glucosa] = 29.13 μM (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl)

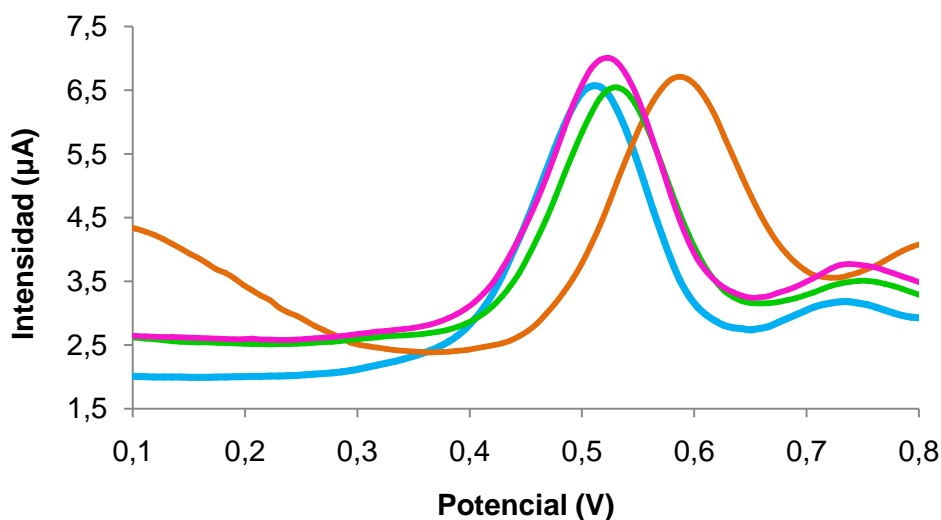


Figura 15. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un SPCE para una concentración de IMP de $9.9 \mu\text{M}$: — [Dopamina] = 0; — [Dopamina] = $0.29 \mu\text{M}$; — [Dopamina] = $19.6 \mu\text{M}$; — [Dopamina] = $29.13 \mu\text{M}$ (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

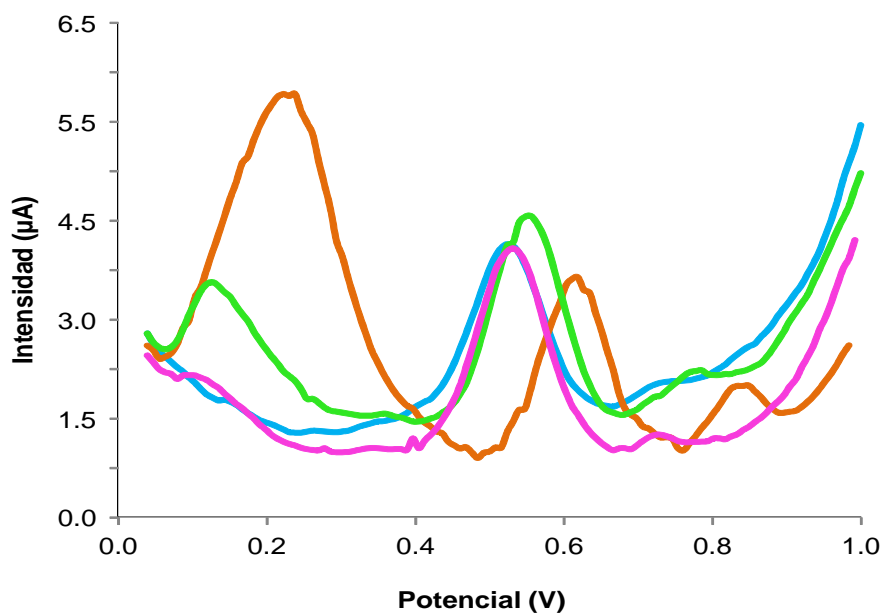


Figura 16. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un SPCE para una concentración de IMP de $9.9 \mu\text{M}$: — [A. Úrico] = 0; — [A. Úrico] = $0.56 \mu\text{M}$; — [A. Úrico] = $8.25 \mu\text{M}$; — [A. Úrico] = $64.4 \mu\text{M}$ (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

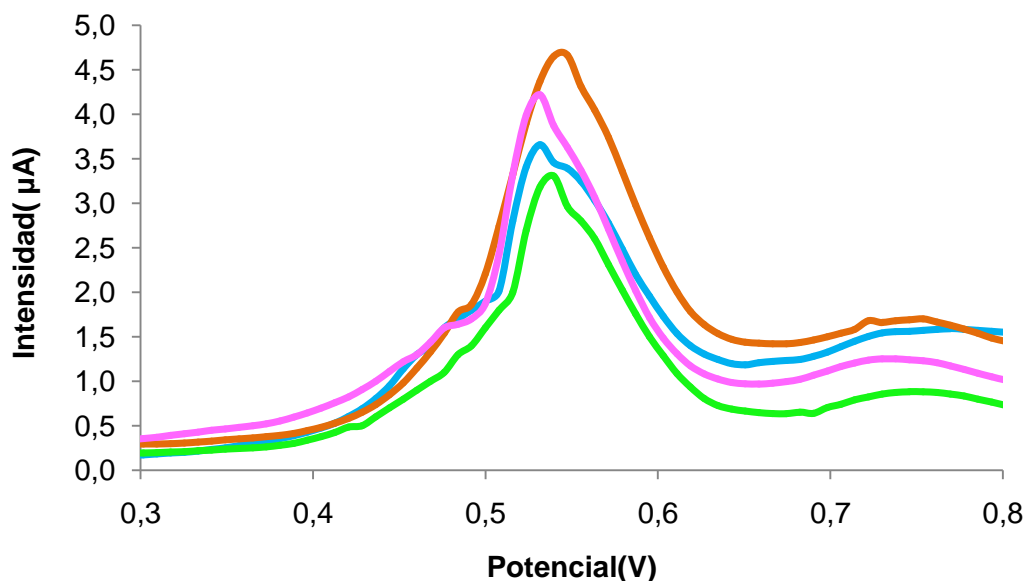


Figura 17. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un SPCE para una concentración de IMP de $9.9 \mu\text{M}$: — [Cítrico] = 0; — [A. Cítrico] = $0.99 \mu\text{M}$; — [A. Cítrico] = $2.91 \mu\text{M}$; — [A. Cítrico] = $29.1 \mu\text{M}$ (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

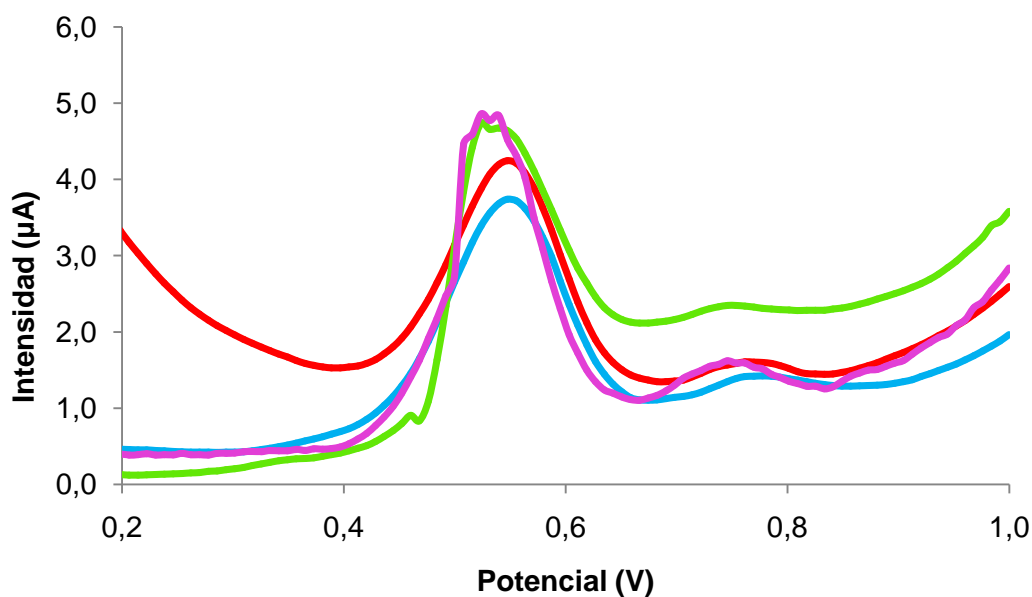


Figura 18. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un SPCE para una concentración de IMP de $9.9 \mu\text{M}$: — [A. Ascórbico] = 0; — [A. Ascórbico] = $0.74 \mu\text{M}$; — [A. Ascórbico] = $9.9 \mu\text{M}$; — [A. Ascórbico] = $56.6 \mu\text{M}$ (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

ANÁLISIS DE IMIPRAMINA EN UN FÁRMACO COMERCIAL

La puesta a punto de un método analítico siendo importante en sí misma, perdería parte de su interés si no demostrara su viabilidad en la resolución de algún problema real. Con el objetivo de comprobar dicha viabilidad, el método analítico desarrollado se aplicó al análisis de una muestra del fármaco antidepresivo comercial Tofranil®.

El análisis del contenido en IMP de un comprimido de Tofranil® requiere las siguientes etapas:

- (1) En primer lugar se introduce un comprimido del fármaco en un vial al que se añaden 10 mL de una mezcla de tampón Britton-Robinson (pH 6) junto con HCl (35%) y etanol debido a su baja solubilidad en agua y se coloca en un tubo de centrifuga de 10 mL de volumen.
- (2) Posteriormente se introduce la mezcla anterior en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos.
- (3) La disolución resultante es centrifugada a 5000 rpm durante 30 minutos.
- (4) Después de la centrifugación, 2.5 mL del sobrenadante es recogido y diluido en un volumen de 25 mL de tampón Britton-Robinson de pH 6.
- (5) La disolución diluida es utilizada como muestra para el análisis.

El análisis de la muestra se llevó a cabo mediante adición estándar. En primer lugar, se adicionaron 10 mL de la disolución tampón Britton-Robinson (pH 6) en la celda electroquímica y seguidamente se añadieron 50 μ L de la disolución diluida (disolución problema) y se registró el voltamperograma. A continuación, se realizaron adiciones sucesivas de 50 μ L de IMP de concentración 10^{-4} M registrándose los voltamperogramas correspondientes. En la figura 19 se muestra la recta de calibración obtenida al representar la intensidad de corriente registrada para cada valor de concentración, una vez eliminados los puntos anómalos.

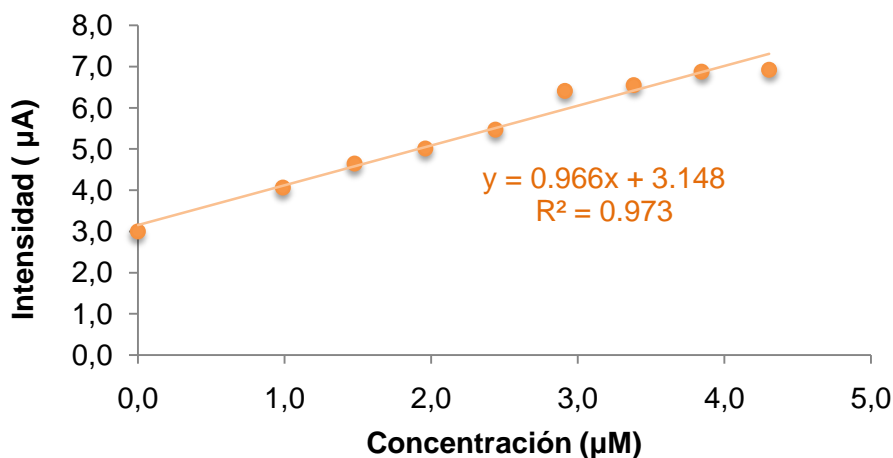


Figura 19. Puntos experimentales y recta de calibrado obtenidos mediante adición estándar para la determinación de la concentración de IMP en una muestra del fármaco Tofranil® empleando SPCEs (Tampón Britton-Robinson (pH6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

Con la recta de calibrado construida se determinó la cantidad de IMP presente en el comprimido del producto farmacéutico. El resultado obtenido, utilizando el método electroquímico desarrollado fue de 24.9 ± 1.1 mg ($n = 3$, $\alpha = 0.05$). Dicha cantidad concuerda con el valor proporcionado por el fabricante (25 mg).

6.3. DETERMINACIÓN DE IMIPRAMINA MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS EMPLEANDO ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE CARBONO MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

Una segunda etapa del trabajo presentado en esta memoria consistió en la modificación de SPCEs con AuNPs con el objetivo de mejorar la sensibilidad del método propuesto. Una manera sencilla de llevar a cabo dicha modificación es la basada en la electrodeposición de las AuNPs a partir de una disolución de oro. Esta metodología consiste esencialmente, tal y como se ha descrito anteriormente, en la colocación de una gota de 100 μL de una disolución de HAuCl_4 sobre los electrodos serigrafados y la aplicación posterior de un potencial de +0.18 V durante 15 s



6.3.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Al igual que en el caso anterior el método desarrollado para la determinación de IMP fue validado mediante el cálculo de diferentes parámetros de calidad.

PRECISIÓN

Para la estimación de la precisión de los AuNPs/SPCEs en la determinación de IMP, se llevó a cabo el cálculo de la reproducibilidad de los mismos, mediante la construcción de diferentes rectas de calibrado empleando 3 electrodos diferentes. Dichos calibrados se realizan mediante adiciones de 100 μL de una disolución de IMP 10^{-5} M, y anotando la intensidad obtenida para cada una de estas adiciones. Posteriormente con la ayuda del programa Progress, se eliminan los puntos anómalos de los calibrados y se construyen las rectas reflejas en la figura 20.

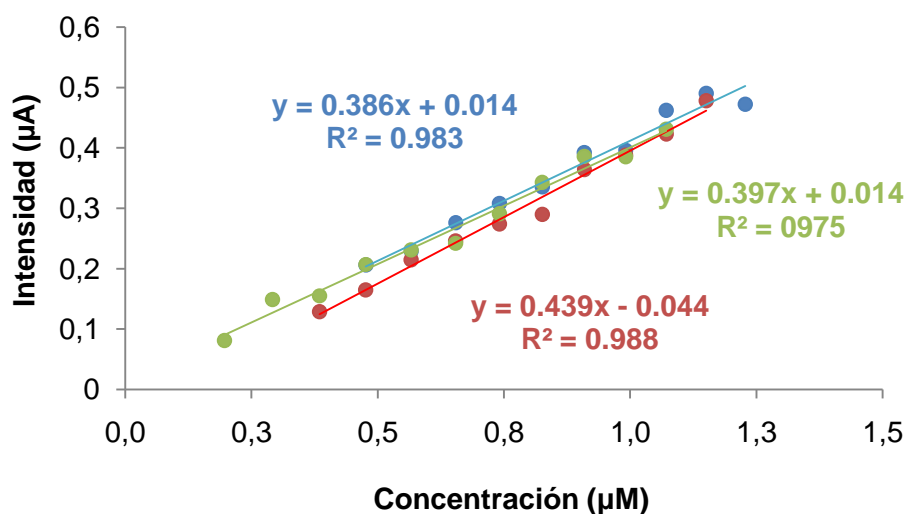


Figura 20. Curvas de calibrado para adiciones crecientes de 50 μL de una disolución de IMP 10^{-5} M con tampón Britton-Robinson pH 6 utilizando AuNPs/SPCEs.

Una vez construidas las rectas de calibración, la reproducibilidad del método fue calculada en términos del valor de RSD asociado a las pendientes de dichas rectas. El valor obtenido para dicho parámetro fue de 6.87% (n=3), que indica que el método desarrollado permite el análisis de IMP con una buena precisión.

CAPACIDAD DE DETECCIÓN

El método electroquímico desarrollado para la determinación analítica de IMP empleando AuNPs/SPCEs ha sido también caracterizado mediante el cálculo de su capacidad de detección, teniendo en cuenta la probabilidad de falso positivo (α) y falso negativo (β) para lo que se utilizó el programa DETARCHI [10]. El valor de capacidad de detección se calculó utilizando también las regresiones lineales validadas fue de $0.28 \pm 0.06 \mu\text{M}$.

INTERFERENTES

Para los electrodos AuNP/SPCEs se llevó también a cabo un análisis de la posible interferencia que pudieran causar especies como el ácido ascórbico, la dopamina, el ácido cítrico, la glucosa y el ácido úrico, en diferentes niveles de concentración. Los resultados de este análisis se resumen en las figuras 21, 22, 23, 24 y 25. En dichas figuras puede observarse que, mientras la glucosa no presenta gran interferencia en el análisis de IMP, el resto de compuestos estudiados influyen en la señal analítica del fármaco. Esta influencia es ampliamente significativa en el caso de la dopamina y del ácido cítrico debido a la aparición de un pico voltamperométrico altamente solapado.

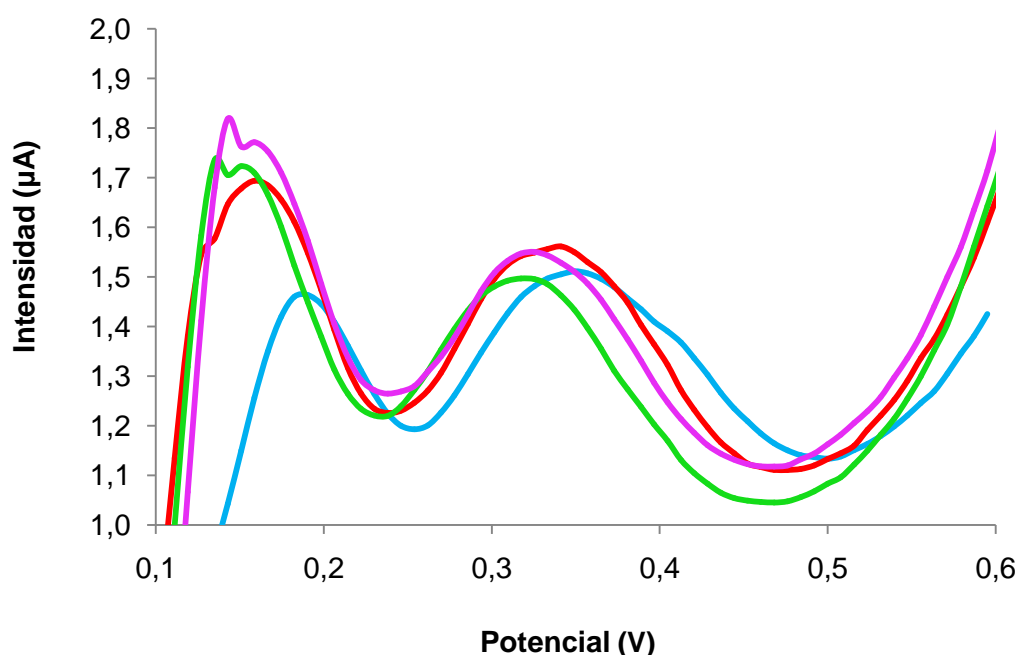


Figura 21. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un AuNP/SPCE para una concentración de IMP de $1.96 \mu\text{M}$: — [Glucosa] = 0; — [Glucosa] = $29.1 \mu\text{M}$; — [Glucosa] = $56.6 \mu\text{M}$; — [Glucosa] = $82.6 \mu\text{M}$ (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

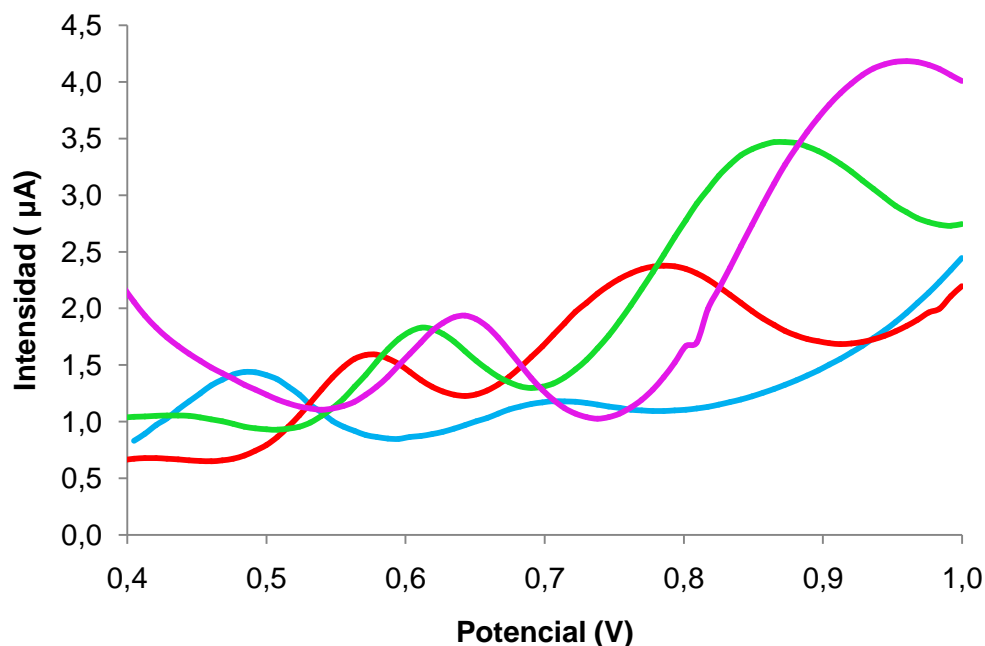


Figura 22. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un AuNP/SPCE para una concentración de IMP de $1.96 \mu\text{M}$: — [Dopamina] = 0; — [Dopamina] = $29.1 \mu\text{M}$; — [Dopamina] = $58.2 \mu\text{M}$; — [Dopamina] = $82.6 \mu\text{M}$ (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

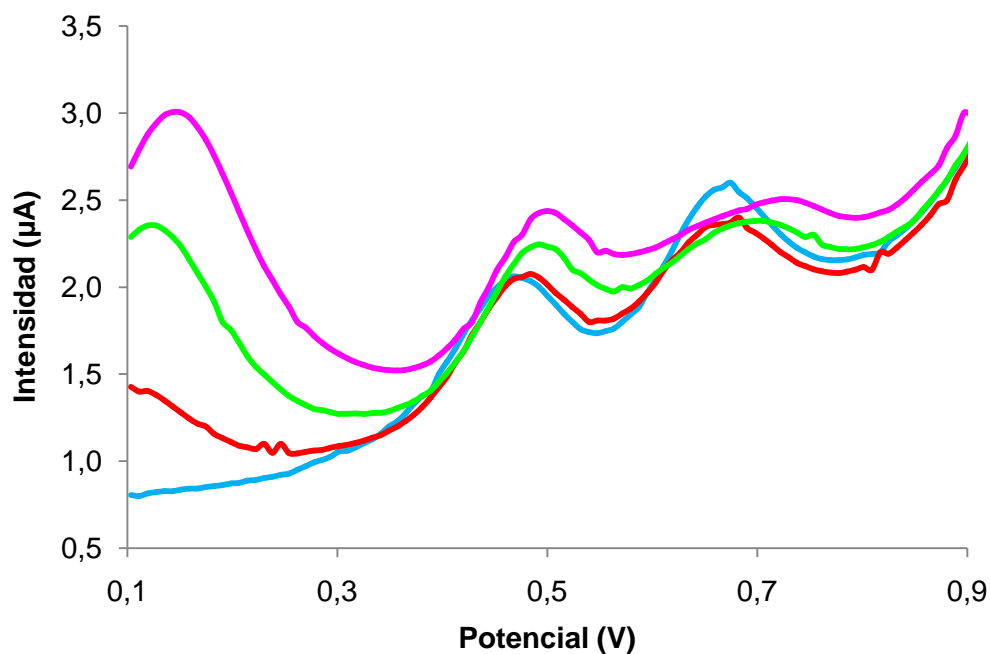


Figura 23. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un AuNP/SPCE para una concentración de IMP de $1.96 \mu\text{M}$: — [A. Úrico] = 0; — [A. Úrico] = $9.9 \mu\text{M}$; — [A. Úrico] = $38.5 \mu\text{M}$; — [A. Úrico] = $56.6 \mu\text{M}$ (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

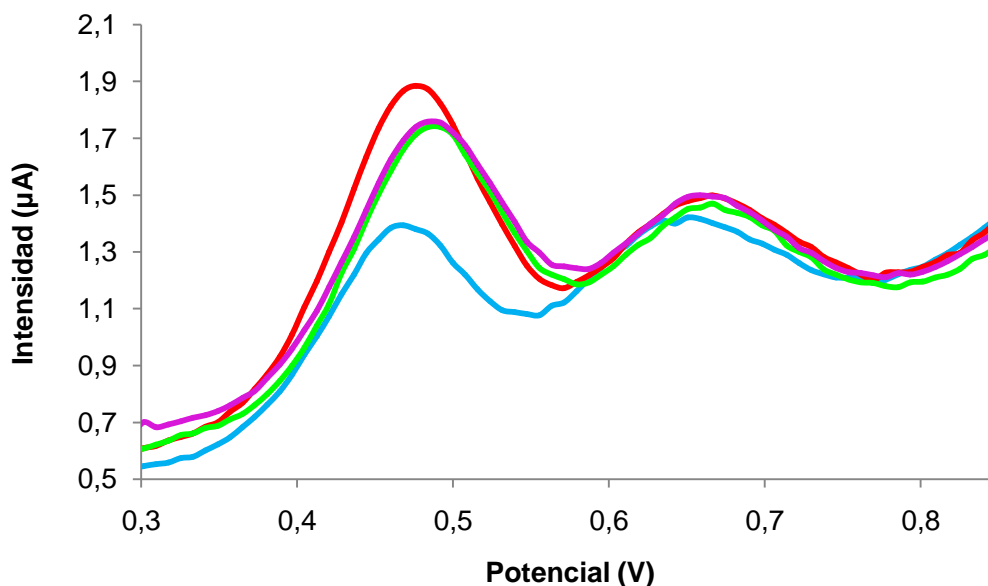


Figura 24. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un AuNP/SPCE para una concentración de IMP de $1.96 \mu\text{M}$: — [A. Cítrico] = 0; — [A. Cítrico] = $29.1 \mu\text{M}$; — [A. Cítrico] = $56.6 \mu\text{M}$; — [A. Cítrico] = $82.6 \mu\text{M}$ (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

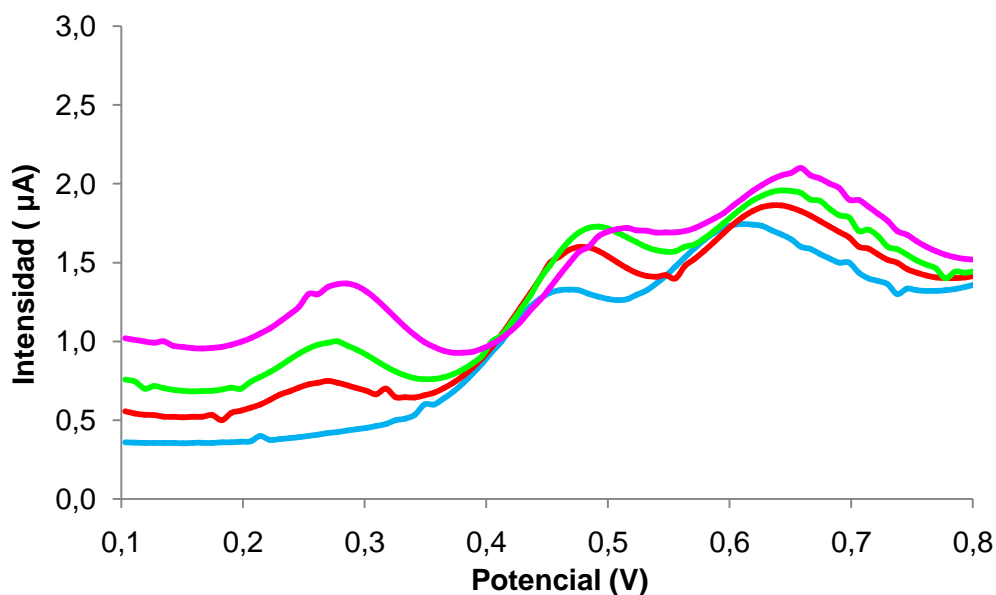


Figura 25. Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando un AuNP/SPCE para una concentración de IMP de $1.96 \mu\text{M}$: — [A. Ascórbico] = 0; — [A. Ascórbico] = $19.6 \mu\text{M}$; — [A. Ascórbico] = $38.4 \mu\text{M}$; — [A. Ascórbico] = $65.4 \mu\text{M}$ (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

ANÁLISIS DE IMIPRAMINA EN UN FÁRMACO COMERCIAL

El análisis de la muestra se llevó a cabo mediante adición estándar. En primer lugar, se adicionaron 10 mL de la disolución tampón Britton-Robinson (pH 6) en la celda electroquímica y seguidamente se añadieron 25 μL de la disolución de fármaco, preparada siguiendo el procedimiento anteriormente descrito y, se registró el voltamperograma. A continuación, se realizaron adiciones sucesivas de 100 μL de IMP

de concentración 10^{-4} M registrándose los voltamperogramas correspondientes con los que se construyeron rectas de calibrado como la mostrada en la figura 26.

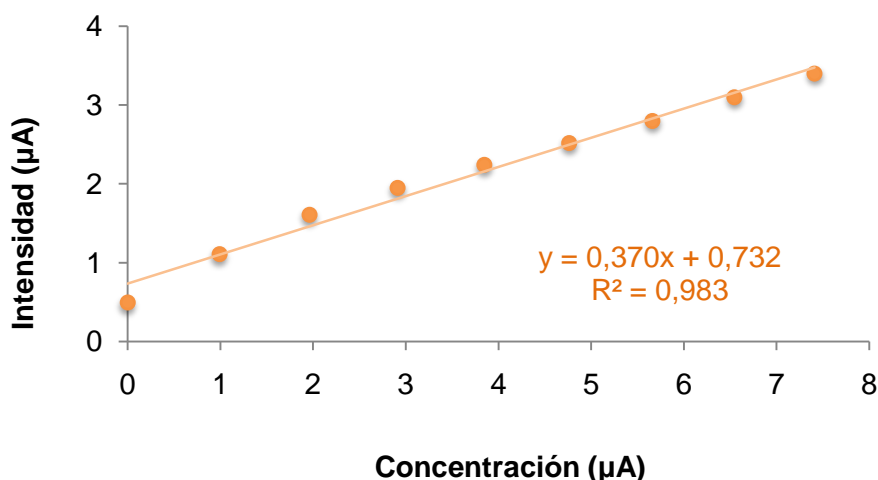


Figura 26. Puntos experimentales y recta de calibrado obtenidos mediante adición estándar para la determinación de la concentración de IMP en una muestra del fármaco Tofranil® empleando AuNPs/SPCEs (Tampón Britton-Robinson (pH 6); Potenciales vs. Electrodo de referencia de Ag/AgCl).

Con la recta de calibrado construida se determinó la cantidad de IMP presente en el comprimido del producto farmacéutico. El resultado obtenido, utilizando el método electroquímico desarrollado fue de 25.07 ± 0.86 mg ($n=3$, $\alpha=0.05$). Dicha cantidad concuerda con el valor proporcionado por el fabricante (25 mg).

7. CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo presentado pueden ser resumidos en las siguientes conclusiones:

- La IMP presenta un pico de oxidación a un potencial de +0.5 V que puede ser utilizado para el análisis de este compuesto empleando SPCEs y AuNPs/SPCEs.
- El valor óptimo de pH para la determinación de IMP con electrodos serigrafados es 6.
- La reproducibilidad del método propuesto en términos de RSD de las pendientes de las rectas de calibración utilizando diferentes electrodos es de 4.75 % y 6.87 % para SPCEs y AuNPs/SPCEs, respectivamente.
- La capacidad de detección obtenida para la IMP en las condiciones óptimas de las variables experimentales es de 14.1 ± 1.7 μM y 0.28 ± 0.06 μM para SPCEs y AuNPs/SPCEs, respectivamente.
- La glucosa y el ácido ascórbico pueden ser considerados como las especies que presentan mayor interferencia en la determinación de IMP con SPCEs .

- La dopamina puede ser considerada como la mayor especie interferente en la determinación de IMP con AuNP/SPCEs .
- Los AuNPs/SPCEs resultan más sensibles en la determinación de IMP pero, presentan mayor número de interferentes que los SPCEs.
- Los SPCEs y AuNPs/SPCEs empleados en este trabajo han resultado ser adecuados para la determinación de IMP en el fármaco comercial Tofranil®.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Ghoroghchian, M. Menghani, K. Salahuddin, *Microchemical Journal* 45 (1992) 62-67.
- [2] P.C. Yannielli, M. Cadeiras, L. Gregoretto, L. Kargieman, D.P. Cardinali, D.A. Golombek, *Biological Rhythm Research* 31((2000) 391-415.
- [3] X. Xu, G. Zhou, H. Li, Q. Liu, S. Zhang, J. Kong, *Talanta* 78 (2009) 26-32.
- [4] B.J. Sanghvi, A.K. Sivastaka, *Analyst* 138 (2013) 1395-1404.
- [5] I. Byryol, B. Uslu, Z. Küçükyavuz, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15 (1996) 371-381.
- [6] M. Khodari, H. Mansour, H. S. El-Din, *Analytical Letters* 30 (1997) 1909-1921.
- [7] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta* 73 (2007) 202–219.
- [8] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, L. Ferreira-Conçalves, M.J. Arcos-Martínez, *Talanta* 79 (2009) 1306-1310.
- [9] P.J. Rousseeuw, A.M. Leroy, *Robust Regression and Outlier Detection*, Wiley, Nueva York (1989).
- [10] L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 13 (1994) 1-6.