

Trabajo especial de grado

*“Determinación voltamétrica de
Amoxicilina en productos farmacéuticos”*

Br. Emily Fonseca
Tutor: Elkis Wehinhold
Co-tutor: Reynaldo Ortiz
Mérida 2022

www.bdigital.ula.ve

Agradecimientos

A Dios mi protector y guía por acompañarme y protegerme a lo largo de este recorrido, por mantenerme recta en el camino que ha elegido para mí y no dejarme sola. Amen

A mi Madre por ser ejemplo de vida y constancia, por su amor y apoyo incondicional, porque fuiste mi fortaleza en todo momento. Te amo.

A mi padre (+) que le estaré agradecida eternamente por su confianza y siempre creer en mí. Te amo.

A mi hermana Jade y su familia hermosa, Daniel Leonardo, Daniel Andrés y Jesús Daniel por su apoyo incondicional y por ser un ejemplo a seguir en la vida. Los amo.

A mi tutor Dr. Reynaldo Ortiz quien con su apoyo absoluto y paciencia me motivo cada día a la culminación de este trabajo.

A Raimond Morón que siempre fue un pilar fundamenta en toda mi carrera.

A la ilustre Universidad de Los Andes y la Facultad de Ciencias que me permitieron formarme como profesional.

A toda mi familia, amigos y compañeros de estudio por el apoyo brindado a lo largo de este hermoso camino.

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Electroquímica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes en Mérida. República Bolivariana de Venezuela

INDICE DE CONTENIDO

Capítulo I

1. Introducción	5
1.2 Antibióticos betalactámicos	5
1.2.1 Clasificación de los antibióticos betalactámicos	7
1.3 Amoxicilina	8
1.3.2 Mecanismo de acción	9
1.3.3 Características Farmacocinéticas	9
1.3.4 Reacciones adversas	10
1.4 Antecedentes de estudio	11

Capítulo II

2. Técnicas instrumentales	25
2.1 Voltametría	25
2.1.2 Voltametría cíclica	27
2.1.2.1 Sistemas reversibles	28
2.1.2.2 Sistemas irreversibles	29
2.1.2.3 Sistemas cuasi-reversibles	30
2.1.3 Voltametría de pulso diferencial (VPD)	31
2.2 Espectroscopia Ultravioleta Visible (UV-Vis)	33
2.2.1 Aspectos cuantitativos de las mediciones de absorción	34
2.2.1.1 Ley de Lambert-Beer	34

Capítulo III

3. Propuesta de investigación	35
3.1 Hipótesis	35
3.2 Justificación	36
3.3 Objetivos	36
3.3.1 Objetivo General	36
3.3.2 Objetivos específicos	36
3.4.1 Celdas y electrodos	37
3.4.2 Reactivos	37
3.4.3 Instrumentación	37
3.4.4 Método de referencia UV-Visible	38
3.4.5 Metodología	38
3.4.6 Plan de Trabajo	39

Capítulo IV

4.1 Procedimiento Experimental	40
4.1.1 Estudios Preliminares	40
4.1.1.1 Voltametría Cíclica del electrodo de Carbón Vítreo	40
4.1.1.2 Voltametría de las soluciones de amoxicilina oxidada (AMOX)	
4.1.1.3 Estudio de reproducibilidad.	
4.2 Influencia de la concentración de AMOX en la intensidad de la corriente	44
4.3 Curva de calibración por adición estándar (CCAET) y análisis de significancia entre los pendientes de la curva de calibración sencilla. Determinación de Amoxicilina	46

4.4 Validación por Espectroscopia UV-Visible	49
<i>Capítulo V</i>	
5.1 Conclusiones	53
5.2 Recomendaciones	54
<i>Capítulo VI</i>	
6.1 Referencias Bibliográficas	55

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la penicilina.	6
Figura 2. Estructura de amoxicilina.	8
Figura 3. Voltamograma cíclico en el electrodo de pasta de carbón modificado con [VO(Salen)].	11
Figura 4. Respuesta voltamétrica del electrodo de pasta de carbón modificado con [VO(Salen)] en soluciones que contienen diferentes concentraciones de AMX en una solución de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl con las diferentes técnicas utilizadas.	12
Figura 5. A) Voltamogramas de redisolución de AMX en el electrodo de GCE, y B) Voltamograma de redisolución con sustracción de fondo en la GCE modificada de MWCNT	13
Figura 6. Voltagrama de 1mM cíclico de amoxicilina en una solución de H_3PO_4	14
Figura 7. Esquema del mecanismo de reacción de Amoxicilina- MnO_2 y reducción-oxidación.	15
Figura 8. Voltagrama para Amoxicilina en etanol y agua.	16
Figura 9. Esquema de reacción.	16
Figura 10. Voltagramas cíclicos de Amoxicilina en tampón Britton-Robinson	17
Figura 11. (A) Voltamogramas cíclicos de $1,0 \times 10^{-3} \text{ M AMX}$, $1,0 \times 10^{-3} \text{ M AMX} + \text{Cu (II)}$ en PBS pH = 7 en CPE y (B) Voltamogramas de onda cuadrada de $1,0 \times 10^{-4} \text{ M AMX}$, $1,0 \times 10^{-4} \text{ M AMX} + \text{Cu (II)}$ y PBS pH = 7 (blanco) en CPE. [22]	19
Figura 12. A) Voltamogramas cíclicos de $1,0 \times 10^{-3} \text{ M AMX}$ en PBS (pH = 7) para varias velocidades de barrido ($0,05 - 0,2 \text{ Vs}^{-1}$); (B) Variación en la corriente máxima de AMX con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido; (C) gráfico de variación del potencial pico con $\log I$ para $1,0 \times 10^{-3} \text{ M AMX}$ en PBS (pH = 7). [22]	20
Figura 13. Voltamogramas cíclicos de $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ AMX}$ en $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solución tampón de fosfato (pH 6,0) para GCE (a), P6LC-PEDOT: PSS / GCE (b) y QDs- P6LC-PEDOT: PSS / GCE (C). Velocidad de barrido $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$. [23]	21
Figura 14. Proceso de oxidación electroquímica de AMX	22
Figura 15. Efecto de diferentes velocidades de barrido en voltamogramas cíclicos en el sensor QDs-P6LCPEDOT: PSS / GCE para un $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ AMX}$ en $0,1 \text{ mol de solución tampón de fosfato L}^{-1}$ (pH 6,0).	22
Figura 16. Celda electroquímica empleada en Voltametría.	26
Figura 17. Señal de excitación empleada en Voltametría cíclica.	27
Figura 18. Voltagrama	27
Figura 19. Voltagrama o voltamperograma cíclico para un sistema reversible.	29
Figura 20. Voltagrama cíclico para un proceso redox irreversible.	30
Figura 21. Voltagrama cíclico para un sistema cuasi-reversible.	31
Figura 22. (A) Señal de excitación en VPD y (B) respuesta típica en VPD.	32
Figura 23. Señal de potencial-tiempo empleada en voltametría de pulso diferencial.	32
Figura 24. Diagrama esquemático del aparato usado para métodos analíticos basados en la absorción de energía radiante (configuración de doble haz).	34
Figura 25. Respuesta voltamétrica del electrodo de CV en H_2SO_4 $0,5 \text{ M}$. $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.	40
Figura 26. Voltametría de barrido lineal para la reducción de AMOX 1 mM en H_3PO_4 .	41
Figura 27. Respuesta voltamétrica de la reducción de AMOX 1 mM a diferentes velocidades de barrido: 5, 10, 20, 50, 100 y 500 mV/s .	42
Figura 28. Respuesta voltamétrica para la reducción de AMOX 1 mM , durante barridos consecutivos, mostrando disminución de la corriente de reducción por envenenamiento de la superficie electroquímica, debido a los productos de reducción.	43
Figura 29. Superposición de la respuesta voltamétrica para la reducción de una solución de amoxicilina $0,01 \text{ M}$ sobre CV en distintas experiencias similares, luego de extraer y realizar la limpieza del electrodo con	44

alúmina de 0,3 micrones.

Figura 30. Respuesta voltamétrica por VBL. obtenida para la reducción de AMOX sobre en H_3PO_4 0,1 M en un intervalo de concentraciones de entre $1,0 \times 10^{-3}$ y $1,2 \times 10^{-2}$ M 45

Figura 31. Curvas de calibración sencilla y curvas de adición de estándar, I_p vs [AMOX] 48

Figura 32. Fotografía de soluciones de amoxicilina + VDB 9,6 μ M y de VDB en DMSO como solvente. 50

Figura 33. Espectros de absorción en Uv-Visible de soluciones de amoxicilina en DMSO, en presencia de VDB 9,6 μ M 50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos betalactámico. 7

Tabla 2. Cifras de mérito para la determinación de AMX utilizando el electrodo propuesto con diferentes técnicas voltamétricas. 12

Tabla 3. Recuperación y determinación de amoxicilina en tabletas en tampón Britton-Robinson 0,04 M a pH 5,0 mediante voltamperometría de pulso diferencial y voltamperometría de onda cuadrada utilizando el electrodo de carbono vítreo modificado con poli (naranja de acridina). 18

Tabla 4. Resultados de recuperación obtenidos para la determinación de AMX en comprimidos farmacéuticos. 20

Tabla 5. Resultados obtenidos del análisis de la formulación farmacéutica que contiene amoxicilina. 23

Tabla 6. Tabla resumen de actuaciones voltamétricas cíclicas de varios electrodos no modificados hacia AMX 24

Tabla 7. Características analíticas de las curvas de calibrado obtenidas mediante VBL. 46

Tabla 8. Resultados de la regresión lineal para las CCAE : $I_p = b + m[Amox]$ figura 31 48

Tabla 9. Concentraciones encontradas por extrapolación de las CCAE. 49

Tabla 10. Características analíticas de la curva de calibrado obtenida mediante espectroscopia UV-Visible. 51

Ecuación de la CCS = $A=0,0501[Amox] -0,00205$

Tabla 11. Características analíticas de la curva de calibrado obtenida mediante espectroscopia UV-Visible. 51

Ecuación de la CCS = $A=0,0501[Amox] -0,00205$

Tabla 12. Análisis de significancia para los fármacos de amoxicilina. 52

Tabla 13. Análisis comparativo entre las técnicas de Voltametría de barrido lineal y la espectroscopia UV-Visible, en la determinación de la Amoxicilina en formulaciones farmacéuticas. 52

CAPITULO I. Introducción

1.1 Antibióticos

El término antibiótico se refiere a agentes antibacterianos de origen natural (productos de algún microorganismo, hongo o bacteria), sintético o semisintético, capaces de inducir la muerte o la detención del crecimiento y la multiplicación de las bacterias y hongos^[1, 2, 3].

Tradicionalmente el término *antibiótico* sirvió para designar una sustancia producida por un microorganismo y el término *antimicrobiano* correspondía a las sustancias de origen sintético. No obstante, hoy en día esta diferenciación tiene escasa significación dado que la mayoría de las drogas actuales se elaboran mediante síntesis química o la fijación de diversas fracciones a la estructura central fundamental de un antibiótico después de la fermentación microbiana^[4].

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva^[3].

Hasta el momento se ha descrito en bibliografía más de 3100 antibióticos, de los que aproximadamente 2400 proceden de microorganismos, aunque sólo unas docenas se han utilizado en medicina debido, entre otros motivos, a que la mayoría de ellos carecen de toxicidad selectiva y son tóxicos casi en igual medida para el parásito y para el huésped^[5].

La mejor forma de clasificar los antibióticos es de acuerdo a su estructura química. Este hecho es explicable porque una estructura química común, implica un mismo mecanismo de acción, un patrón similar de efectos adversos y un mecanismo de generación de resistencia. Sin embargo, pequeños cambios químicos en la molécula patrón de un grupo antibiótico produce importantes cambios en la farmacocinética y el espectro de acción, obteniéndose mayor sensibilidad y penetración tisular^[6]. De acuerdo a esto, los antimicrobianos se organizan en los siguientes grupos: betalactámicos, aminoglucósidos, fenicoles, lincosaminas, macrólidos, tetraciclinas y sulfonamídicos, entre otros^[7].

1.2-Antibióticos betalactámico

Los antibióticos betalactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico^[3].

Consiste en un anillo heterociclo de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno y

según la naturaleza de los radicales se diferencian de las distintas moléculas, siendo las cadenas laterales complementarias las más relacionadas con su toxicidad antimicrobiana y farmacocinética^[8].

Uno de los antibióticos betalactámico que se dieron a principio del año 1928 fue la penicilina y se le atribuye a Alexander Fleming quien, observo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en algunos tubos de ensayo utilizados para el cultivo se inhibían ante la presencia del hongo *Penicillium notatum*^[*]. Más tarde Howard Florey y Ernest Chain, revivieron el interés por el descubrimiento de Fleming y persistieron en la identificación y purificación de la penicilina obteniendo así en 1945 el premio Nobel de medicina.

La penicilina son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético que contiene en el núcleo 6-aminopenicilánico, que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico y difieren entre ellas por sustituciones en la posición 6 del anillo^[3]. La síntesis de la penicilina ha llevado a la obtención de otros principios activos con distintas propiedades farmacocinéticas y mayor espectro antibacteriano^[9].

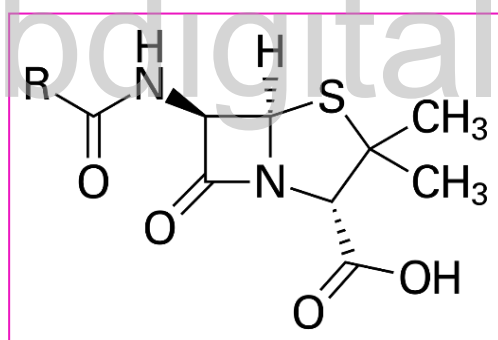


Fig. 1. Estructura de la penicilina.

La penicilina es uno de los compuestos principales en la familia de los antibióticos betalactámico, según su acción prolongada, mayor absorción digestiva, estabilidad frente a B-lactamasas y espectro antimicrobiano ampliado pueden clasificarse como:^[10]

Tabla I. Clasificación de los antibióticos betalactámico ^[10]

Grupo			Vía de administración	
			Parental	Oral
Penicilinas	Sensibles a las betalactamasas	Espectro reducido	Bencilpenicilina	Fenoxibencilpenicilina
		Activas frente a enterobacterias	Ampicilina	Amoxicilina, Ampicilina
		Activas frente a enterobacterias y Pseudomonas	Carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, azlocilina, piperacilina	Indanil-carbenicilina
	Resistente a las betalactamasas	Anti-stafilocócicas	Meticilina, oxacilina, nafcilina	Cloxacilina, dicloxacilina
		Combinadas con inhibidores de las betalactamasas	Ticarcilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, amoxicilina-ácido clavulánico	Amoxicilina-ácido clavulánico
Cefalosporinas	Primera generación		Cefazolina, cefalotina, cefradina	Cefalexina, cefradina, cefadroxilo
	Segunda generación	Activas frente a Haemophilus	Cefamandol, cefuroxima, cefonicida, ceforanida	Cefaclor, axetil cefuroxima, cefprozilo
		Activas frente a Bacteroides	Cefoxitina, cefotetán, cefmetazol	
	Tercera generación	Espectro ampliado	Ceftriaxona, cefotaxima, ceftizoxima	Ceftibuteno, cefdimir, cefixima, cefpodoxima
		Espectro ampliado y anti- Pseudomonas	Ceftacidima, cefoperazona, cefepima	Ninguno
Carbapenémicos			Imipenem-cilastatina meropenem, ertapenem	Ninguno
Monobactámicos			Aztreonam	Ninguno

Su mecanismo de acción consiste en actuar como bactericidas he interfiere con la formación de péptidos glicano, disminuyendo así la consistencia de la pared celular bacteriana y de este modo se favorece la lisis celular ante cualquier cambio del medio. Su ventaja es su gran efectividad y baja toxicidad, cuando su indicación es la correcta. Los compuestos betalactámicos siguen resultando de interés para los investigadores y se ha llegado a crear una muy amplia colección de nuevos candidatos a convertirse en antibióticos comerciales. ^[10]

1.3 Amoxicilina

1.3.1 Generalidades

La amoxicilina es una penicilina semisintética en uso desde la década de 1970. Sola y en combinación con el inhibidor de betalactamasa ácido clavulánico, es la penicilina más utilizada en Europa y en otros lugares, y es un "antibiótico de acceso básico" designado por la OMS. ^[11]

El estrecho espectro de la penicilina llevó a la búsqueda de agentes derivados con actividad bactericida contra organismos tanto grampositivos como gramnegativos. El primer derivado clínicamente relevante fue la ampicilina, descubierta por científicos del laboratorio Beecham en el Reino Unido y lanzada en 1961. Luego se construyó la amoxicilina de ampicilina: en 1972, Beecham lanzó la nueva penicilina semisintética, que difiere estructuralmente de la ampicilina solo por la adición de un grupo hidroxilo en el anillo de benceno. ^[11]

La amoxicilina según la IUPAC (2S, 5R, 6R) -6 - [[(2R) - 2-Amino-2- (4hidroxifenil) Acetil]amino]-3,3-dimetill-7-Oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2- ácido carboxílico ^[1] (**figura 2**). Obtenida en 1970^[2], con formula molecular de C₁₆H₁₉N₃O₅S, es uno de los antibióticos b-lactámicos de uso frecuenten en el mundo, es la única penicilina de espectro moderado, utilizadas en seres humanos y animales para el tratamiento de enfermedades infecciosa ^[3].

La amoxicilina es una aminopenicilina o penicilina sintética de amplio espectro, derivado p- hidroxil de la ampicilina con similar patrón de actividad in vitro. Es activa frente a neumococo por lo que excepto a meningitis puede usarse en dosis altas (1g cada 8 horas) ^[12].

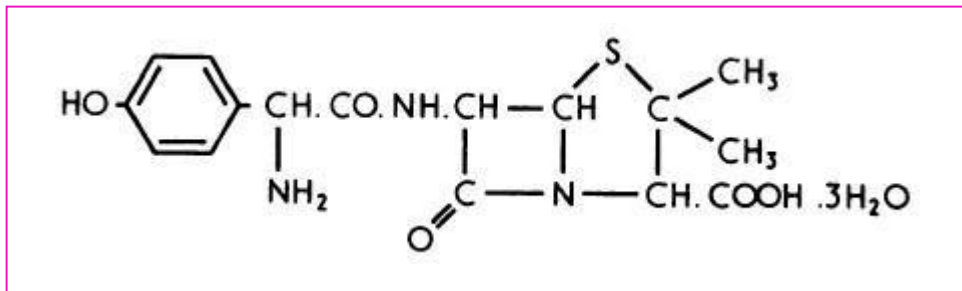


Figura 2. Estructura de amoxicilina. ^[12]

1.3.2 Mecanismo de acción

La amoxicilina impide en las bacterias la correcta formación de las paredes celulares. Concretamente inhibe la conexión entre las cadenas peptidoglicáneas lineares que forman la mayor parte de las paredes de los microorganismos Grampositivos. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la amoxicilina ocasiona, en último término, la lisis de la bacteria y su muerte. ^[13].

Es absorbida rápidamente en el intestino delgado (disponibilidad de aprox. el 80 %) tanto en ayunas como tras la ingesta de alimentos. Es eliminada con la orina sin ser metabolizada.

La Amoxicilina no resiste la acción hidrolítica de las β -lactamasas de muchos estafilococos, por lo que no se usa en el tratamiento de estafilococias. Aunque la amoxicilina es activa frente a los estreptococos, muchas cepas se están volviendo resistentes mediante mecanismos diferentes de la inducción de β -lactamasas, por lo que la adición de ácido clavulánico no aumenta la actividad de la amoxicilina frente a estas cepas resistentes. Dado que muchos otros gérmenes se están volviendo resistentes a la amoxicilina, se recomienda realizar un antibiograma antes de instaurar un tratamiento con amoxicilina, siempre que ello sea posible. ^[13].

Existen algunas cepas resistentes a este fármaco. Especialmente todas las cepas de *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., indol-positivos *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, y *Citrobacter* spp son resistentes. La cantidad de cepas resistentes de *Escherichia coli* parece aumentar. ^[13].

La administración de amoxicilina también puede ser en combinación con un inhibidor de la betalactamasa. Algunos ejemplos de estos son el ácido clavulánico y el sulbactam. Estos inhibidores de la betalactamasa actúan uniéndose irreversiblemente al sitio catalítico de la enzima betalactamasa de un organismo, que causa resistencia al anillo betalactámico original de amoxicilina. Estos fármacos no tienen actividad bactericida

inherente; sin embargo, cuando se combinan con amoxicilina, pueden ampliar el espectro de la amoxicilina a los organismos que producen la enzima betalactamasa. [14]

1.3.3. Características farmacocinéticas

Las concentraciones máximas de Amoxicilina en plasma son de 2 a 2,5 veces mayores que las de ampicilina después de ingestión de la misma dosis; los valores mencionados se alcanzan en términos de dos horas y son en promedio 4 µg/ml cuando se administra 250 mg. Los alimentos no interfieren en la absorción del antibiótico. Tal vez por la mayor absorción de su congénere, la incidencia de diarrea con la Amoxicilina es menor que después de usar ampicilina. la vida media de la Amoxicilina es de 80 min en promedio a concentraciones de la Amoxicilina oral, estos son detectables en el plasma por un lapso dos veces mayor más completa. En promedio, 20 % de la Amoxicilina se liga a proteínas plasmáticas. Gran parte de una dosis del antibiótico se excreta en la forma activa en orina. [13,15]

1.3.4. Reacciones adversas

La historia de reacciones alérgicas a las penicilinas o las cefalosporinas debe considerarse como una contraindicación. Las reacciones de hipersensibilidad cruzada entre las penicilinas y las cefalosporinas se presentan en los pacientes entre 1% a 16.5%, pero por lo general, los efectos son escasamente significativos desde el punto de vista clínico. [13, 15]

La amoxicilina se tolera bien, pero algunas molestias comunes pueden ser síntomas gastrointestinales (GI), como náuseas, vómitos y diarrea. Las superinfecciones, como las de los hongos o la colitis por Clostridioides difficile, también son complicaciones importantes. La cristaluria, la nefritis y la anemia hemolítica pueden suceder con la administración prolongada. Es de destacar que los pacientes que toman amoxicilina pueden tener menos diarrea que aquellos que toman ampicilina, lo que puede conducir a una mejor absorción en el intestino. [16]

Otra complicación importante a tener en cuenta son las reacciones de hipersensibilidad. La amoxicilina puede provocar reacciones de tipo I, II, III o IV. Es importante diferenciar entre una reacción de hipersensibilidad de tipo I y de tipo IV porque una puede ser más peligrosa que una reacción de tipo I es una hipersensibilidad mediada por IgE a un paciente sensibilizado que desencadena una liberación generalizada de histamina que conduce a una urticaria como erupción pruriginosa o incluso síntomas sistémicos más graves, como anafilaxia. Una reacción de hipersensibilidad de tipo IV no se produce mediada por la liberación de histamina, y es más papular o morbiliforme y a menudo no

pica. Los profesionales sugieren que casi todos los pacientes que reciben amoxicilina inadvertidamente para la mononucleosis infecciosa desarrollan una erupción maculopapular causada por una reacción de hipersensibilidad mediada por el tipo IV. Estos tipos de reacciones no se conocen para provocar anafilaxia.^[16]

1.4. Antecedentes de estudios que involucran el comportamiento electroquímico de la Amoxicilina

Se han empleado muchos métodos para la determinación de amoxicilina, como estudios farmacocinéticos, cromatográficos, espectrofotométricos y electroquímicos; de estos últimos algunos de los más recientes y relevantes, se describen a continuación:

En 2006 Bergamini y colaboradores,^[17] realizaron la evaluación de diferentes técnicas voltamétricas en la determinación de amoxicilina utilizando un electrodo de pasta de carbón modificado con [N, N -etilenbis(salicilideneaminato)]oxovanadio (IV). Se observó que la corriente del par redox $[V^{IV}O(\text{Salen})]/[V^{V}O(\text{Salen})]$ en la superficie del electrodo aumenta proporcionalmente al logaritmo de la concentración de AMX. El comportamiento electroquímico del electrodo modificado se caracterizó por voltamperometría cíclica y se obtuvieron curvas analíticas para AMX utilizando LSV de barrido lineal, DPV de pulso diferencial y voltamperometría de onda cuadrada SWV en condiciones optimizadas. Se observaron límites de detección a 24,8, 16,6 y 8,49 $\mu\text{mol L}^{-1}$ en LSV, DPV y SWV, respectivamente. Se aplicó el método SWV utilizando el electrodo modificado en la determinación de AMX en tabletas de formulaciones farmacéuticas y se comparó con el método yodométrico.

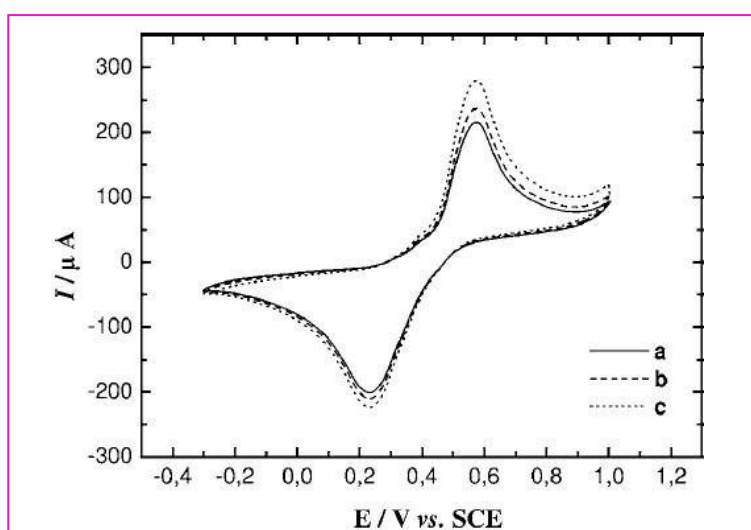


Figura 3. Voltamograma cíclico en el electrodo de pasta de carbón modificado con $[VO(\text{Salen})]$ a velocidad de barrido de 20 mV s^{-1} entre $-0,30$ y $1,0 \text{ V vs SCE}$, en solución de $\text{KCl } 0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,5, en ausencia a y en presencia de $25,0$ (b) y $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ AMX.^[17]

Los perfiles voltamétricos y la curva analítica se presentan en la figura 4.

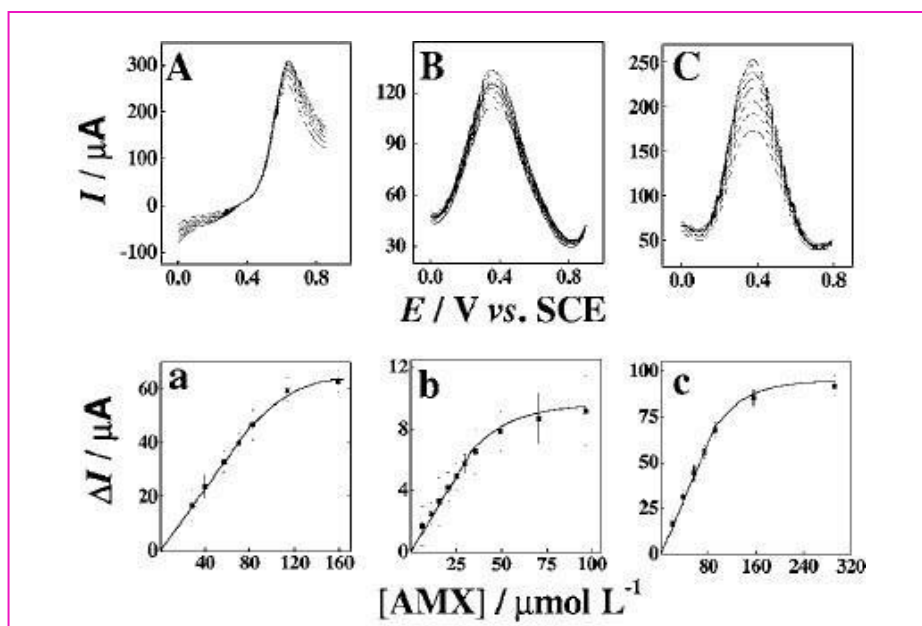


Figura 4. Respuesta voltamétrica del electrodo de pasta de carbón modificado con [VO(Salen)] en soluciones que contienen diferentes concentraciones de AMX en una solución de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl con las diferentes técnicas utilizadas. A) LSV: $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$. B) DPVs: $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ y amplitud de pulso 50 mV . C) SWV: frecuencia 10 Hz , paso 10 mV y amplitud de onda cuadrada 50 mV . Curvas analíticas obtenidas con las diferentes técnicas: a) LSV, b) DPV y c) SWV.^[17]

A partir de los datos de la Tabla 2, es posible concluir que LSV y SWV presentaron el mayor rango dinámico lineal LDR, pero SWV permite trabajar en un rango mayor de concentraciones de AMX. De hecho, el límite de detección observado en SWV es el más bajo observado en el conjunto de técnicas empleadas en este trabajo. La oxidación de AMX con el electrodo modificado estudiado en las diferentes técnicas aplicadas y sus respectivas curvas analíticas se muestran por separado en la Figura 4.

Tabla 2. Cifras de mérito para la determinación de AMX utilizando el electrodo propuesto con diferentes técnicas voltamétricas.^[17]

Técnica	LDR ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Sensibilidad ($\mu\text{A}\mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
LSV	28,5–82,6	0,563	24,8
DPV	18,3–35,5	0,175	16,6
SWV	18,9–91,9	0,736	8,49

En 2009 Behzad Rezaei colaboradores, ^[18] realizaron estudio del comportamiento electroquímico de la amoxicilina (AMX), un antibiótico b-lactámico, en el cual se describe un electrodo modificado con nanotubos de carbono de paredes múltiples (MWCNT) mediante espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) y voltamperometría de redisolución por adsorción para la determinación sensible de AMX en muestras farmacéutica y muestras de orina humana dentro de un amplio rango de pH de 2.0 a 10.0, bajo condiciones optimizadas se demostró que el pico de oxidación tiene dos rangos dinámicos lineales de 0,6 - 8,0 y 10,0 - 80,0 mM con un límite de detección de 0,2 mM y una precisión de <4%.

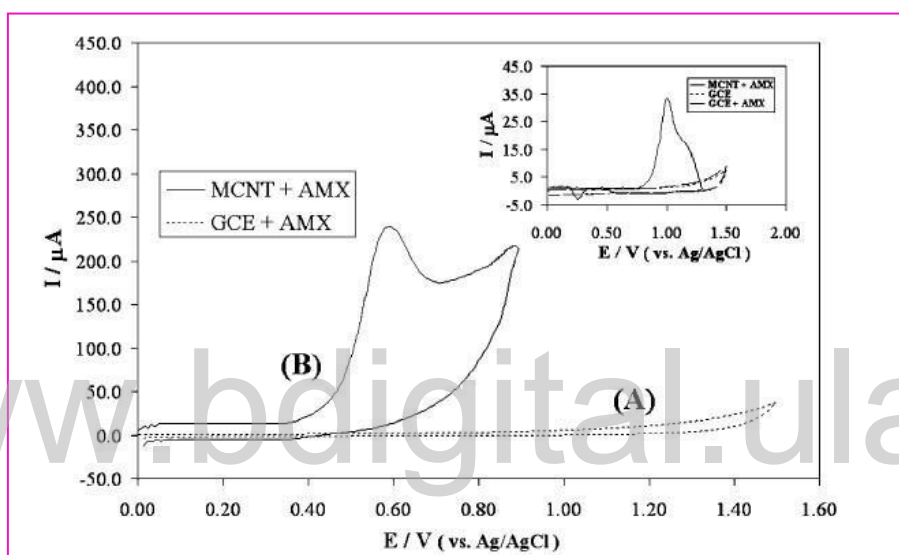


Figura 5. A) Voltamogramas de redisolución de AMX en el electrodo de GCE, y B) Voltamograma de redisolución con sustracción de fondo en la GCE modificada de MWCNT. Otras condiciones: 20 mM AMX; tasa de barrido de 100 mV s⁻¹; pH 7,5; y tiempo de acumulación de 6 minutos. El recuadro muestra los voltamogramas de redisolución con sustracción de fondo correspondientes en pH 3,0. ^[18]

Como puede verse, la oxidación de amoxicilina en el electrodo de carbono vítreo desnudo y en condiciones ácidas muestra una onda mal definida atribuida a la oxidación del sustituyente fenólico al grupo carbonilo relevante. En la solución tampón básica, AMX no muestra ninguna señal de electrooxidación en el GCE. Los resultados mencionados, se han realizado mediante medidas de remoción por adsorción para potenciar las señales de salida. La amoxicilina produce un pico de oxidación bien definido en el electrodo modificado de MWCNT cerca de 1,0 y 0,6 V para pH 3,0 y 7,5, respectivamente, y la corriente de pico de oxidación aumenta significativamente en comparación con la del GCE desnudo. El aumento de la corriente máxima y la disminución del potencial de oxidación son evidencias claras del efecto catalítico de los MWCNT hacia la oxidación de amoxicilina. El producto generado de la oxidación de AMX se retiene en la superficie

del electrodo, que puede identificarse por su reducción a $\sim 0,25$ V a pH 3,0 en el barrido inverso. Los estudios electroquímicos para identificar el mecanismo de oxidación de AMX confirman la contribución de un electrón y un protón en el proceso. El análisis por este método en comparación con otros métodos electroquímicos informados se puede realizar con una sensibilidad y un rango de determinación más altos con un límite de detección experimental bajo de 0,2 mM. Este electrodo modificado se puede utilizar correctamente para la determinación de amoxicilina en muestras de fármacos y orina humana con resultados satisfactorios. ^[18]

En este mismo año, Mei-Hsin Chiu y colaboradores ⁽¹⁹⁾ desarrollaron una metodología para mejorar la detección electroquímica de amoxicilina basado en la conocida conversión química de los catecoles en o-quinonas mediante oxidación con MnO_2 , la cual puede posteriormente determinarse fácilmente por reducción electroquímica en electrodos de carbono serigrafiados (SPCE). Emplearon un reactor de MnO_2 acoplado con un sensor amperométrico para lograr mayor selectividad y mejor detección. Bajo las condiciones optimizadas, con un potencial aplicado de 0,0 V frente a Ag/AgCl obtuvieron un límite de detección de 17 nM.

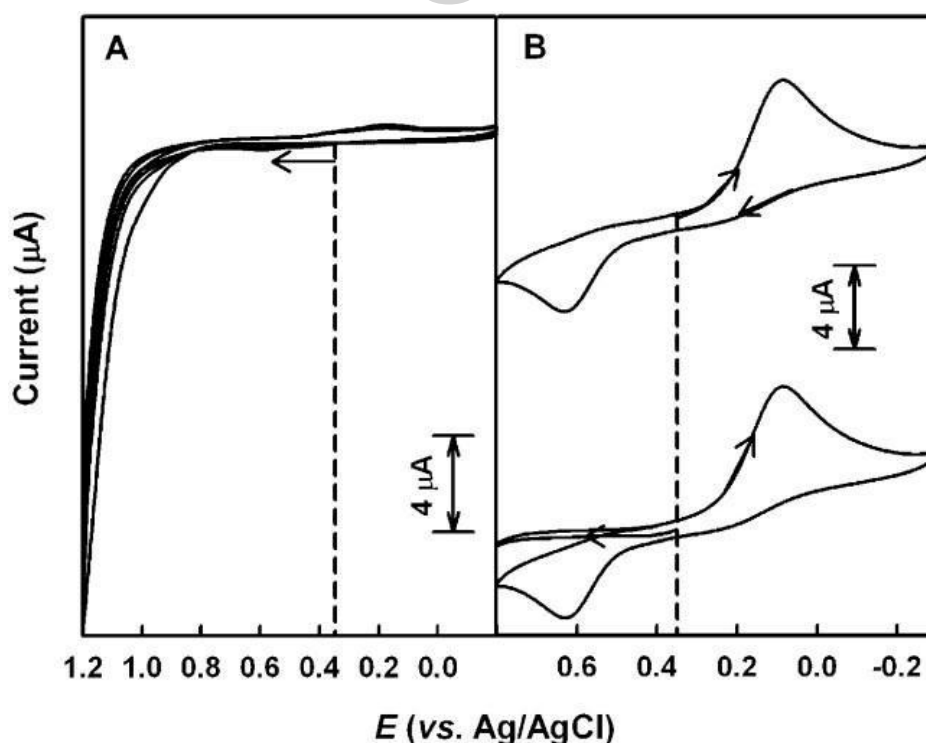


Figura-6.- Voltamogramas cíclicos de 1 mM de amoxicilina en una solución 0,1 M de H_3PO_4 en un SPCE desnudo antes (A) y después (B) de la reacción con MnO_2 a una velocidad de barrido de 50 mV/s. La línea discontinua indica el potencial de barrido inicial.

En primer lugar, compararon los voltagramas cíclicos típicos de la amoxicilina antes/después de la oxidación química con MnO_2 . Como se muestra en la figura 6a, la oxidación electroquímica directa de la de la amoxicilina no es adecuada para fines analíticos, ya que la respuesta electroquímica de la amoxicilina es muy débil, además, los picos de la amoxicilina disminuyen o aumentan irregularmente durante el barrido consecutivo. Por otro lado (fig. 6B) muestra un voltagrama cíclico bien definido y estable con un pico de reducción a unos 0,1 V y el pico de oxidación correspondiente a aprox.

0,6 V se obtuvo tras completar la oxidación química con MnO_2 cerca de 30 min, procesos estos que se atribuyen al siguiente esquema de reacción:

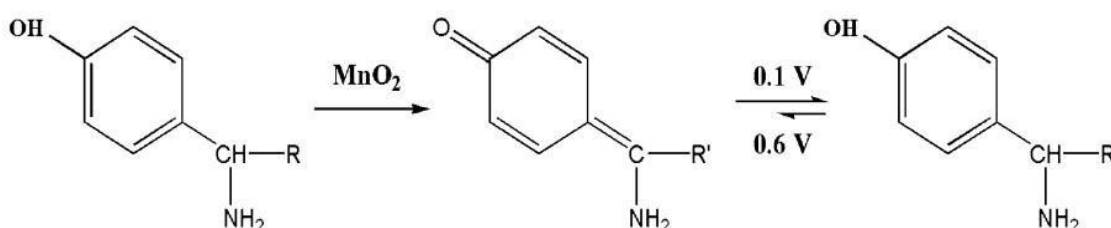


Figura 7. Esquema del Mecanismo de reacción Amoxicilina - MnO_2 y reducción – oxidación en la superficie electródica.

En 2014 Duke Orata y colaboradores,^[20] informaron sobre las propiedades redox de la amoxicilina, un antibiótico de amplio espectro, en un electrodo de trabajo modificado con bentonita. El voltamograma cíclico obtenido con etanol está bien definido y es casi reversible, lo que sugiere una cinética rápida del electrodo. El pico de oxidación en el caso del agua exhibe un hombro a 0.195v y un pico bien definido a 0.465v con un pico de reducción amplio aproximado a 0.450v. En el caso del etanol, hay un solo pico de oxidación bien definido a 0.480v y un pico de reducción bien definido a 0.330v. Interacción de amoxicilina con cationes metálicos (Co^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+} y Cu^{2+}), aminoácidos- metionina, leucina arginina y con hidrocortisona y paracetamol. Los resultados obtenidos confirman las interacciones de la amoxicilina con estas sustancias químicas. El potencial redox de la amoxicilina se ve alterado o inhibido en algunos casos. Esto es informativo dado que estas sustancias se usan comúnmente junto con la amoxicilina como parte de una receta, a pesar del hecho de que los aminoácidos son macromoléculas importantes en el sistema bioquímico / fisiológico humano.

El análisis espectrofotométrico UV-vis mostró que la absorbancia de la amoxicilina se ve afectada por el pH de la solución de electrolitos, probablemente una indicación de que este último afecta el grado de conjugación en la amoxicilina.

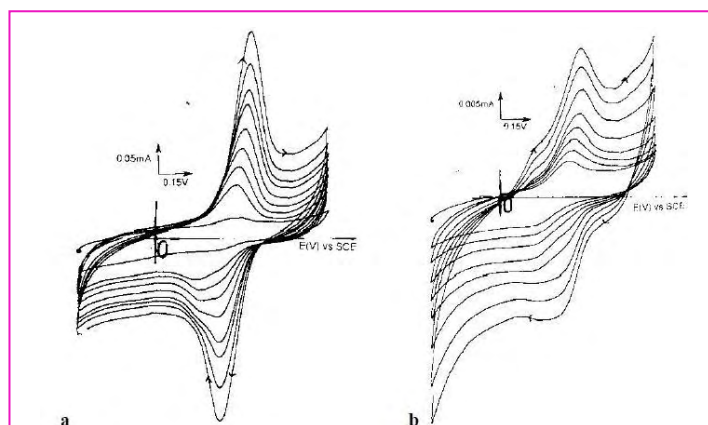


Figura 8. (a) CV para Amoxicilina en etanol;(b) CV obtenido para Amoxicilina en agua. [20]

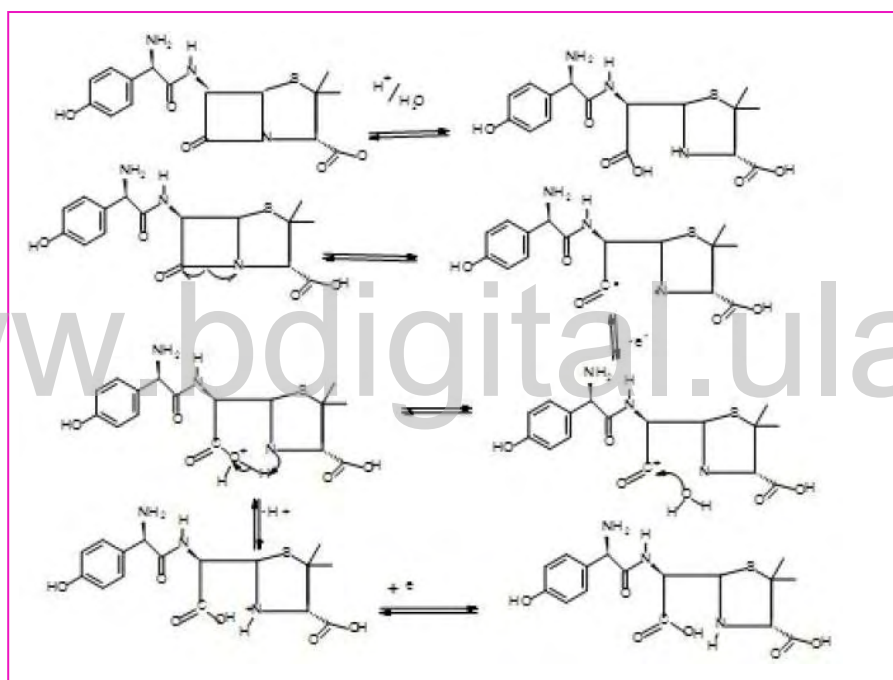


Figura 9: Esquema propuesto de oxidación / reducción de amoxicilina. [20]

La Amoxicilina tiene un grupo funcional amida que está electroquímicamente cerca de la funcionalidad azetidina-2-ona. Por lo tanto, se espera que se someta a hidrólisis con la apertura del anillo de azetidina-2-ona de cuatro miembros, en un proceso $2H + / 1e$. Este comportamiento redox se asemeja mucho el proceso redox quinina / imina en polinalina (2). [20]

En 2015 Fatma Ağın, [21] describe como el comportamiento electro-oxidativo de la amoxicilina se investigó en un electrodo de carbono vítreo modificado con poli(naranja de acridina) de pH 5,0 a 8,0 mediante voltamperometría cíclica, de pulso diferencial y de

onda cuadrada. Se demostró que la electroquímica de la amoxicilina es irreversible y la difusión se controla utilizando el electrodo modificado con poli(naranja de acridina). La amoxicilina se determinó por pulso diferencial y voltamperometría de onda cuadrada en tampón Britton-Robinson 0,04 M a pH 5,0. Las curvas de calibración fueron lineales entre 0,4 y 20 μM con límites de detección de $1,87 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ y $1,55 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ para voltamperometría de pulso diferencial y voltamperometría de onda cuadrada, respectivamente. Los métodos desarrollados proporcionaron alta selectividad, precisión y exactitud y se emplearon para la determinación de amoxicilina en productos farmacéuticos y suero humano.

En la Figura 10 se muestran voltamogramas cíclicos típicos de 10 mM de amoxicilina con el electrodo modificado con poli(acridina naranja) en tampón Britton-Robinson 0,04 M a pH 5,0, 7,0, 9,0 y en tampón fosfato 0,025 M a pH 5,0 presente en todos los valores de pH a aproximadamente 0,92 V (frente a Ag / AgCl) en tampón Britton-Robinson 0,04 M a pH 5,0.

Este pico muestra que la amoxicilina sufre una oxidación electroquímica irreversible en el electrodo de carbono vítreo modificado con poli (naranja de acridina).^[21]

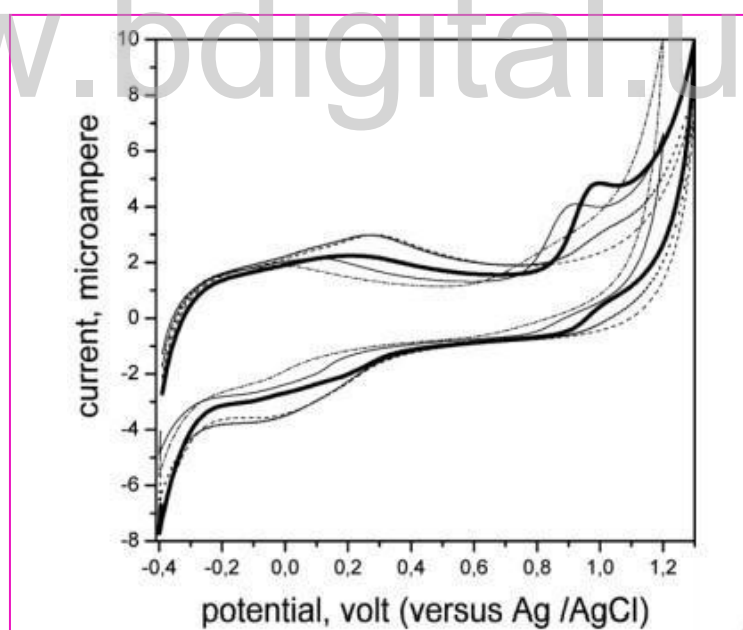


Figura 10. Voltamogramas cíclicos de amoxicilina en tampón Britton-Robinson 0,04 M a pH 5,0 (—), pH 7,0 (---), pH 9,0 (- · - · -) y tampón fosfato 0,025 M pH 5,0 (····) utilizando la poli(acridina naranja) electrodo de carbono vítreo modificado. La línea discontinua es tampón fosfato 0,025 M a pH 5,0; la concentración de amoxicilina es 100 μM ; y la velocidad de barrido es 100 mV s^{-1} .^[21]

A continuación, se muestra la tabla con los valores obtenidos en esta investigación en muestras farmacéuticas:

Tabla 3. Recuperación y determinación de amoxicilina en tabletas en tampón Britton-Robinson 0,04 M a pH 5,0 mediante voltamperometría de pulso diferencial y voltamperometría de onda cuadrada utilizando el electrodo de carbono vítreo modificado con poli (naranja de acridina).^[21]

Parámetros determinados	Tableta (mg)	
	Voltamperometría diferencial de pulsos	Voltamperometría de onda cuadrada
Masa etiquetada (mg)	1000	1000
Masa determinada (mg) *	1005	1001
Desviación estándar relativa %	0,53	0,38
Inclinación % (Bias)	□0,5	□0,1
valor t	0,157	
Valor F	0,524	
Agregado (mg)	250,00	250,00
Encontrado (mg) *	251,25	250,75
Promedio recuperado (%)	100,56	100,30
Desviación estándar relativa de recuperación (%)	0,51	0,29
Inclinación % (Bias)	□0,5	□0,3

En 2019 A. Hrioua y colaboradores,^[22] realizaron estudios de detección voltamétrica de amoxicilina en el electrodo de grafito utilizando el efecto quelato de los iones de cobre (II) para la aplicación en sangre humana y tabletas farmacéuticas. Hrioua et al, sugiere un nuevo método electroquímico para la determinación voltamétrica indirecta de amoxicilina (AMX) en presencia de iones de cobre Cu (II) en el electrodo de pasta de carbón (CPE), este método se basa en la interacción entre el antibiótico β -lactámico y los iones de cobre. Dicha interacción se estudió en primer lugar mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV), donde el pico correspondiente a la oxidación de AMX a 0,7 V disminuye significativamente en presencia de iones de cobre. El producto de reacción se caracterizó por espectrofotometría UV-visible y espectroscopía infrarroja (IR). Además, cuando se añadió AMX al electrolito de soporte que contenía iones de cobre, se incrementó la corriente voltamétrica del sistema redox Cu (II)/Cu (I). Por tanto, este aumento de la corriente se utilizó para la determinación indirecta de amoxicilina. Al seleccionar una concentración apropiada de cobre (II), la curva de calibración para AMX se estableció en el rango de concentración de $1,95 \times 10^{-7}$ a $1,46 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Se encontró que el límite de detección era $8,84 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. Se estudió la influencia de diferentes compuestos orgánicos en la determinación de AMX y el efecto de la coexistencia de otros iones metálicos en la solución electrolítica. La aplicabilidad del método propuesto se probó en sangre humana y tabletas farmacéuticas.

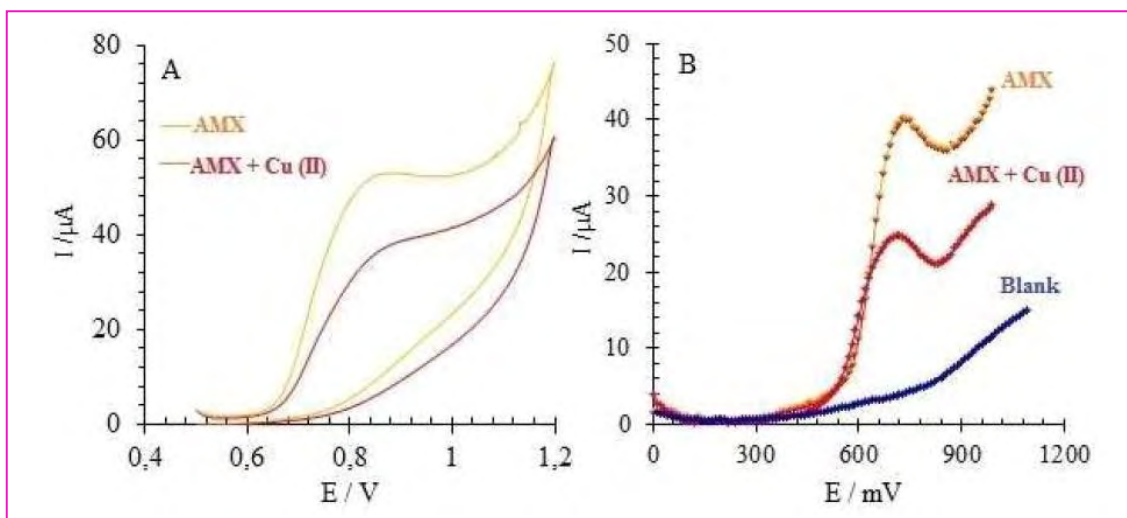


Figura 11. (A) Voltamogramas cíclicos de 1.0×10^{-3} M AMX, 1.0×10^{-3} M AMX + Cu (II) en PBS pH = 7 en CPE y (B) Voltamogramas de onda cuadrada de 1.0×10^{-4} M AMX, 1.0×10^{-4} M AMX + Cu (II) y PBS pH = 7 (blanco) en CPE. ^[22]

Los voltamogramas cíclicos para la electrooxidación de 1 mM AMX en PBS a pH 7.0, como se muestra en la Figura 11A, presentan una onda de oxidación a 0.85 V, que se atribuye a la oxidación del grupo OH de los sitios fenólicos del AMX ($\varphi - OH$). Los voltamogramas de onda cuadrada de electrooxidación de AMX 0.1 mM para ambos en ausencia y presencia de 0.1 mM de Cu (II) en PBS (pH = 7) se comparan en la Figura 11B, como puede verse, el potencial pico anódico de oxidación de amoxicilina en el electrodo de pasta de carbón es de aproximadamente 0,7 V. La presencia de Cu (II) tuvo una tremenda influencia en la respuesta del electrodo, es evidente que la corriente anódica de AMX en presencia de Cu (II) es significativamente menor que la de una solución sin ella. Esta disminución está directamente relacionada tanto con la disminución de la concentración de AMX como con la formación de un nuevo producto formado, que no se puede oxidar en el electrodo de trabajo.

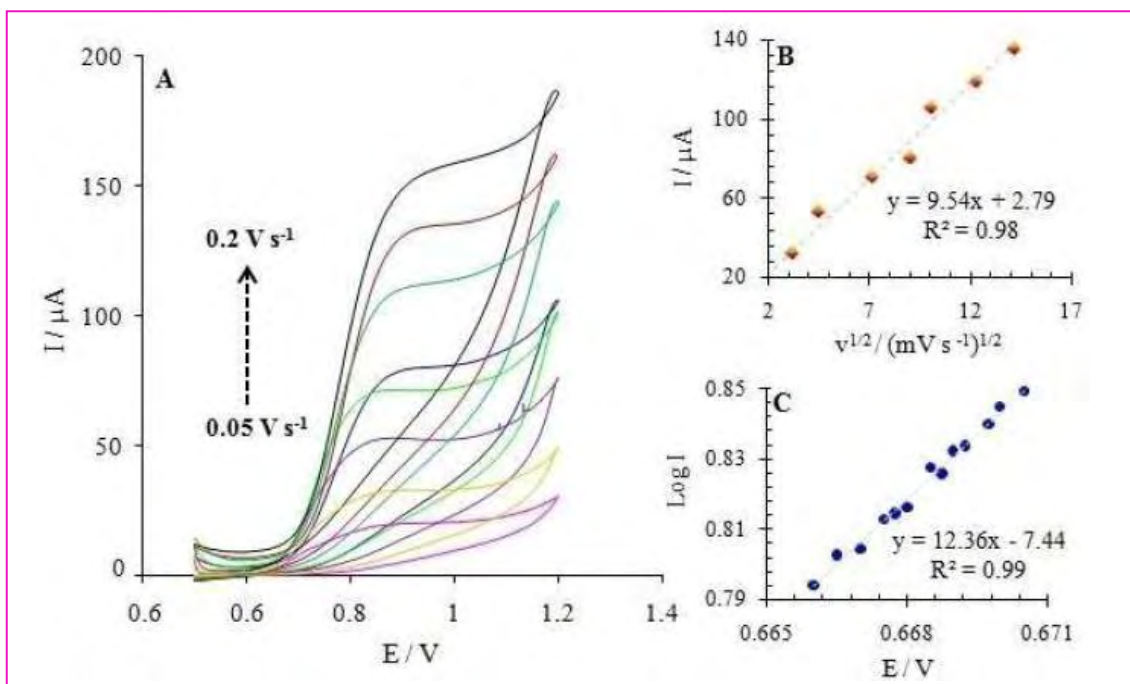


Figura 12. A) Voltamogramas cíclicos de $1,0 \times 10^{-3}$ M AMX en PBS (pH = 7) para varias velocidades de barrido (0,05 - 0,2 Vs^{-1}); (B) Variación en la corriente máxima de AMX con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido; (C) gráfico de variación del potencial pico con log I para $1,0 \times 10^{-3}$ M AMX en PBS (pH = 7).^[22]

La Figura 12A muestra los voltamogramas cíclicos de AMX registrados a diferentes velocidades de barrido en el rango de 0,05 V a 0,2 V. Se registró el efecto de la corriente máxima de $1,0 \times 10^{-3}$ M AMX frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Figura 12B). Se obtuvo una buena relación lineal, mostrando que la reacción de oxidación de AMX está controlada por proceso de difusión, lo que confirma la ley de Randles-Sevcik. Además, para calcular el coeficiente de transferencia electrónica y el número de electrones transferidos en el paso de determinación de la velocidad, se registró un gráfico entre el potencial máximo y el log I de oxidación AMX (Figura 12C).^[22]

En la siguiente tabla se muestra los resultados obtenidos en muestras farmacéuticas:

Tabla 4. Resultados de recuperación obtenidos para la determinación de AMX en comprimidos farmacéuticos.^[22]

Nombre del fármaco	AMX encontrado (mg/tableta)	RSD (%)	Recuperación (%)
Augmentin	1033.31	2.68	103.3
Aximicina	1061.39	2.59	106.10
Novoclina	1019.32	6.06	101.93
Neumocid	1006.12	4.25	100.63

En 2020 Ademar Wong y colaboradores, ^[23] presentaron una nueva plataforma electroquímica basada en nanomateriales de bajo costo para la detección sensible del antibiótico amoxicilina en diferentes matrices, desarrollaron un nuevo dispositivo electroquímico basado en una combinación de nanomateriales como puntos cuánticos de telururo de cadmio y carbono Printex 6L dentro de una película de poli (3,4-etilendioxitiofeno) poliestireno sulfonato para la determinación sensible de amoxicilina. Las características morfológicas, estructurales y electroquímicas del material nanoestructurado se evaluaron mediante difracción de rayos X, microscopía confocal, microscopía electrónica de transmisión y técnicas voltamétricas. La sinergia entre estos materiales aumentó la actividad electroquímica, la tasa de transferencia de electrones y el área de la superficie del electrodo, lo que condujo a una alta magnitud del corriente pico anódico para la determinación de amoxicilina. Se realizó la determinación electroquímica del antibiótico utilizando voltamperometría de onda cuadrada. En las condiciones experimentales optimizadas, el sensor propuesto mostró alta sensibilidad, repetibilidad y estabilidad a la determinación de amoxicilina, con una curva analítica en el rango de concentración de amoxicilina de 0,90 a 69 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, y un límite de detección bajo de 50 nmol.L^{-1} . Sin interferencia significativa en la señal electroquímica de amoxicilina se observó a partir de posibles interferencias biológicas y fármacos de amplio uso, como ácido úrico, paracetamol, urea, ácido ascórbico y cafeína. Se demostró que sin ningún tratamiento previo de la muestra y utilizando un dispositivo de medición simple, el sensor podría ser un método alternativo no solo para el análisis de productos farmacéuticos (tabletas comerciales) y muestras clínicas (orina), sino también para examinar la calidad de los alimentos (muestras de leche).

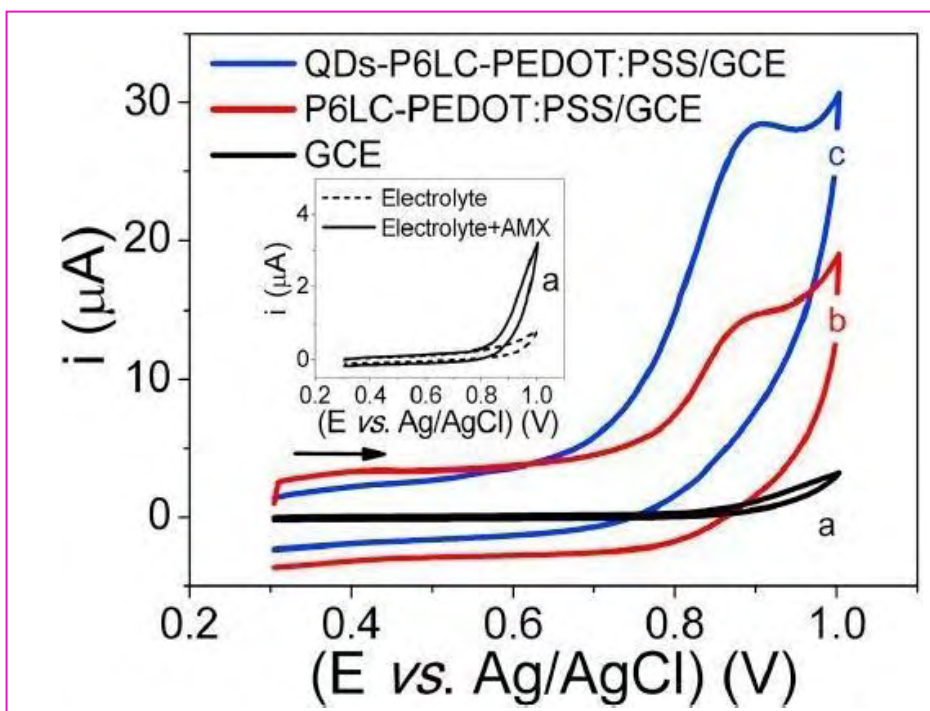


Figura 13. Voltamogramas cíclicos de 0.5 mmol L^{-1} AMX en 0.1 mol L^{-1} de solución tampón de fosfato (pH6.0) para GCE (a), P6LC-PEDOT: PSS / GCE (b) y QDs- P6LC- PEDOT: PSS / GCE (C). Velocidad de barrido $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$. [23]

En la Fig. 13 (a), no se observaron procesos electroquímicos significativos en la respuesta voltamétrica de GCE desnudo en presencia de la solución estándar de 0.50 mmol L^{-1} AMX. Sin embargo, en las curvas (b) y (c), que fueron resultados de P6LC-PEDOT: PSS / GCE y QDs-P6LC-PEDOT: PSS / GCE, respectivamente, se obtiene una alta respuesta electroquímica en presencia de una solución que contiene 0.50 mmol L^{-1} AMX, revela oxidación irreversible bien definida picos a $+0,88 \text{ V}$, correspondientes a la oxidación de AMX en la superficie del electrodo. Se ha informado que estos procesos electroquímicos corresponden a los procesos de oxidación representados en el Esquema de la figura 14. [23]

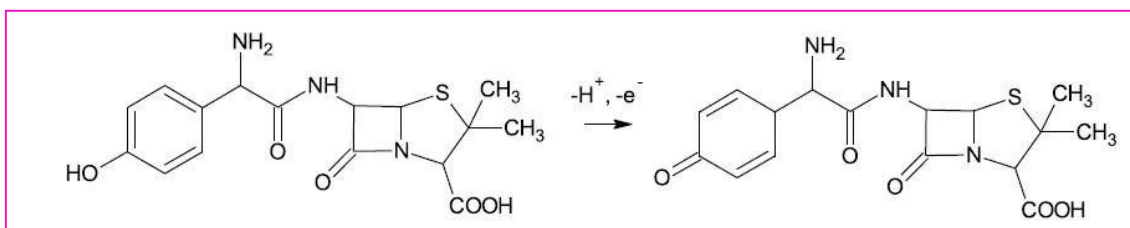


Figura 14. Procesos de oxidación electroquímica de AMX. [23]

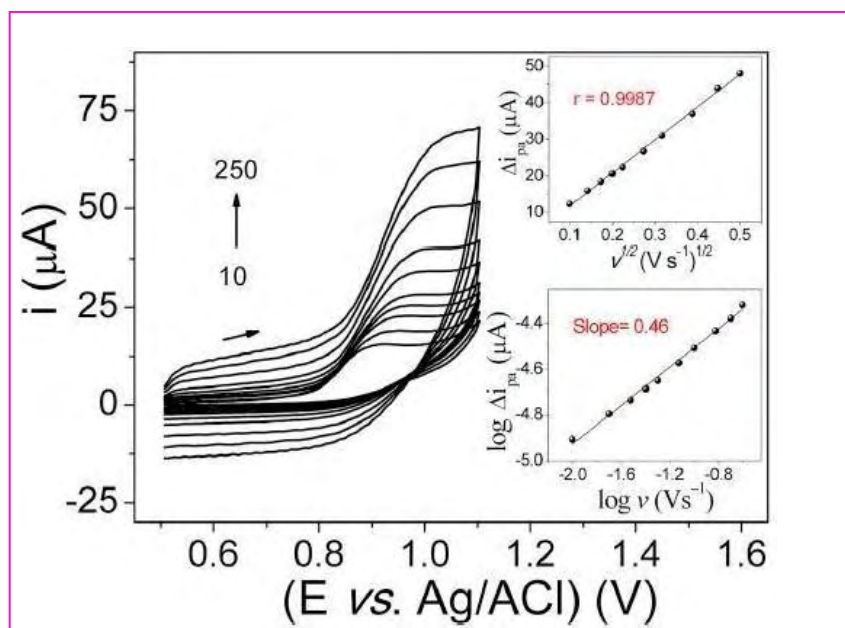


Figura 15. Efecto de diferentes velocidades de barrido en voltamogramas cíclicos en el sensor QDs-P6LCPEDOT: PSS / GCE para un 0,5 mmol L⁻¹ AMX en 0,1 mol de solución tampón de fosfato L-1 (pH 6,0).^[23]

Se investigó la influencia de las velocidades de barrido de 10 a 250 mV s⁻¹ en la respuesta analítica para una solución de 0,50 mmol L⁻¹ AMX (Fig. 15). Las corrientes de pico anódicas (i_{pa}) de AMX en solución tampón de fosfato (pH 6,0) cambiaron a valores más positivos a medida que aumentaba la velocidad de barrido, lo que caracteriza una reacción electroquímica irreversible. El gráfico de Δi_{pa} frente a $v^{1/2}$ fue lineal, lo que indica que el transporte de masa del AMX sobre la superficie del electrodo se produjo por difusión. Los gráficos de $\log i_{pa}$ frente a $\log v$ (recuadro de la Fig. 16) mostraron valores de pendiente de 0,43, característicos de los sistemas controlados por difusión.^[23]

Tabla 5. Resultados obtenidos del análisis de la formulación farmacéutica que contiene amoxicilina.^[23]

Muestra	Valor nominal	Método propuesto (mol L ⁻¹)	Método comparativo (mol L ⁻¹)	Recuperación ^b (sensor, %)	RSD (sensor, %) ^c	Error relativo ^d
		Encontrado ^a	Encontrado ^a			
Fármaco	500 mg/tableta	(484 ± 4)	(490 ± 2)	97	3,3	-1

a. Promedio de 3 concentraciones medidas.

b. Porcentaje de recuperación = [Encontrado / Agregado] × 100

c. Desviación estándar relativa = (desviación estándar / media) \times 100.

d. Error relativo = [(método propuesto – método comparativo) / (método comparativo)]

\times

1

0

0

.

En este sentido, considerando estos resultados, el método SWV se puede aplicar con éxito en el análisis de AMX en fármacos, leche y muestras de orina, ya que no hubo interferencias significativas de la matriz. ^[23]

En 2021 A.Hrioua y colaboradores, ^[24] presentan una revisión de avances recientes en sensores electroquímicos para la detección de amoxicilina en muestras biológicas y ambientales, con respecto a estudios de voltametría recopilaron lo siguiente : El comportamiento electroquímico de la amoxicilina se ha estudiado utilizando electrodos no modificados como carbono vítreo, grafito de carbono, fieltro de carbono, carbono a base de nanotubos de carbono Toray, acero inoxidable, oro, rutenio, PbO₂, electrodo de diamante dopado con boro, platino y pantalla. electrodos impresos. En la mayoría de estos estudios, la amoxicilina no presentó ninguna señal voltamétrica de los electrodos sin modificar, pero solo algunos de ellos (carbono vítreo (GC), pasta de carbono (CP), pasta de nanotubos de carbono (CNP), carbono-grafito (CG.), carbón Toray (CT), fieltro de carbón (CF) y electrodos serigrafiados (SP)) pudieron mostrarlo, a menudo con un pico no bien definido, lo que refleja su baja sensibilidad, por lo tanto, no eran lo suficientemente buenos para fines analíticos. En este contexto, se utilizaron medidas voltamétricas cíclicas (CV) para estudiar la electrooxidación de amoxicilina en electrodos no modificados. La respuesta electroquímica mostró un pico de oxidación, que se debe a la reacción de oxidación del sustituyente fenólico (Φ –OH) al respectivo grupo carbonilo (Φ = O) en la cadena lateral de la molécula. ^[24]

Tabla 6. Tabla resumen de actuaciones voltamétricas cíclicas de varios electrodos no modificados hacia AMX. ^[24]

Electrodo ^a	Medio ^b	Potencial de pico anódico (V)
CPE	Buffer de acetato	0,5
	PBS	0,7
CNP	PBS	0,58; 0,78
GCE	Na ₂ SO ₄	0,6
	Buffer de acetato	0,7
CGE	Na ₂ SO ₄	0,68
CTE	NaCl	Entre 0,5-1
CFE	Na ₂ SO ₄	0,625
SPE	PBS	0,25
SPCE	H ₃ P0 ₄	0,6

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO II. Técnicas instrumentales

El estudio electroquímico se fundamenta básicamente en la observación de los procesos REDOX originados en una celda electroquímica, que se define como un sistema compuesto de fases conductoras de carga cuyo funcionamiento se basa en la generación de energía eléctrica o para la formación o descomposición de un compuesto químico deseado, en donde el interés de estudio es la actividad generada en la interfase que se da cuando un electrodo entra en contacto con una solución que posee un elemento electroactivo, a dicho electrodo se le asigna el nombre de “**electrodo de trabajo**” y el control de dicho proceso electroquímico se lleva a cabo de un potencial o corriente aplicada y un electrodo que genera un interfase de composición bien definida y estable, el cual se denomina “**electrodo de referencia**”.

Las técnicas que fundamentan al estudio electroquímico son las Técnicas Voltamétricos, las cuales se basan en la respuesta corriente-potencial de un electrodo polarizable inmerso en una solución denominada analito. En estas técnicas, se estudian los cambios de corriente, como una función del potencial aplicado a través de la celda electrolítica. El proceso involucra la electrólisis de una o más especies electroactivas, permitiendo observar con mayor detalle la reacción de la especie electroactiva en el electrodo y mecanismo de transferencia de masa.

2.1. Voltametría ^[25-28].

Se llaman métodos voltamétricos a las técnicas electroanalíticas que dependen de la medida de corrientes en función del potencial aplicado. En ellos, se usan condiciones que facilitan la polarización del electrodo de trabajo o indicador, en la solución que se analiza.

Históricamente, la voltametría se desarrolló a partir de la polarografía en 1922 por el químico checoslovaco Jaroslav Heyrovsky. Posteriormente, Matherson y Nichols desarrollaron los métodos de barrido rápido de potencial, voltametría de barrido lineal y voltametría cíclica, técnicas que fueron descritas teóricamente por Randles y Sevcik, lo cual constituyó un avance importante en el desarrollo de los métodos electroanalíticos. Actualmente se han desarrollado numerosas técnicas voltamétricas de gran sensibilidad con grandes aplicaciones en diversas áreas de la ciencia y la tecnología.

La voltametría se basa en la medida de la corriente en una celda electroquímica en condiciones de polarización por concentración completa, de forma que la velocidad de oxidación o reducción del analito está limitada por la velocidad de transferencia de masa

de la especie estudiada a la superficie del electrodo. Esta técnica es ampliamente usada por los químicos analíticos, inorgánicos, los fisicoquímicos y los bioquímicos para estudios fundamentales de procesos de oxidación y reducción en distintos medios, procesos de adsorción sobre superficies y mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos modificadas químicamente.

La celda electroquímica utilizada actualmente en voltametría, se compone de tres electrodos sumergidos en una disolución que contiene el analito y, un exceso de un electrolito no reactivo llamado electrolito soporte. Uno de los tres electrodos es el *electrodo de trabajo*, cuyo potencial frente a un electrodo de referencia se varía linealmente con el tiempo. En el electrodo de trabajo ocurre la reacción electroquímica de interés y debe actuar como una fuente o depósito de electrones por intercambio con moléculas en la interfaz electrodo-solución. El segundo electrodo es denominado *electrodo de referencia* y tiene un potencial que permanece constante durante el experimento. El tercer electrodo *es un contra-electrodo* cuya función es conducir la corriente que se origina en la celda hasta el electrodo de trabajo a través de la disolución.

Las distintas técnicas voltamétricas que existen se diferencian básicamente entre sí, en la función del potencial que se aplica al electrodo de trabajo. Estas técnicas son: voltametría de barrido lineal, voltametría cíclica, voltametría de pulso normal, voltametría de pulso diferencial, voltametría de onda cuadrada y voltametría de preconcentración y redisolución.

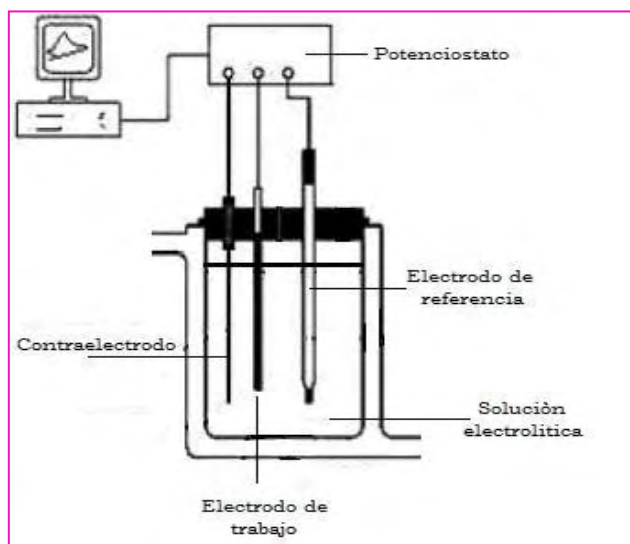


Figura. 16. Celda. electroquímica empleada en Voltametría

2.1.2. Voltametría cíclica ^[25-28].

La variación de un potencial en un electrodo estacionario colocado en una disolución no agitada está provocada por una señal de forma triangular. El potencial se varía linealmente desde E_0 hasta E_f , cuando se ha alcanzado este valor el sentido de barrido se invierte y el potencial vuelve a su valor original E_0 figura 18, este ciclo de excitación puede ser repetido cuantas veces lo requiera la experiencia.

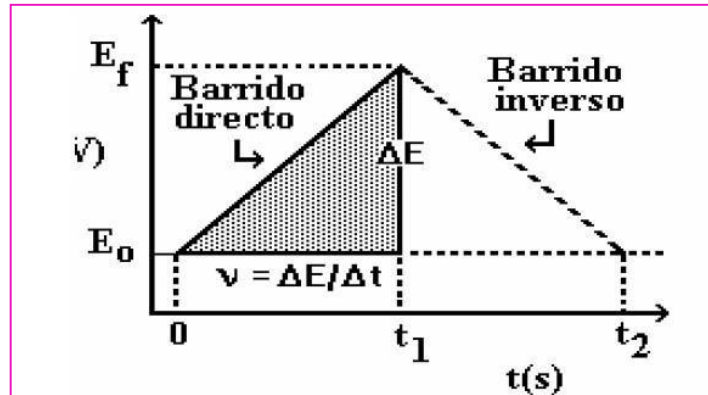


Figura 17. Señal de excitación empleada en Voltametría cíclica.

www.bdigital.ula.ve

El intervalo de potenciales seleccionado para un experimento dado es aquel donde ocurre la oxidación o la reducción de la especie en estudio. El registro de la respuesta a la perturbación, se obtiene al graficar la corriente leída al potencial asociado, en una curva del tiempo $E=f(i)$, esta se denomina voltagrama o voltamperograma el cual se puede apreciar en la siguiente figura:

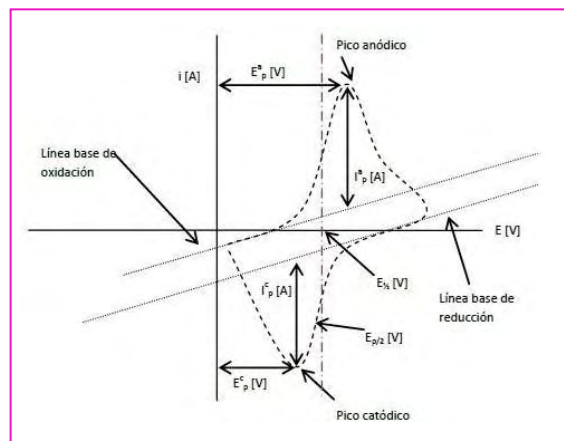


Figura 18. Voltagrama

Los parámetros más importantes de un voltograma cíclico son:

1. Intensidad de corriente de pico anódica (i_{ap})
2. Intensidad de corriente de pico catódica (i_{cp})
3. Potencial de pico catódico (ECP)
4. Potencial de pico anódico (E_{ap})

Esta técnica es una de las más utilizada para analizar y estudiar el comportamiento redox de las especies, de las reacciones químicas en que participan (mecanismos de reacción, reacciones químicas acopladas), en la determinación de parámetros termodinámicos y el estado o limpieza del electrodo utilizado.

A continuación, se explica con detalle los procesos y criterios de reacciones en un sistema electroquímico:

2.1.2.1. Sistemas reversibles.

En un sistema redox reversible, la velocidad de transferencia electrónica es más grande que la velocidad de la transferencia de masa y, por lo tanto; se mantiene el equilibrio Nernsterniano en la superficie del electrodo (Figura 20). Este proceso viene dado por la ecuación de Randles-Sevcik (Ec. 1):

$$1. \quad i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0 \nu^{1/2} \text{ a } 298 \text{ } ^\circ K \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde i_p es la densidad de corriente pico en $A \cdot cm^{-2}$, n el número de electrones transferidos, A es el área del electrodo en cm^2 , D es el coeficiente de difusión en $cm^2 \cdot s^{-1}$, ν es la velocidad de barrido en $V \cdot s^{-1}$ y C_0 es la concentración de la especie O en $mol \cdot cm^{-3}$. Otros criterios tomados en cuenta son:

$$2. \quad \frac{i_{p,a}}{i_{p,c}} = 1, \text{ si no existen implicaciones químicas.} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$3. \quad \Delta E = E_p - E_{p,1/2} = 2.2 \frac{RT}{nF} = \frac{59mv}{n} \text{ y } E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{59mv}{n} \text{ a } 298 \text{ } ^\circ K \quad (\text{Ec. 3})$$

$$4. \quad |i_p|, \text{ aumenta con } D^{1/2}, \text{ pero no de manera proporcional.}$$

- El potencial de pico es independiente de la velocidad de barrido y el ancho de banda de un pico es $2(57/n)$ mV. También es independiente de la concentración.
- La corriente pico es dependiente de la velocidad de barrido y proporcional a la concentración del analito.

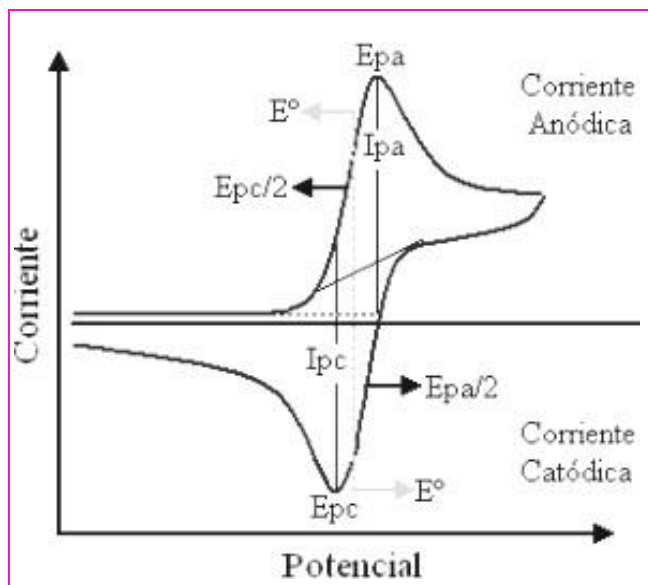


Figura 19. Voltamograma cíclico para un sistema reversible

En el voltamograma cíclico obtenido a partir de un sistema reversible, se puede identificar una corriente de pico anódico y una corriente de pico catódico (I_{pa} y I_{pc}) al igual que los potenciales a los cuales se observan esos máximos de corriente (E_{pa} y E_{pc}). Se puede identificar, además, el potencial al cual la corriente es la mitad de la corriente de pico ($E_{p/2}$) y la diferencia de potencial entre el pico de corriente anódico y el pico de corriente catódico. Estos parámetros resultan de gran importancia en el diagnóstico del sistema analizado.

2.1.2.2. Sistemas irreversibles

En el caso de un sistema irreversible, la transferencia electrónica es insuficiente como para mantener el equilibrio de Nernst en la superficie del electrodo y la forma del voltamograma varía (Figura 21). Para especies irreversibles la ecuación de Randles – Sevcik se modifica debido a la corrección de términos cinéticos.

$$1. \quad I_p = 2.99 \times 10^5 n(a_c n_a)^{1/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \text{ a } 298 \text{ } ^0K \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde $n\alpha$ es el número de electrones transferidos en el paso determinante de la reacción y a_c el coeficiente de transferencia. Adicionalmente si el proceso redox es irreversible se debe cumplir que:

2. $\Delta E = E_p - E_{p/2} = \frac{48}{a \alpha} mV$ a 298 °K (Ec. 5)
3. No existen picos inversos.
4. La corriente pico es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad y el potencial pico es dependiente de la velocidad.

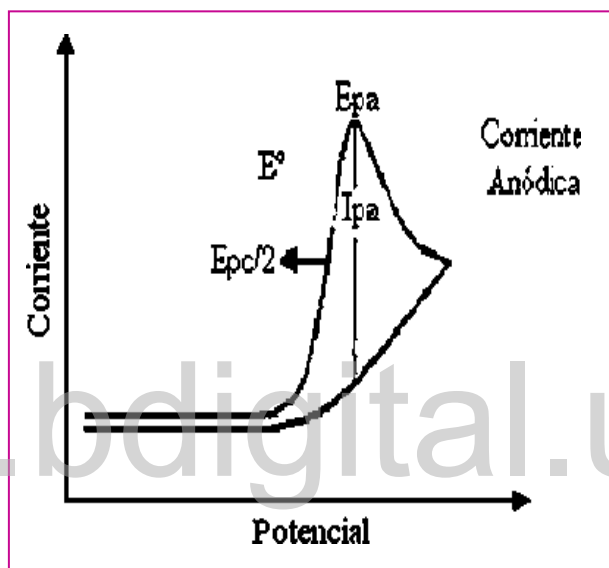


Figura 20. Voltograma cíclico para un proceso redox irreversible.

2.1.2.3. Sistemas cuasi-reversibles

Un sistema cuasi-reversible es caracterizado principalmente por una transferencia electrónica muy lenta y presenta la forma que se muestra en la figura 22. En este caso se debe cumplir:

1. $i_p = (2,69 \times 10^5 n^{3/2} D_0^{1/2} C_0 v^{1/2})$ (Ec. 6)

2. $|i_p|$, incrementa con $v^{1/2}$ pero no proporcionalmente. (Ec. 7)

3. $\frac{i_{p,a}}{i_{p,c}} = \text{sí } a = a_c = 0,5$ (Ec. 8)

4. ΔE_p es más grande que $\frac{59mV}{n}$ e incrementa con v . (Ec. 9)

5. E_p^c , se desplaza hacia valores negativos cuando incrementa v . (Ec. 10)

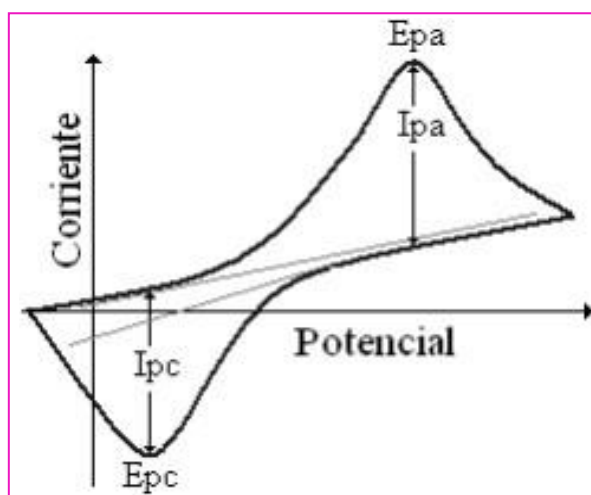


Figura 21. Voltograma cíclico para un sistema cuasi-reversible.

2.1.3 Voltametría de Pulso Diferencial (VPD).^[29,30]

La voltametría de pulso diferencial (VPD), es una de las técnicas electroanalíticas que alcanzó una gran popularidad a partir de 1970, es una técnica extensamente usada para medir niveles de trazas en especies orgánicas e inorgánicas ($10^{-8}M$). En esta técnica, la señal de excitación, consiste en aplicar una serie de pulsos fijos de pequeña amplitud (ΔE) (de 10 a 100 mV) a manera de escalera (figura 22.A), superpuesto sobre una rampa de barrido lineal. Sin embargo, amplitudes de pulso mayores de 100 mV no son viables, ya que hace que la anchura del potencial de media onda también aumente y conlleva a una pérdida de la resolución del pico. La corriente se mide dos veces: una vez justo antes de aplicar el pulso (i_1) y otra durante los milisegundos finales del mismo (i_2). La primera corriente se resta instrumentalmente de la segunda por lo que el voltograma de pulso es un gráfico de diferencias de corriente (Δi) en función del potencial antes de aplicar el pulso. El uso de pulsos minimiza los efectos de la corriente de carga (capacitiva) y mejora la relación señal-ruido con lo cual se mejora el límite de detección. La diferencia de corriente medida (Δi) proporciona al voltograma diferencial una forma de pico que es análogo a la derivada de la onda polarográfica. La corriente pico es una medida cuantitativa de la concentración, ya que es proporcional a la misma, y el potencial de pico viene dado por la expresión:

$$E_{\text{máx.}} = E_{1/2} - \Delta E/2$$

En la figura 22 se muestra la rampa de potencial aplicada para esta técnica con respecto a línea de avance de potencial, y la respuesta típica de esta Voltametría.

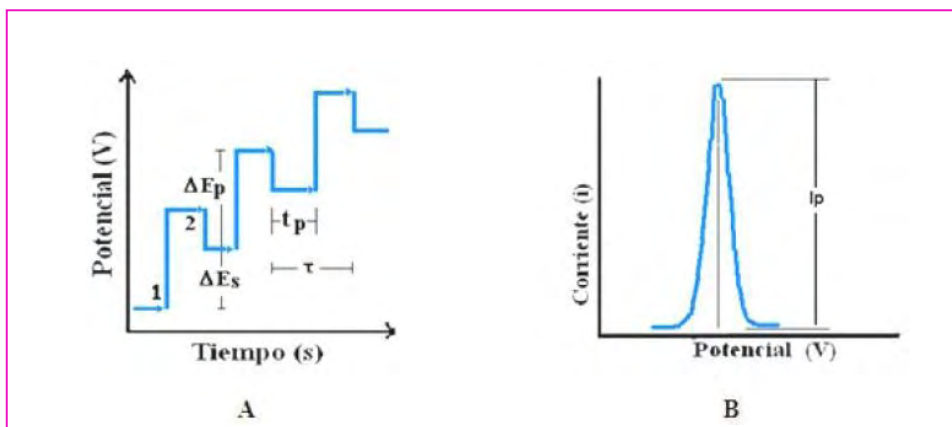


Figura 22. (A) Señal de excitación en VPD y (B) respuesta típica en VPD

La disminución de la línea base en el voltagrama se entiende como el resultado de las diferentes velocidades de respuesta entre la corriente capacitiva y la faradaica con respecto al potencial aplicado. Cuando un potencial base es mucho menor al requerido para que se lleve a cabo la reacción electroquímica, la electrólisis presente es despreciable, por lo que la corriente obtenida es prácticamente debida a la carga de la doble capa. Después de un tiempo t' , el potencial es cambiado bruscamente a un valor E , mayor al anterior, lo cual provoca que tanto la corriente capacitiva como la faradaica aumenten; sin embargo, durante el tiempo que dura el pulso, la corriente no faradaica disminuye de forma muy rápida en comparación con la corriente debida a la reacción electroquímica. Esto provoca que en las cercanías del fin del pulso la mayor parte de la corriente observada justo antes del pulso y aquella justo antes de que termine el aporte de la corriente capacitiva. Este proceso se puede describir mediante la siguiente figura 23:

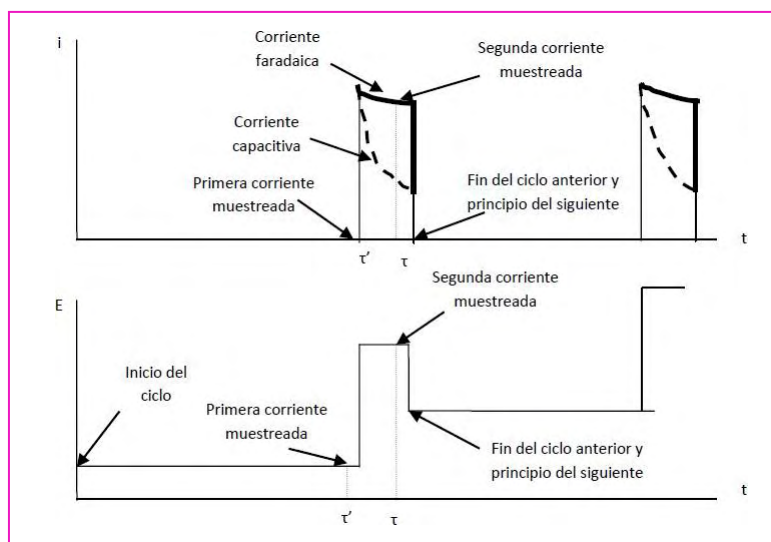


Figura 23. Señal de potencial-tiempo

Una respuesta típica de este tipo de Voltametría figura 23.B, en donde se observan tres zonas principales que se asocian a diferentes etapas en la reacción electroquímica:

1. Cuando el potencial aplicado es muy inferior al E_0' de la reacción electroquímica al igual que el pulso de potencial aplicado, como consecuencia de esto no se genera un aumento considerable en la corriente.

2. Cuando el potencial aplicado se encuentra alrededor de E_0' , el pulso de potencial sí favorece la reacción electroquímica por lo que se genera un brusco aumento del valor absoluto de la corriente.

3. Una vez que se llega a valores de potencial donde la reacción electroquímica se lleva a cabo en su máxima velocidad, la corriente generada es prácticamente constante a cualquier potencial, por lo que en el Δi se presenta un valor constante y cercano a cero.

Dicho proceso se encuentra regido por la expresión teórica, según Parry y Osteryoung como:

$$I_p = nFA C D^{1/2} (1-\theta) \pi^{1/2} (t^* - t)^{1/2} / (1+\theta) \quad (\text{ec.12})$$

$$\Theta = \exp [nF (\Delta E_p) / 2RT] \quad (\text{ec.13})$$

$$E_p = E_{1/2} - (\Delta E_p / 2) \quad (\text{ec. 14})$$

Donde:

- **n**: número de electrones transferidos
- **A**: área superficial del electrodo (cm^2)
- **D**: coeficiente de difusión de la especie electroactiva (cm^2/s)
- **C**: concentración de la especie electroactiva (mol/cm^3)
- t^* : tiempo de la primera corriente muestreada por pulso (s)
- t : tiempo de la segunda corriente muestreada por pulso (s)

2.2. Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS).^[31,32]

La espectroscopía UV-VIS es una técnica que involucra absorción de luz ultravioleta y visible por parte de una molécula, promoviendo el paso de un electrón desde un orbital molecular fundamental a un orbital excitado; se producen entonces transiciones de electrones desde niveles energéticos bajos a niveles más altos. Transiciones entre un orbital enlazante o un par de electrones libres y otro orbital no completo antienlazante. La separación energética entre estos orbitales moleculares corresponde a las longitudes de onda del visible, dichas longitudes de onda se encuentran aproximadamente entre 190 y 780 nm . La espectroscopia de absorción molecular es valiosa para la identificación de

grupos funcionales en una molécula. Sin embargo, son más importantes las aplicaciones de la espectroscopia de absorción UV-VIS para la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes. En un espectrofotómetro UV-visible, la luz de una fuente continua pasa a través de un monocromador (un prisma, rejilla de difracción o filtro), el cual aísla las radiaciones de las longitudes de onda deseadas a partir de las radiaciones policromáticas que inciden o se reflejan desde el objeto, seleccionando así una banda estrecha de longitudes de onda de luz incidente. Esta luz monocromática atraviesa una muestra de espesor conocido, contenida en una celda o cubeta fabricada con material que permite el paso de la radiación en la región espectral que interesa, para luego medir la potencia radiante de la luz que sale por medio de un detector. La figura 25 muestra esquemáticamente este proceso en una configuración de doble haz, que permite la fuente de luz en un espectrofotómetro por lo general es una lámpara de tungsteno de bajo voltaje, la cual emite en forma continua una región del espectro, la intensidad de esa radiación varía de forma gradual con la longitud de onda. El monocromador tiene como componentes principales una ranura de entrada, un elemento que dispersa la luz en sus longitudes de onda componentes (en general una red de difracción), y una ranura de salida que permite seleccionar la longitud de onda deseada, la cual permite que sólo una banda estrecha de éstas pueda pasar a través de la muestra. El detector es un fototubo que se utiliza para convertir la señal luminosa en señal eléctrica, y así transmitir informaciones al procesador de señal, el cual permite efectuar lecturas de transmitancia y absorbancia.

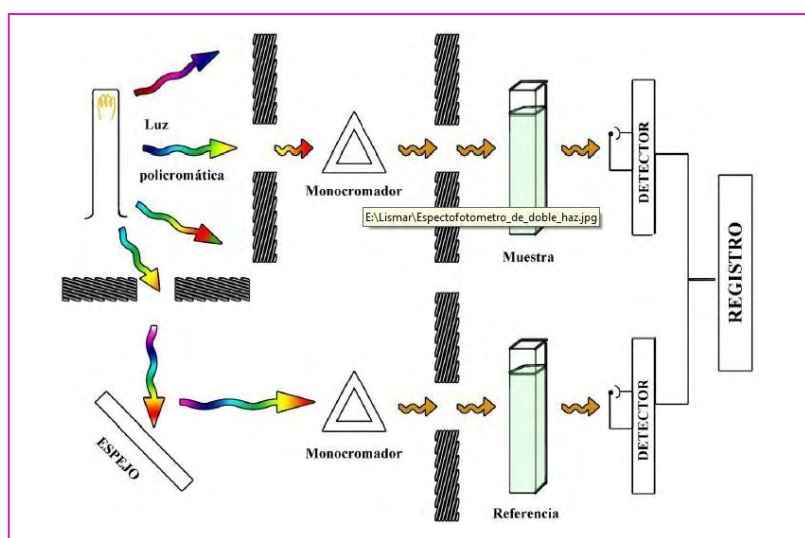


Figura 24. Diagrama esquemático del aparato usado para métodos analíticos basados en la absorción de energía radiante (configuración de doble haz).

2.2.1 Aspectos cuantitativos de las mediciones de absorción

2.2.1.1 Ley de Lambert-Beer.

La Ley de Lambert-Beer, considera la relación entre la potencia de la luz incidente y la de la transmitida, en función tanto de la longitud de paso óptico como de la concentración de la especie absorbente, esta ley permite corregir la dependencia de la concentración y otros factores operacionales al comparar distintos compuestos y sirve como base de todas las determinaciones cuantitativas prácticas. Esta ley combinada puede expresarse matemáticamente como: corrección automática de la absorción del blanco.

$$\frac{\log P_0}{P} = kbc$$

Donde k es una constante de proporcionalidad, b la longitud de paso óptico y c la concentración. La cantidad $\log(P_0/P)$ se define como absorbancia y se representa por el símbolo A , así:

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Siendo a una constante de proporcionalidad llamada absorptividad, la cual es un coeficiente característico de la sustancia absorbente a cada longitud de onda. La magnitud de a dependerá de las unidades empleadas para b y c . Cuando la concentración se expresa en moles por litro y la longitud de la celda en centímetros, la absorptividad se llama absorptividad molar y se designa como ϵ y tiene unidades de $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, entonces la absorbancia es:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

CAPÍTULO III. Propuesta de investigación

3.1. Hipótesis

Es posible determinar amoxicilina en fármacos aplicando técnicas voltamétricas, ya que este compuesto bajo condiciones adecuadas experimenta reacciones de oxidación-reducción al someterlo a una diferencia de potencial.

3.2. Justificación

El uso de antibióticos β -lactámicos se ha incrementado durante los últimos años debido a su capacidad para erradicar a microorganismos bacteriales implicados en distintos procesos infecciosos, que en cantidades elevadas de ingestas pueden causar daños al organismo humano. En el área de electroquímica, se han desarrollado numerosos métodos voltamétricos que han permitido estudiar el comportamiento electroquímico de la amoxicilina y proponer posibles mecanismos de oxidación, en medio acuoso y en medio

orgánico. Es de especial interés implementar técnicas de análisis complementarias que permitan tener una visión más completa del proceso. La espectroscopia de Uv-Visible, ha demostrado ser una herramienta accesible y viable para realizar análisis directos y rápidos sobre mecanismos de reacción, interacciones de cromóforos suministrando información espectral del proceso de oxidación/reducción y como método comparativo.

3.3. Objetivos

3.3.1. Objetivo General

- ✓ Desarrollar una metodología para la determinación de amoxicilina en productos farmacéuticos basada en el uso de la voltametría.

3.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Optimizar los parámetros inherentes al método de análisis propuesto.
- ✓ Aplicar la metodología propuesta en diversas presentaciones comerciales de productos farmacéuticos.
- ✓ Determinar los diferentes parámetros analíticos como: sensibilidad, precisión, límite de cuantificación y límite de detección.
- ✓ Realización la validación del método, mediante una técnica de referencia como es la espectroscopia UV-Visible.

3.4.1. Celdas y electrodos

- ✓ Se utilizará una celda de un compartimiento.
- ✓ El sistema a usar consta de tres electrodos. Un electrodo de trabajo de platino, el cual será cuidadosamente pulido a espejo con alúmina 0,3 y 0,05 μm , sometido a ultrasonido por 10 minutos y lavado con agua $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ de pureza, finalmente éste será ciclado en una solución de H_2SO_4 0,5 M en una ventana desde -0,2 a 1,3 V purgando el sistema con nitrógeno durante 5 minutos. Este procedimiento se repetirá hasta obtener un voltograma cíclico estable. Como electrodo de referencia se empleará un alambre de plata sumergido en una disolución 0,01 M de nitrato de plata en acetonitrilo. El contra-electrodo a utilizar está constituido por un alambre de platino en forma de espiral que será previamente flameado antes de colocarse frente al electrodo de trabajo.

3.4.2. Reactivos

Reactivos	Casa comercial	Pureza (%)
Amoxicilina	Genven	99,9
MnO_2	Searle	99,9
H_3PO_4	Merck	85
(DMSO)	Scharlau	99,7
Verde de Bromocresol	Merk	95,0

3.4.3. Instrumentación

- ✓ Para la preparación de las soluciones se empleará una balanza analítica (Modelo: Explorer, capacidad: 210 g, Lectura: 0,1 a 1 mg) y agua ultrapura obtenida de un sistema Millipore Milli QTM.

- ✓ Los estudios electroquímicos de optimización se realizarán en un potenciostato/galvanostato **Radiometer** modelo **VoltaLab PSTO50** controlado mediante el software *VoltaMaster versión* de Radiometer.
- ✓ Los experimentos de espectroscopia UV-visible se realizarán en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25

3.4.4. Método de referencia UV-visible

El método propuesto se basa en la formación de un complejo de pares de iones de amoxicilina con verde de bromocresol en un solvente orgánico. Una característica importante del método es que no se requiere extracción y es factible a temperatura ambiente

Procedimiento:

- ✓ **Solvente:** Dimetilsulfóxido
- ✓ **Soluciones:** Patrón: 50 ml de una solución de Amoxicilina de 1×10^{-4} M.
- ✓ **Muestras:** pesar el equivalente a 5 pastillas de Amoxicilina, pulverizar y tomar 0,05 g del Fármaco, agitarlo por aproximadamente 30min hasta disolverlo en (DMSO)
- ✓ **Solución de Verde de Bromocresol:** preparar 25 ml con una concentración de 0,001M en DMSO.

Se determina la concentración de la muestra de amoxicilina mediante curvas de calibración sencilla midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm, de una serie de soluciones de amoxicilina en el intervalo de 1-13 mg/L contentivas de VDB a una concentración constante de $9,6 \mu\text{M}$.

3.4.5. Metodología

- ✓ Estudio electroquímico de la amoxicilina por voltametría cíclica.
- ✓ Optimización de los parámetros instrumentales.
- ✓ Análisis preliminar del sistema en estudio.
- ✓ Elaboración de curvas de calibración.
- ✓ Correlación del método propuesto con una técnica de referencia basada en espectroscopia UV-Visible.

CAPÍTULO IV. Resultados y discusión

4.1. Procedimiento experimental

4.1.1. Estudios preliminares por voltametría

4.1.1.1. Voltametría cíclica del electrodo de Carbón Vítreo

Inicialmente se realizó un estudio por voltametría cíclica del electrodo de carbón vítreo (CV) en una solución de ácido sulfúrico 0,5 M, para comprobar el estado de la superficie electródica y la limpieza del sistema. En la figura 25 se muestra la respuesta voltamétrica luego de realizar 50 barridos de potencial a una velocidad 100 mV/s en una ventana de potencial de 1,0 a -1,5 V. Esta respuesta concuerda con la reportada para este electrodo en este medio ^[33], observándose claramente las ondas reversibles de oxidación y reducción de los grupos funcionales tipo quinona - hidroquinona de la superficie del carbón vítreo entre aproximadamente -0,25 y 0,25 V, y una onda de reducción con E_p a -0,85 V que se atribuye a la reducción de iones hidrogeno. Esto indica que el electrodo está acondicionado adecuadamente para medidas electroquímicas en un amplio intervalo de potencial.

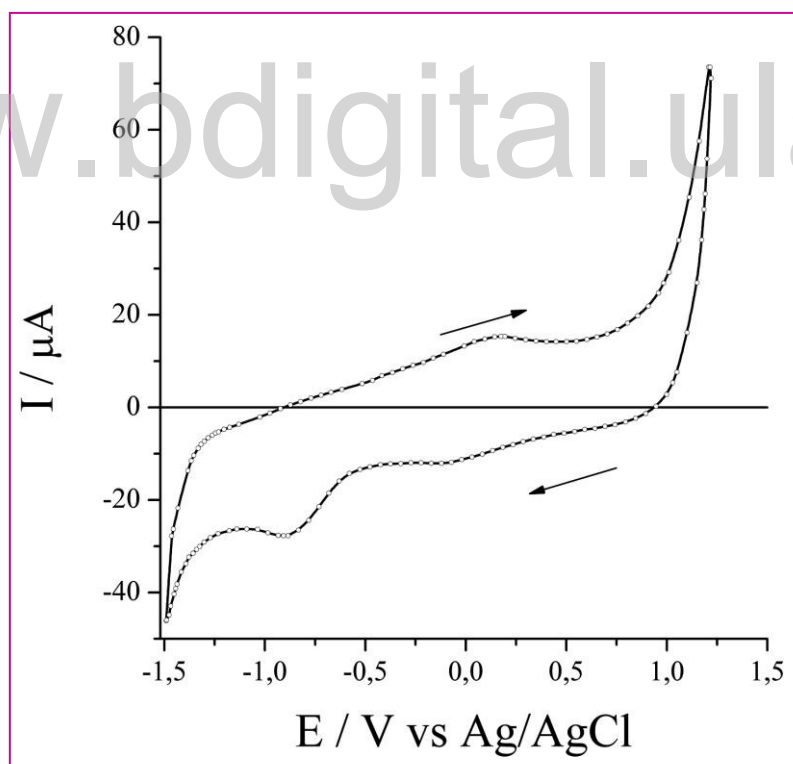


Figura 25.- Respuesta voltamétrica del electrodo de CV en H_2SO_4 0,5 M. $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Sistema de trabajo:

De acuerdo a los reportes bibliográficos ^[19], se eligió como medio electrolítico para los estudios voltamétricos, una solución 0,1 M de H_3PO_4 .

Para los estudios voltamétricos, se preparó una solución patrón de amoxicilina 0,1 M, 100 ml de esta solución, fue mezclada con aproximadamente 2 g de MnO_2 en polvo y sometida a baño ultrasónico durante 2 horas y luego fue centrifugada para separar cuantitativamente

el MnO₂ sobrante. A partir de esta solución (AMOX) se prepararon las demás soluciones para los diferentes estudios.

4.1.1.2 Voltametría de las soluciones de Amoxicilina oxidada (AMOX).

En la figura 26, se muestra la respuesta obtenida por Voltametría de barrido lineal, de una solución de AMOX 1 mM en H₃PO₄ 0,1 M, sobre el electrodo de CV a una velocidad de barrido de 50 mV/s; partiendo desde un potencial de 0,8 V hasta -0,8 V vs Ag/AgCl, se puede observar la ausencia de ondas de oxidación anódica y una onda pronunciada de reducción catódica, atribuible a la reducción del grupo quinona de la AMOX a hidroquinona, tal como lo reportan Mei-Hsin Chiu y colaboradores^[19]. Bajo estas condiciones de trabajo, el E_p de reducción de la AMOX se observa a -0,49 V vs Ag/AgCl (E_p = -0,49 V).

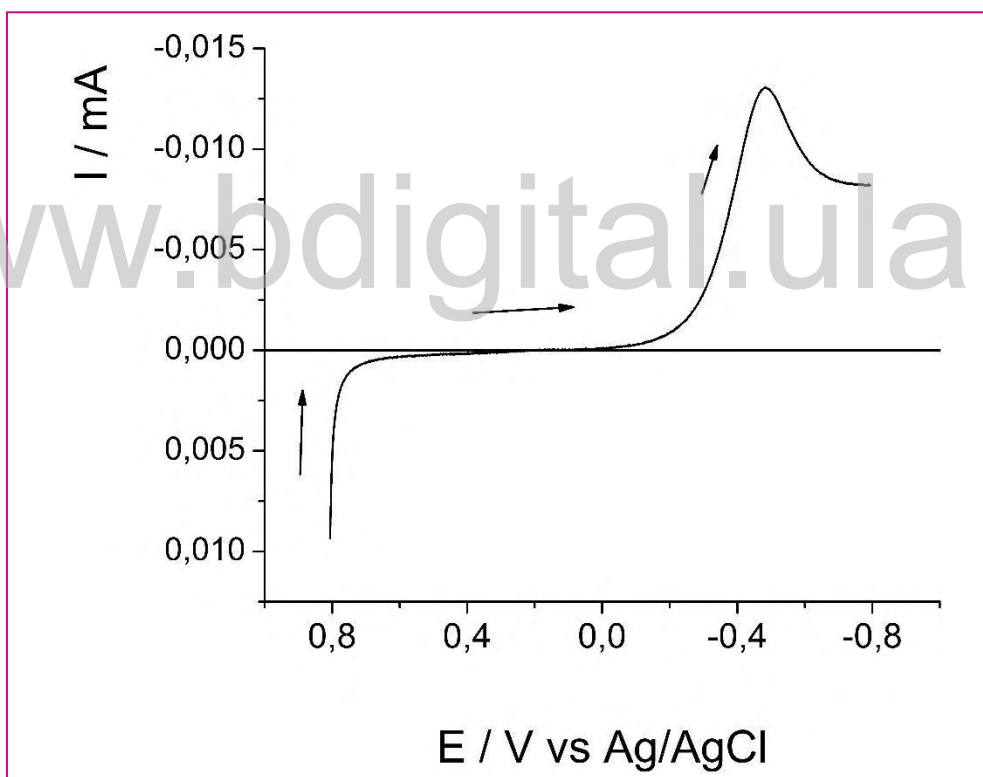


Figura 26.- Voltametría de barrido lineal para la reducción de AMOX 1mM en H₃PO₄.

Al realizar esta experiencia a diferentes velocidades de barrido, pero solamente en el intervalo catódico desde 0,0 hasta -0,8 V (Figura 27), se obtiene una respuesta típica para un sistema irreversible en el cual el E_p catódico es dependiente de la velocidad de barrido y se infiere un mecanismo de reacción mixto ya que al graficar I_p catódico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido , no hay comportamiento lineal en todo el intervalo de velocidades (Figura 27 B) y la curva no intercepta en el origen, como lo exigen los criterios de reversibilidad ^[34].

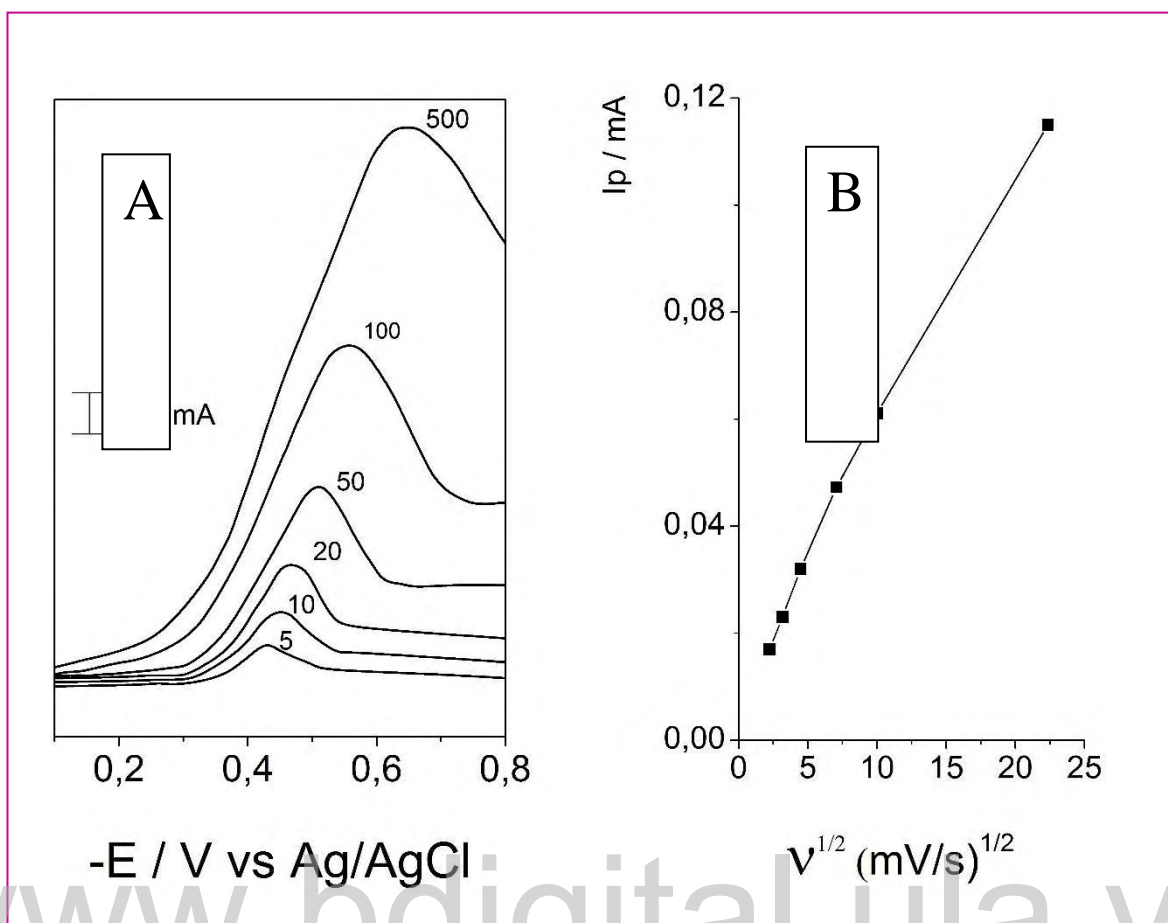


Figura 27.- Respuesta voltamétrica de la reducción de AMOX 1mM a diferentes velocidades de barrido: 5, 10, 20, 50, 100 y 500 mV/s.

Por otro lado en la figura 27 A, se puede observar que a partir de la velocidad de barrido de 50 mV/s, las ondas catódicas comienzan a ensancharse, lo cual para fines analíticos va en detrimento de la selectividad del método. Por tal razón, todos los estudios en este trabajo se realizaron a 50 mV/s.

4.1.1.3 Estudio de reproducibilidad

Para estudiar la reproducibilidad de las medidas de I_p catódico, se realizaron barridos consecutivos a 50 mV/s, en un intervalo de potencial entre 0 y -1,2 V, se puede observar una disminución drástica de la corriente del pico de reducción catódica, a medida que transcurren los barridos consecutivos, lo cual es indicativo del envenenamiento de la superficie electrodo, motivado posiblemente a la formación de productos de reacción que se adsorben y bloquean el área efectiva del electrodo. Este mismo comportamiento se observa incluso al restringir el potencial de barrido catódico final a potenciales cada vez menores, hasta llegar a -0,5 V, lo cual indica que las especies bloqueantes se forman a potenciales cercanos al E_p catódico.

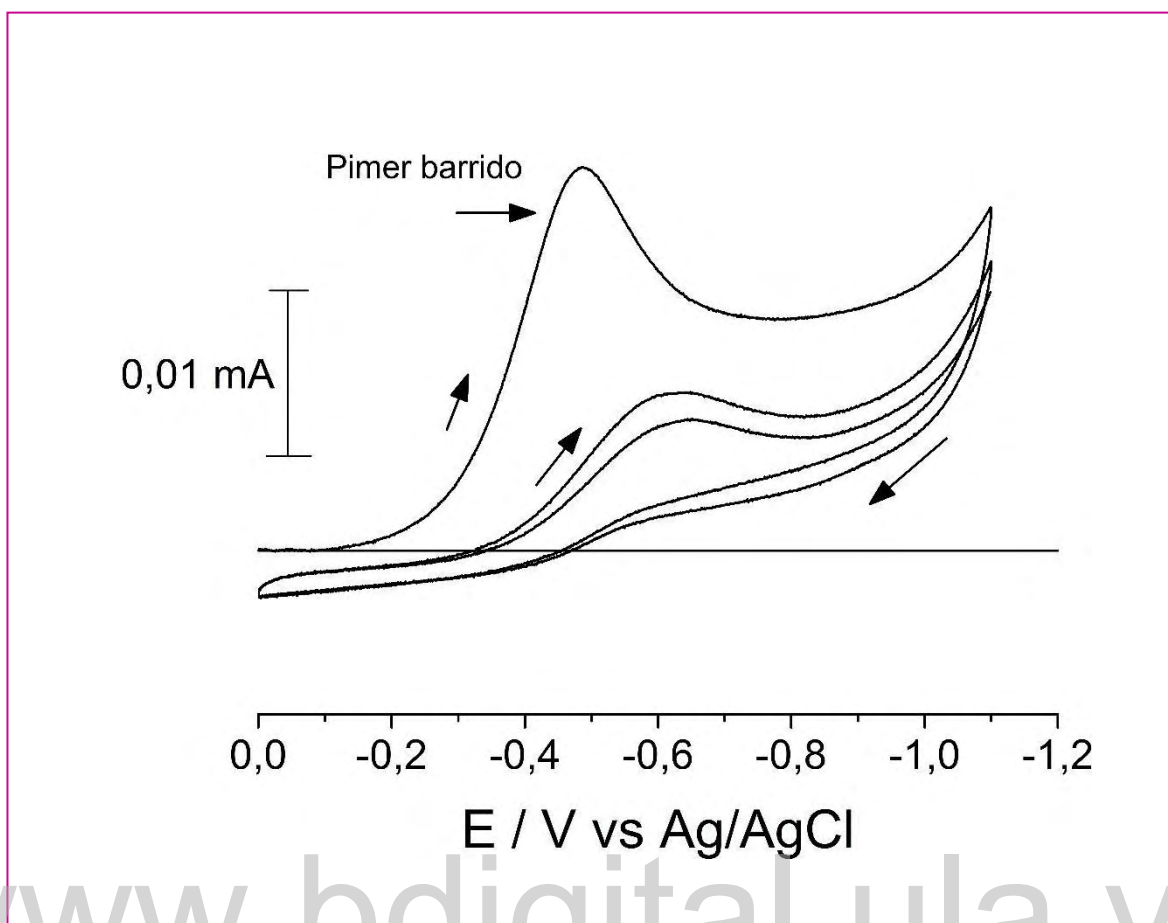


Figura 28.- Respuesta voltamétrica para la reducción de AMOX 1mM, durante barridos consecutivos, mostrando disminución de la corriente de reducción por envenenamiento de la superficie electrodoica, debido a los productos de reducción.

Debido a este resultado, para poder obtener medidas reproducibles y repetitivas de I_p para fines analíticos, se procedió a realizar un estudio, en el cual, después de realizar el primer barrido voltamétrico, se extrae el electrodo de CV, se pule durante 30 segundos con alúmina de 0,3 micrómetros y se somete a ultrasonido durante 30 segundos en agua ultrapura y se realiza nuevamente la medida voltamétrica para obtener la onda de reducción de la AMOX.

En la figura 29 se muestra la superposición de la respuesta voltamétrica para la reducción de una solución de AMOX 1 mM de distintas experiencias similares, pudiéndose observar una alta reproducibilidad en las intensidades de pico, en el gráfico de I_p obtenido en distintos barridos, se puede determinar que la reproducibilidad de la intensidad de corriente de pico es cercana al 99 %.

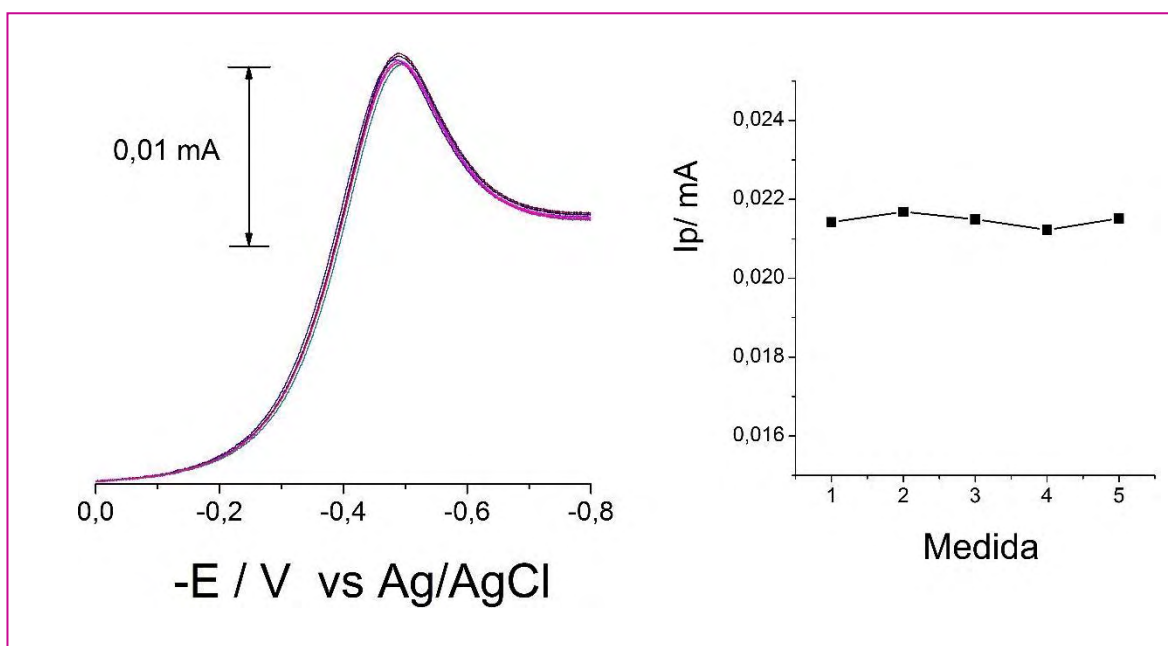


Figura 29.- Superposición de la respuesta voltamétrica para la reducción de una solución de amoxicilina 0,01M sobre CV en distintas experiencias similares, luego de extraer y realizar la limpieza del electrodo con alúmina de 0,3 micrones.

4.2 Influencia de la concentración de AMOX en la intensidad de corriente.

Para estudiar la influencia de la concentración de AMOX sobre la intensidad de los picos catódicos, se realizaron experimentos de VBL bajo las condiciones ya definidas y se realizaron barridos en soluciones desde $1,0 \times 10^{-4}$ hasta $1,4 \times 10^{-2}$ M. En la figura 30 se muestran los voltagramas obtenidos y la curva resultante de graficar la I_p del pico a -0,48 V. Donde se puede observar un aumento creciente de las intensidades de corriente sin embargo a partir de concentraciones cerca de $1,2 \times 10^{-2}$ M, se produce un cambio en la pendiente de la curva I_p vs [AMOX] obteniéndose una zona lineal, entre $1,0 \times 10^{-3}$ y $1,2 \times 10^{-2}$ M; de esta manera las curvas de calibración sencilla y de adición de estándar se realizaron en este intervalo de concentraciones.

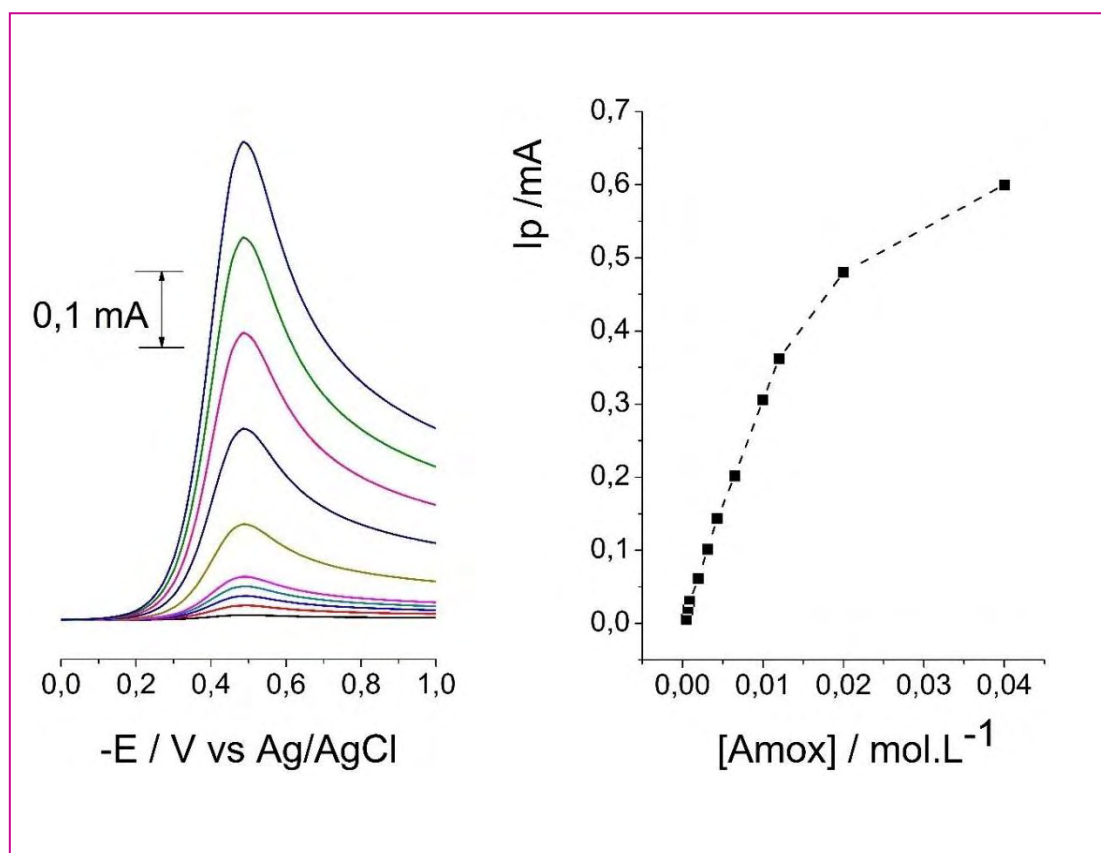


Figura 30.- Respuesta voltamétrica por VBL obtenida para la reducción de AMOX sobre en H_3PO_4 0,1 M en un intervalo de concentraciones de entre $1,0 \times 10^{-4}$ y $1,4 \times 10^{-3}$ M

Características analíticas de las curvas de calibrado

Los criterios cuantitativos de la ecuación de la recta obtenidos por regresión lineal son: la pendiente (m) y su desviación estándar (S_m), el corte en la ordenada (b) y su desviación estándar (S_b), los cuales permiten obtener los parámetros de calidad como son la sensibilidad, la precisión de la técnica, necesarias para determinar los límites de detección y de cuantificación, los cuales se definen como ^[35]:

$$\text{Límite de Detección (LOD)} = 3S_b / m \quad \text{Ec.1}$$

$$\text{Límite de cuantificación (LOQ)} = 10S_b / m \quad \text{Ec.2}$$

En la tabla 7 se puede apreciar los parámetros de calidad obtenidos a partir de la curva de calibración sencilla y la desviación estándar del blanco obtenida experimentalmente.

Tabla 7. Características analíticas de las curvas de calibrado obtenidas mediante VBL.

Técnica	R	Sensibilidad (<i>m</i>) <i>mA/mol.L⁻¹</i>	<i>S_m</i> <i>mA/mol.L⁻¹</i>	Intercepto (<i>b</i>) <i>mA</i>	<i>S_b</i> <i>mA</i>	LOD $\times 10^{-4}$ <i>mol.L⁻¹</i>	LOQ $\times 10^{-3}$ <i>mol.L⁻¹</i>
VBL	0,9990	32,1	0,45	0,067	0,003	3,21	1,07

4.3 Curva de calibración por adición de estándar (CCAЕ) y análisis de significancia entre las pendientes de la curva de calibración sencilla. Determinación de Amoxicilina.

Para determinar si existen interferencia de matriz en las condiciones estudiadas, se realizó una curva de calibración por adición de estándar para cada uno de los medicamentos estudiados; para lo cual se siguió el protocolo siguiente:

M1 y M2: tomando en cuenta la cantidad de medicamento declarada por el fabricante se pesó la cantidad de polvo necesaria para preparar 50 mL de solución de concentración nominal de 0,1 M.

M3: se pulverizaron y homogeneizaron 5 pastillas y tomando en cuenta la cantidad de medicamento declarada por el fabricante (500 mg / pastilla) se pesó la cantidad necesaria para preparar una solución de concentración nominal de Amoxicilina 0,1 M en el electrolito de soporte.

Todas las soluciones fueron sometidas a baño ultrasónico para facilitar la disolución del medicamento y luego centrifugadas para eliminar el exceso de excipiente insoluble.

Con las soluciones de los medicamentos descritas anteriormente, se prepararon soluciones de concentración nominal de amoxicilina 0,05 M con las cuales a su vez se prepararon una serie de 6 soluciones de cada medicamento, contentivas de 1 ml de solución 0,05 M del respectivo medicamento y volúmenes variables en incremento de una solución patrón 0,1 M de amoxicilina, para así tener una serie de soluciones de muestra más estándar que corresponden a un intervalo de concentraciones desde 2×10^{-3} hasta $1,2 \times 10^{-2}$ M

En la figura 31 se muestran las CCAE obtenidas para cada medicamento, superpuestas a la CCS, donde se observan excelentes correlaciones lineales, sin embargo, para todos los casos hay una diferencia apreciable en el valor de la pendiente de la recta, respecto a la CCS.

Para determinar si las diferencias entre las pendientes de la CCS y las curvas de CCAE son estadísticamente significativas, se realizó la prueba de hipótesis (t-Student) ^[35]

En la cual:

1. Se define el problema H_0 y H_a : como la hipótesis e hipótesis nula:

$$H_0: \bar{X} = \mu$$

$$H_a: \bar{X} \neq \mu$$

Donde, \bar{X} valor de la pendiente de la curva de adición estándar y μ : valor de la pendiente de la curva de calibración sencilla.

- a. Nivel de confianza 95 % ($\alpha=0,05$).
- b. Valor del estadístico experimental:

$$c. t_{exp.} = \frac{|\mu - \bar{X}| \times \sqrt{n}}{s} \quad \text{Ec. 3}$$

- d. Donde, n es el número de mediciones y s es la desviación estándar de la pendiente de la curva de adición estándar.

Para los tres medicamentos los valores de t_{exp} calculados son: $t_{M1} = 58,3$; $t_{M2} = 175,6$ y $t_{M3} = 108,6$.

El valor crítico estadístico (valor tabulado en función del nivel de confianza y los grados de libertad):

$$t_{crítico} = t(\alpha, \sigma) = t(0,05, 5) = 2,57$$

Mediante el análisis estadístico de significancia de las pendientes de la curva de calibración sencilla y la curva del método de adición estándar, se realiza la comparación entre t_{exp} y $t_{crítico}$:

Para determinar la existencia de interferencias de la matriz en la determinación de amoxicilina, se observa que para todos los casos, $t_{exp} > t_{crítico}$, por lo tanto se comprueba la hipótesis nula H_a , lo que indica que con un nivel de confianza del 95 %, la diferencia entre \bar{X} y μ es significativa, ya que el valor de t_{exp} se encuentra muy por encima del rango establecido; este resultado implica que bajo las condiciones de trabajo, existe interferencias de matriz que afectan las mediciones, por lo tanto se debe aplicar solo la curva de calibración por adición de estándar para las determinaciones.

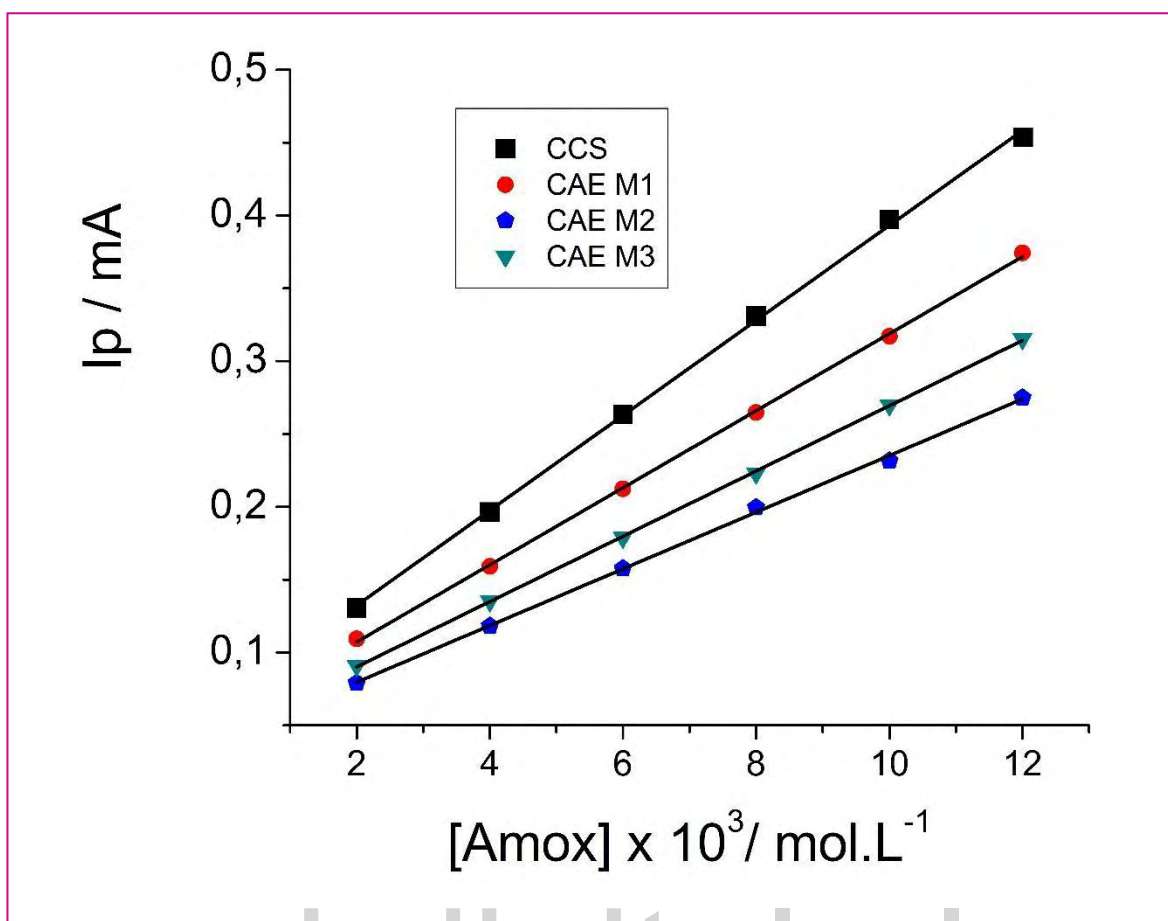


Figura 31.- Curvas de calibración sencilla y curvas de adición de estándar, Ip vs [AMOX]

Tabla 8.- Resultados de la regresión lineal para las CCAE: $I_p = b + m[\text{Amox}]$ figura 31

Fármaco	m	S _m	b (mA)	S _b (mA)	R
M1	26,44923	0,24871	0,05433	0,00194	0,99956
M2	22,41129	0,13812	0,04526	0,00108	0,99981
M3	19,44965	0,29483	0,04067	0,0023	0,99885

Conocido esto, se procedió a construir curvas de adición de estándar para encontrar la concentración de Amoxicilina en las diversas formulaciones farmacéuticas, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 9.

4.3.1 Curvas de calibración por adición de estándar (CCAET)

Los valores de volumen y concentración empleados para la elaboración de las CCAE fueron los siguientes:

$$C_{\text{muestra}}(\text{nominal}) = 6,5 \times 10^{-3} \text{M}; V_{\text{muestra}} = 10 \text{ ml}; C_{\text{estándar}} = 0,03 \text{M}; V_{\text{estándar}} = 0,1, 2, 3, 4, 5, 6 \text{ ml}$$

El error de la concentración extrapolada S_{XE} fue calculado mediante la expresión^[34]:

$$S_{x_E} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

donde

Ec. 4

$$S_{y/x} = \sqrt{\sum_i \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (\text{Error estándar de regresión}).$$

n = número de puntos experimentales, $y = I_p$, $x = [CS]$

El intervalo de error se expresa para un límite de confianza del 95 %, para lo cual el valor estadístico tabulado es 2,57 para 5 grados de libertad (6-1 medidas), siendo cada punto de la curva el promedio de 5 medidas, con la superficie del electrodo limpia como se explicó anteriormente.

Tabla 9. Concentraciones encontradas por extrapolación de las CCAE.

Fármaco	Ecuación de la CAE	[Amox] Nominal mol.L ⁻¹ ×10 ³	[Amox] Obtenida mol.L ⁻¹ ×10 ³	LC ($S_{xe} \times 2,45$)	% Recuperación
M1	$I_p = 0,20850 + 0.03752[Amox]$	6,5	6,67	0,11	102,61 ± 1,69
M2	$I_p = 0,13604 + 0.02579[Amox]$		6,33	0,25	97,38 ± 3,85
M3	$I_p = 0,10001 + 0.01874[Amox]$		6,40	0,18	98.46 ± 2,77

4.4.- Validación por espectroscopia UV-Visible:

Como se ha mencionado anteriormente, la validación por espectroscopia UV-Visible, se realizó mediante un método reportado en la bibliografía [36].

En la figura 32, se puede observar la diferencia de color que entre una solución de verde de bromocresol 9,6 μM y la misma solución 9,6 μM de VDB pero además contentiva de 10 mg/L de amoxicilina, en DMSO como solvente.

Este cambio se debe como lo establece la bibliografía, a la formación de un par iónico entre la amoxicilina y el VDB, lo produce un máximo de absorbancia a 630 nm; en la figura 33A, se muestran los espectros obtenidos para diversas soluciones de Amoxicilina en presencia de una concentración fija de 9,6 μM de VB. Por otra parte, en la figura 33B se muestra la curva de calibración sencilla obtenida al graficar la absorbancia a 630 nm en

función de las concentraciones en el intervalo de 0 – 14 mg/L. Cada punto corresponde al promedio de 5 mediciones de absorbancia, cuya reproducibilidad en todos los casos fue mayor al 99,9 %.

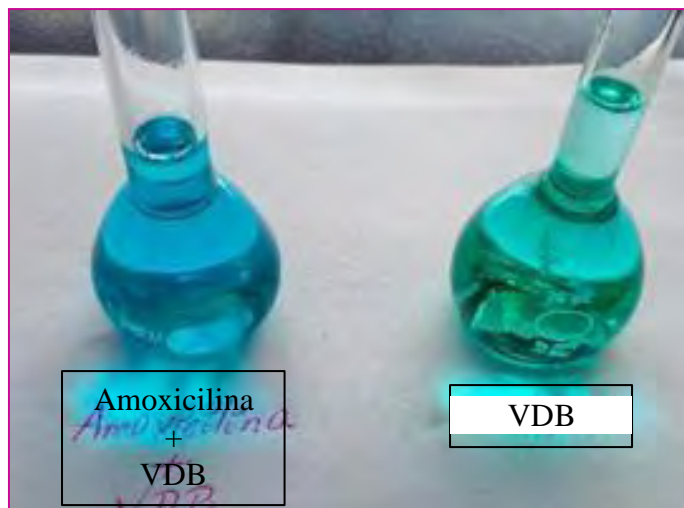


Figura 32.- Fotografía de soluciones de amoxicilina + VDB 9,6 μM y de VDB en DMSO como solvente.

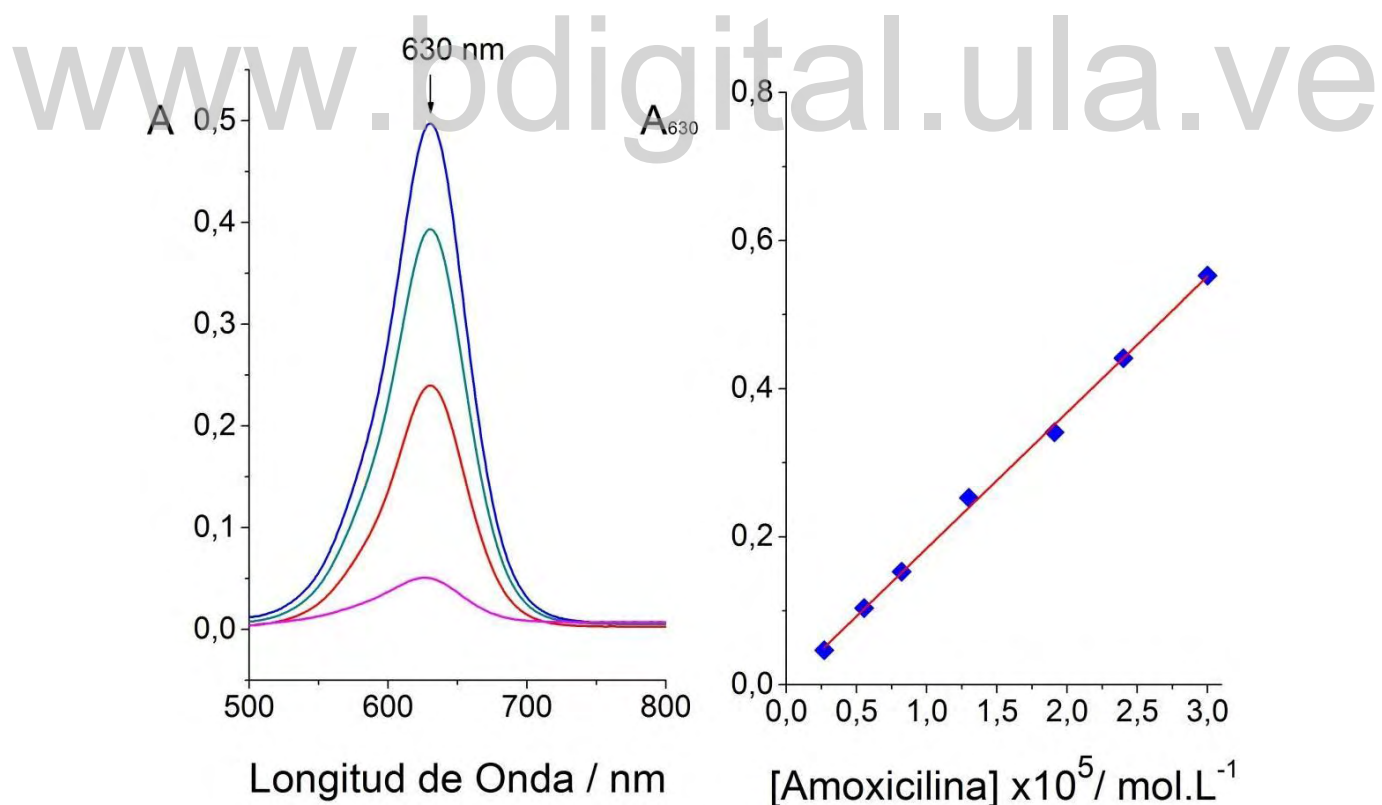


Figura 33.- Espectros de absorción en UV-Visible de soluciones de amoxicilina en DMSO, en presencia de VDB 9,6 μM

Tabla 10. Características analíticas de la curva de calibrado obtenida mediante espectroscopia UV-Visible. Ecuación de la CCS = A=0,0501[Amox] -0,00205

R	Sensibilidad (m) A/mol.L ⁻¹	S _m ×10 ³	Intercepto (b) U.A.	S _b	LOD mol.L ⁻¹	LOQ mol.L ⁻¹
0,9993	18293	263	0,002	0,0057	9,410 ⁻⁷	3,2 10 ⁻⁶

Tabla 11. Concentraciones molares obtenidas por interpolación de las curvas de calibración sencilla.

Fármaco	[Amoxicilina] Nominal μM	[Amoxicilina] Obtenida μM	LC (S _{xo} ×2,45*)	% Recuperación
M1	8,50	8,71	0,08	102,47
M2		8,01		94,23
M3		8,36		98,35

*t_{crítico} para 6 grados de libertad (7-1 medidas) y 95 % de confianza.

El error de la concentración interpolada se encontró mediante la ecuación 5

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{m^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ec.5

Donde p= número de repeticiones = 5

Análisis de significancia entre los resultados obtenidos por VBL y espectroscopia UV-Visible.

Para decidir si la diferencia entre dos medidas muestrales, \bar{X}_1 y \bar{X}_2 es significativa, se calcula el estadístico t [14].

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Ec.6

Donde s se calcula a partir de:

$$s^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{(n_1+n_2-2)}$$

Ec.7

y tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad = 6 + 7 - 2 = 11.

x_1 = porcentaje de recuperación en VBL

x_2 = porcentaje de recuperación en UV-Visible

s_1 = desviación estándar en VBL

s_2 = desviación estándar en UV-Visible

De acuerdo a los criterios cuantitativos obtenidos mostrados en la tabla 3, 4, 5 y 6, se determinan los t_{exp} para los fármacos en estudio resumiéndose en la tabla 1 que se muestra a continuación:

Tabla 12. Análisis de significancia para los fármacos de amoxicilina.

Formulación	$t_{crítico}$ (Límite de confianza del 95% y 11 grados de libertad)	$t_{experimental}$
M1	2,20	1,03
M2		0,85
M3		0,25

Para un límite de confianza del 95 % los valores indican que ambas técnicas arrojan resultados que no difieren significativamente para el análisis de estas formulaciones.

Tabla 13. Análisis comparativo entre las técnicas de Voltametría de barrido lineal y la espectroscopia UV-Visible, en la determinación de la Amoxicilina en formulaciones farmacéuticas.

Parámetros	Voltametría de barrido lineal	Espectroscopia UV-Visible
Intervalo de Concentración	$1,0 \times 10^{-3} - 1,5 \times 10^{-2} M$	$1,0 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-5} M$
LOD	$3,21 \times 10^{-4}$	$9,4 \times 10^{-7}$
LOQ	$1,07 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-6}$
Sensibilidad	$32,1 \text{ mA/mol.L}^{-1}$	$18.293 \text{ A/ mol.L}^{-1}$
Selectividad	Es bastante selectiva, ya que el proceso de oxidación previa, activa directamente la molécula de amoxicilina, sin embargo, hay interferencia de matriz.	Muy selectivo, ya que se forma un complejo iónico exclusivamente entre el Verde de bromocresol y la amoxicilina y en el medio de trabajo no se observan interferencias de matriz.
Tiempo de análisis	Los tiempos de análisis para las medidas instrumentales son comparables, de dos a 3 minutos por muestra. El tiempo de preparación de las muestras para el análisis por VBL suele ser más largo que para UV-Visible, ya que en medio acuoso no todos los excipientes de las formulaciones son solubles y se requiere tratamiento ultrasónico y separación por filtración o por centrifugación. En DMSO el solvente usado en espectroscopia UV-visible, el proceso de separación del analito es más sencillo, e incluso innecesario con algunas formulaciones, en las cuales los excipientes se disuelven totalmente.	

Toxicidad	Se trabaja en medio acuoso, menos toxico.	Se trabaja en un solvente orgánico con mayor toxicidad que el agua.
Costos <ul style="list-style-type: none"> ✓ Reactivos ✓ Instrumentación 	<p>Se requiere mayor cantidad de reactivos ya que se deben preparar blancos, estándares y muestras que requieren un electrolito soporte.</p> <p>Las celdas y electrodos que se emplean para esta técnica son de bajos costos las celdas y electrodos utilizados se pueden construir de manera manual en el laboratorio.</p>	<p>Sólo se requiere de un solo reactivo como solvente para los estándares y muestras.</p> <p>Los costos para esta técnica son mayores debido a que los componentes ópticos tienen un valor bastante elevado y no existen posibilidades de construir las celdas.</p>

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

1. En este trabajo se desarrolló una nueva propuesta metodológica para la determinación de Amoxicilina en formulaciones farmacéuticas (comprimidos y polvo para suspensión oral). La estrategia de trabajo utilizada para la preparación de estándares y muestras para el caso de los estudios electroquímicos realizados en medio acuoso, así como también las experiencias realizadas por espectroscopia UV-Visible utilizando DMSO como solvente; propiciaron el desarrollo de un método de análisis simple, rápido y de bajo costo.
2. Bajo las condiciones de trabajo seleccionadas se construyeron curvas de calibración sencilla y de adición de estándar para evaluar el comportamiento lineal de la amoxicilina en el rango de concentraciones seleccionado, para los cuales se observó que las pendientes de las CCAE mostraron diferencias significativas con las correspondientes a la concentración por voltametría de barrido lineal, indicando estos resultados que el método propuesto si presenta interferencias de tipo físico y químico por parte de la matriz de la muestra.
3. Los porcentajes de recuperación obtenidos tanto como para la técnica de VBL como para la de espectroscopia UV-Visible revelan que la concentración de amoxicilina encontrada en las dos técnicas muestra una buena concordancia con los valores declarados en la etiqueta del producto. Mostrando la prueba de *t-studen*, que estadísticamente las dos técnicas proporcionan resultados que no difieren significativamente para las soluciones estudiadas de amoxicilina. Lo que permite así utilizar como validación la técnica espectroscópica, como esta reportado en la bibliografía consultada.
4. Las figuras de mérito relacionadas con sensibilidad, precisión y exactitud; confieren a ambas técnicas un perfil adecuado para ser utilizado en el control de calidad de este tipo de productos.
5. El aporte más significativo de este trabajo, es el haber aplicado por primera vez un método analítico a medicamentos genéricos fabricados por empresas venezolanas,

confirmando que el contenido encontrado, se ajusta al declarado por las empresas fabricantes.

5.2. Recomendaciones

1. El estudio puede también aplicarse a matrices biológicas utilizando electrodos modificados; el cual puede ser útil para análisis de rutina de farmacocinéticas, bioequivalencia y estudios de estabilidad.
2. Otra técnica de validación para la metodología electroquímica aquí propuesta, podría ser la técnica de espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO VI.

6. Referencias bibliográficas

[1] **Dawson, J.** “Lo esencial en farmacología”. Editorial Dan Horton-Szar. 2ª Edición. España. (2003), 31.

[2] **Koolman, J.; Rohm, K.** “Bioquímica. Texto y Atlas”. Editorial Médica Panamericana. 3ª Edición. España. (2004), 254.

[3] **Seija, V.; Vignoli, R.** Temas de bacteriología y virología médica. ”Principales grupos de antibióticos” [Publicación en línea]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/48239918/Principales-grupos-de-antibioticos> Consultado el 15 de abril del 2012.

[4] **Remington.** “Farmacia”. Editorial Médica Panamericana. 20ª Edición. España. Tomo 2, (2003), 1795 y 1831.

[5] **Korolkovas, A.; Burckhalter, J.** “Compendio esencial de química farmacéutica”. Editorial Reverté. España. (1978), 625-626.

[6] **Torres, L. (2001).** “Tratado de anestesia y reanimación”. Arán Ediciones. España. (2001) 1112.

[7] **Romero, R.** “Microbiología y parasitología humana”. Editorial Médica Panamericana. 3ª Edición. México. (2007) 51. modified electrode”. Talanta 86 (2011) 227– 232.

[8] **García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J. A., & Gómez, J. (2011).** Bacteriemias por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Revista española de quimioterapia, 24(2).

[9] **Rubio, A., Perea, J. A., Honorato, J., & Cuenca, R. (1985).** Farmacología clínica de las penicilinas. Revista de Medicina de la Universidad de Navarra, 33-33.

[10] **Kurochkina, V. B., Satarova, D. E., & Nys, P. S. (2000).** Combinatorial enzymology. Synthesis of novel betalactam libraries. Khimiya, 41(6 Suppl).

[11] **Huttner, A., Bielicki, J., Clements, M. N., Frimodt-Møller, N., Muller, A. E., Paccaud, J. P., & Mouton, J. W. (2019).** Oral amoxicillin and amoxicillin–clavulanic acid: properties, indications and usage. Clinical Microbiology and Infection.

[12] **García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J. A., & Gómez, J. (2011).** Bacteriemias por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Revista española de quimioterapia, 24(2).

[13] Cutipa Choque, D. T. (2015). Determinación del tiempo de vida útil de Amoxicilina en cápsulas de 500 mg, mediante un estudio de estabilidad acelerada (Doctoral dissertation).

[14] Hendricks, K. A., Wright, M. E., Shadomy, S. V., Bradley, J. S., Morrow, M. G., Pavia, A. T., ... & Bower, W. A. (2014). Centers for disease control and prevention expert panel meetings on prevention and treatment of anthrax in adults. *Emerging infectious diseases*, 20(2).

[15] Goodman, & Gilman. (s.f.). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw – Hill Interamericana.

[16] Bobak J. Akhavan; Niloufar R. Khanna; Praveen Vijhani. Last Update: August 27, 2020. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482250/#_ncbi_dlg_citbx_NBK482250 (Consultado el 10-03-201)

[17] Bergamini, M. F., Teixeira, M. F., Dockal, E. R., Bocchi, N., & Cavalheiro, É. T. (2006). Evaluation of different voltammetric techniques in the determination of amoxicillin using a carbon paste electrode modified with [N, N'-ethylenebis (salicylideneaminato)] oxovanadium (IV). *Journal of the Electrochemical Society*, 153(5), E94.

[18] Rezaei, B., & Damiri, S. (2009). Electrochemistry and adsorptive stripping voltammetric determination of amoxicillin on a multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 21(14), 1577-1586.

[19] Mei-Hsin Chiu, Jen-Lin Chan, Jyh-Myng Zen. (2009). An Analyte Derivatization Approach for Improved Electrochemical Detection of Amoxicillin.

[20] Orata, D., Yusuf, A., & Nineza, C. (2014). Electrochemical characterization of amoxycillin, a broad spectrum antibiotic on a bentonite host matrix, using cyclic voltammetry.

[21] Ağın, F. (2016). Electrochemical determination of amoxicillin on a poly (acridine orange) modified glassy carbon electrode. *Analytical Letters*, 49(9), 1366-1378.

[22] Hrioua, A., Farahi, A., Lahrich, S., Bakasse, M., Saqrane, S., & El Mhammedi, M. A. (2019). Chronoamperometric Detection of Amoxicillin at Graphite Electrode using Chelate Effect of Copper (II) Ions: Application in Human Blood and Pharmaceutical Tablets. *ChemistrySelect*, 4(28), 8350-8357.

[23] Wong, A., Santos, A. M., Cincotto, F. H., Moraes, F. C., Fatibello-Filho, O., & Sotomayor, M. D. (2020). A new electrochemical platform based on low cost nanomaterials for sensitive detection of the amoxicillin antibiotic in different matrices. *Talanta*, 206, 120252.

- [24] **Hrioua, A., Loudiki, A., Farahi, A., Bakasse, M., Lahrich, S., Saqrane, S., & El Mhammedi, M. A.** (2020). Recent advances in electrochemical sensors for amoxicillin detection in biological and environmental samples. *Bioelectrochemistry*, 107687.
- [25] **Skoog, D.; Holler, J.; Nieman, T.** “Fundamentos de Química Analítica”. Thompson. 8ª Edición. México. (2005), 675-716.
- [26] **Martínez, Y.; Ortíz, R.; Hernández, R.** “Prácticas de Electroanalítica: Técnicas Electroanalíticas parte II, Voltamperometría”. Universidad de Los Andes. Venezuela (2007), 26-29.
- [27] **Skoog, D.; Holler, J.; Nieman, T.** “Principios de Análisis Instrumental”. Mc Graw Hill. 5ª Edición. Madrid-España. (2001), 409-434 y 691-710.
- [28] **Menolasina, S.** “Fundamentos y aplicaciones de la electroquímica”. Universidad de Los Andes. Consejo de publicaciones. Mérida-Venezuela, (2004) 113-140.
- [29]. **Mabbott, G.** “An introduction to cyclic voltammetry”. *Journal of Chemical Education* 60 (1983) 697-702.
- [30]. **Wang, J.** “Analytical electrochemistry”. Wiley-VCH. 2ª Edición. Nueva York (2001) 28.
- [31]. **Carroz, D.** “Química Orgánica Básica”. Publicaciones Vicerrectorado Académico. 3ª Edición. Venezuela (2009) 759-760.
- [32]. **Skoog Douglas A., Holler James F.** Principios de análisis instrumental 6ª ED, Ediciones paraninfo, Madrid (2009).
- [33]. **Ozkan S., Uslu B., Zuman P.;** Electrochemical oxidation of sildenafil citrate (Viagra) on carbon electrodes. *Analytica Chemical Acta* 501 (2004) 227-233.
- [34]. **Allen j. Bard.; Larry R. Faulkner.** *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*. 2ª Edicion. Nueva York (2002).
- [35]. **James N. Miller.; Jane C. Miller.** *Estadística y quimiometría para química analítica*. 4ª Edicion. Madrid (2002).
- [36]. **Mrudul R. Keskar.; Ravin M. Jugade.** (2013). A new Spectrophotometric method for determination of amoxicillin using bromocresol green.