



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ELECTRODO DE PASTA DE
CARBONO PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN EL ANÁLISIS CUANTITATIVO
DE PIRIDOXINA, ÁCIDO ASCÓRBICO Y GALATO DE PROPILO

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. A. MIGUEL ANGEL RIVERA RECILLAS

DR. JULIO CÉSAR AGUILAR CORDERO
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ELECTRODO DE
PASTA DE CARBONO PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN EL
ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PIRIDOXINA, ÁCIDO ASCÓRBICO Y
GALATO DE PROPILO**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.A. MIGUEL ANGEL RIVERA RECILLAS



Ciudad de México,

2021

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. José de Jesús García Valdés
Vocal	Dr. Felipe de Jesús González Bravo
Vocal	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero
Vocal	Dr. Edgar Jesús Borja Arco
Secretario	Dra. Ana Sofía Varela Gasque

El presente trabajo se llevó a cabo en la Facultad de Química de la UNAM, en el laboratorio 3C de Química y Electroquímica Analítica del edificio A, bajo la asesoría del Dr. Julio César Aguilar Cordero. Durante todo el periodo de estudio y desarrollo de este proyecto, se contó con el apoyo económico de la beca nacional para estudios de posgrado, otorgada por el CONACYT (CVU: 878028), así como de los proyectos PAPIIT 221918 (DGAPA, UNAM) y PAIP 5000-9031 (FQ UNAM). Agradecemos la invaluable ayuda brindada por el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM y por el M. en C. Juan Rolando Vázquez Miranda al permitir el uso del equipo cromatográfico empleado en el desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

1. Índice de figuras	1
2. Índice de tablas	4
3. Abreviaturas	5
4. Introducción	6
5. Antecedentes	7
5.1 Técnicas electroquímicas	7
5.1.1 Voltamperometría.....	7
5.1.2 Voltamperometría de barrido lineal VL.....	8
5.1.3 Voltamperometría cíclica CV	9
5.1.4 Cronoamperometría CA.....	9
5.2 Electrodo de pasta de carbono EPC	11
5.2.1 Aplicaciones de los EPC en el análisis electroquímico.....	12
5.3 Características electroquímicas de los analitos estudiados	13
5.3.1 Ferrocianuro	13
5.3.2 Ácido ascórbico (AA)	15
5.3.3 Galato de propilo (PG).....	18
5.3.4 Piridoxina (PN).....	20
5.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución CLAR	21
6. Objetivos	24
6.1 Objetivo principal	24
6.2 Objetivos particulares.....	24
7. Justificación e hipótesis	24
8. Metodología	25
8.1 Reactivos y materiales para experimentos electroquímicos	25
8.2 Reactivos y materiales para experimentos con CLAR	26
8.3 Construcción y caracterización electroquímica del electrodo de trabajo.....	27
8.3.1 Construcción de los EPC.....	27
8.3.2 Estudios electroquímicos.....	28
8.3.2.1 Determinación de la repetibilidad de la respuesta del electrodo y de su área electroactiva	28

8.3.2.2 Piridoxina, galato de propilo y ácido ascórbico.....	29
8.4 Aplicación del EPC para la cuantificación electroquímica de PN o AA	29
8.4.1 PN.....	30
8.4.2 AA.....	30
8.5 Implementación del método CLAR para cuantificar PN	30
8.5.1 Evaluación del tiempo de retención.....	30
8.5.2 Linealidad.....	30
8.5.3 Variación de flujo.....	31
8.6 Comparación del método electroquímico de cuantificación de Piridoxina con el método CLAR	31
9. Resultados y discusión.....	33
9.1 Caracterización de la respuesta del electrodo de trabajo usando $K_4Fe(CN)_6$ como sonda electroquímica	33
9.2 Estudio voltamperométrico de PN empleando el EPC	42
9.3 Estudio voltamperométrico de PG empleando el EPC	46
9.4 Estudio voltamperométrico de AA empleando el EPC	50
9.5 Aplicación del EPC para la determinación de AA en un producto comercial (Rosavit C)	54
9.6 Aplicación del EPC a la cuantificación de PN en muestras comerciales y comparación de los resultados voltemperométricos con los de un método de análisis cromatográfico no validado, basado en el recomendado por la USP	56
9.6.1 Evaluación del tiempo de retención.....	57
9.6.2 Linealidad.....	58
9.6.3 Variación de flujo.....	60
10. Conclusiones	68
11. Anexo	64
12. Referencias.....	67

1. Índice de figuras

Figura 1. Potencial aplicado en función del tiempo en voltamperometría de barrido lineal	8
Figura 2. Potencial aplicado en función del tiempo en voltamperometría cíclica	9
Figura 3. Potencial aplicado en función del tiempo en cronoamperometría	10
Figura 4. Esquema del voltamperograma cíclico esperado para una disolución de ferrocianuro	15
Figura 5. Mecanismo de oxidación de ácido ascórbico de acuerdo con Ruiz <i>et al.</i> (1977)	16
Figura 6. Voltamperograma cíclico esperado para una disolución de ácido ascórbico	18
Figura 7. Mecanismo de oxidación para galatos de acuerdo con Gunckel <i>et al.</i> (1998)	19
Figura 8. Ejemplos de voltamperogramas cíclicos para PG 4×10^{-4} M. (a) y (c) se obtuvieron con un electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono en KCl 0.1 M y en disolución de PG, respectivamente. (b) y (d) con un electrodo modificado con nanotubos de carbono y polímeros impresos molecularmente en KCl 0.1 M y en disolución de PG.....	20
Figura 9. Esquema del mecanismo de oxidación de PN.....	21
Figura 10. Cromatograma que ilustra la separación de 3 sustancias: A, B y C	23
Figura 11. Electrodo de pasta de carbono en una relación 80:20 de grafito y aceite de parafina, respectivamente	28
Figura 12. Voltamperogramas cíclicos (4 repeticiones) para $K_4Fe(CN)_6$ 5.4 mM en KCl 0.1 M, sin renovar la superficie del EPC. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.12$ V, $E_{i1} = 0.68$ V, $E_{i2} = -0.28$ V, $E_E = 5$ mV, $v = 0.100$ V s^{-1}	34
Figura 13. Voltamperogramas cíclicos de $K_4Fe(CN)_6$ 5.4 mM en KCl 0.1 M, a velocidades de barrido iguales a 0.060, 0.080, 0.100, 0.120, 0.140, 0.160, 0.180 y 0.200 V s^{-1} . ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.12$ V, $E_{i1} = 0.68$ V, $E_{i2} = -0.28$ V, $E_E = 0.005$ V, $v = 0.100$ V s^{-1}	37
Figura 14. Corriente de pico anódica en función de la raíz cuadrada de la v para $K_4Fe(CN)_6$ en concentración igual a 5.4 mM, en KCl 0.1 M, a velocidades de barrido: 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 $mV s^{-1}$. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.12$ V, $E_{i1} = 0.68$ V, $E_{i2} = -0.28$ V, $E_E = 5$ mV, $v = 100$ $mV s^{-1}$	38
Figura 15. Logaritmo de la corriente de pico anódica en función del logaritmo de la v para $K_4Fe(CN)_6$ 5.4 mM, en KCl 0.1 M, a velocidades de barrido iguales a 0.060, 0.080, 0.100, 0.120, 0.140, 0.160, 0.180 y 0.200 V s^{-1} . ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.12$ V, $E_{i1} = 0.68$ V, $E_{i2} = -0.28$ V, $E_E = 0.005$ V, $v = 0.100$ V s^{-1}	40
Figura 16. Cronoamperograma obtenido para una disolución de ferrocianuro de potasio en concentración igual a 5.4 mM: $E_0 = 0$ V, potencial del pulso = 0.4 V, muestreo = 2 ms, duración de pulso = 20 s	40

Figura 17. Corriente medida a lo largo del experimento cronoamperométrico como función de $t^{-1/2}$ $\pi^{-1/2}$	41
Figura 18. Voltamperogramas de barrido lineal para PN en concentraciones iguales a: 10, 30, 50, 70, 90 y 110 μM sin renovar la superficie del ECP entre cada concentración (4 réplicas), en DBF 0.1 M, pH = 7. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = 0.3 \text{ V}$, $E_f = 1.2 \text{ V}$, $E_E = 5 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	43
Figura 19. Voltamperogramas de barrido lineal para PN en concentraciones iguales a: 10, 30, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 μM , renovando la superficie del ECP entre cada concentración (3 réplicas), en DBF 0.1 M, pH = 7. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = 0.3 \text{ V}$, $E_f = 1.2 \text{ V}$, $E_E = 5 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	43
Figura 20. Voltamperogramas de barrido lineal para PN en concentraciones iguales a: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 μM , en DBF 0.1 M, pH = 7. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = 0.3 \text{ V}$, $E_f = 1.2 \text{ V}$, $E_E = 5 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	45
Figura 21. Curva de calibración obtenida para PN en concentraciones iguales a: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 μM , en DBF 0.1 M, pH = 7. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = 0.3 \text{ V}$, $E_f = 1.2 \text{ V}$, $E_E = 5 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	46
Figura 22. Voltamperogramas de barrido lineal para PG en concentraciones iguales a : 11 (A), 22 (B), 44 (C) y 112 μM sin renovar la superficie del ECP entre cada concentración (4 réplicas), en DBF 0.1 M, pH = 7. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.15 \text{ V}$, $E_f = 1.2 \text{ V}$, $E_E = 0.005 \text{ V}$, $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$	47
Figura 23. Voltamperogramas de barrido lineal para PG en concentraciones iguales a : 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 μM , en DBF 0.1 M, pH = 7. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.15 \text{ V}$, $E_f = 1.2 \text{ V}$, $E_E = 0.005 \text{ V}$, $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$	48
Figura 24. Curva de calibración de PG en concentraciones iguales a: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 μM , en DBF 0.1 M, pH = 7. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.15 \text{ V}$, $E_f = 1.2 \text{ V}$, $E_E = 5 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$	49
Figura 25. Voltamperogramas de barrido lineal para AA en concentraciones iguales a 40, 100, 130, 160 y 190 μM sin renovar la superficie del ECP entre cada concentración (3 réplicas), en DBF 0.1 M, pH = 4.5. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.08 \text{ V}$, $E_f = 0.85 \text{ V}$, $E_E = 0.005 \text{ V}$, $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$	50
Figura 26. Voltamperogramas de barrido lineal para curva de calibración de AA en concentraciones iguales a 117, 140, 163, 186, 209, 232 y 254 μM , en DBF 0.1 M, pH = 4.5. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.08 \text{ V}$, $E_f = 0.85 \text{ V}$, $E_E = 0.005 \text{ V}$, $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$	51
Figura 27. Voltamperogramas de barrido lineal para curva de calibración de AA en concentraciones iguales a : 1200, 1499, 1799, 2099, 2399, 2699 y 2923 μM , en DBF 0.1 M, pH = 4.5. ER de	

plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm ⁻³ y CE de grafito. $E_0 = -0.08$ V, $E_f = 0.85$ V, $E_E = 0.005$ V, $\nu = 0.100$ V s ⁻¹	52
Figura 28. Curva de calibración de ácido AA en concentraciones iguales a 117, 140, 163, 186, 209, 232 y 254 μ M, en DBF 0.1 M, pH = 4.5. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm ⁻³ y CE de grafito. $E_0 = -0.08$ V, $E_f = 0.85$ V, $E_E = 0.005$ V, $\nu = 0.100$ V s ⁻¹	52
Figura 29. Curva de calibración de AA en concentraciones iguales a 1200, 1499, 1799, 2099, 2399, 2699 y 2923 μ M, en DBF 0.1 M, pH = 4.5. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm ⁻³ y CE de grafito. $E_0 = -0.03$ V, $E_f = 0.85$ V, $E_E = 0.005$ V, $\nu = 0.100$ V s ⁻¹	53
Figura 30. Voltamperogramas obtenido para una muestra de Rosavit C (3 réplicas). DBF 0.1 M. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm ⁻³ y CE de grafito. $E_0 = 0$ V, $E_f = 0.85$ V, $E_E = 0.005$ V, $\nu = 0.100$ V s ⁻¹	55
Figura 31. Cromatograma obtenido para piridoxina en concentración igual a 0.34 mM. Fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.8 mL min ⁻¹	57
Figura 32. Curva de calibración obtenida por CLAR para piridoxina en concentraciones iguales a: 97.3, 145.9, 194.6, 243.2, 291.8, 340.5, 389.1 y 437.7 μ M, en agua. 95:5 de fase acuosa/orgánica, flujo de 0.8 mL min ⁻¹	58
Figura 33. Cromatograma obtenido para piridoxina en concentración igual a 300.6 μ M. Fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.7 mL min ⁻¹	63
Figura 34. Cromatograma obtenido para piridoxina en concentración igual a 291.8 μ M. Fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.8 mL min ⁻¹	64
Figura 35. Cromatograma obtenido para piridoxina en concentración igual a 293 μ M. Fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.9 mL min ⁻¹	64
Figura 36. Cromatograma obtenido para una muestra de Meclison. Fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.8 mL min ⁻¹	65
Figura 37. Voltamperograma obtenido para una muestra de Meclison. DBF 0.1 M. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm ⁻³ y CE de grafito. $E_0 = 0.3$ V, $E_f = 1.2$ V, $E_E = 5$ mV, $\nu = 100$ mV s ⁻¹	66

2. Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones experimentales fijadas en los experimentos de caracterización con VL para PN, PG y AA.....	29
Tabla 2. Valores de i_{pa} , i_{pc} y i_{pa} / i_{pc} para disoluciones acuosas de ferrocianuro de potasio 5.4 mM en KCl 0.1 M, a diferentes velocidades de barrido.	36
Tabla 3. Área electroactiva obtenida para el EPC, empleando cronoamperometría	41
Tabla 4. Valores de i_{pa} para clorhidrato de piridoxina por quintuplicado en diferentes concentraciones, renovando la superficie del EPC cuando se cambió el nivel de concentración	45
Tabla 5. Límites de detección y cuantificación para piridoxina con voltamperometría de barrido lineal, empleando el EPC, calculados según las ecuaciones del anexo (Shrivastava y Gupta, 2011)	47
Tabla 6. Valores de i_{pa} para PG por quintuplicado en diferentes concentraciones, renovando la superficie del EPC cuando se cambió el nivel de concentración	48
Tabla 7. Límites de detección y cuantificación para PG con voltamperometría de barrido lineal, empleando el EPC, calculados según las ecuaciones del anexo (Shrivastava y Gupta, 2011)	49
Tabla 8. Valores de i_{pa} para AA por cuadruplicado en diferentes concentraciones, renovando la superficie del EPC cuando se cambió el nivel de concentración	51
Tabla 9. Límites de detección y cuantificación para AA con voltamperometría de barrido lineal, empleando el EPC, calculados según las ecuaciones del anexo (Shrivastava y Gupta, 2011)	53
Tabla 10. Resultado experimental para la determinación de AA en la muestra de Rosavit C por VL utilizando el EPC.....	55
Tabla 11. Tiempos de retención para piridoxina en concentración igual a 300 μ M por sextuplicado, en tres días diferentes. fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.8 mL min ⁻¹	58
Tabla 12. Límites de detección y cuantificación para piridoxina en el método CLAR calculados según las ecuaciones del anexo (Shrivastava y Gupta, 2011)	59
Tabla 13. Porcentaje de recobro de clorhidrato de piridoxina empleando un flujo de 0.7 mL min ⁻¹	62
Tabla 14. Porcentaje de recobro de clorhidrato de piridoxina empleando un flujo de 0.8 mL min ⁻¹ ..	62
Tabla 15. Porcentaje de recobro de clorhidrato de piridoxina empleando un flujo de 0.9 mL min ⁻¹ ...	62
Tabla 16. Resultados experimentales para la determinación de piridoxina en la muestra de Meclison por el método CLAR	66
Tabla 17. Resultados experimentales para la determinación de piridoxina en la muestra de Meclison por el método electroquímico usando el EPC.	67
Tabla 18. Comparación de las principales características de las técnicas utilizadas para la determinación de piridoxina en la muestra de Meclison.....	68

3. Abreviaturas

AA Ácido ascórbico

CV Coeficiente de variación

CE Contraelectrodo

CLAR Cromatografía de líquidos de alta resolución

DBF Disolución buffer de fosfatos

E_0 Potencial de inicio

E_E Incremento de potencial

E_i Potencial de inversión

E_f Potencial final

E_p Potencial de pico

E_{pa} Potencial de pico anódico

E_{pc} Potencial de pico catódico

EPC Electrodo de pasta de carbono

ER Electrodo de referencia

ET Electrodo de trabajo

ECS Electrodo de calomel saturado

i_p Corriente de pico

i_{pa} Corriente de pico anódica

i_{pc} Corriente de pico catódica

v Velocidad de barrido

VL Voltamperometría de barrido lineal

PG Galato de propilo

PN Piridoxina

s Desviación estándar

tr Tiempo de retención

4. Introducción

Los electrodos de pasta de carbono se han usado en voltamperometría como electrodos de trabajo desde la década de 1950, como alternativa al electrodo de gota de mercurio empleado por Jaroslav Heyrovsky en polarografía, técnica por la que le fue otorgado el premio nobel en 1959. Desde su aparición, los electrodos de pasta de carbono han sido ampliamente estudiados desde el punto de vista de su caracterización electroquímica y aplicación como sensores electroquímicos. Se han informado en la literatura una gran cantidad de pastas de carbono con diferente composición (Švancara y Schachl, 1999), así como propuestas de modificación física o química (Królicka *et al.*, 2002), además de su uso para el análisis electroquímico de sustancias orgánicas e inorgánicas en muestras del ambiente, farmacéuticas y alimentarias (Yan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

A pesar de la existencia de otros materiales para su empleo como sensores electroquímicos, tales como el carbono vítreo, oro, cobre o platino, hoy en día las pastas de carbono siguen usándose en todo el mundo porque son fáciles de preparar, por su bajo costo y por su versatilidad para ser modificadas física y químicamente, entre las principales razones (Madhuchandra y Swamy, 2019). Estos puntos son de suma importancia para la investigación y docencia, ya que implican que se pueden construir y usar electrodos para, por ejemplo, la caracterización de sistemas electroquímicos, la enseñanza del análisis de sustancias con técnicas electroquímicas y el desarrollo de métodos analíticos eficaces, eficientes, sensibles y selectivos, todo ello empleando materiales de bajo costo y miniaturizados.

Tanto en la docencia como en la investigación, es importante contar con instrumentos y métodos de bajo costo para realizar ciencia básica y aplicada, que permitan alcanzar los objetivos planteados con la optimización y el uso mínimo de los recursos a disposición. Esto es aún más importante en el área de la química analítica, pues a pesar del vasto conocimiento existente de técnicas y metodologías, si se tiene que recurrir a un análisis oficial en la normatividad muchas veces se

encuentra con que no cumple con lo mencionado ni con los principios de la química verde.

En este trabajo se plantea el uso de un electrodo de pasta de carbono para el análisis químico de ácido ascórbico, galato de propilo y piridoxina, que son sustancias de interés farmacológico o nutricional usualmente cuantificadas usando titulaciones rédox, fluorimetría (AOAC 967.21, 1967; AOAC 985.33, 1990) o cromatografía de líquidos de alta resolución (AOAC, 983.15; British Standards Institution, 2014). El empleo del EPC puede resultar una alternativa sencilla, eficaz y de bajo costo frente a los métodos de análisis recomendados en la farmacopea. Los electrodos de pasta de carbono contruidos usando grafito y aceite de parafina, se caracterizaron electroquímicamente usando ferrocianuro de potasio como sonda electroquímica. Posteriormente, se estudió la respuesta electroquímica de estos electrodos con tres diferentes analitos de interés farmacéutico o nutracéutico (ácido ascórbico, galato de propilo y piridoxina) mediante voltamperometría cíclica o de barrido lineal. Los electrodos preparados se usaron para el análisis cuantitativo en muestras farmacéuticas de ácido ascórbico y en la obtención de una curva de calibración para galato de propilo y, finalmente, para el caso de la piridoxina se compararon los resultados obtenidos por la vía electroquímica con los que arrojó un método cromatográfico implementado *ad hoc*, tomando como base un método oficial de análisis (FEUM, 2014).

5. Antecedentes

5.1 Técnicas electroquímicas

5.1.1 Voltamperometría

Voltamperometría es un término que se refiere a un conjunto de técnicas electroquímicas en las que se aplica un potencial variable a un electrodo de trabajo en una celda electroquímica, mientras se mide la corriente como respuesta característica (Compton y Banks, 2007). La celda electroquímica, en su conformación más común en la actualidad, está constituida por tres electrodos. Uno

de ellos es el electrodo de trabajo, cuyo potencial se hace variar con el tiempo. El segundo electrodo es el de referencia y su potencial permanece constante durante todo el experimento. El tercero es un contraelectrodo que permite cerrar el circuito eléctrico de conducción de la intensidad de corriente.

En todas las técnicas voltamperométricas se representa la corriente medida en función del potencial aplicado a un electrodo de trabajo específico, que está dado con respecto al potencial de un electrodo de referencia determinado. Esta representación recibe el nombre de voltamperograma.

5.1.2 Voltamperometría de barrido lineal

En esta técnica, también conocida como LSV por sus siglas en inglés, se aplica un potencial al electrodo de trabajo que cambia de manera lineal con respecto al tiempo. Se seleccionan un potencial de inicio y un potencial final para realizar un barrido de potencial. El tiempo que tome realizar el barrido desde el potencial de inicio hasta el potencial final dependerá de la velocidad de barrido que se fije. Las velocidades de barrido que normalmente se emplean contemplan valores de 1 hasta 2000 mV s^{-1} . Si el potencial inicial es menor que el potencial final, la perturbación corresponde a un “barrido anódico”. Si, por el contrario, el potencial final es menor que el potencial inicial, se dice que se aplica un “barrido catódico”.

La representación gráfica de la corriente medida en función del potencial aplicado recibe el nombre de voltamperograma de barrido lineal. En la Figura 1 se muestra la forma de perturbación de potencial en voltamperometría de barrido lineal.

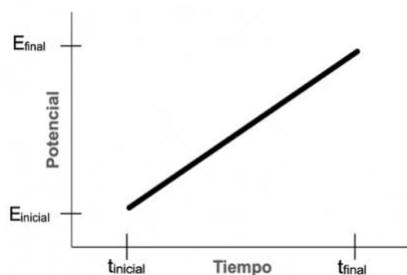


Figura 1. Potencial aplicado en función del tiempo en voltamperometría de barrido lineal.

5.1.3 Voltamperometría cíclica

Esta técnica consiste en imponer un barrido de potencial lineal con respecto al tiempo, de manera similar a la voltamperometría de barrido lineal. Sin embargo, en este caso la perturbación de E en función del tiempo es de forma triangular y se puede repetir un número n de ciclos según la información que se busque obtener del sistema (Kissinger y Heineman, 1996).

Los valores de potencial donde el barrido cambia de dirección reciben el nombre de potenciales de inversión. La corriente resultante a lo largo de la perturbación es medida por un potenciostato para obtener una función $i = f(E)$, cuya representación gráfica es llamado voltamperograma cíclico. La Figura 2 muestra la señal de perturbación característica $E = f(t)$ en voltamperometría cíclica.

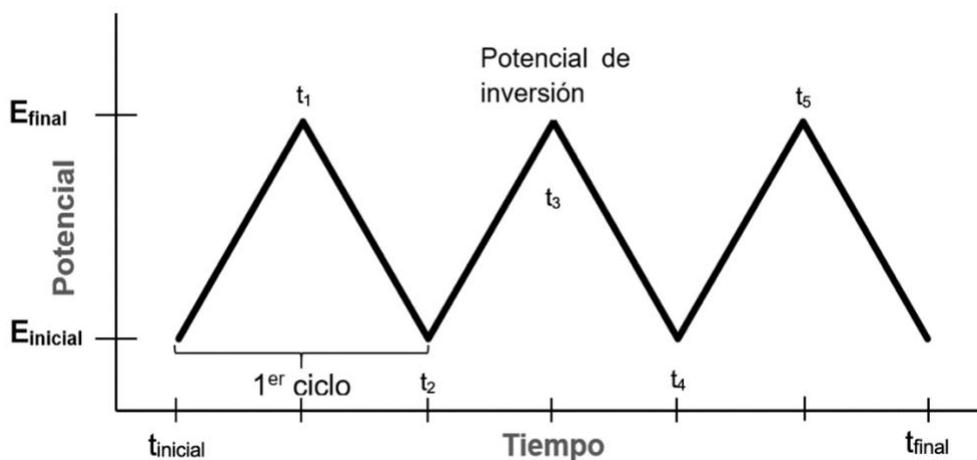


Figura 2. Potencial aplicado en función del tiempo en voltamperometría cíclica. t_1 - t_5 son tiempos de inversión del barrido de potencial de electrodo.

5.1.4 Cronoamperometría (CA)

En esta técnica se aplica una perturbación de potencial constante en función del tiempo, midiendo la respuesta de corriente en función del tiempo. La forma de perturbación más sencilla en cronoamperometría involucra la selección de 2 potenciales que se aplican de manera constante durante un intervalo de tiempo determinado en forma de pulsos (Bard y Faulkner, 2012). El primer pulso se realiza

en un valor de potencial donde no ocurra reacción electroquímica alguna, durando normalmente algunos milisegundos. Al terminar este primer pulso, se aplica un segundo pulso que se mantiene durante un tiempo τ , en cuyo valor de potencial ocurre la reacción electroquímica de interés. La corriente medida a lo largo de todo el experimento se representa en función del tiempo, y la representación gráfica es llamada cronoamperograma. La perturbación cronoamperométrica descrita se muestra en la Figura 3. Es importante señalar que el pulso en el que ocurre la reacción electroquímica deber ser seleccionado según la información que se busque, por lo que antes de realizar experimentos cronoamperométricos es común realizar experimentos de voltamperometría cíclica para determinar los valores de potencial ideales para los pulsos de potencial en la CA.

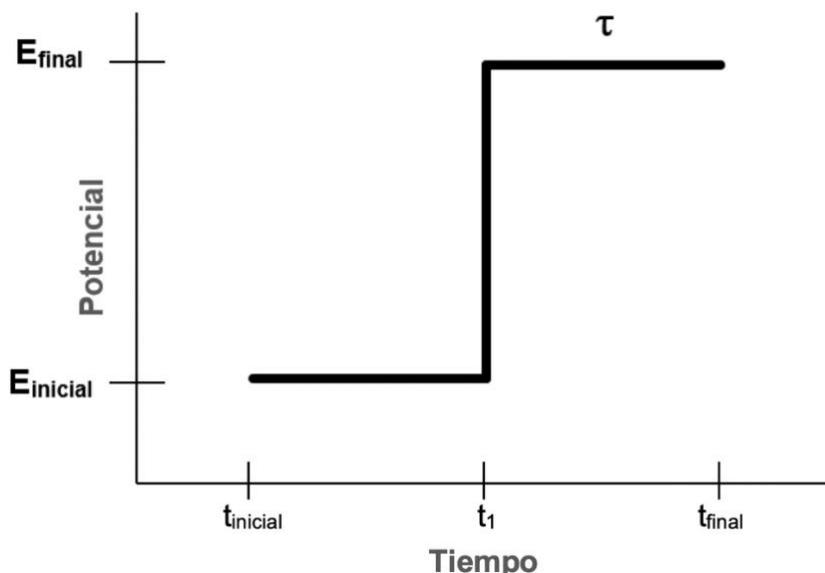


Figura 3. Potencial aplicado en función del tiempo en cronoamperometría. El potencial inicial se aplica hasta el tiempo t_1 , momento en el que se aplica el potencial final durante el tiempo τ hasta el tiempo final.

En un cronoamperograma típico obtenido en condiciones de control difusional, la corriente decae como función del tiempo de acuerdo con la ecuación de Cottrell (1).

$$i = nFAD^{1/2}C(\pi t)^{-1/2} \quad (1)$$

Donde i (A) es la corriente, n es el número de electrones intercambiados en la reacción al electrodo, F (C mol⁻¹) es la constante de Faraday, A (cm²) el área del electrodo, D (cm² s⁻¹) el coeficiente de difusión, t (s) es el tiempo y C (mol cm⁻³) la concentración de la especie electrolizada en el seno de la disolución.

Utilizando la ecuación de Cottrell se puede determinar cualquiera de las variables de las que depende la corriente, siempre y cuando el parámetro a calcular sea la única incógnita.

5.2 Electrodo de pasta de carbono, EPC

Este tipo de electrodos se encuentran constituidos por una pasta de carbono conformada por una mezcla de grafito y un aglutinante. Las características de estos componentes determinarán las propiedades de la pasta. En el caso del grafito, el tamaño de partícula y la pureza química. El aglutinante, por su parte, debe poseer una elevada viscosidad, baja volatilidad, nula solubilidad en medio acuoso y, lo más importante, debe ser inerte química y electroquímicamente (Svankara *et al.*, 2009). Entre los aglutinantes más usados se encuentran los aceites minerales, los hidrocarburos alifáticos y aromáticos, los aceites de silicona y los hidrocarburos halogenados (Urbaniczky y Lundström, 1984; Boujtita *et al.*, 1996). Debido a las características particulares y variables de cada componente de la pasta, la relación grafito – aglutinante se elige de forma empírica, según la experiencia y la literatura, sin embargo, se considera común una relación (1 g : 0.4 – 1 mL) (Svankara *et al.*, 2012).

Los EPC se pueden clasificar como EPC no modificados y EPC modificados. Los no modificados son aquellos que sólo están compuestos por grafito y un aglutinante, mientras que los modificados contienen componentes adicionales que llevan a las subclasificaciones: química, si el componente que modifica la pasta de carbono tiene interacciones químicas con los demás componentes de la pasta o con los analitos; física, si el componente adicional cambia las propiedades físicas de la

pasta, o biológica, si el componente adicional es una biomolécula, un organelo, células aisladas o tejido biológico.

5.2.1 Aplicaciones de los EPC

Los EPC se han empleado como electrodo de trabajo en el análisis cuantitativo y cualitativo de sustancias de interés biológico desde las décadas de 1960 y 1970 (Karolczak *et al.*, 1976). Por ello, existe una gran variedad de metodologías reportadas que involucran la determinación de compuestos orgánicos e inorgánicos con alguna técnica electroquímica, haciendo uso de EPC modificados o no modificados, como se muestra en la breve recopilación hecha por Zima *et al.* (2009). En ella, se reporta que se ha determinado bisfenol A, carbohidratos, dopamina, metformina, piroxicam, riboflavina, tocoferol, ácido úrico, entre otros analitos, empleando EPC. Es de notar que en muchos de estos trabajos se utilizaron electrodos no modificados, conocidos como “bare carbon paste electrodes”, o EPC simples o “al natural”.

Algunas aplicaciones involucran el monitoreo *in vivo* de sustancias. Por ejemplo, Bolger y Lowry (2005) monitorearon el oxígeno en tejido cerebral de ratas expuestas a diferentes condiciones usando EPC no modificados. De manera similar, O'Neill (1993) estudió cómo se modificaba el tejido cerebral por EPC implantados en ratas vivas. Shamsipur *et al.* (2004) utilizaron un electrodo de pasta de carbono sin modificar para la determinación de plata, mercurio y cobre, empleando una red neuronal artificial para modelar la relación entre el potencial y la concentración, con la finalidad de predecir la concentración de los cationes en disoluciones. También, se han utilizado EPC para cuantificar herbicidas. Por ejemplo, De Lima *et al.* (2011) cuantificaron linuron en muestras de agua y vegetales como zanahoria y cebolla.

La razón por la que hoy en día se siguen empleando EPC no modificados, es por su sencillez, facilidad de preparación y bajo costo. A pesar de que la modificación física, química o biológica puede otorgar ventajas tales como mayor sensibilidad o selectividad, muchas veces se presentan desventajas que merman las posibilidades

de aplicación. Por ejemplo, hay modificaciones que funcionan en un solo experimento electroquímico, ya que la superficie del electrodo cambia o se “ensucia” por la presencia de moléculas que se adsorben, implicando un incremento pronunciado en el tiempo de análisis.

5.3 Características electroquímicas de los analitos estudiados

5.3.1 Ferrocianuro

El sistema del par redox ferricianuro/ferrocianuro, que corresponde a los compuestos de coordinación $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ y $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ respectivamente, es por mucho el más estudiado en la literatura electroquímica (Niranjana *et al.*, 2009). Esto se debe, en parte, a su comportamiento “ideal” como sistema reversible con una transferencia electrónica rápida. Sin embargo, el comportamiento electroquímico de este par redox y, en particular, su cinética electroquímica, dependen, entre otros factores, de la naturaleza química de la superficie del electrodo, ya que el proceso de transferencia electrónica, que tiene como estimador el valor de la constante heterogénea de intercambio electrónico k^0 , es sensible a las condiciones de la superficie electródica (McCreery, 2008).

Este sistema redox es el más utilizado como referencia o “modelo” para realizar las caracterizaciones básicas de los EPC, empleando experimentos de voltamperometría cíclica. Esto es debido, en parte, a la ya mencionada variedad de estudios existentes del comportamiento del par redox en diferentes configuraciones electrodo – disolución. Es por ello que al realizar experimentos con este sistema, se pueden comparar fácilmente los resultados obtenidos con los de la literatura, además de que se pueden hacer contrastes con otros electrodos que se tengan a disposición. Para realizar los experimentos de caracterización, se recomienda trabajar en un intervalo de concentración desde 0.1 a 5 mM (Švancara y Schachl, 1999), de esta forma se puede determinar la ocurrencia de fenómenos tales como adsorción, envejecimiento o presencia de oxígeno en la pasta.

Cuando se realiza un experimento de voltamperometría cíclica con una par redox reversible, como es considerado el ferri/ferrocianuro, el voltamperograma resultante es como el que se muestra en la Figura 4. Siguiendo la dirección de las flechas que indican la dirección del barrido de potencial, se tiene inicialmente una corriente prácticamente constante que corresponde a la corriente capacitiva, que comienza a aumentar debido al proceso de electrooxidación del ferrocianuro a ferricianuro, teniendo así un aporte de corriente farádica.

Cuando la concentración de ferrocianuro en la superficie del electrodo se vuelve nula, la corriente alcanza su máximo valor, denominándose corriente de pico anódica, i_{pa} , llamándose el valor de potencial donde ocurre esto potencial de pico anódico E_{pa} . La corriente comienza a decaer mientras se sigue electrolizando ferrocianuro, que tiene que transportarse hasta la interfase por difusión. Aun cuando se aplica el potencial de inversión E_i , el potencial del electrodo sigue siendo lo suficientemente oxidante como para convertir ferrocianuro en ferricianuro, por lo que se siguen teniendo corrientes anódicas.

Una vez que se han alcanzado potenciales lo suficientemente reductores, parte del ferricianuro que se generó durante el barrido anódico comienza a reducirse a ferrocianuro, produciendo un incremento en la corriente catódica. Durante el barrido catódico, el valor absoluto de la corriente alcanza un valor máximo, correspondiente a la corriente de pico catódica i_{pc} cuando la concentración de ferricianuro en la interfase del electrodo es nula, y el potencial donde sucede esto es el potencial de pico catódico E_{pc} . Finalmente, el valor absoluto de la intensidad de corriente vuelve a decaer mientras se electroliza el ferricianuro de los alrededores de la interfase.

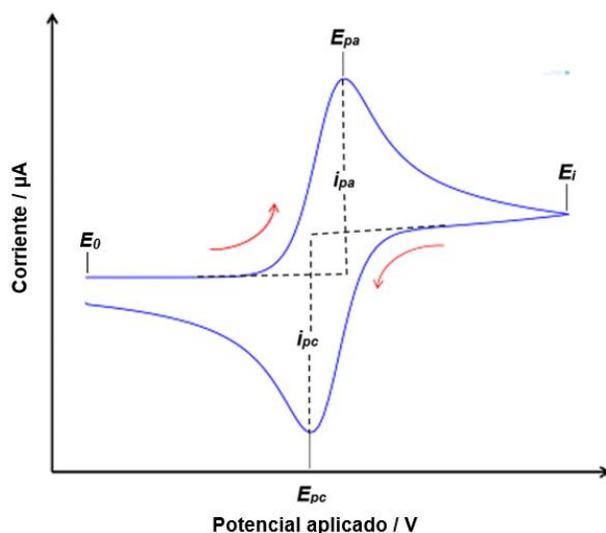


Figura 4. Esquema del voltamperograma cíclico esperado para una disolución de ferrocianuro. i_{pa} = corriente de pico anódica, E_{pa} = potencial de pico anódico, i_{pc} = corriente de pico catódica, E_{pc} = potencial de pico catódico y E_i = potencial de inversión. Las flechas indican el sentido del barrido de potencial aplicado.

Empleando los potenciales y las corrientes de pico, se puede determinar si el sistema se comporta como reversible en un electrodo de trabajo en particular. Puesto que solo se intercambia un electrón en la reacción electroquímica, si existe reversibilidad química y electroquímica, la diferencia de potenciales de pico $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ debe ser igual a $59/n$ mV (Elgrishi *et al.*, 2018), y la relación de corrientes de pico $|i_{pa} / i_{pc}|$ debe ser igual a la unidad. Si estas condiciones no se cumplen, es probable que el sistema electroquímico se comporte como cuasirreversible o irreversible. En este caso, los valores de potenciales de pico se modificarían si se realizan voltamperogramas a diferentes velocidades de barrido.

5.3.2 Ácido ascórbico

La oxidación de AA (vitamina C) se ha estudiado extensivamente en diferentes electrodos de trabajo y se ha considerado que en su mecanismo hay una o más reacciones químicas acopladas (Karabinas y Jannakoudakis, 1984). El mecanismo general se muestra en la Figura 5, iniciando con la disociación del ácido (1), siguiendo con las reacciones (2) y (3) que involucran dos oxidaciones con

transferencia de un electrón cada una, ambas rápidas, que ocurren en el mismo valor de potencial, siendo el producto de éstas el ácido dehidroascórbico. Este último no se puede reducir reversiblemente y es rápidamente protonado (4) y consecuentemente puede transformarse en el ácido 2,3-dicetogulónico de acuerdo con la reacción (5) (Ruiz *et al.*, 1977).

En la literatura se suele considerar a las dos reacciones electroquímicas como una sola, haciendo lo mismo para las dos reacciones químicas que involucran la formación del ácido 2,3-dicetogulónico, por lo tanto, el mecanismo se considera *EC* (Lovander *et al.* 2018).

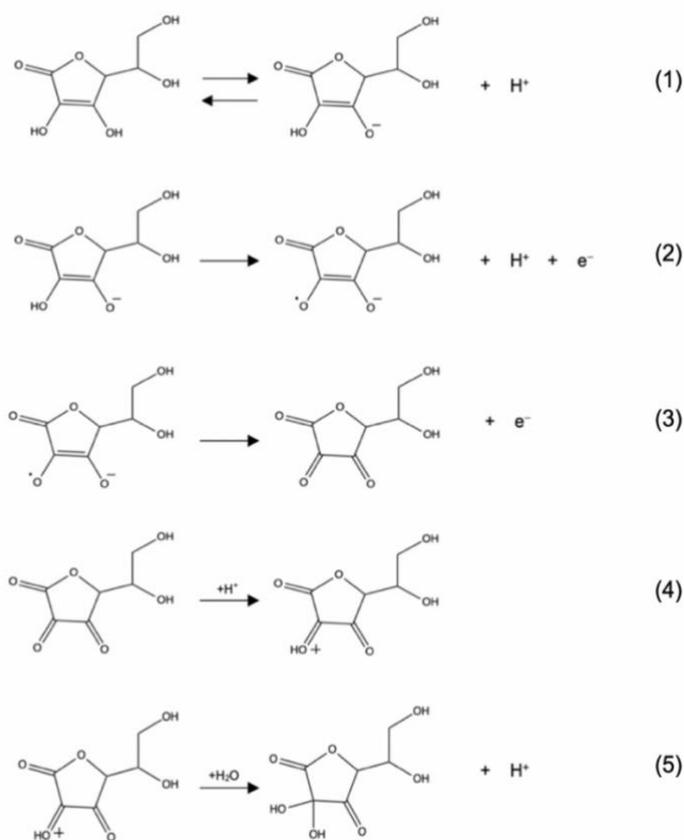


Figura 5. Mecanismo de oxidación de AA de acuerdo con Ruiz *et al.* (1977).

Cuando se realiza un experimento de voltamperometría cíclica para esta sustancia, se observa una señal de electrooxidación durante el barrido anódico de potencial, mientras que durante el barrido catódico no se observa señal alguna, debido a que la reacción electroquímicamente es irreversible.

En la Figura 6 se muestran ejemplos de voltamperogramas cíclicos típicos de AA. Por su naturaleza irreversible, solo se tienen como parámetros importantes la corriente de pico anódica y el potencial de pico anódico. La primera depende proporcionalmente de la concentración en intervalos de concentración amplios, y por ello se pueden realizar cuantificaciones del analito en muestras de diferente naturaleza. El potencial de pico depende del pH del medio, y se desplaza a valores positivos cuando el medio se vuelve más ácido, debido a que el potencial formal del par AA/ácido dehidroascórbico es una función del pH, ya que el AA puede disociarse y su grado de ionización depende de la acidez del medio, como se observa en la reacción (1) de la Figura 5. Asimismo, i_{pa} y E_{pa} son función de la velocidad de barrido, pues la corriente de pico es una función del gradiente de concentración en la interfase, evaluado sobre la superficie del electrodo, mientras que el potencial de pico se desplaza hacia valores mayores de potencial, como se espera para reacciones electroquímicas irreversibles (Bard y Faulkner, 2012).

En el cuerpo humano, la vitamina C tiene muchas funciones que incluyen aquellas en donde participa como un antioxidante que dona electrones en reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Por ejemplo, la síntesis de carnitina depende de una enzima de la que el AA es un cofactor (Rebouche, 1991). Asimismo, el AA en su forma radicalaria, intermediario de la oxidación sucesiva mostrada en la Figura 5, reacciona con otros radicales libres oxidantes cuyos potenciales de reducción son altos, por ejemplo, $HO\bullet$, $RO\bullet$ y $ROO\bullet$ (Buettner y Juirkiewics, 1996). Por esto, el AA es un excelente agente antioxidante.

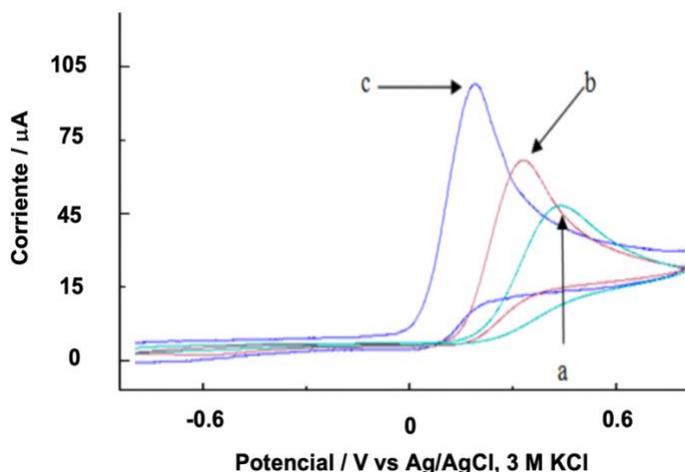


Figura 6. Voltamperogramas cíclicos típico para una disolución de AA 3.5 mM en KH_2PO_4 0.1M. (a) Electrodo de carbono vítreo, (b) Electrodo de carbono vítreo modificado con ZnO, (c) Electrodo de carbono vítreo modificado con ZnO y nanotubos de carbono. ER de plata/cloruro de plata y CE de platino, $\nu = 0.050 \text{ V s}^{-1}$ (Ngai *et al.*, 2013).

5.3.3 Galato de propilo

Esta sustancia se ha estudiado electroquímicamente en disolventes orgánicos y en medio acuoso. Gunckel *et al.* (1998) reportaron el comportamiento electroquímico de diferentes galatos, entre ellos el PG, utilizando un electrodo de carbono vítreo. Postularon que el mecanismo de oxidación de estos compuestos es básicamente el mismo, mostrado en la Figura 7. En él se describe una reacción electroquímica en la que se oxida el mismo grupo hidroxilo en todas las moléculas, formándose un radical galato (1). Este radical tiene diferentes estructuras resonantes (2) y es convertido inmediatamente en una quinona, cediendo un electrón y un protón durante el proceso (3).

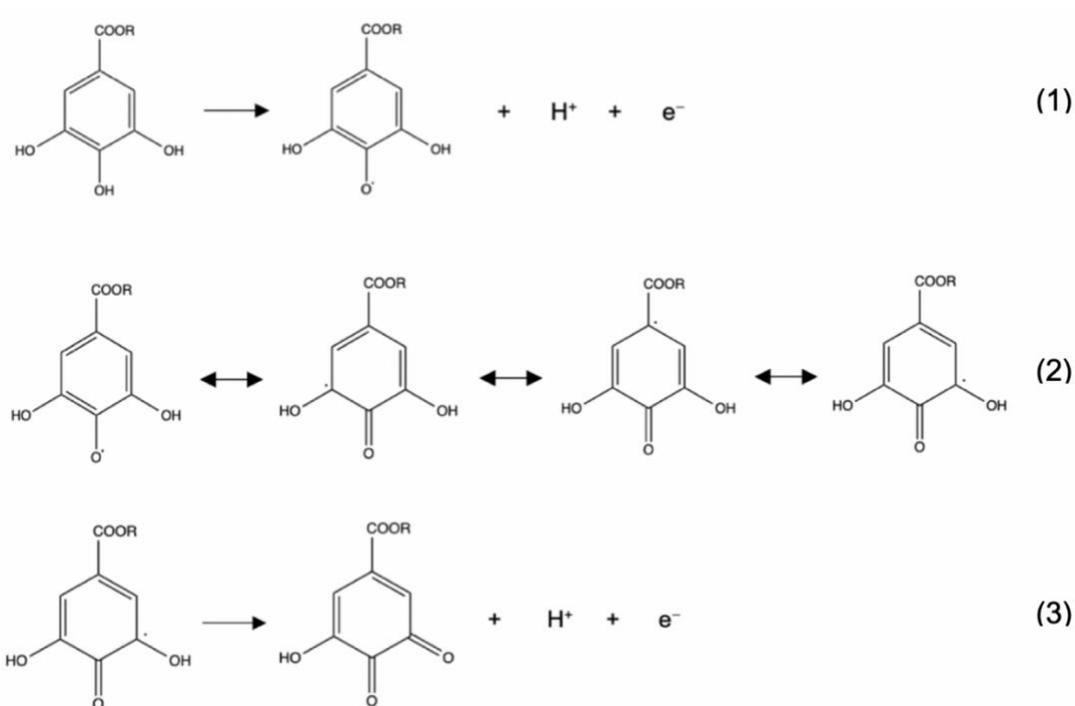


Figura 7. Esquema del mecanismo de oxidación para la familia de los galatos de acuerdo con Gunckel *et al.* (1998).

Como se deduce de la Figura 7, la principal característica estructural que es responsable de hacer del PG un buen agente antioxidante, es el número y disposición de los grupos fenólicos en el anillo aromático que está presente en todos los galatos. Esta sustancia es capaz de donar el átomo de hidrógeno de los grupos fenólicos a radicales libres. Esto es de suma importancia para detener o minimizar la propagación en cadena de radicales libres durante el proceso de oxidación de lípidos (Garrido *et al.*, 2011).

Se ha reportado que en electrodos como el de carbono vítreo, electrodos modificados de carbono vítreo con nanotubos de carbono (Xu *et al.*, 2015) y electrodos de oro modificados con nanotubos de carbono (Vikraman *et al.*, 2013), la electrooxidación de PG es irreversible ya que cuando se realizan experimentos de voltamperometría cíclica se observa una señal anódica debida al proceso global de las reacciones electroquímicas ya mencionadas. A modo de ejemplo, se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos por Xu y colaboradores en la Figura 8.

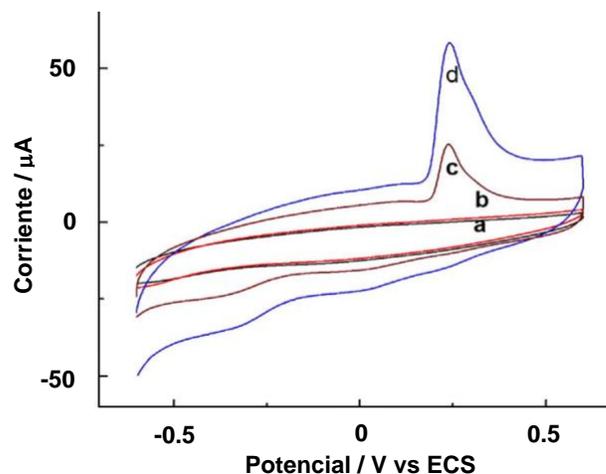


Figura 8. Ejemplos de voltamperogramas cíclicos para PG 4×10^{-4} M. (a) y (c) se obtuvieron con un electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono en KCl 0.1 M y en disolución de PG, respectivamente. (b) y (d) con un electrodo modificado con nanotubos de carbono y polímeros impresos molecularmente en KCl 0.1 M y en disolución de PG (Xu *et al.*, 2015).

Al igual que sucede con el AA, la corriente de pico depende proporcionalmente de la concentración. Asimismo, el potencial formal depende del pH, por lo que el potencial de pico se modifica según el valor de pH, desplazándose a valores positivos cuando el medio se vuelve más ácido. El valor de i_{pa} y E_{pa} son función de la velocidad de barrido.

5.3.4 Piridoxina (vitamina B₆)

El mecanismo de oxidación de esta vitamina se ha propuesto anteriormente. De acuerdo con Kusmanovic *et al.* (2016) y Hernández *et al.* (2003), y como se muestra en la Figura 9, la PN se oxida a piridoxal (vitámero) al donar dos electrones y dos protones (1). Posteriormente, el piridoxal se hidrata (2) y se forma un hemiacetal (3), el cual vuelve a perder dos electrones y dos protones para formar ácido piridóxico (4).

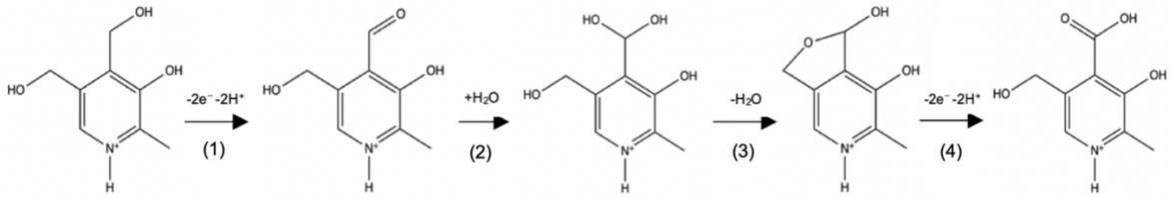


Figura 9. Esquema del mecanismo de oxidación de PN, de acuerdo con Hernández *et al.* (2003).

La oxidación de PN en medio acuoso, empleando electrodos de diferentes materiales, modificados y sin modificar, es irreversible, por lo cual el voltamperograma cíclico que se esperaría para esta sustancia es similar al mostrado en la Figura 6.

En los humanos, la vitamina B₆ está involucrada en el desarrollo y la función celular. Tiene un papel importante en más de 100 reacciones catalizadas por enzimas (Lovander, 2018). En el cuerpo humano, la PN se oxida enzimáticamente al vitámero llamado piridoxal-5'-fosfato, que es la forma activa de la vitamina B₆.

De manera similar a como sucede con el AA y el PG, la corriente de pico es directamente proporcional a la concentración. Tanto el potencial formal como el valor de i_{pa} dependen del pH. El primero se vuelve mayor y positivo cuando el pH disminuye, mientras que la corriente de pico alcanza su valor máximo cuando predomina la forma anfóterica de la PN, es decir, cuando se cumple que $pK_{a2} < pH < pK_{a1}$ (Habibi *et al.*, 2010). Finalmente, al tratarse también de un sistema irreversible, E_{pa} y i_{pa} dependen de la velocidad de barrido.

5.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Con el fin de contrastar los resultados de las pruebas electroquímicas hechas con el EPC, mencionados en las secciones anteriores, con datos de análisis químicos realizados usando otra técnica analítica, se decidió trabajar la determinación de PN mediante CLAR, puesto que en una enorme mayoría de artículos sobre la cuantificación de PN publicados entre 1980 y 2021 (632 fueron encontrados

empleando la cadena “pyridoxine” AND “HPLC” en la base de datos SciFinderⁿ) usan esa técnica y que, como se mostró anteriormente, la PN puede cuantificarse usando el EPC construido en este trabajo. La CLAR es, además, la técnica recomendada por la USP para analizar este vitámero de la vitamina B₆. Por otra parte, sólo se encontraron 60 trabajos (usando la cadena “pyridoxine” AND “voltammetry” en la misma base de datos, SciFinderⁿ) en el mismo periodo mencionado antes en los que se determina a la PN empleando técnicas voltamperométricas, lo que vuelve interesante llevar a cabo la comparación propuesta.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica de separación en la que la muestra con los componentes a separar se solubiliza en un líquido denominado fase móvil y se hace pasar a través de una columna, denominada fase estacionaria. Los componentes de la muestra se separan de acuerdo con su afinidad por la fase estacionaria y la fase móvil. Esto se debe a la existencia de equilibrios de reparto de los analitos que tienen lugar entre las dos fases condensadas, descritos por la constante de distribución termodinámica K_D , que se define como la relación entre las actividades del analito en la fase estacionaria y en la fase móvil, respectivamente (Meyer, 2010).

La fase móvil que está contenida en reservorios transparentes, generalmente de borosilicato, se desgasifica y se bombea a alta presión a través del sistema de separación (columna) hasta llegar al sistema de detección. La muestra solubilizada en la fase móvil se inyecta con una jeringa cromatográfica por medio del sistema de introducción de muestra, constituido por una válvula de dos pasos y seis vías. La válvula permite introducir un volumen constante de muestra hacia la columna (Lundanes, Reubsaet y Greibrokk, 2013). Los componentes así separados son acarreados hacia el detector, que identifica alguna propiedad física, química o fisicoquímica de los analitos, generando una señal que es procesada por el sistema de registro (Sarker, 2001). Dicho sistema, conformado actualmente por computadoras, representa gráficamente la respuesta cromatográfica en función del tiempo de retención, en forma de lo que se conoce como cromatograma.

Un ejemplo de cromatograma se muestra en la Figura 10, en la que se expone como ejemplo la separación de 3 sustancias, que generan una señal que aparece según su tiempo de retención, que es el tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta la detección. Se deduce entonces que la sustancia menos retenida en la columna es A, mientras que C es la sustancia que más interacción tuvo con la columna.

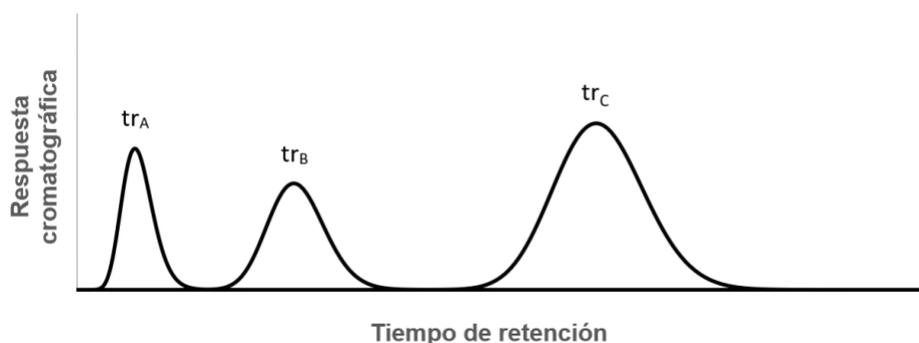


Figura 10. Cromatograma que ilustra la separación de 3 sustancias: A, B y C. Los símbolos tr_A , tr_B y tr_C representan los tiempos de retención del analito respectivo.

Los cromatogramas y la forma de los picos cromatográficos brindan información acerca de la eficiencia y el desempeño cromatográficos. Empleando los tiempos de retención y el ancho de las señales, se pueden calcular parámetros cromatográficos tales como el número de platos teóricos o la resolución, el primero tiene que ver con el número de equilibrios del analito que suceden en su distribución entre la fase estacionaria y la fase móvil, mientras que la resolución indica el grado de separación que existe entre dos picos cromatográficos (Hage, 2018).

El área bajo cada señal cromatográfica es importante para las determinaciones analíticas, ya que generalmente incrementa proporcionalmente con la concentración. Por ello, se pueden realizar curvas de calibración que representan el área cromatográfica de una señal en función de la concentración, utilizando estándares de concentración creciente del analito de interés. Sin embargo, en la industria y en la investigación es común realizar calibraciones empleando un solo

estándar, con la principal finalidad de reducir el tiempo de análisis y el consumo de reactivos (Rocha *et al.*, 2018). No obstante, la aplicabilidad de este tipo de calibración debe corroborarse con una prueba estadística pertinente.

6. Objetivos

6.1 Objetivo principal

Determinar la viabilidad del uso de un electrodo de pasta de carbono construido en el laboratorio como un electrodo de trabajo sencillo, eficaz, de bajo costo y fácil empleo en el estudio y el análisis electroquímico de ácido ascórbico, galato de propilo y piridoxina, sustancias de interés farmacéutico y alimentario.

6.2 Objetivos particulares

1. Estudiar el comportamiento del electrodo de pasta de carbono para evaluar su aplicabilidad al estudio y al análisis electroquímico de cuatro analitos: ferrocianuro de potasio (como sonda electroquímica de uso común para la caracterización de electrodos de trabajo), PN, AA y PG (como analitos de interés farmacéutico y alimentario).
2. Proponer bases metodológicas para el desarrollo de métodos electroanalíticos para el análisis y cuantificación de PN, AA y PG.
3. Implementar un método cromatográfico para la cuantificación de PN a partir del oficial de la farmacopea, con la finalidad de comparar los resultados del método electroanalítico.
4. Analizar el contenido de AA (vitamina C) presente en una muestra comercial usando el electrodo de pasta de carbono preparado

7. Justificación e hipótesis

7.1 Justificación

En atención al esfuerzo de la academia para proponer procedimientos analíticos que permitan contribuir a la formación de profesionales, es necesario desarrollar metodologías sencillas, eficaces, eficientes y de bajo costo, que relacionen al estudiante con los principios

básicos del análisis químico. En este trabajo se desea demostrar que usando este tipo de metodologías y buscando minimizar el uso de recursos e insumos, se pueden obtener resultados equiparables a los que se consiguen con otras opciones analíticas más complejas y costosas, y que las técnicas electroanalíticas pueden dar respuesta adecuada a necesidades analíticas de industrias en las que tradicionalmente no se les aprovecha.

7.2 Hipótesis

El uso de electrodos de pasta de carbono para el análisis electroquímico de ácido ascórbico, galato de propilo y piridoxina en formulaciones farmacéuticas permitirá establecer condiciones de trabajo útiles para el desarrollo de métodos electroquímicos de análisis que compitan en costo, exactitud, incertidumbre y rapidez con métodos cromatográficos empleados para el análisis de los analitos mencionados.

8. Metodología

El agua desionizada (resistividad igual a $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) usada en todos los experimentos en este trabajo se obtuvo de un equipo PURELAB Ultra de ELGA. Las determinaciones de pH se realizaron con un medidor de pH marca Thermo Scientific Orion 5 Star, usando un electrodo combinado de vidrio Thermo Scientific, que fue calibrado para su uso con amortiguadores de referencia de la misma marca con valores de pH iguales a 4.01 ± 0.01 , 7.00 ± 0.01 y 10.01 ± 0.01 ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). Para medir las masas de las sustancias empleadas, se usó una balanza semimicroanalítica marca Mettler Toledo XP105DR ($e = 1 \text{ mg}$ (división de verificación); $d = 0.01 \text{ mg}/0.1 \text{ mg}$ (división real de la escala) para el intervalos de pesada de $31 \text{ g}/120 \text{ g}$).

8.1 Reactivos y materiales para los experimentos electroquímicos

Para los experimentos voltamperométricos se emplearon como electrolitos soportes disoluciones amortiguadoras (o buffer) de fosfatos de concentración igual a 100 mM ajustadas a valores de pH iguales a 4.5 para los experimentos con ácido ascórbico, o a 7.0 para los experimentos con galato de propilo o piridoxina, que se prepararon disolviendo las cantidades apropiadas de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 (J.T. Baker, 98.1 y 100% , respectivamente) en un volumen igual a 250 mL , preparándose nuevas

disoluciones cada semana. El electrolito soporte se almacenó a temperatura ambiente.

Para preparar las disoluciones estándar de PN (Supelco, 99.9 %), PG (Sigma Aldrich, 98 %), ferrocianuro de potasio (Productos Químicos Monterrey, 99.9 %) y AA (Sigma Aldrich, 99.9 %), se utilizaron alícuotas de una disolución madre de cada analito en una concentración igual a 10 mM, elaborada al disolver la cantidad necesaria del reactivo analítico en un matraz volumétrico de 10 mL. Las diluciones se hicieron en matraces volumétricos de 10 mL, empleando alícuotas mínimas de 200 μ L. Todos los días se prepararon nuevas disoluciones debido a la degradación de los analitos, empleando el electrolito soporte como diluyente, repitiendo el procedimiento descrito. Todo el material volumétrico utilizado (clase A, pero sin calibrar en nuestro laboratorio) fue nuevo de la marca Pyrex. En el caso de los experimentos con ferrocianuro de potasio, se empleó KCl (J.T. Baker, 99 %) como electrolito soporte.

En todos los experimentos electroquímicos se utilizó como electrodo de referencia uno comercial de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm⁻³, constituido por un alambre de plata recubierto de cloruro de plata en contacto con KCl 3.5 M, de la marca CH Instruments. Todos los potenciales de electrodo se midieron y se informan con respecto a este electrodo de referencia. Como contraelectrodo se empleó una barra de grafito de 3.8 mm de diámetro de marca BeanTown Chemical. Se usó un potenciostato marca PalmSens3, el cual se vinculó con una computadora personal para realizar los análisis con el programa PStTrace.

8.2 Reactivos y materiales para experimentos en CLAR

Para la preparación de la fase acuosa se utilizó fosfato diácido de potasio (J.T. Baker, 98.1 %) en una concentración igual a 2.70 g L⁻¹, y el valor de pH se ajustó a 3 empleando ácido fosfórico al 80 % (J.T. Baker). Como fase orgánica se utilizó metanol grado cromatográfico (J.T. Baker). En lugar del 1-hexanosulfonato de sodio (recomendado por la USP, pero que no fue posible conseguir por cuestiones de

tiempo), se usó dodecil sulfato de sodio (Sigma Aldrich, 99 %) como reactivo de par iónico, preparado con la fase acuosa en una concentración de 4 g L⁻¹. Las fases acuosa y orgánica, además de la disolución con el reactivo de par iónico, se filtraron en un equipo Millipore con una membrana Durapore HVLP de tamaño de poro igual a 0.45 µm (Merck), y se desgasificaron en un baño de ultrasonido con sistema de vacío.

Como equipo instrumental se utilizó una bomba LS-Class acoplada a un detector UV de inyección manual de la marca Thermo Separation Products. La columna cromatográfica fue una C₁₈ Spherisorb ODS2 de 25 cm de largo y 4.6 mm de diámetro interno, con tamaño de partícula igual a 5 µm, de Waters. El registro se llevó a cabo en una computadora y los datos fueron procesados con el software N2000 Chromatography Data System.

8.3 Construcción y caracterización del electrodo de trabajo

8.3.1 Construcción

Los EPC se prepararon mezclando grafito y aceite de parafina grado USP (adquirido en Farmacia París) en una relación 80:20. Para preparar la pasta, se pesaron las cantidades requeridas de grafito y aceite de parafina para preparar aproximadamente 300 mg de pasta en la relación antes señalada. Las dos sustancias se colocaron en un vaso de precipitados de 50 mL y se mezclaron cuidadosamente durante 5 minutos con la ayuda de una espátula, para posteriormente traspasar la pasta obtenida a un mortero de ágata, donde la mezcla se molió para homogeneizarla por otros 5 minutos, hasta obtener una pasta gris brillante.

Para cada electrodo preparado, se empacaron 200 mg de pasta de carbono en un tubo de teflón (comprado en La Paloma Compañía de metales S.A. de C.V.) de 10 cm de largo, 5 mm de diámetro externo y 3 mm de diámetro interno. En los tubos previamente cortados al tamaño mencionado, tras lijar la superficie que estaría expuesta a las disoluciones, se introdujeron tornillos de acero inoxidable 304 para

compactar y extruir la pasta más fácilmente, así como para establecer el contacto eléctrico en el electrodo. La pasta se empacó en los tubos con ayuda de una espátula, compactándola periódicamente con el tornillo para asegurar que la columna de pasta en el tubo de teflón fuese lo más homogénea posible. En la Figura 11 se muestra una fotografía de un electrodo ensamblado de la manera relatada.



Figura 11. Electrodo EPC con una relación 80:20 m:m de grafito y aceite de parafina, empacado en un tubo de teflón, usando un tornillo de acero inoxidable para la extrusión de la pasta y el contacto eléctrico.

8.3.2 Estudios electroquímicos

8.3.2.1 Determinación de la repetibilidad de la respuesta del electrodo y de su área electroactiva.

El ferricianuro y el ferrocianuro de potasio se han empleado durante mucho tiempo como compuestos de caracterización y comparación del comportamiento de distintos electrodos de trabajo o de referencia. En esta tesis, el ferrocianuro de potasio fue empleado para caracterizar el comportamiento electroquímico de los electrodos y las celdas con las que se trabajó. Para realizar estos experimentos de caracterización, típicamente se prepararon 10 mL de una disolución acuosa de $K_4Fe(CN)_6$ 5.4 mM en KCl 0.1 M. Para los experimentos de voltamperometría cíclica se emplearon las siguientes condiciones: $E_0 = -0.12$ V, $E_{i1} = 0.68$ V, $E_{i2} = -0.28$ V,

$E_E = 0.005 \text{ V}$, $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$. Antes de cada experimento voltamperométrico, la superficie del electrodo de trabajo se renovó con un paño de tela raso, pero la superficie no se renovó durante las réplicas de dichos experimentos.

Para la estimación del área electroactiva del EPC se preparó una disolución acuosa de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ en concentración igual a 5.4 mM, utilizando KCl 0.1 M como electrolito soporte. Con esta disolución se llevaron a cabo experimentos de cronoamperometría, empleando los siguientes parámetros: $E_0 = 0 \text{ V}$, $E_E = 0.4 \text{ V}$, $E_f = 0 \text{ V}$, muestreo cada 2 ms, duración de pulso igual a 70 s. Se utilizó un mismo EPC en todos los experimentos, sin renovar su superficie.

Para la corrección de caída óhmica, se determinó la resistencia de la disolución mediante el potencióstato utilizado y se usó posteriormente para la corrección de los valores de potencial usando Microsoft Excel.

8.3.2.2 Piridoxina, galato de propilo y ácido ascórbico

Para el estudio electroquímico de los tres analitos de interés, se utilizó VL como técnica electroquímica, bajo las condiciones mostradas en la Tabla 1. Las disoluciones de todos los experimentos se prepararon tal y como se indicó en la sección 8.1, incluyendo las utilizadas para las curvas de calibración.

Tabla 1. Condiciones experimentales fijadas en los experimentos de caracterización con VL para PN, PG y AA.

Analito	E_0 (V)	E_f (V)	E_E (mV)	ν (mV s ⁻¹)
PN	0.30	1.20	5	100
PG	- 0.15	1.20	5	100
AA	- 0.08	0.85	5	100

8.4 Aplicación del EPC para la cuantificación electroquímica de PN o AA

8.4.1 PN

Para la determinación de PN se utilizó una muestra farmacéutica de Meclison, cuya formulación indica que, por tableta, se tienen 25 mg de clorhidrato de meclizina, 50 mg de clorhidrato de piridoxina y excipiente cbp. La masa promedio de 20 tabletas fue de 504.2 mg. Las 20 tabletas fueron trituradas en un mortero hasta obtener un polvo fino, del cual se pesó una masa igual a 41.3 mg, que se suspendió en aproximadamente 8 mL del electrolito soporte para luego aplicarle ultrasonido durante 15 segundos. La disolución resultante se filtró y se aforó a 10 mL. De esta última se hicieron dos diluciones subsecuentes en las que se tomó 500 μ L y se llevó a un volumen de 10 mL. La última dilución se utilizó para realizar los experimentos en la celda electroquímica, haciendo previamente una calibración con disoluciones de PN en concentraciones iguales a: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 mM.

8.4.2 AA

Se determinó el contenido de AA en una muestra de Rosavit C, cuya formulación indica que se tienen 500 mg de AA, 100 mg de extracto seco de pétalos de rosa canina y excipiente cbp. La masa promedio de 20 tabletas fue de 1.1421 g. Las 20 tabletas fueron trituradas en un mortero hasta obtener un polvo fino. Para la cuantificación de AA en esta muestra se realizó una curva de calibración con concentraciones de 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700 y 2930 μ M de AA, utilizando VL en las condiciones dadas en la tabla 1 (sección 8.3.2.2). Para el tratamiento de muestra, se pesó una cantidad de 51.1 mg del polvo obtenido de las tabletas, se suspendió en aproximadamente 8 mL de electrolito soporte y se le aplicó ultrasonido durante medio minuto, se filtró y se aforó a 10 mL. Se tomó una alícuota de 2 mL y se llevó a 10 mL de aforo. Esta última disolución de la muestra se colocó en la celda electroquímica para analizarse por triplicado.

8.5 Implementación del método CLAR para cuantificar piridoxina

8.5.1 Evaluación del tiempo de retención

Se prepararon 50 mL de una disolución de PN con el reactivo señalado en la sección 8.1, en una concentración igual a 3 mM y se realizó una dilución 1:10. Esta última disolución se inyectó seis veces en el cromatógrafo en tres días diferentes para evaluar la repetibilidad y la reproducibilidad de las mediciones, preparando una nueva disolución cada día, registrándose el tiempo de retención de cada pico cromatográfico.

El equipo cromatográfico se acondicionó durante 1 hora con la fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.8 mL min⁻¹. Se inyectó la disolución acuosa de dodecil sulfato de sodio para posteriormente analizar la disolución de piridoxina, esperando 10 minutos entre cada inyección para el registro de los cromatogramas.

8.5.2 Linealidad

Se prepararon 50 mL de una disolución madre de piridoxina con el mismo reactivo utilizado en los experimentos electroquímicos, en una concentración igual a 3 mM, en agua. De esta disolución se realizaron 8 diluciones de 10 mL para el experimento de linealidad, cuyas concentraciones fueron de 97.3, 145.9, 194.6, 243.2, 291.8, 340.5, 389.1 y 437.7 µM.

Para acondicionar el equipo cromatográfico y realizar el registro de los cromatogramas, se utilizaron las mismas condiciones que aquellas señaladas en la sección 8.5.1, es decir, se inyectó la disolución del reactivo de par iónico para posteriormente inyectar las disoluciones de piridoxina por triplicado, esperando 10 minutos entre cada inyección para el registro de los cromatogramas.

8.5.3 Variación del flujo

Se prepararon por duplicado 50 mL de una disolución madre de piridoxina en una concentración igual a 3 mM, en agua. De cada disolución se realizó una dilución 1:10. Una de estas disoluciones se utilizó como estándar de trabajo y la otra se empleó como estándar de recobro.

El equipo cromatográfico se acondicionó durante 1 hora con la fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, en tres días diferentes, con flujos de 0.7, 0.8 y 0.9 mL min⁻¹. En cada día se hicieron 6 inyecciones de la disolución estándar de trabajo, realizando una inyección previa de la disolución del reactivo de par iónico. Finalmente, se realizaron 3 inyecciones de la disolución estándar de recobro. Entre cada inyección se dejó un tiempo de 10 minutos para registrar los cromatogramas.

8.6 Comparación del método electroquímico de cuantificación de piridoxina con el método CLAR

Para realizar la determinación de piridoxina por ambos métodos, se utilizó una muestra farmacéutica de Meclison, cuya formulación indica que, por tableta, se tienen 25 mg de clorhidrato de meclizina, 50 mg de clorhidrato de piridoxina y excipiente cbp. El peso promedio de 20 tabletas fue de 504.2 mg. Las 20 tabletas fueron trituradas en un mortero hasta obtener un polvo fino.

Para la determinación con CLAR, se pesó una cantidad de 307.2 mg del polvo fino, se suspendió en aproximadamente 20 mL de agua y se le aplicó ultrasonido durante medio minuto. La disolución resultante se filtró para eliminar las partículas del excipiente y se aforó a 50 mL. Finalmente, se realizó una dilución 1:10 y la disolución resultante se empleó para realizar las inyecciones en el sistema cromatográfico. Por otra parte, se preparó 50 mL de una disolución estándar de concentración igual a 3 mM, en agua y se le realizó una dilución 1:10 que se utilizó para el experimento.

El equipo cromatográfico se acondicionó durante 1 hora con la fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.8 mL min⁻¹. Se hicieron 6 inyecciones de la disolución estándar, realizando una inyección previa de la disolución del reactivo de par iónico. Finalmente, se realizaron 3 inyecciones de la disolución de la muestra. Entre cada inyección se dejó un tiempo de 10 minutos para registrar los cromatogramas.

Para la determinación con el método electroquímico, se pesó una cantidad de 41.3 mg del polvo fino, se suspendió en aproximadamente 8 mL del electrolito soporte y se le aplicó ultrasonido durante 15 segundos. La disolución resultante se filtró y se aforó a 10 mL. De esta última se hicieron dos diluciones subsecuentes en las que se tomó 500 µL y se llevó a un volumen de 10 mL. La última dilución se utilizó para realizar los experimentos en la celda electroquímica, haciendo previamente una calibración con disoluciones de PN en concentraciones iguales a: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 µM.

9. Resultados

9.1 Caracterización electroquímica de la respuesta del electrodo de trabajo usando K₄Fe(CN)₆ como sonda electroquímica.

Siguiendo las recomendaciones de caracterización de EPC no modificados (Švancara *et al.*, 2012), se eligió al ferrocianuro de potasio, K₄Fe(CN)₆, como analito para realizar las primeras evaluaciones de la respuesta del EPC. El objetivo de estas evaluaciones era determinar si el EPC construido resultaba útil para llevar a cabo experimentos voltamperométricos, y para ello se estudió su respuesta en la electrooxidación de ferrocianuro de potasio. De estos experimentos voltamperométricos de prospección se obtuvo una estimación del área electroactiva del EPC, y se concluyó sobre la capacidad del electrodo de dar una respuesta directamente proporcional a la concentración de ferrocianuro de potasio. Sin embargo, esto no implica que esto sea igual para otras sustancias que podrían por

ejemplo adsorberse al electrodo y producir respuestas no proporcionales a la concentración.

El comportamiento electroquímico del $K_4Fe(CN)_6$ sobre los EPC construidos en este trabajo, usando CV como técnica electroanalítica, es el ya conocido para este sistema: durante el barrido anódico se observa una señal de electrooxidación, seguida de una de electroreducción cuando el barrido de potencial se invierte. Cuando la velocidad de barrido en CV es igual a 0.100 V s^{-1} , los potenciales de pico anódico y catódico aparecen en 0.320 y 0.140 V , respectivamente. Bajo estas condiciones, la diferencia de potenciales de pico, igual a 0.180 V y mucho mayor que los 0.059 V esperados para un sistema rápido o nernstiano, muestra que la reacción electroquímica es relativamente lenta. Esto puede deberse a la naturaleza hidrofóbica de la superficie del electrodo, así como a la carga acumulada sobre ella (Guo *et al.*, 2013).

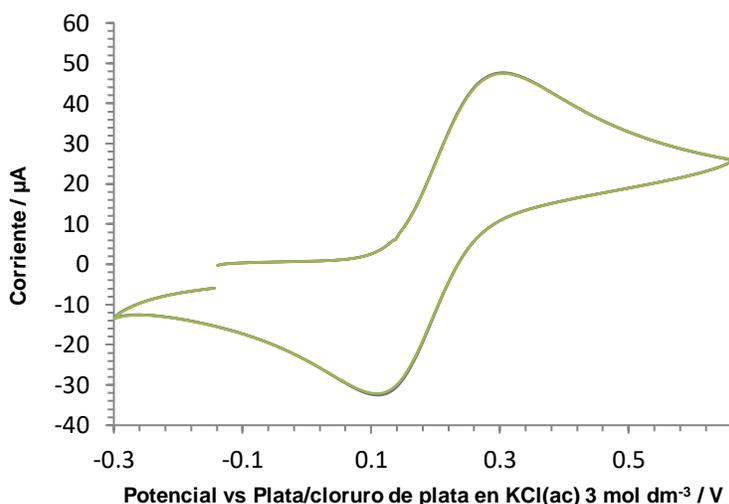


Figura 12. Voltamperogramas cíclicos (4 repeticiones) para $K_4Fe(CN)_6$ 5.4 mM en $\text{KCl } 0.1 \text{ M}$, sin renovar la superficie del EPC. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl(ac)} 3 \text{ mol dm}^{-3}$ y CE de grafito. $E_0 = -0.12 \text{ V}$, $E_{i1} = 0.68 \text{ V}$, $E_{i2} = -0.28 \text{ V}$, $E_E = 5 \text{ mV}$, $v = 0.100 \text{ V s}^{-1}$. Las cuatro curvas prácticamente están sobrepuestas.

En estos experimentos de prospección, se observó que se pueden realizar determinaciones sin la necesidad de renovar la superficie del EPC entre cada

voltamperograma como se observa en la Figura 12, ejemplificando con el experimento a 0.100 V s^{-1} . Para cada valor de potencial aplicado durante el barrido, los valores de corriente que se tienen en el voltamperograma inicial y en sus repeticiones son prácticamente iguales. En la figura en cuestión, prácticamente se traslapan las señales de cada una de las 4 réplicas mostradas, por lo que aparentemente sólo hay una curva voltamperométrica.

Con la finalidad de evaluar la repetibilidad de la respuesta voltamperométrica (la magnitud de las corrientes y los potenciales de pico) para diferentes velocidades de barrido, buscando determinar si las señales electroquímicas estaban controladas por difusión o adsorción y si era necesario en este caso renovar la superficie del electrodo entre repeticiones de barridos voltamperométricos, se obtuvo una serie de voltamperogramas a distintas velocidades de barrido, haciendo varias repeticiones para cada velocidad empleada. Se realizaron experimentos voltamperométricos por triplicado, en un intervalo de velocidades de barrido comprendido entre 0.080 y 0.180 V s^{-1} . En la Figura 13 se presentan los voltamperogramas obtenidos para disoluciones de ferrocianuro de potasio 5.4 mM en $\text{KCl } 0.1 \text{ M}$ usando diferentes velocidades de barrido, corregidos por caída óhmica. En la Tabla 2 se muestran los valores de corriente de pico obtenidos para estos experimentos. Los coeficientes de variación de la corriente de pico anódica son menores al 0.5% para todas las velocidades de barrido, corroborando la es alta repetibilidad del trazo voltamperométrico, como se describió anteriormente para la Figura 12.

En cuanto a las características del sistema redox, la relación entre las corrientes de pico anódica y catódica se acercan a 1 en todas las velocidades de barrido que fueron utilizadas; sin embargo, los valores de potencial de pico se desplazan en función de la velocidad de barrido. Es decir, el valor absoluto de la diferencia de potenciales de pico es proporcional a la velocidad de barrido, siendo de 0.140 V en 0.100 V s^{-1} y llegando hasta 0.240 V en 0.200 V s^{-1} . Esto indica que el comportamiento electroquímico del par ferricianuro/ferrocianuro no corresponde al de un sistema reversible en el EPC, lo que también se ha observado en otros electrodos, como es el caso de otros electrodos de carbono (Ferreira *et al.*, 2002),

de platino (Aristov y Habekost, 2015) o electrodos de platino modificados (Benoudjit *et al.*, 2018).

Por lo anterior, el comportamiento electroquímico del par ferricianuro/ferrocianuro puede aproximarse al de un sistema cuasirreversible, pudiéndose caracterizar con el método de Nicholson empleando el parámetro Ψ , tal como lo describen Griffiths y asociados (Griffiths *et al.*, 2014).

Tabla 2. Valores de i_{pa} , i_{pc} y i_{pa} / i_{pc} para disoluciones acuosas de ferrocianuro de potasio 5.4 mM en KCl 0.1 M, a diferentes velocidades de barrido.

Corriente de pico anódica (μA)								
Réplica	60 mV s ⁻¹	80 mV s ⁻¹	100 mV s ⁻¹	120 mV s ⁻¹	140 mV s ⁻¹	160 mV s ⁻¹	180 mV s ⁻¹	200 mV s ⁻¹
1	38.0	42.0	45.6	48.7	51.5	53.9	56.2	58.2
2	37.9	42.0	45.7	48.8	51.6	53.9	56.3	58.2
3	38.1	42.3	45.8	48.8	51.7	54.1	56.4	58.4
\bar{X}	38.0	42.1	45.7	48.8	51.6	54.0	56.3	58.3
s	0.10	0.18	0.10	0.07	0.07	0.09	0.10	0.12
CV (%)	0.26	0.42	0.23	0.14	0.14	0.17	0.18	0.20
Réplica	Corriente de pico catódica ($ \mu\text{A} $)							
1	33.7	36.8	38.7	40.1	41.3	42.1	43.2	43.8
2	33.9	36.4	38.4	40.0	41.4	42.3	43.3	43.9
3	34.1	36.2	38.3	39.9	41.5	42.5	43.1	44.1
\bar{X}	33.9	36.5	38.5	40.0	41.4	42.3	43.2	43.9
s	0.20	0.31	0.21	0.10	0.10	0.20	0.10	0.15
CV (%)	0.59	0.84	0.54	0.25	0.24	0.47	0.23	0.35
Cociente promedio de las corrientes de pico anódicas y catódicas								
(i_{pa} / i_{pc})	1.1	1.2	1.2	1.2	1.2	1.3	1.3	1.3

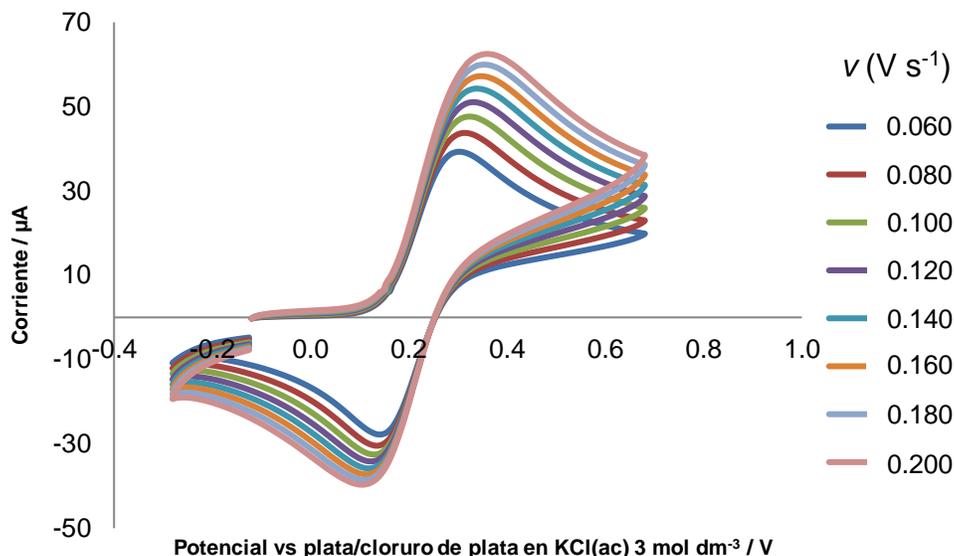


Figura 13. Voltamperogramas cíclicos de $K_4Fe(CN)_6$ 5.4 mM en KCl 0.1 M, a velocidades de barrido iguales a 0.060, 0.080, 0.100, 0.120, 0.140, 0.160, 0.180 y 0.200 $V s^{-1}$, sin renovar la superficie del EPC. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.12 V$, $E_{i1} = 0.68 V$, $E_{i2} = -0.28 V$, $E_E = 0.005 V$, $v = 0.100 V s^{-1}$.

La Figura 14 muestra la variación de la corriente de pico en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. La ecuación de la regresión lineal es: $i_p = 101.7 \pm 1.17 v^{1/2} + 13.25 \pm 0.42$, con un valor de $r^2 = 0.9971$, indicando que los datos se ajustan a una línea recta y que la reacción de electrooxidación del ferrocianuro está controlada por difusión.

Lo anterior también se puede concluir al realizar una gráfica que represente el cambio del logaritmo de la corriente de pico en función del logaritmo de la velocidad de barrido, presentada en la Figura 15. La ecuación de regresión obtenida es: $\log i_p = 0.363 \pm 0.003 \log v + 0.933 \pm 0.006$, con un valor de $r^2 = 0.9986$. El valor de la pendiente es menor que 0.5, indicando el control por difusión complicado con una posible inactivación paulatina de la superficie que, sin embargo, no es notable al replicar los barridos para una misma velocidad de barrido.

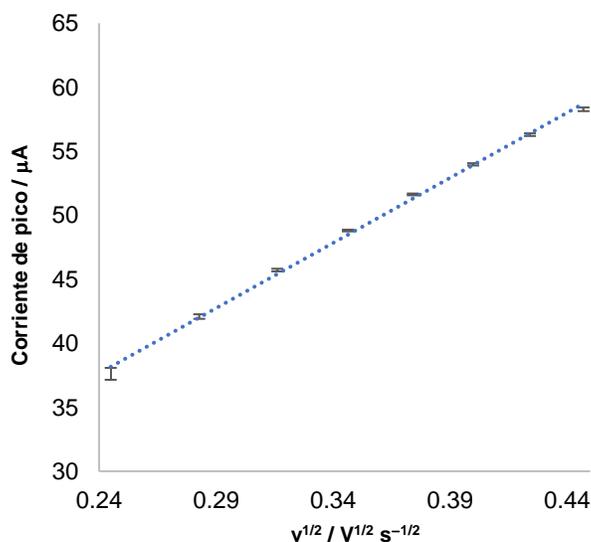


Figura 14. Corriente de pico anódica en función de la raíz cuadrada de la v para $K_4Fe(CN)_6$ en concentración igual a 5.4 mM, en KCl 0.1 M, a velocidades de barrido: 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 $mV s^{-1}$. ER de plata/plata cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.12 V$, $E_{i1} = 0.68 V$, $E_{i2} = -0.28 V$, $E_E = 5 mV$, $v = 100 mV s^{-1}$.

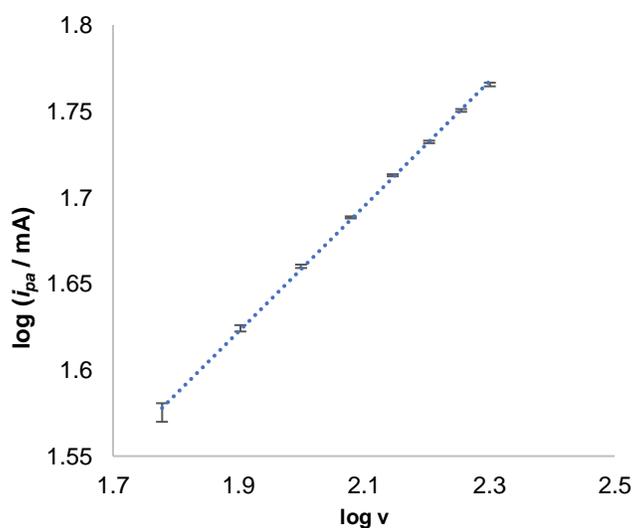


Figura 15. Logaritmo de i_{pa} en función del logaritmo de v para $K_4Fe(CN)_6$ 5.4 mM, en KCl 0.1 M, a velocidades de barrido iguales a 0.060, 0.080, 0.100, 0.120, 0.140, 0.160, 0.180 y 0.200 $V s^{-1}$. ER de plata/plata cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.12 V$, $E_{i1} = 0.68 V$, $E_{i2} = -0.28 V$, $E_E = 0.005 V$, $v = 0.100 V s^{-1}$.

Estos resultados muestran que el tiempo experimental se puede reducir drásticamente cuando se emplee esta sustancia o se estudie con fines electroquímicos, debido a que no se tiene que recurrir a renovar la superficie del electrodo durante el desarrollo experimental (lo que no siempre es necesariamente cierto para cualquier sistema de estudio), lo cual resultó una ventaja y fue práctico para la determinación del área geométrica del electrodo.

Para estimar el área electroactiva del electrodo de pasta de carbono, se utilizó la cronoamperometría, y los experimentos se realizaron con una disolución de ferrocianuro de potasio. Se eligió esta sustancia debido a que el sistema ferri/ferrocianuro ya se encuentra caracterizado.

En la Figura 16 se muestra un cronoamperograma obtenido para una disolución de ferrocianuro de potasio 5.4 mM en KCl 0.1 M. El potencial de pulso elegido fue de 0.4 V vs plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm⁻³, el cual se seleccionó para asegurar que existía condición de control difusional. Como se observa, la corriente decae conforme el tiempo del experimento transcurre, debido al incremento del espesor de la capa de difusión a medida que se lleva a cabo la reacción electroquímica.

Empleando la ecuación de Cottrell (sección 5.1.4), los datos se ajustaron a una línea recta al representar la corriente medida como función del inverso de la raíz cuadrada del producto πt . Esto se muestra en la Figura 17. De acuerdo con estos resultados, la pendiente de la regresión lineal es igual a $nFAD^{1/2}C$, es decir, al producto del número de electrones intercambiados, la constante de Faraday, el área del electrodo, la raíz cuadrada del coeficiente de difusión y la concentración de la especie electrolizada en el seno de la disolución.

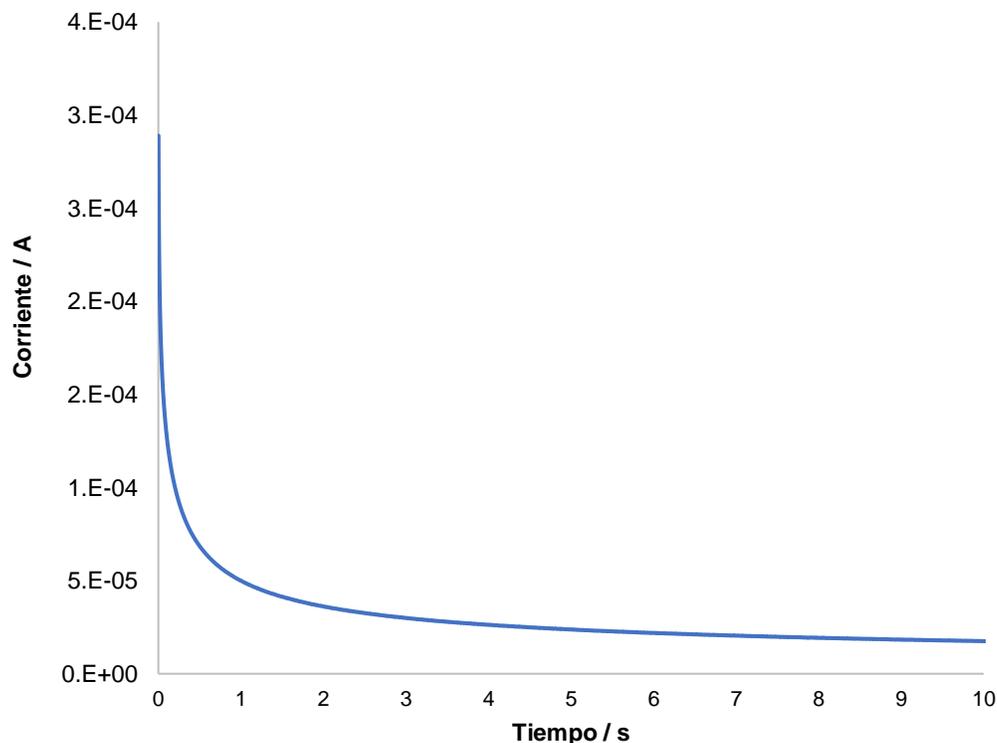


Figura 16. Cronoamperograma obtenido para una disolución de ferrocianuro de potasio en concentración igual a 5.4 mM: $E_0 = 0$ V, potencial del pulso = 0.4 V, muestreo = 2 ms, duración de pulso = 20 s.

Puesto que en la oxidación de ferrocianuro a ferricianuro se intercambia un electrón, y ya que la concentración de la disolución es conocida, al considerar un valor de coeficiente de difusión igual a $7.17 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ (Baur y Wightman, 1991), y sabiendo que la ecuación de la recta de la Figura 17 es $i(\text{A}) = 9.0 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-9} t^{-0.5} \pi^{-0.5} + 1.7749 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-9}$, $r^2 = 0.9999$, es posible calcular el área electroactiva del EPC, la cual es de 6.35 mm^2 , en promedio. El resultado por triplicado de este experimento se muestra en la Tabla 3. El diámetro del área transversal del tubo empleado para construir el EPC es de aproximadamente 3 mm, lo cual equivale a un área geométrica cercana a los 7 mm^2 , por lo que se puede concluir que la estimación del área electroactiva del electrodo es aceptable.

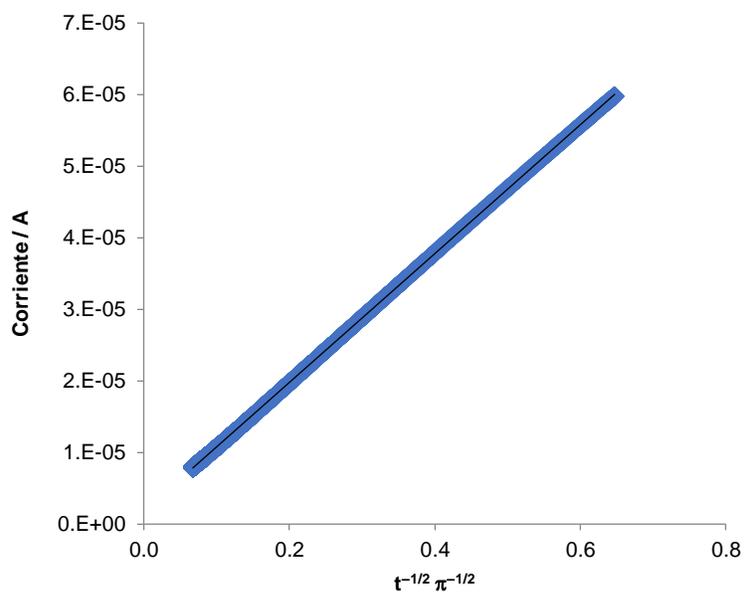


Figura 17. Corriente medida a lo largo del experimento cronoamperométrico como función de $t^{-1/2} \pi^{-1/2}$.

Tabla 3. Área electroactiva obtenida para el EPC (se muestran el valor promedio y la desviación estándar de tres medidas repetidas) empleando cronoamperometría.

Determinación	Área obtenida (mm ²)
1	6.40
2	6.54
3	6.10
\bar{X}	6.35 ± 0.22

Como se mencionó en la sección 5.3.1, la utilidad del ferrocianuro como sonda electroquímica para estos experimentos de caracterización de los EPC construidos radica en que el sistema redox ferricianuro/ferrocianuro es un sistema ampliamente estudiado, del cual se conocen muchas de sus propiedades. Así, a pesar de que se evaluó sólo a grandes rasgos su comportamiento electroquímico sobre los EPC, con los resultados obtenidos se pudo concluir que el funcionamiento del EPC en la celda electroquímica es adecuado y que los cambios observados en su respuesta son

debidos únicamente al experimento electroquímico descrito, si bien este comportamiento permite decir que el EPC puede emplearse como electrodo de trabajo para llevar a cabo experimentos voltamperométricos mientras no exista evidencia contraria.

9.2 Estudio voltamperométrico de PN empleando el EPC

Esta sustancia se caracteriza por presentar un perfil electroquímico irreversible en el electrodo de pasta de carbono, muy similar al que se observa en carbono vítreo. Se tiene un potencial de pico anódico en 760 mV vs plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm⁻³ y ausencia total de señales cuando el barrido de potencial se invierte en voltamperometría cíclica.

Como primera aproximación, se evaluó si la señal de corriente de fondo y faradaica son similares entre cada experimento cuando la superficie del electrodo no es renovada, como se hizo con el ferrocianuro de potasio. La superficie del electrodo se renovó antes de introducir el EPC en la celda electroquímica.

En la Figura 18 se muestran los voltamperogramas obtenidos en la condición de experimentación ya descrita. En este y en los demás experimentos donde no se renovó la superficie, se observó que la señal de electrooxidación no se incrementaba de forma lineal con la concentración, además de que la forma definida de los voltamperogramas en régimen de difusión pura se perdía tras varias repeticiones, dando lugar a voltamperogramas de forma sigmoideal, que se asemejan a los que se obtendrían si se mantuviera una difusión convectiva. Todo esto puede deberse a adsorción de productos de la reacción electroquímica que inactivan paulatinamente al electrodo, reduciendo así la rapidez de la reacción electroquímica.

Por lo anterior, para este analito se decidió renovar la superficie del EPC usando un paño después de realizar un voltamperograma y tres réplicas para cada nivel de concentración. Con ello, la magnitud de la corriente de pico incrementaba en función

de la concentración en mayor medida y no se perdía la linealidad de la respuesta. Esto se realizó en las curvas de calibración subsecuentes y en la aplicación para el análisis de vitamina B₆ en muestras. La Figura 19 muestra 3 réplicas de voltamperogramas para diferentes concentraciones de piridoxina, observando que los valores de corriente-potencial de las réplicas se asemejan en comparación con los de la Figura 16, mejorando la precisión de los resultados.

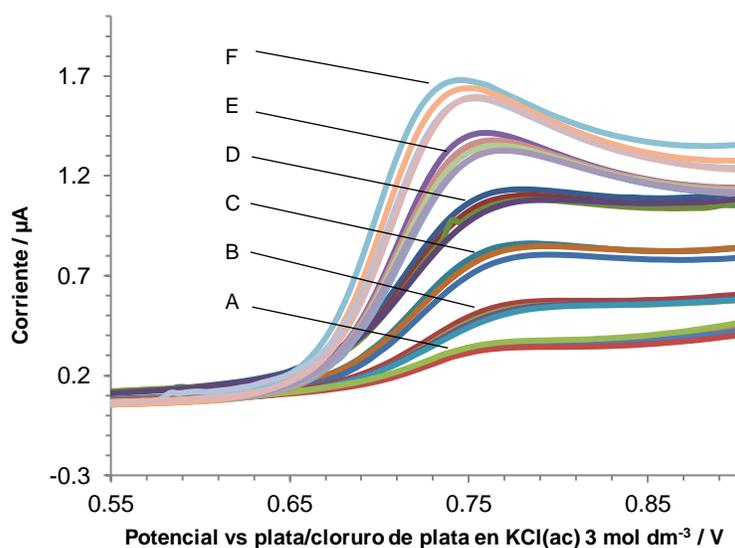


Figura 18. Voltamperogramas de barrido lineal para PN en concentraciones iguales a: 10 (A), 30 (B), 50 (C), 70 (D), 90 (E) y 110 (F) μM sin renovar la superficie del ECP entre cada concentración (4 réplicas), en DBF 0.1 M, $\text{pH} = 7$. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl}(\text{ac}) 3 \text{ mol dm}^{-3}$ y CE de grafito. $E_0 = 0.3 \text{ V}$, $E_f = 1.2 \text{ V}$, $E_E = 5 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

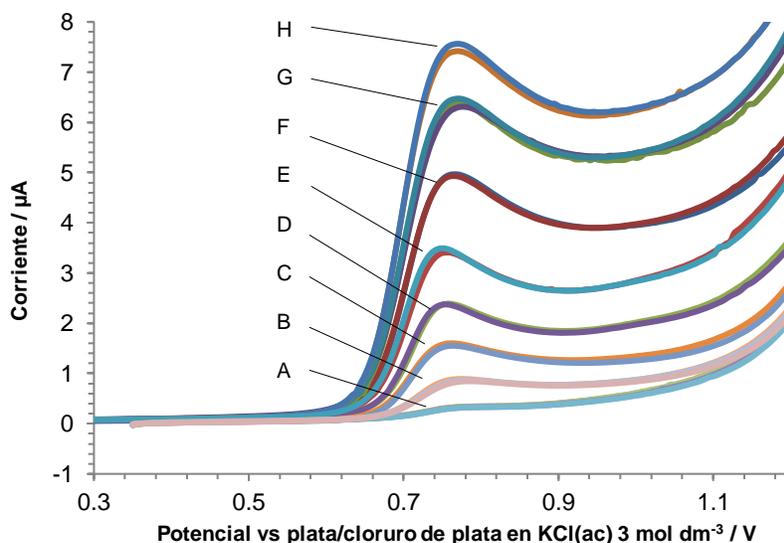


Figura 19. Voltamperogramas de barrido lineal para PN en concentraciones iguales a: 10 (A), 30 (B), 50 (C), 100 (D), 150 (E), 200 (F), 250 (G) y 300 (H) μM , renovando la superficie del EPC entre cada concentración (3 réplicas), en DBF 0.1 M, $\text{pH} = 7$. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl(ac)} 3 \text{ mol dm}^{-3}$ y CE de grafito. $E_0 = 0.3 \text{ V}$, $E_f = 1.2 \text{ V}$, $E_E = 5 \text{ mV}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Estos resultados muestran que, dada una superficie del EPC, esta no se modifica o prácticamente no cambia, permitiendo que, en principio, se puedan realizar determinaciones más rápidas, eficaces y sencillas. Y, por otra parte, el comportamiento electroquímico de PN en el EPC es muy similar al ya estudiado en el electrodo de carbono vítreo, pero presenta ventajas tales como ser más económico y tener una relación señal-línea base mayor (Wu & Song, 2007).

La Tabla 4 muestra el coeficiente de variación de la corriente de pico en cuatro diferentes concentraciones, renovando la superficie del electrodo entre cada concentración. De acuerdo con esto y a lo previamente discutido, para fines de aplicación del EPC en el análisis cuantitativo y con la finalidad de disminuir el tiempo de análisis, se decidió renovar la superficie del electrodo después de realizar las réplicas necesarias para cada nivel de concentración en una curva de calibración. Por ejemplo, en una calibración con 7 estándares, se realizarían 7 renovaciones de superficie del EPC, y una más cuando se analice la muestra.

Tabla 4. Valores de i_{pa} para clorhidrato de piridoxina por quintuplicado en diferentes concentraciones, renovando la superficie del EPC cuando se cambió el nivel de concentración.

Réplica	Concentración (μM)			
	40	50	60	70
1 (μA)	0.836	1.160	1.347	1.618
2 (μA)	0.855	1.180	1.386	1.600
3 (μA)	0.882	1.194	1.399	1.634
4 (μA)	0.861	1.222	1.332	1.665
5 (μA)	0.882	1.143	1.331	1.675
\bar{X}	0.863	1.180	1.359	1.638
s	0.019	0.031	0.032	0.031
CV (%)	2.26	2.59	2.32	1.92

En la Figura 19 se muestran algunos de los voltamperogramas obtenidos para disoluciones de concentración creciente de piridoxina. Algunos de los voltamperogramas obtenidos, en particular los que corresponden a concentraciones en un intervalo que va de 10 a 70 μM , se usaron para construir una curva de calibración, y se muestran en la Figura 20. La ecuación de la regresión lineal es $i_{pa} = 0.0262 \pm 0.0014 C - 0.0787 \pm 0.0644$. El error típico es igual a 0.0297, con el cual se calcularon los límites de detección y cuantificación de acuerdo con Shrivastava y Gupta (2011), que se muestran en la Tabla 5.

Farag *et al.* (2019) reportaron un límite de detección para PN de 1.84 μM con un electrodo de carbono vítreo modificado con nafion, usando voltamperometría diferencial de pulsos. Kuzmanovic *et al.* (2016) utilizaron la misma técnica con un electrodo de diamante dopado con boro y obtuvieron un límite de detección igual a 3.76 μM . Esto demuestra que con el sencillo electrodo de pasta de carbono construido en este trabajo se pueden obtener límites de detección similares a los que se alcanzan con electrodos más complejos e indica que su desempeño es adecuado y podría mejorarse aún más si se emplean técnicas tales como voltamperometría de onda cuadrada, que permitiría incrementar la sensibilidad y, probablemente, disminuir los límites de detección y cuantificación.

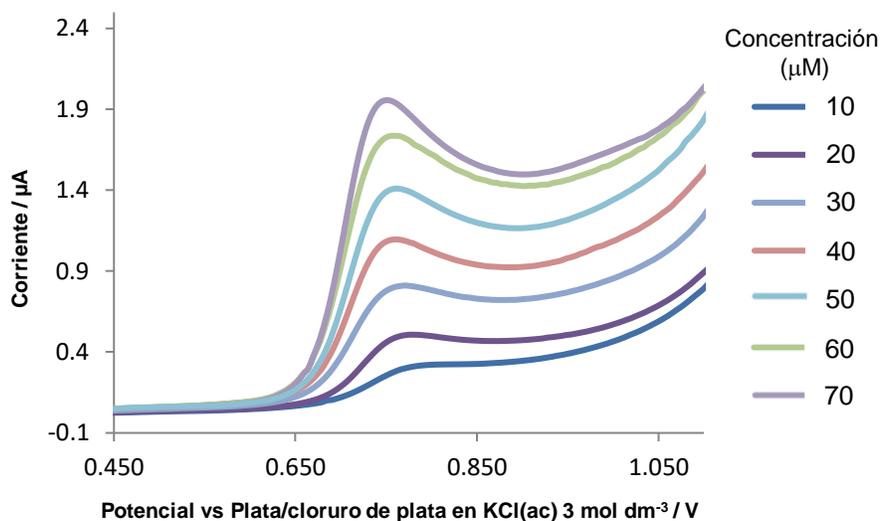


Figura 20. Voltamperogramas de barrido lineal para PN en concentraciones iguales a: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 μM , en DBF 0.1 M, pH = 7. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl}(\text{ac})$ 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = 0.3$ V, $E_f = 1.2$ V, $E_E = 5$ mV, $\nu = 100$ mV s^{-1} .

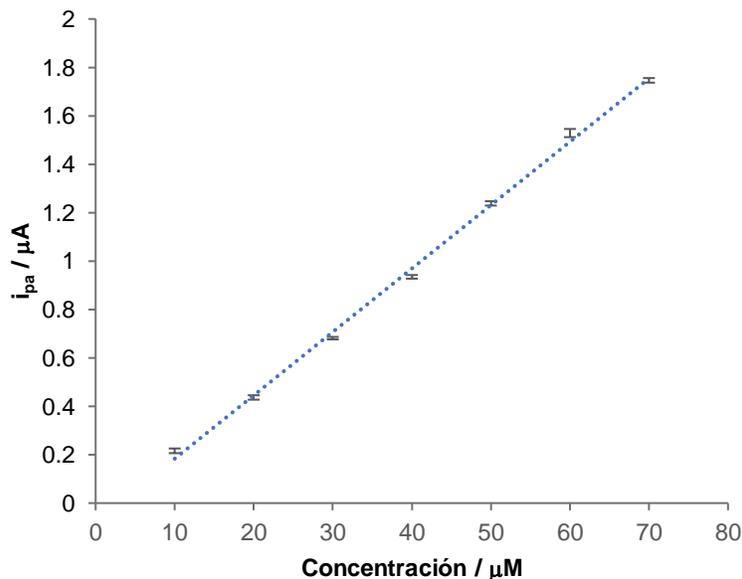


Figura 21. Curva de calibración obtenida para PN en concentraciones iguales a: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 μM , en DBF 0.1 M, pH = 7. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl}(\text{ac})$ 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = 0.3$ V, $E_f = 1.2$ V, $E_E = 5$ mV, $\nu = 100$ mV s^{-1} .

Tabla 5. Límites de detección y cuantificación para piridoxina con voltamperometría de barrido lineal, empleando el EPC, calculados según las ecuaciones del anexo (Shrivastava y Gupta, 2011).

Límite de detección	Límite de cuantificación
3.40 μM	11.32 μM

9.3 Estudio voltamperométrico de PG usando el EPC

Para esta sustancia, la respuesta a su oxidación sobre el electrodo de pasta de carbono mostró un comportamiento similar al observado con la piridoxina. Mientras más voltamperogramas se obtenían para un mismo valor de concentración, el valor de la corriente disminuía, incrementando el coeficiente de variación de la corriente de pico. Por ello, para los experimentos realizados se renovó la superficie del electrodo después de obtener cuatro réplicas.

En la Figura 22 se muestran voltamperogramas de barrido lineal para disoluciones de PG de diferente concentración, haciendo 5 mediciones repetidas en cada nivel de concentración antes de renovar la superficie del EPC. Estas medidas repetidas para cada concentración son prácticamente iguales entre ellas, lo que se muestra claramente en los datos seleccionados mostrados en la Tabla 6 (véase el coeficiente de variación calculada para cada caso, menor que el 2.3 %).

En la Figura 23, se presentan los voltamperogramas de barrido lineal para disoluciones de PG de concentración creciente, observando que la corriente de pico incrementa proporcionalmente con la concentración. En la Figura 24, se muestra la curva de calibración en que se obtuvo en un intervalo de concentración de 10 a 80 μM . La ecuación de regresión lineal obtenida es $i_{pa} = 0.0623 \pm 0.0050 C + 0.4427 \pm 0.2543$, siendo el error típico igual a 0.1334 y el valor de r^2 de 0.994. Los valores de límite de detección y cuantificación se muestran en la Tabla 7.

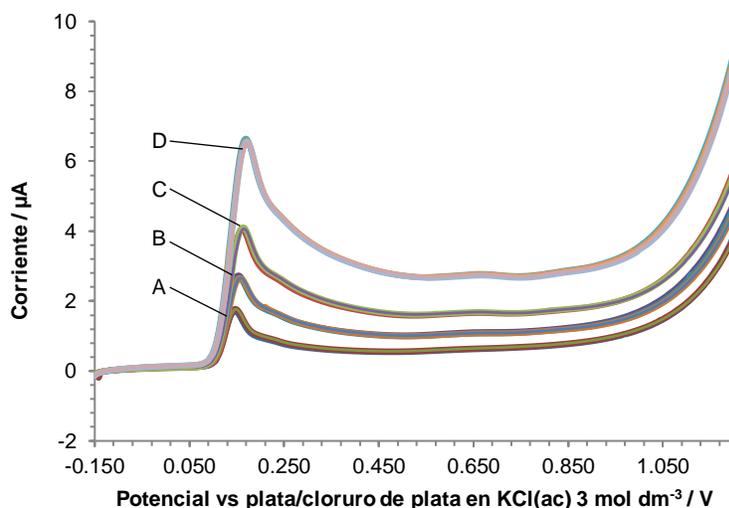


Figura 22. Voltamperogramas de barrido lineal para PG por quintuplicado en concentraciones iguales a 11 (A), 22 (B), 44 (C) y 112 (D) μM renovando la superficie del electrodo entre niveles de concentración. DBF 0.1 M, pH = 7. ER de plata-cloruro de plata en $\text{KCl}(\text{ac})$ 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.15$ V, $E_f = 1.2$ V, $E_E = 0.005$ V, $v = 0.100$ V s^{-1} .

Tabla 6. Valores de 5 mediciones repetidas de i_{pa} para PG en diferentes concentraciones. Antes de cambiar el nivel de concentración se renovó la superficie del electrodo Valores de i_{pa} .

Réplica	Concentración (μM)			
	11	22	44	112
1 (μA)	1.35	2.56	3.89	6.37
2 (μA)	1.39	2.47	3.90	6.36
3 (μA)	1.40	2.50	3.87	6.34
4 (μA)	1.33	2.44	4.06	6.31
5 (μA)	1.33	2.51	3.95	6.23
\bar{X}	1.36	2.50	3.94	6.32
s	0.03	0.05	0.08	0.10
CV (%)	2.3	1.8	2.0	0.9

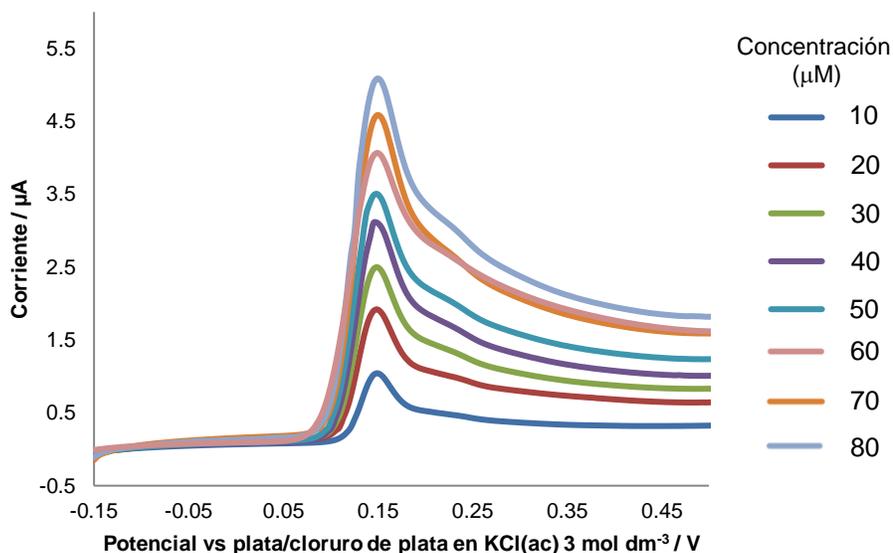


Figura 23. Voltamperogramas de barrido lineal para PG en concentraciones iguales a : 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 μM , en DBF 0.1 M, $\text{pH} = 7$. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl}(\text{ac})$ 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.15$ V, $E_f = 1.2$ V, $E_E = 0.005$ V, $\nu = 0.100$ V s^{-1} .

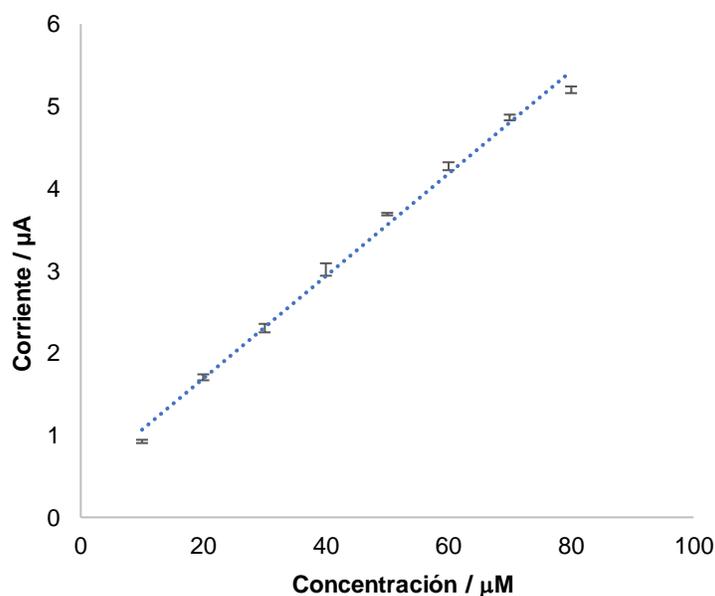


Figura 24. Curva de calibración de PG en concentraciones iguales a: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 μM , en DBF 0.1 M, $\text{pH} = 7$. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl}(\text{ac})$ 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.15$ V, $E_f = 1.2$ V, $E_E = 5$ mV, $\nu = 100$ mV s^{-1} .

Tabla 7. Límites de detección y cuantificación para PG con voltamperometría de barrido lineal, empleando el EPC, calculados según las ecuaciones del anexo (Shrivastava y Gupta, 2011).

Límite de detección	Límite de cuantificación
545 nM	1.82 μ M

Agüí y colaboradores (1996) reportaron un límite de detección para PG de 400 nM, utilizando un microelectrodo de fibra de carbono modificado con un polímero de 3-metil tiofeno y voltamperometría diferencial de pulsos. Por otra parte, Cyriac *et al.* (2016) obtuvieron un límite de detección de 190 nM para esta sustancia, empleando un electrodo de carbono vítreo modificado con nanopartículas de oro y voltamperometría diferencial de pulsos. Por lo tanto, el EPC construido en este trabajo presenta un buen desempeño, permitiendo realizar cuantificaciones en bajas concentraciones de PG en medio acuoso.

9.4 Estudio voltamperométrico del AA usando el EPC

Esta sustancia se estudió inicialmente en el mismo electrolito soporte que los otros analitos, en buffer fosfatos con un valor de pH igual 7; sin embargo, con la finalidad de desplazar el potencial de pico anódico hacia valores mayores, se decidió disminuir el valor de pH del medio a 4.5. En esta condición, el potencial de pico anódico aparece en 230 mV vs plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm⁻³, como se muestra en la Figura 25, en la que se tienen voltamperogramas obtenidos para disoluciones de AA de diferente concentración.

Se utilizó el mismo método de renovación de superficie del EPC que en el caso del PG. Pues las réplicas de los voltamperogramas para una misma concentración son prácticamente iguales. Los coeficientes de variación de la corriente de pico para diferentes niveles de concentración se presentan en la Tabla 8, presentando valores menores al 1.9 %.

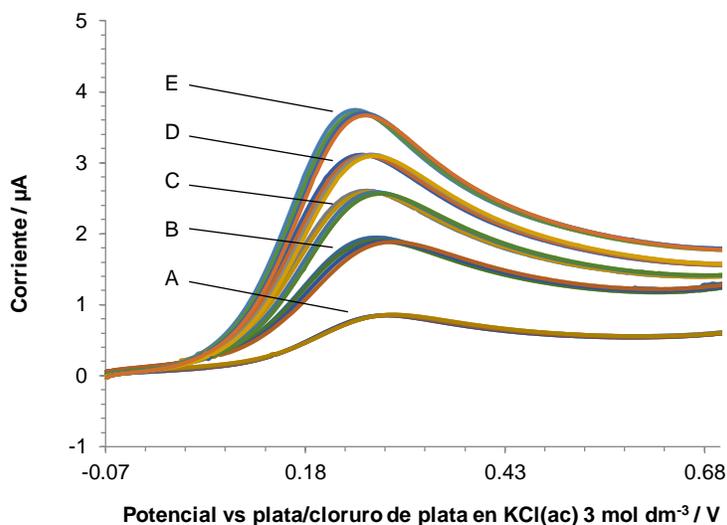


Figura 25. Voltamperogramas de barrido lineal para AA en concentraciones iguales a 40 (A), 100 (B), 130 (C), 160 (D) y 190 (E) μM sin renovar la superficie del ECP entre cada concentración (3 réplicas), en DBF 0.1 M, pH = 4.5. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl}(\text{ac})$ 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.08$ V, $E_f = 0.85$ V, $E_E = 0.005$ V, $\nu = 0.100$ V s^{-1} .

Tabla 8. Valores de i_{pa} para AA por cuadruplicado en diferentes concentraciones, renovando la superficie del EPC cuando se cambió el nivel de concentración.

Réplica	Concentración (μM)				
	40	100	130	160	190
1 (μA)	0.586	1.418	2.170	2.734	3.334
2 (μA)	0.579	1.436	2.204	2.739	3.291
3 (μA)	0.595	1.429	2.183	2.746	3.288
4 (μA)	0.590	1.479	2.229	2.723	3.245
\bar{X}	0.588	1.441	2.197	2.736	3.290
S	0.007	0.027	0.026	0.010	0.036
CV (%)	1.12	1.85	1.17	0.35	1.11

En las Figuras 26 y 27, se muestran los voltamperogramas de barrido lineal para disoluciones de AA de concentración creciente. La corriente de pico incrementa proporcionalmente con la concentración. En las Figuras 28 y 29, se tienen las curvas de calibración en los mismos intervalos de concentración que los voltamperogramas.

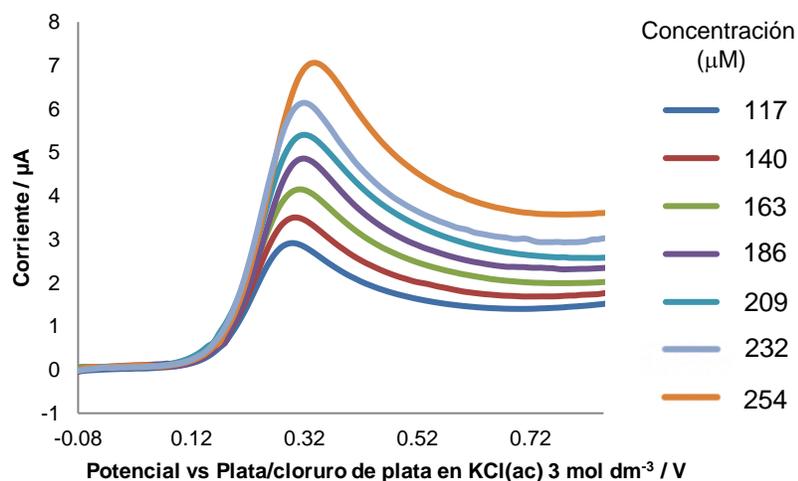


Figura 26. Voltamperogramas de barrido lineal para curva de calibración de AA en concentraciones iguales a 117, 140, 163, 186, 209, 232 y 254 μM , en DBF 0.1 M, pH = 4.5. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl}(\text{ac})$ 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.08$ V, $E_f = 0.85$ V, $E_E = 0.005$ V, $v = 0.100$ V s^{-1} .

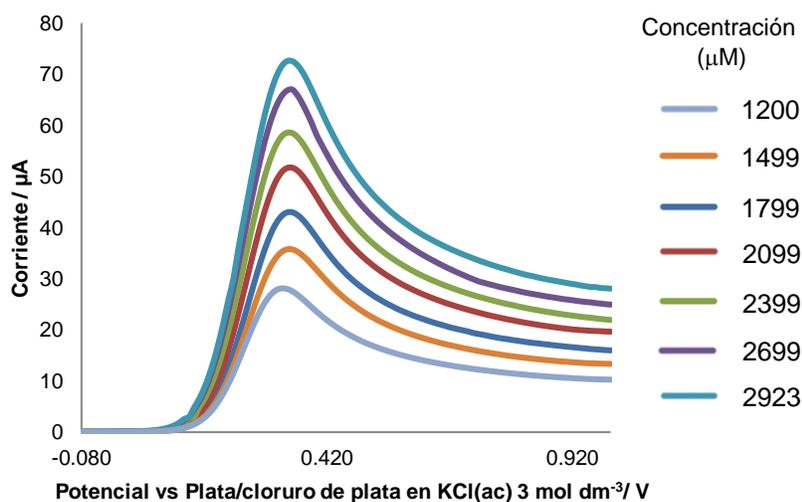


Figura 27. Voltamperogramas de barrido lineal para curva de calibración de AA en concentraciones iguales a : 1200, 1499, 1799, 2099, 2399, 2699 y 2923 μM , en DBF 0.1 M, pH = 4.5. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl}(\text{ac})$ 3 mol dm^{-3} y CE de grafito. $E_0 = -0.08$ V, $E_f = 0.85$ V, $E_E = 0.005$ V, $v = 0.100$ V s^{-1} .

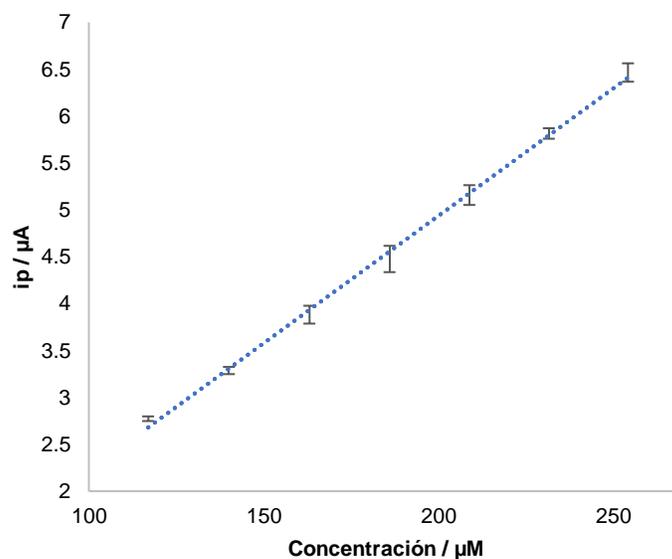


Figura 28. Curva de calibración de ácido AA en concentraciones iguales a 117, 140, 163, 186, 209, 232 y 254 μM , en DBF 0.1 M, pH = 4.5. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl(ac)} 3 \text{ mol dm}^{-3}$ y CE de grafito. $E_0 = -0.08 \text{ V}$, $E_f = 0.85 \text{ V}$, $E_E = 0.005 \text{ V}$, $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$.

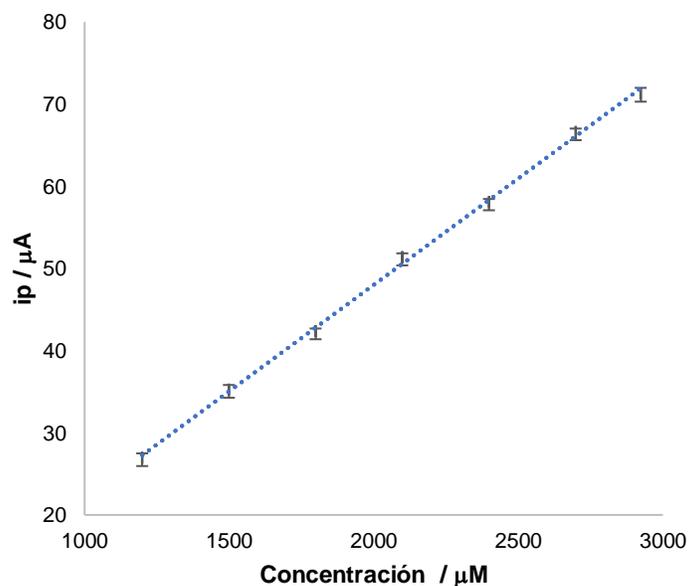


Figura 29. Curva de calibración de AA en concentraciones iguales a 1200, 1499, 1799, 2099, 2399, 2699 y 2923 μM , en DBF 0.1 M, pH = 4.5. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl(ac)} 3 \text{ mol dm}^{-3}$ y CE de grafito. $E_0 = -0.03 \text{ V}$, $E_f = 0.85 \text{ V}$, $E_E = 0.005 \text{ V}$, $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$.

La ecuación de regresión lineal para el intervalo de concentraciones de 117 a 254 μM es $i_{pa} = 0.0272 \pm 0.0014 C - 0.4973 \pm 0.2679$, siendo el error típico igual a 0.0659 y $r^2 = 0.998$. Con esto, se calcularon los valores de límite de detección y cuantificación, que se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Límites de detección y cuantificación para AA con voltamperometría de barrido lineal, empleando el EPC, calculados según las ecuaciones del anexo (Shrivastava y Gupta, 2011), mostradas en la sección 11 del presente escrito.

Límite de detección	Límite de cuantificación
7.27 μM	24.23 μM

El límite de detección es del mismo orden de magnitud de aquellos encontrados en la literatura. Por ejemplo, Vedenyapina, Kazakova y Skundin (2019) reportaron un límite de detección igual a 1.87 μM , utilizando un electrodo de diamante dopado con boro con voltamperometría de onda cuadrada. PISOCHI *et al.* (2011) obtuvieron un límite de detección de 75 μM con un electrodo de platino y otro de 20 μM con un electrodo de pasta de carbono, mientras que los límites de cuantificación resultantes con los mismos electrodos fueron 250 y 18 μM , respectivamente, empleando voltamperometría diferencial de pulsos. De acuerdo con esto, el EPC construido en este trabajo es eficiente para determinar AA en bajas concentraciones.

La ecuación de regresión lineal para la curva de calibración de la Figura 29, cuyo intervalo de concentraciones es de 1200 a 2923 μM es $i_{pa} = 0.026 \pm 0.001 C - 3.8 \pm 2.1$, siendo el error típico igual a 0.5813 y $r^2 = 0.998$. Al ser un intervalo de concentraciones más amplio, se eligió para realizar la cuantificación del analito en tabletas comerciales (sección 9.2).

9.5. Aplicación del EPC para la determinación de AA en un producto comercial (Rosavit C)

Antes de tratar de realizar una determinación de AA en la muestra de Rosavit C, se realizó un ensayo para determinar si los otros componentes de la formulación, como el extracto de rosa canina o residuos del excipiente generaban alguna clase de interferencia. En la Figura 30 se muestran los voltamperogramas obtenidos para una disolución de la muestra de Rosavit C, de acuerdo con la cantidad de la muestra utilizada y la magnitud de la corriente de pico esperada según las curvas de calibración obtenidas previamente. De estos resultados se concluye que no hay interferencia alguna del resto de los componentes de la formulación en la señal debida la electrooxidación de la vitamina C.

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la cuantificación de AA en la muestra de Rosavit C, de acuerdo con lo mencionado en la sección 8.4 (numeral 48 de esta lista). Tras el análisis, se encontró que la muestra contiene en promedio 501.4 (promedio) \pm 0.2 (desviación estándar de una determinación por triplicado) mg de AA por tableta. El fabricante indica en el marbete que el contenido de la sustancia por tableta es igual a 500 mg. Al realizar una prueba *t* utilizando la ecuación del anexo (Miller y Miller, 2002), usando como referencia este último valor y la desviación estándar del resultado experimental de 0.2, se concluye que hay diferencia significativa ($P = 0.05$, $n = 3$). Sin embargo, cabe señalar que utilizar como referencia el valor indicado por el fabricante puede ser no adecuado, puesto que la cantidad real de AA presente en la muestra pudiese ser más cercana a la determinada por el método electroquímico, lo cual se podría corroborar al cuantificar la sustancia por un método oficial. A pesar de esto, el resultado indica que el fabricante cumple con la especificación de la Farmacopea Mexicana, la cual señala que la cantidad de AA no deber ser mayor al 160 % del principio activo indicado en el marbete.

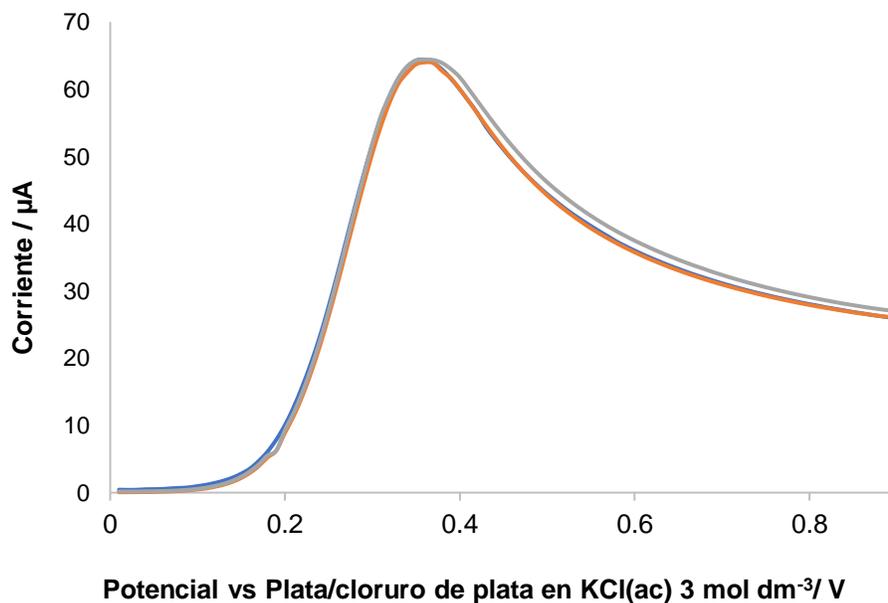


Figura 30. Voltamperogramas obtenido para una muestra de Rosavit C (3 réplicas). DBF 0.1 M. ER de plata/cloruro de plata en KCl(ac) 3 mol dm⁻³ y CE de grafito. $E_0 = 0$ V, $E_f = 0.85$ V, $E_E = 0.005$ V, $v = 0.100$ V s⁻¹.

Tabla 10. Resultado experimental para la determinación de AA en la muestra de Rosavit C por VL utilizando el EPC.

Ecuación de la recta de calibración (n = 7)	$i_{pa} = 0.0026 \pm 0.0013 C - 3.59 \pm 2.72$
\bar{X} de la señal de la muestra	61.98 μ A \pm 0.02
Resultado	501.4 \pm 0.2 mg / tableta
Cantidad indicada por el fabricante	500 mg / tableta

9.6 Aplicación del EPC a la cuantificación de PN en muestras comerciales y comparación de los resultados voltamperométricos con los de un método de análisis cromatográfico no validado, basado en el recomendado por la USP

Una vez que se sabe que el EPC construido en este trabajo permite observar las señales de electrooxidación de tres analitos de interés farmacéutico o alimenticio, se decidió poner a prueba el análisis voltamperométrico de PN en una muestra farmacéutica, comparándolo contra un método desarrollado (que por motivos de la pandemia ya no nos fue posible validar) en nuestros laboratorios con el apoyo del M. en C. Juan Rolando Vázquez y del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM, que permitió el uso de los equipos cromatográficos con que se cuenta en el laboratorio 3E del Edificio A de la misma. Para desarrollar este método se partió de las indicaciones que da la USP, que recomienda llevar a cabo la determinación de la piridoxina usando 1-hexanosulfonato de sodio como un reactivo de par iónico, sustituyendo este compuesto (que no teníamos disponible en el laboratorio) por dodecil sulfato de sodio, como se señaló en la sección 8.2.

En la Figura 31 se muestra un cromatograma obtenido para una disolución de clorhidrato de piridoxina en una concentración igual a 0.34 mM en las condiciones empleadas en este trabajo. A pesar de que estas no son las mismas que las de la farmacopea mexicana o la USP, en donde se utiliza hexanosulfonato de sodio como reactivo de par iónico, la forma del pico cromatográfico y su tiempo de retención son muy similares (Scienc Technologies, 2002-2018). El coleo de la señal cromatográfica también se ha observado cuando se usó dodecilsulfato de sodio con acetonitrilo, ácido acético y tetrahidrofurano como fase móvil (Al Jallad *et al.*, 1999), y cuando se utilizó ácido heptanosulfónico, trietilamina y metanol (Amidzic *et al.*, 2005). De acuerdo con esto, es muy difícil reducir el factor de coleo de la piridoxina, incluso cuando se utiliza un reactivo de par iónico.

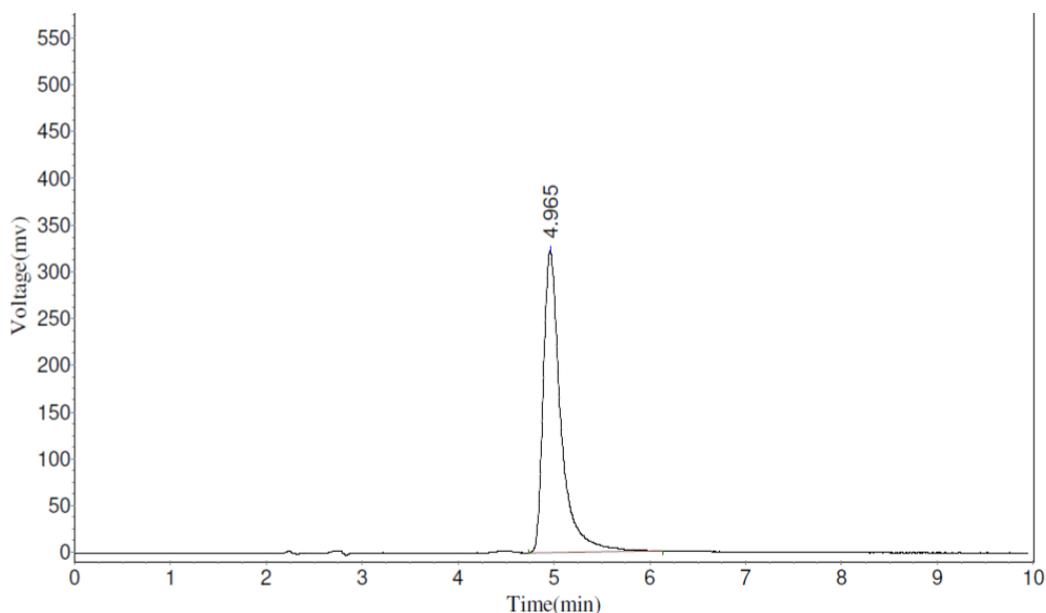


Figura 31. Cromatograma obtenido para piridoxina en concentración igual a 0.34 mM. Fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.8 mL min^{-1} .

Debido a los objetivos particulares de este trabajo, se decidió continuar con las condiciones de trabajo cromatográficas ya descritas y no se optimizaron más allá para reducir el factor de coelución indicado por el software, con un valor de 1.7, ya que como se mostrará en los párrafos siguientes, es un parámetro que no afecta en las determinaciones realizadas.

9.6.1 Evaluación del tiempo de retención

Para estimar la reproducibilidad del método cromatográfico, se registraron los tiempos de retención de piridoxina por sextuplicado en tres días diferentes. En la Tabla 11 se muestran los resultados para este experimento. Se observa que el tiempo de retención fue prácticamente igual para los tres días, con coeficientes de variación menores al 0.5 %.

Tabla 11. Tiempos de retención para piridoxina en concentración igual a 300 μM por sextuplicado, en tres días diferentes. fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.8 mL min^{-1} .

Inyección	Día 1 / tr (min)	Día 2 / tr (min)	Día 3 / tr (min)
1	4.998	4.957	4.965
2	4.998	4.957	4.965
3	4.998	4.965	4.940
4	4.998	4.957	4.948
5	4.990	4.948	4.965
6	4.990	4.957	4.998
\bar{X}	4.995	4.957	4.964
S	0.004	0.005	0.020
CV (%)	0.083	0.109	0.402

9.6.2 Linealidad

En la Figura 32 se muestra la curva de calibración por estándar externo para piridoxina, en un intervalo de 0.097 a 0.438 mM. La ecuación de la regresión lineal es $A = 12172239 \pm 297832 C - 12845 \pm 86347$, con un valor de $r^2 = 0.9994$ y un error típico de 38406.9.

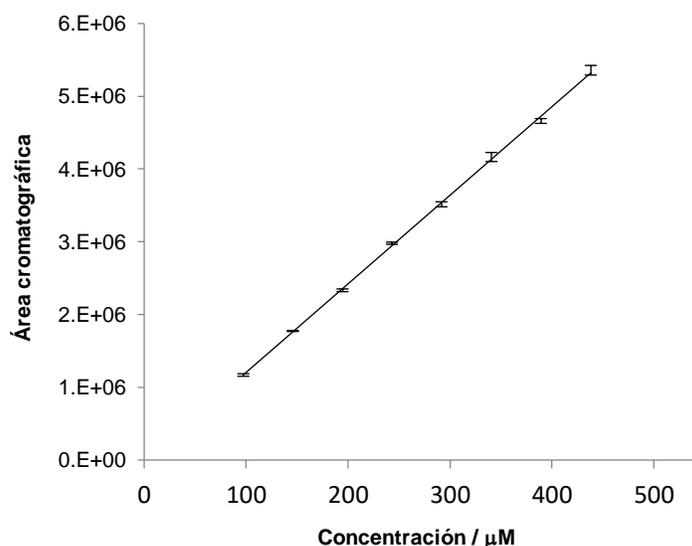


Figura 32. Curva de calibración obtenida por CLAR para piridoxina en concentraciones iguales a: 97.3, 145.9, 194.6, 243.2, 291.8, 340.5, 389.1 y 437.7 μM , en agua. 95:5 de fase acuosa/orgánica, flujo de 0.8 mL min^{-1} .

Los valores del límite de detección y cuantificación se muestran en la Tabla 12. Como se observa, tanto el límite de detección como el de cuantificación son del mismo orden que aquellos obtenidos con voltamperometría y el EPC construido en este trabajo, los cuales se presentaron en la Tabla 4.

Tabla 12. Límites de detección y cuantificación para piridoxina en el método CLAR calculados según las ecuaciones del anexo (Shrivastava y Gupta, 2011).

Límite de detección	Límite de cuantificación
9.47 μM	31.55 μM

Al realizar la prueba t para la ordenada al origen, se concluye que ésta es estadísticamente igual a 0, por lo que es viable realizar calibraciones por estándar externo con un solo punto, es decir, calibraciones por factor de respuesta. Asimismo, al realizar este tipo de calibración, el tiempo requerido para llevar a cabo el análisis de piridoxina en una muestra determinada disminuye drásticamente, ya que sólo se requiere utilizar una disolución estándar y la muestra.

Así, para calcular el factor de respuesta Fr de piridoxina con una disolución estándar, esta se debe inyectar un número n de veces en el cromatógrafo y al obtener el área cromatográfica se emplea la ecuación:

$$Fr = \frac{\text{Área cromatográfica}}{\text{Concentración del estándar}}$$

Obteniendo así un factor de respuesta promedio con su correspondiente intervalo de confianza o coeficiente de variación. En el caso de las concentraciones del estándar utilizadas, siempre se procuró que fueran cercanas a la mitad del intervalo de concentraciones utilizado, es decir, 0.3 mM.

Una vez que se prepara la muestra, su concentración en la disolución que se inyecta en el cromatógrafo se calcula utilizando las áreas de las señales y el factor de respuesta:

$$\text{Concentración del estándar} = \frac{\text{Área cromatográfica}}{Fr}$$

Y conociendo el procedimiento realizado para preparar la muestra, se calcula la concentración de piridoxina en la muestra original.

9.6.3 Variación de flujo

Para verificar si una ligera variación de flujo afectaba el desempeño cromatográfico del método implementado, se evaluó el porcentaje de recobro de una disolución estándar en tres experimentos en los cuales se varió el flujo, con valores de 0.7, 0.8 y 0.9 mL min⁻¹. Cada experimento se realizó en tres días diferentes.

En las Tablas 13, 14 y 15 se muestran los resultados del porcentaje de recobro para los valores de flujo iguales a 0.7, 0.8 y 0.9 mL min⁻¹, respectivamente. Asimismo, en las Figuras 33, 34 y 35 se presentan los cromatogramas obtenidos para piridoxina en concentración aproximada de 300 µM, en los respectivos flujos ya mencionados.

Como era de esperarse, el tiempo de retención promedio disminuyó conforme el valor de flujo incrementaba, existiendo una diferencia de tiempo de retención igual a 1.4 minutos entre el flujo de 0.9 y el de 0.7 mL min⁻¹. Sin embargo, se deduce que para muestras relativamente sencillas, como las farmacéuticas, es viable utilizar cualquiera de estos tres valores de flujo, en especial en aquellas donde la vitamina B₆ es el único principio activo.

En cuanto a los porcentajes de recobro, para el flujo de 0.7 mL min⁻¹ se obtuvo un valor de 103.3 %, para el de 0.8 mL min⁻¹ uno de 103.4 %, y para el flujo de 0.9 mL min⁻¹ se obtuvo 100.6 %. Estos resultados demuestran que la variación de flujo no tuvo efecto en la precisión del método. Además, los coeficientes de variación para las áreas cromatográficas y los tiempos de retención fueron menores al 3.1 %, tanto en las disoluciones estándar de trabajo como en los estándares de recobro.

Tabla 13. Porcentaje de recobro de clorhidrato de piridoxina empleando un flujo de 0.7 mL min⁻¹.

Estándares	Área \bar{X}	CV (%)	tr \bar{X} (min)	CV (%)	Recobro (%)
Trabajo (300.6 μ M)	4370988.6	3.1	5.601	1.1	103.3
Recobro (296.7 μ M)	4457843	0.8	5.521	0.2	

Tabla 14. Porcentaje de recobro de clorhidrato de piridoxina empleando un flujo de 0.8 mL min⁻¹.

Estándares	Área \bar{X}	CV (%)	tr \bar{X} (min)	CV (%)	Recobro (%)
Trabajo (291.8 μ M)	3742215.1	2.5	4.877	0.3	103.4
Recobro (292.8 μ M)	38805333.1	1.7	4.882	0.6	

Tabla 15. Porcentaje de recobro de clorhidrato de piridoxina empleando un flujo de 0.9 mL min⁻¹.

Estándares	Área \bar{X}	CV (%)	tr \bar{X} (min)	CV (%)	Recobro (%)
Trabajo (293.0 μ M)	3368442.9	0.6	4.206	0.1	100.6
Recobro (307.9 μ M)	3560339.3	3.1	4.209	0.3	

Por otra parte, se observa una aparente correlación entre el área promedio cromatográfica y el flujo, puesto que se obtuvieron valores mayores de área para el flujo de 0.7 mL min⁻¹. Esto podría ser de importancia en cuanto a la sensibilidad del método se refiere, por ejemplo, en una determinación de piridoxina a niveles traza. Es por esto que para los experimentos subsecuentes se utilizó el flujo intermedio (0.8 mL min⁻¹).

En este trabajo se decidió calcular el porcentaje de recobro usando estándares en lugar de muestras fortificadas, como comúnmente se realiza en la literatura. La razón de esto fue para eliminar la variable de la preparación de la muestra y una posible interferencia de la matriz. Con ello se demostró que el método cromatográfico implementado tiene precisión, reproducibilidad y es eficiente para los fines de este trabajo. Como se verá más adelante, el método funcionó para analizar una muestra farmacéutica adecuadamente, para compararse con el método electroquímico de principal interés.

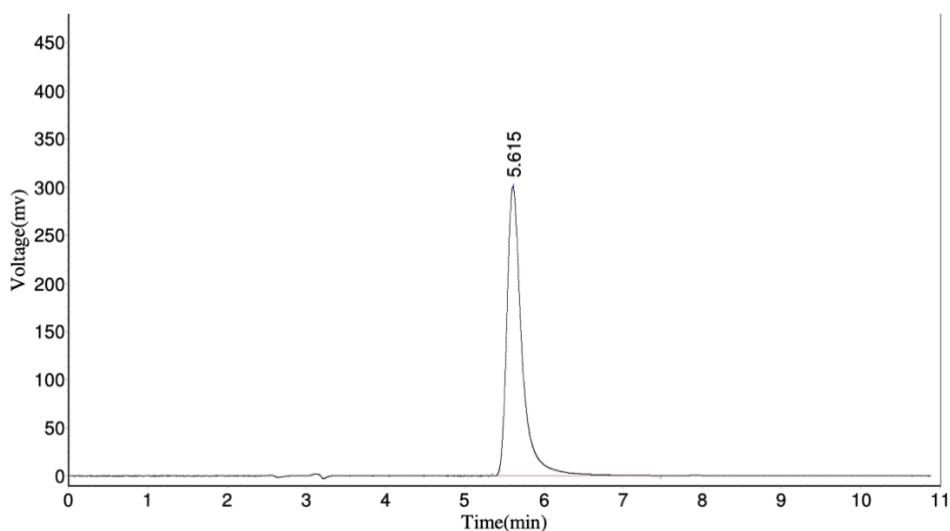


Figura 33. Cromatograma obtenido para piridoxina en concentración igual a 300.6 μM . Fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.7 mL min^{-1} .

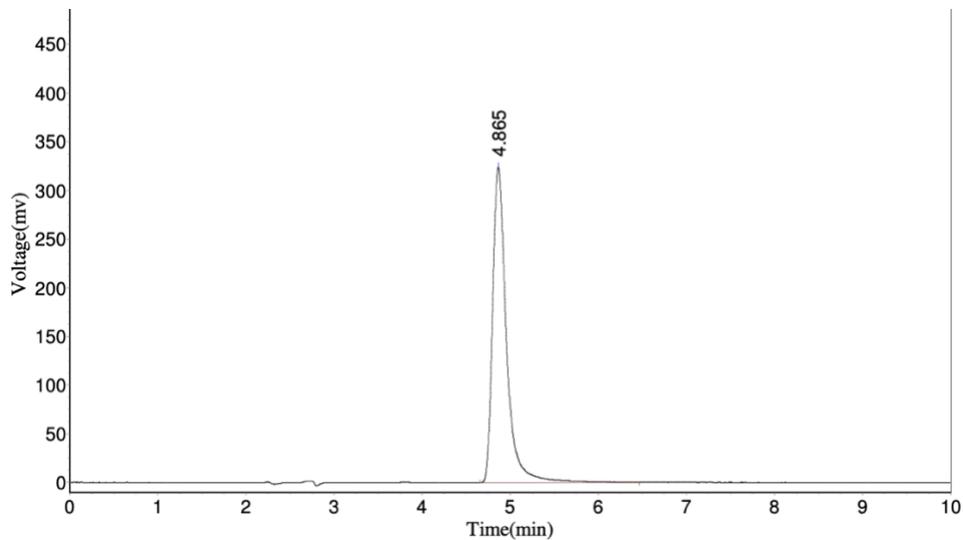


Figura 34. Cromatograma obtenido para piridoxina en concentración igual a 291.8 μM . Fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.8 mL min^{-1} .

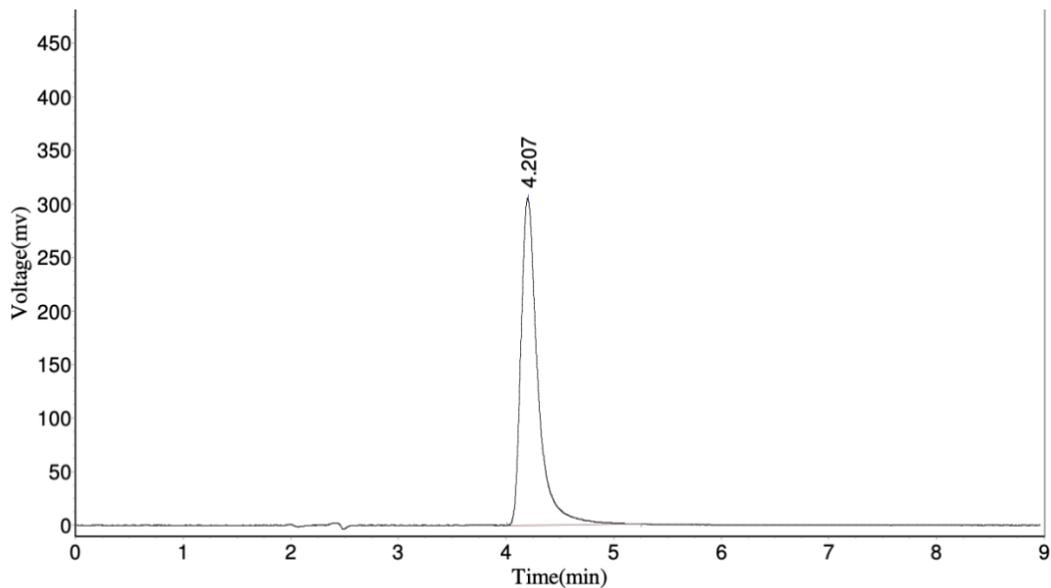


Figura 35. Cromatograma obtenido para piridoxina en concentración igual a 293 μM . Fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.9 mL min^{-1} .

Debido a la presencia de meclizina en la muestra farmacéutica analizada, se realizó un ensayo para determinar si dicha sustancia actúa como interferente en los dos métodos. En las Figuras 36 y 37 se tiene el cromatograma y el voltamperograma, respectivamente, de la muestra tratada de acuerdo con las condiciones particulares de cada método. Se observa únicamente la señal correspondiente a la piridoxina en ambos casos; además, la magnitud tanto de la corriente de pico como del área cromatográfica se correlacionan con la concentración esperada de piridoxina, de donde se desprende que la meclizina no generó una señal que se estuviera traslapando con la producida por la piridoxina en ninguno de los dos métodos de análisis usados.

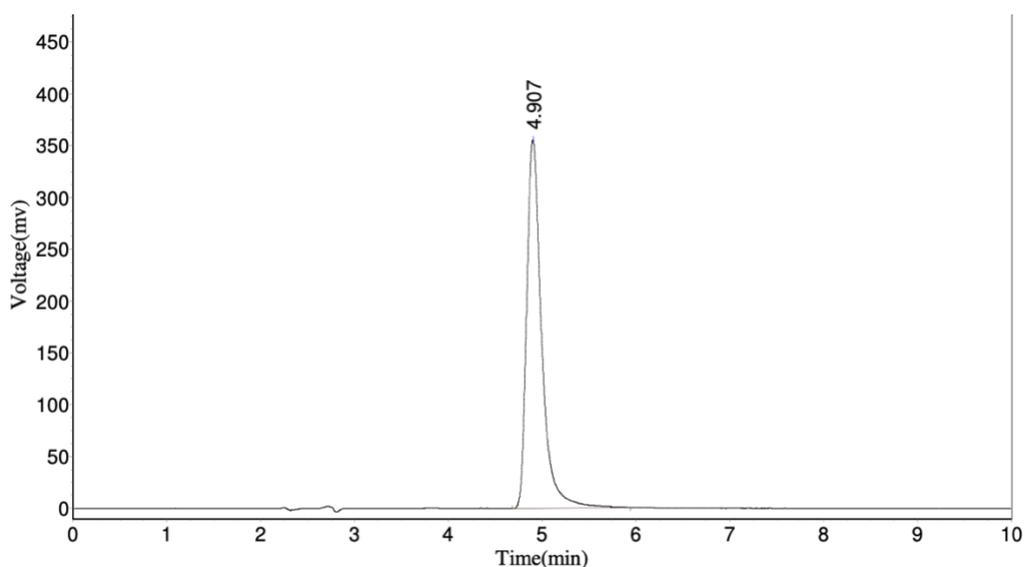


Figura 36. Cromatograma obtenido para una muestra de Meclison. Fase móvil compuesta de una proporción 95:5 de fase acuosa/orgánica, con un flujo de 0.8 mL min⁻¹.

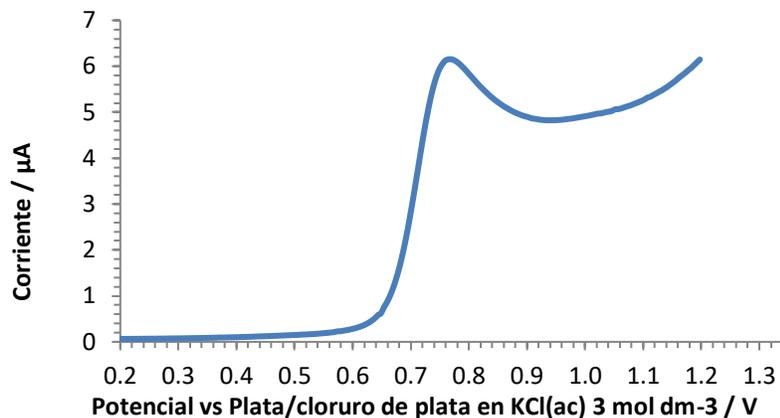


Figura 37. Voltamperograma obtenido para una muestra de Meclison. DBF 0.1 M. ER de plata/cloruro de plata en $\text{KCl}(\text{ac}) 3 \text{ mol dm}^{-3}$ y CE de grafito. $E_0 = 0.3 \text{ V}$, $E_f = 1.2 \text{ V}$, $E_E = 5 \text{ mV}$, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

En la Tabla 16 se muestran los resultados de la cuantificación de clorhidrato de piridoxina por CLAR, en el cual se obtuvo un resultado de $52.4 \pm 0.45 \text{ mg/tableta}$. En la Tabla 17 se tiene la determinación de la misma sustancia por voltamperometría de barrido lineal, utilizando el EPC, en donde el resultado fue de $51.18 \pm 1.10 \text{ mg/tableta}$. Si bien la desviación estándar es menor utilizando cromatografía, al usar el estadístico F , conforme se indica en el anexo, se concluye que no hay diferencia significativa en el contraste de las varianzas ($F < F_{2,2}$, $P = 0.05$). Además, de acuerdo con la Farmacopea Mexicana, las tabletas de clorhidrato de piridoxina no deben contener menos del 95 % y no más del 115 % de la sustancia indicada en el marbete, por lo cual se sabe por ambos métodos que el fabricante cumple con esta especificación.

Tabla 16. Resultados experimentales para la determinación de piridoxina en la muestra de Meclison por el método CLAR.

Disoluciones	Área \bar{X}	CV (%)	tr \bar{X} (min)	CV (%)	Resultado
Estándar (291.8 μM)	3742215.1	2.5	4.877	0.3	52.4 \pm 0.45 mg/tableta
Muestra	3982455.8	0.9	4.901	0.4	

Tabla 17. Resultados experimentales para la determinación de piridoxina en la muestra de Meclison por el método electroquímico usando el EPC.

Ecuación de la recta de calibración (n = 7)	$i_{pa} = 0.080 \pm 0.007 C + 0.66 \pm 0.40$
\bar{X} de la señal de la muestra	5.10 μ A \pm 0.11
Resultado	51.18 \pm 1.10 mg/tableta

De acuerdo con la comparación realizada, el electrodo de pasta de carbono presenta un buen desempeño para realizar determinaciones electroquímicas en muestras farmacéuticas, ya que los datos de la cuantificación en la muestra de Meclison son equiparables. Lo anterior se demuestra al realizar la comparación de dos medias experimentales cuyas desviaciones estándar, expresadas en los resultados de las Tablas 16 y 17, son significativamente iguales. El valor calculado del estadístico t es igual a 1.78, y es menor que el valor crítico de t_4 que es 2.78 ($P = 0.05$). Las ecuaciones empleadas para este contraste se muestran en el anexo, tomadas de Miller y Miller (2002). Además, los valores previamente mostrados de los límites de detección y cuantificación para el método electroquímico y el de CLAR son del mismo orden de magnitud, siendo menores los del primero.

En la Tabla 18 se presenta una breve comparación de las características principales de cada técnica, tales como costo de los equipos y tiempo de análisis empleados en este experimento. De acuerdo con ésta, utilizar la técnica electroquímica para desarrollar un método de análisis en el que se utilice un EPC de construcción sencilla puede tener múltiples ventajas frente aquellos que emplean la técnica cromatográfica, ya que utilizar instrumentación de bajo costo y equipos menos complejos facilitan el análisis de ciertas sustancias.

Tabla 18. Comparación de las principales características de las técnicas utilizadas para la determinación de piridoxina en la muestra de Meclison.

Técnica	Voltamperometría	CLAR
Costo aproximado del equipo	Potenciostato: \$ 70 000	Comatógrafo marca Thermo Scientific, modelo Uitimate 3000: \$ 1 000 000
Volumen de reactivos utilizado	Agua para electrolito soporte y estándares: 150 mL Agua para muestra: 80 mL	Agua para fase móvil: 475 mL Metanol para fase móvil: 25 mL Agua para reactivo de par iónico: 20 mL Agua para estándar: 100 mL Agua para muestra: 100 mL
Tiempo de preparación o acondicionamiento	Electrodo de pasta de carbono: 10 min	Columna: 60 min
Tiempo de análisis	Curva de calibración y muestra: 25 min	Un estándar y muestra: 90 min
Tiempo preparación muestra	45 min	45 min

El método cromatográfico implementado en este trabajo fungió como una referencia para contrastar los resultados obtenidos con voltamperometría y el electrodo de pasta de carbono y, conforme lo obtenido para la muestra farmacéutica analizada, puede decirse que, en este caso, fue más conveniente desde diferentes aspectos realizar la determinación con la técnica electroquímica. Ya se han realizado otras comparaciones entre técnicas electroquímicas y cromatográficas (Erk y Biryol, 2003), llegando a la misma conclusión. Sin embargo, la cromatografía es de amplio uso en la investigación y, sobre todo, en la industria debido a su especificidad y capacidad de discriminación por el hecho de ser una técnica de separación, lo cual podría ser una de las razones por las que es la técnica más usada con fines de cuantificación en los rubros ya mencionados. Es por todo lo anterior que un profesional de la química debe poseer los conocimientos pertinentes para evaluar y proponer las técnicas y metodologías más convenientes según las necesidades y recursos disponibles, en el ámbito donde se desarrolle.

10. Conclusiones

- A través del estudio voltamperométrico realizado para ácido ascórbico, piridoxina y galato de propilo, se puede decir que las metodologías de análisis que puedan desarrollarse para estudio y cuantificación de dichas sustancias, y que impliquen el uso del electrodo de pasta de carbono, son una alternativa sencilla, eficaz, de bajo costo y fácil empleo.
- El electrodo de pasta de carbono es eficiente como instrumento de trabajo y de menor costo frente a otros materiales como el oro o platino.
- Se establecieron bases metodológicas para la cuantificación de AA y piridoxina en muestras de carácter farmacéutico y alimentario, usando voltamperometría de barrido lineal y el electrodo de pasta de carbono.
- Se comparó el resultado obtenido con el electrodo de pasta de carbono frente al obtenido con el método cromatográfico (basado en el oficial de la farmacopea), en la cuantificación de piridoxina en muestras farmacéuticas, concluyéndose que estadísticamente son iguales.

11. Anexo

11.1 Cálculo de los errores en la pendiente y en la ordenada al origen de las curvas de calibración

En primer lugar se calcula el estadístico $S_{\frac{y}{x}}$, que estima los errores aleatorios en la dirección y:

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Donde \hat{y}_i son los puntos sobre la recta de regresión calculada previamente con el método de los mínimos cuadrados, correspondientes a los valores individuales de x , es decir, los valores de y ajustados.

Se procede entonces a calcular la desviación estándar de la pendiente m :

$$S_m = \frac{S_{\frac{y}{x}}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde \bar{x} es el promedio de los valores x_i utilizados para calcular la recta de regresión.

La desviación estándar de la ordenada en el origen b es:

$$S_b = S_{\frac{y}{x}} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

11.2 Cálculo de los límites de detección y cuantificación

Para calcular ambos límites, se utilizó el estadístico $S_{\frac{y}{x}}$. El límite de detección se estimó de acuerdo con:

$$LD = \frac{3 S_{\frac{y}{x}}}{m}$$

Donde m es la pendiente de la recta de regresión. De manera muy similar, el límite de cuantificación se calculó según:

$$LC = \frac{10 S_{\frac{y}{x}}}{m}$$

11.3 Cálculo del error aleatorio de la concentración en la curva de calibración

Para estimar el error aleatorio de una concentración que se obtuvo al despejarla de la ecuación de regresión, se empleó la siguiente ecuación:

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

Donde p es el número de determinaciones realizadas de y_0 , el cual es el valor experimental de y a partir del cual se calcula la concentración con la ecuación de regresión. Además, \bar{x} y \bar{y} son los promedios de los valores x_i y y_i .

11.4 Comparación de una media experimental con un valor conocido

Para comparar una media, \bar{x} , obtenida a partir de datos experimentales con un valor de referencia, μ , se calcula el estadístico t usando la siguiente ecuación:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{n}}{s}$$

Donde s es la desviación estándar muestral y n el tamaño de la muestra. El valor absoluto de t se compara con el valor crítico de dicho estadístico obtenido de tablas para un nivel de significación concreto, utilizando $n - 1$ grados de libertad.

11.5 Comparación de dos medias experimentales

Para este caso se tienen dos media muestrales, \bar{x}_1 y \bar{x}_2 , cuyas desviaciones estándar son significativamente iguales, las cuales se contrastan con el estadístico t de la siguiente manera:

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

Donde r considera los grados de libertad y la desviación estándar de cada conjunto muestral:

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

El valor calculado de t se compara con el valor crítico obtenido de tablas para un nivel de confianza concreto, utilizando $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

11.6 Prueba F para la comparación de desviaciones estándar

Para comprobar si la diferencia entre dos valores de s muestrales es significativa, se calcula el valor de F de acuerdo con la siguiente manera:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Los valores de las varianzas deben ser dispuestos tal que $F \geq 1$. Los grados de libertad del numerador y denominador son $n_1 - 1$ y $n_2 - 2$, respectivamente. El valor de F calculado debe ser menor al valor crítico para un cierto nivel de confianza, el cual se obtiene de la tabla correspondiente.

12. Referencias

- Agüí, L., López-Huertas, M. A., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (1996). Voltammetric behaviour of poly(3-methylthiophene)-coated cylindrical carbon fibre microelectrodes: Electrochemical oxidation of the antioxidant propyl gallate. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 414(2), 141–148. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(96\)04685-2](https://doi.org/10.1016/0022-0728(96)04685-2)
- AL-JALLAD, T., AL-KURDI, Z., BADWAN, A., & JABER, A. M. Y. (1999). Simultaneous Determination of Pyridoxine Hydrochloride and Meclizine Hydrochloride in Tablet Formulations by HPLC. *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 5(8), 479–483. <https://doi.org/10.1211/146080899128735199>
- Amidžić, R., Brboric, J., Čudina, O., & Vladimirov, S. (2005). RP-HPLC determination of vitamins B₁, B₃, B₆, folic acid and B₁₂ in multivitamin tablets. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 70(10), 1229–1235. <https://doi.org/10.2298/JSC0510229A>
- Association of Official Analytical Chemists, Method 967.21 (1967). Ascorbic Acid in Vitamin Preparation and Juices. *AOAC Official Methods of Analysis* (18th ed.), Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA, p. 45.1.14
- Association of Official Analytical Chemists, Method 967.22 (1967). Vitamin C in vitamin preparations. *AOAC Official Methods of Analysis* (18th ed.), Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA, p. 45.1.15
- Association of Official Analytical Chemists, Method 983.15 (1994). Phenolic Antioxidants in Oils, Fats, and Butter Oil. *AOAC Official Methods of Analysis* (18th ed.), Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA, 47.2.02

- Association of Official Analytical Chemists, Method 985.33 (1990). Vitamin C (Reduced Ascorbic Acid) in Ready-to-Feed Milk-Based Infant Formula 2,6-Dichloroindophenol Titrimetric Method. *AOAC Official Methods of Analysis* (18th ed.), Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA, 1108-1109.
- Bard, Allen J., Faulkner, L. R. (2012). *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications* (2nd ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00056-9>
- Baur, J. E., & Wightman, R. M. (1991). Diffusion coefficients determined with microelectrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 305(1), 73–81. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(91\)85203-2](https://doi.org/10.1016/0022-0728(91)85203-2)
- Benoudjit, A., Bader, M. M., & Wan Salim, W. W. A. (2018). Study of electropolymerized PEDOT:PSS transducers for application as electrochemical sensors in aqueous media. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 17, 18–24. <https://doi.org/10.1016/J.SBSR.2018.01.001>
- Bolger, F. B., & Lowry, J. P. (2005). Brain tissue oxygen: In vivo monitoring with carbon paste electrodes. *Sensors*, 5(11), 473–487. <https://doi.org/10.3390/s5110473>
- Boujtita, M., Chapleau, M., & El Murr, N. (1996). Biosensors for analysis of ethanol in food: Effect of the pasting liquid. *Analytica Chimica Acta*, 319(1–2), 91–96. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(95\)00482-3](https://doi.org/10.1016/0003-2670(95)00482-3)
- British Standards Institution AW/275 (2014). Foodstuffs. Determination of vitamin B₆ by high performance chromatography, BS EN 14164:2014.
- Compton, R. G., & Banks, C. E. (2007). *Understanding Voltammetry* (Tercera edición). World Scientific. https://doi.org/10.1142/9789812779809_0004

- Cyriac, S. T., Thomas, D., Vikraman, A. E., & Kumarz, K. G. (2016). Electrochemical sensor for propyl gallate, based on synergic effect of gold nanoparticle and poly(p-aminobenzenesulfonic acid). *Journal of the Electrochemical Society*, 163(14), B683–B688. <https://doi.org/10.1149/2.0251614jes>
- De Lima, F., Gozzi, F., Fiorucci, A. R., Cardoso, C. A. L., Arruda, G. J., & Ferreira, V. S. (2011). Determination of linuron in water and vegetable samples using stripping voltammetry with a carbon paste electrode. *Talanta*, 83(5), 1763–1768. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.12.014>
- Elgrishi, N., Rountree, K. J., McCarthy, B. D., Rountree, E. S., Eisenhart, T. T., & Dempsey, J. L. (2018). A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *Journal of Chemical Education*, 95(2), 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
- Erk, N., & Biryol, J. (2003). Voltammetric and HPLC techniques for the determination of paroxetine hydrochloride. *Pharmazie*, 58(10), 699–704.
- Farag, A. S., Pravcová, K., Česlová, L., Vytřas, K., & Sýs, M. (2019). Simultaneous Determination of Caffeine and Pyridoxine in Energy Drinks using Differential Pulse Voltammetry at Glassy Carbon Electrode Modified with Nafion®. *Electroanalysis*. <https://doi.org/10.1002/elan.201800646>
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11^a edición, Vol. 2, 2014.
- Ferreira, N. G., Silva, L. L. G., Corat, E. J., & Trava-Airoldi, V. J. (2002). Kinetics study of diamond electrodes at different levels of boron doping as quasi-reversible systems. *Diamond and Related Materials*, 11(8), 1523–1531. [https://doi.org/10.1016/S0925-9635\(02\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S0925-9635(02)00060-2)
- Griffiths, K., Dale, C., Hedley, J., Kowal, M. D., Kaner, R. B., & Keegan, N. (2014). Laser-scribed graphene presents an opportunity to print a new generation of disposable electrochemical sensors. *Nanoscale*, 6(22), 13613–13622. <https://doi.org/10.1039/c4nr04221b>

- Gunckel, S., Santander, P., Cordano, G., Ferreira, J., Munoz, S., Nunez-Vergara, L. J., & Squella, J. A. (1998). Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. *Chemico-Biological Interactions*, 114(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(98\)00041-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(98)00041-6)
- Guo, K., Freguia, S., Dennis, P. G., Chen, X., Donose, B. C., Keller, J., Rabaey, K. (2013). Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems. *Environmental Science and Technology*, 47(13), 7563–7570. <https://doi.org/10.1021/es400901u>
- Guzmán-Hernández, D. S., Ramírez-Silva, M. T., Palomar-Pardavé, M., Corona-Avedaño, S., Galano, A., Rojas-Hernández, A., & Romero-Romo, M. (2012). Electrochemical characterization of tenoxicam using a bare carbon paste electrode under stagnant and forced convection conditions. *Electrochimica Acta*, 59, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.10.046>
- Hage, D. S. (2018). Chromatography. In *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry* (pp. 1–32). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00001-3>
- Karabinas, P., Jannakoudakis, D. (1984). kinetic parameters and mechanism of the electrochemical oxidation of l-ascorbic acid on platinum electrodes in acid solutions. *J. Electroanalytical Chemistry* 160, 159–167
- Karolczak, M., Dreiling, R., Adams, R. N., Felice, L. J., & Kissinger, P. T. (1976). Electrochemical techniques for study of phenolic natural products and drugs in microliter volumes. *Analytical Letters*, 9(9), 783–793. <https://doi.org/10.1080/00032717608059143>
- Kissinger, Peter T., Heineman, W. R. (1996). *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*. (segunda edición). Marcel Dekker.

- Królicka, A., Pauliukaitis, R., Svancara, I., Metelka, R., Bobrowski, A., Norkus, E., ... Vytřas, K. (2002). Bismuth-film-plated carbon paste electrodes. *Electrochemistry Communications*, 4(2), 193–196. [https://doi.org/10.1016/S1388-2481\(01\)00301-0](https://doi.org/10.1016/S1388-2481(01)00301-0)
- Kuzmanović, D., Khan, M., Mehmeti, E., Nazir, R., Amaizah, N. R. R., & Stanković, D. M. (2016). Determination of pyridoxine (Vitamin B6) in pharmaceuticals and urine samples using unmodified boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, 64, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2016.02.018>
- Li, J., Gao, P., Li, X., Yan, Z., & Mao, X. (2005). Study on the adsorptive catalytic voltammetry of aloe-emodin at a carbon paste electrode. *Science in China, Series B: Chemistry*, 48(5), 442–448. <https://doi.org/10.1360/042004-33>
- Lovander, M. D., Lyon, J. D., Parr, D. L., Wang, J., Parke, B., & Leddy, J. (2018). Review-electrochemical properties of 13 vitamins: A critical review and assessment. *Journal of the Electrochemical Society*. Electrochemical Society Inc. <https://doi.org/10.1149/2.1471714jes>
- Lundanes, E., Reubsaet, L., Greibrokk, T. (2013). *Chromatography: Basic Principles. Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition* (1st ed.). Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00244-0>
- Madhuchandra, H. D., & Swamy, B. E. K. (2019). Poly (Vanillin) Modified Carbon paste electrode for the Determination of Adrenaline: A Voltammetric Study. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(3), 697–702. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.09.002>
- McCreery, R. L. (2008, July). Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/cr068076m>
- Meyer, V. R. (2010). *Practical High-Performance Liquid Chromatography* (5th ed.). Wiley.

- Miller, J., & Miller, J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. (4th ed.). Prentice Hall.
- Niranjana, E., Kumara Swamy, B. E., Raghavendra Naik, R., Sherigara, B. S., & Jayadevappa, H. (2009). Electrochemical investigations of potassium ferricyanide and dopamine by sodium dodecyl sulphate modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 631(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.02.011>
- Ngai, K. S., Wee Tan, T., Zainal, Z., Zawawi, R. M., & Zidan, M. (2013). Voltammetry detection of ascorbic acid at glassy carbon electrode modified by single-walled carbon nanotube/zinc oxide. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(8), 10557–10567.
- O'Neill, R. D. (1993). Sensor-tissue interactions in neurochemical analysis with carbon paste electrodes in vivo. *The Analyst*, 4(118), 433–438. <https://doi.org/10.1039/AN9931800433>
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Negulescu, G. P., & Pisoschi, A. (2011). Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes. *Molecules*, 16(2), 1349–1365. <https://doi.org/10.3390/molecules16021349>
- Ruiz, J. J., Aldaz, A., And, ~, Dom~nguez, M., Juan, J., Ruiz, A., & Aldaz, M. D. (1977). *Mechanism of L-ascorbic acid oxidation and dehydro-L-ascorbic acid reduction on a mercury electrode. I. Acid medium. Can. J. Chem* (Vol. 55). Retrieved from www.nrcresearchpress.com
- Sarker, S. (2001). *Practical Problem Solving in HPLC. Talanta*. Wiley-VCH. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00560-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00560-9)
- Shamsipur, M., Tashkhourian, J., Hemmateenejad, B., & Sharghi, H. (2004). Application of artificial neural network to simultaneous potentiometric determination of silver(I), mercury(II) and copper(II) ions by an unmodified

carbon paste electrode. *Talanta*, 64(3), 590–596.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.03.034>

Shrivastava, A., & Gupta, V. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>

Švancara, I., Vytrás, K., Kalcher, K., Walcarius, A., & Wang, J. (2009). Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanalysis*. <https://doi.org/10.1002/elan.200804340>

Švancara, I., Kalcher, K., Walcarius, A., & Vytras, K. (2012). *Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes. Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes*. <https://doi.org/10.1201/b11478>

Švancara, I., & Schachl, K. (1999). The testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy*, 93(8), 498–499.

Urbaniczky, C., & Lundström, K. (1984). Voltammetric studies on carbon paste electrodes. The influence of paste composition on electrode capacity and kinetics. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 176(1–2), 169–182. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(84\)80315-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(84)80315-0)

Vedenyapina, M. D., Kazakova, M. M., & Skundin, A. M. (2019). Voltammetric Determination of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Formulations on a Boron Doped Diamond Electrode. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 93(6), 1178–1181. <https://doi.org/10.1134/S0036024419060335>

Wu, Y., & Song, F. (2007). Voltammetric Investigation of Vitamin B₆ at a Glassy Carbon Electrode and Its Application in Determination. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2008, Vol. 29, No. 1

- Xu, G., Chi, Y., Li, L., Liu, S., & Kan, X. (2015). Imprinted propyl gallate electrochemical sensor based on graphene/single walled carbon nanotubes/sol-gel film. *Food Chemistry*, 177, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.097>
- Yan, Z., Li, J., Fei, J., Mao, X., Gao, P., & Ding, Y. (2005). Study on the adsorptive catalytic voltammetry of emodin at a carbon paste electrode. *Analytical Letters*, 38(10), 1641–1650. <https://doi.org/10.1081/AL-200065808>
- Zima, J., Švancara, I., Barek, J., & Vytřas, K. (2009). Recent advances in electroanalysis of organic compounds at carbon paste electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39(3), 204–227. <https://doi.org/10.1080/10408340903011853>