



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Título del trabajo:

Determinación voltamétrica del antibiótico
azitromicina y comparación con métodos descritos
en la bibliografía

Autor/es

Álvaro Javier Arnaiz Vallejo

Director/es

Juan Carlos Vidal Ibáñez

Máster en Química Industrial

FACULTAD DE CIENCIAS

2020

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1.- INTRODUCCIÓN.....	2
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1.- A rapid and sensitive molecularly imprinted electrochemiluminescence sensor for Azithromycin determination in biological samples	6
2.2.- A sensitive and selective voltammetric sensor based on multiwall carbonnanotubes decorated with MgCr2O4for the determination of azithromycin	8
2.3.- Adsorptive stripping voltammetric determination of azithromycin at a glassy carbon electrode modified by electrochemical oxidation	10
2.4.- Electrochemical behavior of azithromycin at graphene and ionic liquid composite film modified electrode	12
2.5.- Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and Hemomycin® at gold electrode in neutral electrolyte	14
3.- OBJETIVO DE LA PARTE EXPERIMENTAL.....	15
3.1.- Objetivo general:	15
3.2.- Objetivos específicos:	16
4.- PARTE EXPERIMENTAL.....	16
4.1.- INSTRUMENTACIÓN	16
4.2.- REACTIVOS	18
4.3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	19
4.3.1.- ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD (ALTURA Y POSICIÓN DE LOS PICOS VOLTAMÉTRICOS) DEPENDIENDO DEL PH DE LA DISOLUCIÓN Y DEL PULIDO DEL ET	19
4.3.2.- CURVA DE CALIBRADO DE AZITROMICINA	19
4.3.3.- NANOESTRUCTURACIÓN DE LOS ELECTRODOS DE TRABAJO	20
4.3.4.- TRATAMIENTO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES	21
5.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	21
5.1.- INFLUENCIA DEL PULIDO Y EL PH.....	21
5.2.- CURVA DE CALIBRADO CON ELECTRODOS GCE SIN MODIFICAR	24
5.3.- VOLTAGRAMAS DE LA AZT CON ELECTRODOS GCE NANOESTRUCTURADOS.....	25
6.- CONCLUSIONES	27
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es la detección y cuantificación del antibiótico Azitromicina utilizando técnicas electroquímicas y mediante electrodos de carbono vítreo tanto modificados (con nanopartículas de oro y nanotubos de carbono) como sin modificar, comparando los resultados obtenidos.

Si bien en un principio el trabajo de este TFM se consideró como un trabajo completamente experimental, como consecuencia de la crisis producida por el COVID-19 y el confinamiento durante el Estado de Alarma, a partir de mediados del mes de marzo de 2020 no pudimos trabajar en el laboratorio. Por lo que la parte experimental iniciada anteriormente (y descrita en la memoria) se completó con una comparación de estos resultados con los descritos en la bibliografía científica sobre el tema. Para ello se han seleccionado de la bibliografía científica 5 trabajos con situaciones experimentales modelo distintas para la determinación voltamétrica de la azitromicina. Sus conclusiones se comparan analíticamente con los resultados de nuestro trabajo experimental.

En primer lugar, se estudiaron experimentalmente en el laboratorio las condiciones óptimas para la determinación voltamétrica del antibiótico azitromicina, obteniéndose que se deben llevar a cabo a pH=7 en tampón fosfato, mediante voltamperometría diferencial de pulsos en sentido anódico.

Una vez conocidas las mejores condiciones se realizó una curva de calibrado para la cuantificación de azitromicina en una muestra problema de concentración desconocida. No obstante, no se llegó a finalizar esta tarea por el motivo indicado.

En último lugar, se nanoestructuraron los electrodos de trabajo de carbón vítreo (GC, glassy-carbon), al objeto de comprobar cambios en las propiedades analíticas (sensibilidad/selectividad). Para ello se emplearon nanopartículas de oro (AuNPs) y nanotubos de carbono (CNTs). Los resultados experimentales obtenidos se compararon con electrodos de trabajo sin modificar. Las propiedades analíticas en la determinación voltamétrica optimizada de azitromicina se comparan con los resultados y conclusiones encontradas en la bibliografía científica sobre el tema.

ABSTRACT

The objective of his work is the detection and quantification of the antibiotic Azithromycin using electrochemical techniques and glassy carbon electrodes both

modified (with gold nanoparticles and carbon nanotubes) and unmodified, comparing the results obtained.

Although at first the work of this TFM was considered as a completely experimental work, as a consequence of the crisis produced by COVID-19 and the confinement during de State of Alarm, as from mid.March 2020 we could not work in the laboratory. Therefore, the experimental part started earlier (and described in the report) was completed with a comparison of these results with those described in the scientific literature on the subject. For this, 5 works with different experimental situations have been selected from the scientific literature for the voltammetric determination of azithromycin. Their conclusions are analytically compared with the results of our experimental work.

In the first place, the optimal conditions for the voltammetric determination of the antibiotic azithromycin were experimentally studied in the laboratory, obtaining that they should be carried out at $\text{pH} = 7$ in phosphate buffer, by means of differential voltammetry of pulses in an anodic direction.

Once the best conditions were known, a calibration curve for Azithromycin was measured, for the quantification of a test sample of unknown concentration, however, this task was not completed for the indicated reason.

Lastly, the glassy carbon (GC) working electrodes were nanostructured, in order to check changes in analytical properties (sensitivity / selectivity). For this, gold nanoparticles (AuNPs) and carbon nanotubes (CNTs) were used. The experimental results obtained were compared with unmodified working electrodes. The analytical properties in the optimized voltammetric determination of azithromycin are compared with the results and conclusions found in the scientific literature on the subject.

1.- INTRODUCCIÓN

Los antibióticos macrólidos se han utilizado de ampliamente en medicina para tratar problemas causados por infecciones bacterianas, sobre todo en los tejidos dermatológicos y en el sistema respiratorio, lo que ha llevado a que las ventas mundiales de este tipo de antibióticos alcancen miles de millones de dólares cada año¹.

La azitromicina (AZT) es un derivado semisintético de la familia de antibióticos macrólidos, consistentes en una clase de productos naturales que poseen un gran anillo

de lactona macrocíclica al que se pueden unir uno o varios desoxiazúcares y que pueden tener 14, 15 o 16 miembros. Tiene mejores propiedades farmacocinéticas en tejidos que otros antibióticos de la misma familia, así como una gran actividad antibiótica con rápida absorción y una vida media más larga¹. Como otros antibióticos posee efectos secundarios, por ejemplo, afectando inevitablemente al tracto gastrointestinal durante su uso, por lo que es necesario un control en su administración para reducir sus efectos en los humanos [1].

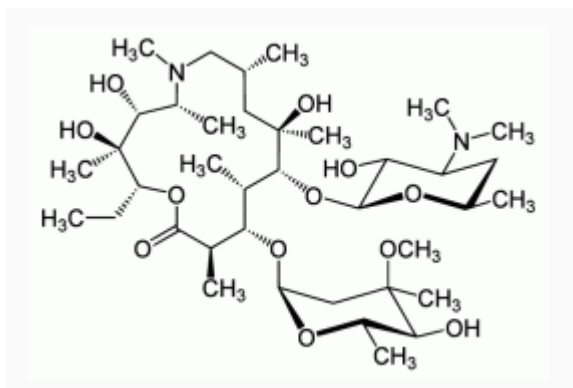


Figura 1.- Estructura de la azitromicina

Pliva es una empresa farmacéutica croata cuya sede se encuentra en la capital, Zagreb. Finalizando la década de 1970, un grupo de investigadores de esta empresa descubrió el antibiótico azitromicina. Ya desde los primeros ensayos demostró ser muy eficaz y permanecer en los tejidos corporales de los animales durante un tiempo mayor que otros antibióticos similares [2].

Esta empresa croata patentó el medicamento en todo el mundo, más tarde, el grupo Pfizer se dio cuenta del potencial de este antibiótico adquiriendo los derechos para su distribución en los estados Unidos siendo en la actualidad un medicamento de uso común [2].



Figura 2.- Capsulas de azitromicina comercializadas por la empresa Pfizer

La azitromicina es una lactona de 15 ciclos semisintética derivada de la eritromicina (Fig. 1). La AZT juega un papel muy importante en el tratamiento de infecciones en las vías respiratorias, toxoplasmosis, patógenos no clásicos (como la *Helicobacter pylori*) e infecciones pediátricas. También ha sido utilizada para el tratamiento de infecciones de piel y de tejidos blandos y alguna enfermedad de transmisión sexual [3].

Como se ha mencionado anteriormente, la AZT se obtiene mediante una modificación de la eritromicina, esta modificación consiste en la inserción de un nitrógeno sustituido con un grupo metilo, en la posición 9ª del anillo largo de la macrolactona. Esta modificación distingue los azólidos de los macrólidos ya que estos únicamente contienen carbono y oxígeno en sus anillos [4].

La inserción del nitrógeno en el anillo altera significativamente las propiedades químicas, biológicas y farmacocinéticas, aumentando la estabilidad y mejorando su resistencia al ambiente gástrico, además, se previene la formación de anhidrohemicetal asociado con toxicidad gastrointestinal que aparece con la eritromicina.

El mecanismo de actuación de la AZT es similar al de otros macrólidos, se enlaza a una subunidad de los ribosomas bacterianos inhibiendo un mensajero natural de la síntesis de ARN. Sin embargo, comparado con otros antibióticos macrólidos, la AZT ha mejorado la actividad antimicrobiana, tiene un perfil más favorable de reacciones adversas, y ha mejorado las propiedades farmacocinéticas [4].

La AZT es eliminada de forma lenta por el cuerpo humano, la ruta primaria de excreción es vía la bilis. Debido a sus valores de pK_a (8.6 y 9.5) la azitromicina se encuentra en el cuerpo humano de forma protonada. Los grupos aminos son fácilmente oxidados, estas formas de oxidación son la base para la determinación analítica de estos macrólidos [5][6].

En la actualidad también ha cobrado cierto protagonismo debido a la crisis sanitaria provocada por el virus SARS-CoV-2 que provoca la enfermedad COVID-19, ya que es uno de los antibióticos que se utiliza para combatir la enfermedad.

El uso de AZT contra el COVID-19 ha demostrado tener efectos terapéuticos según varios estudios [7] pero el mecanismo no es todavía conocido, aunque se han propuesto varios: se cree que aumenta el pH de la maduración del endosoma, también que puede inhibir la endocitosis inhibiendo la replicación del virus, o que puede interferir con la entrada viral a través de la unión del virus y el receptor anfitrión. Todavía son necesarios estudios posteriores para llegar a conocer con exactitud el modo en que actúa la azitromicina [8].

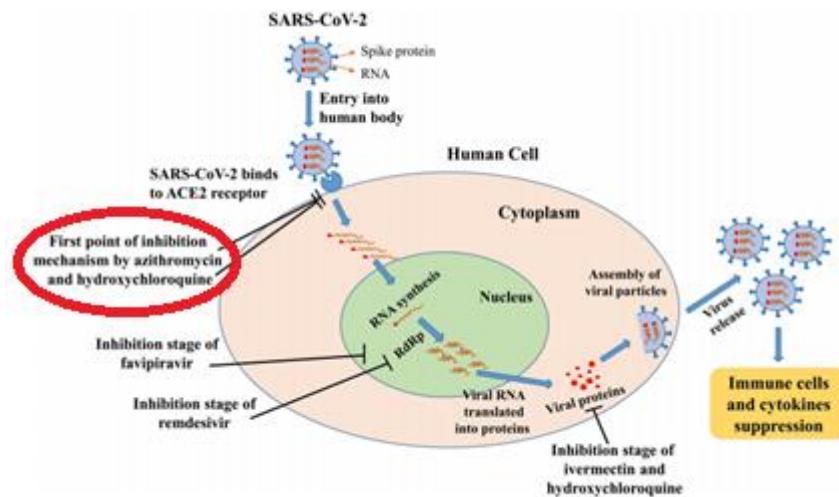


Figura 3.- Etapa de introducción del virus SARS-CoV-2 donde actúa la azitromicina (rodeada en rojo).

Muchos de los procedimientos empleados para la determinación de este tipo de antibióticos están basados en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estas técnicas tienen muchas ventajas como buenos rangos lineales y límites de detección bajos (LOD=1.12 μM , $R^2=0.9994$ [9], LOD=0.013 μM , $R^2=0.997$ [10]). La cromatografía líquida (normalmente acoplada a espectrometría de masas [11] [12]) destaca también por su selectividad y sensibilidad ya que se consiguen separar eficientemente los interferentes de la matriz, pero presenta desventajas importantes como la compleja instrumentación y la difícil portabilidad *in situ* por lo que es interesante desarrollar técnicas alternativas que funcionen bien en cuanto selectividad y sensibilidad pero que se combinen con la rapidez y la posibilidad de realizarlas *in situ* como pueden ser las técnicas electroquímicas^{8,9}.

Se procedió a una revisión bibliográfica de distintos métodos voltamétricos y electroquímicos para la determinación de AZT, abarcando varios tipos de electrodos de trabajo (carbono vítreo, oro) y varios métodos de modificación de estos (nanopartículas, polimerización...). De esta información, se han seleccionado como modelos los 5 trabajos más importantes y que abarcan algún aspecto novedoso en la determinación voltamétrica de AZT.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se resumen a continuación los resultados y propiedades analíticas de trabajos recientes publicados para la determinación voltamétrica y electroquímica de la AZT. En estos trabajos que se han seleccionado como los más relevantes, se muestran distintas posibilidades de modificación de los electrodos de trabajo (polímeros modelados

molecularmente, nanomateriales, ... etc.) junto a distintas formas de llevar a cabo las determinaciones voltamétricas (voltametría directa, voltametría de redisolución, preconcentración por adsorción, barridos impulsionales, uso de líquidos iónicos ... etc.). El objetivo es mostrar las propiedades analíticas en cada caso y compararlas junto a el procedimiento experimental que hemos optimizado en nuestro laboratorio

2.1.- A rapid and sensitive molecularly imprinted electrochemiluminescence sensor for Azithromycin determination in biological simples [1]

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.02.010>

Determinación de Azitromicina mediante un sensor electroquimioluminiscente fabricado a partir de un electrodo de pasta de carbono modificado por un polímero de impronta molecular. Este polímero, sintetizado químicamente, actúa a modo de molde que reconoce selectivamente a la molécula de AZT.

Se comparan en estos trabajos las propiedades analíticas más importantes y sus aspectos más particulares o novedosos. Rango lineal entre 1×10^{-10} y 4×10^{-7} mol/L, límite de detección (LOD) 2.3×10^{-11} mol/L.

Se controló la morfología de la superficie del electrodo mediante SEM (scanning electron microscope).

Sistema de 3 electrodos: electrodo de trabajo MIP (*molecularly imprinted polymer*) o NIP (*non imprinted polymer*), Ag/AgCl como electrodo de referencia y un hilo de platino como electrodo auxiliar.

Síntesis del MIP: está basada en la polimerización por precipitación, empleando la molécula de antibiótico como plantilla para la creación de un molde selectivo para su reconocimiento. El procedimiento de síntesis del polímero se basó en la polimerización química utilizando 2,2-azobisisobutironitrilo (AIBN) como precursor y etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) como agente enlazante. Se añadió eritromicina (ERY), y ácido metacrílico (MAA) con metanol y acetonitrilo, se agitó y después se añadió EGDMA y AIBN, se volvió a agitar y se limpió con metanol y ácido acético que después debe ser eliminado. Una vez obtenido el MIP se mezcló con polvo de grafito en un mortero con ayuda de aceite de parafina. La superficie del electrodo de trabajo se pulió previamente. Para el NIP, como polímero de control sin capacidad de reconocer a la AZT, se empleó el mismo procedimiento, pero sin AZT. El MIP así formado tuvo capacidad de enlazar selectivamente a moléculas de AZT a través de los grupos funcionales creados, una vez eliminada la AZT del polímero sintetizado.

Este polímero se empleó en la determinación de AZT en muestras de sangre y orina: sin otro tratamiento que la eliminación de partículas sólidas (ultrafiltración a 0.45 μm), y dilución con tampón fosfato de 0.1M (pH=8), dejando reaccionar la AZT con el MIP durante 10 minutos. Para la electroquimioluminiscencia se añadió $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (8mM, pH 7). Se empleó voltamperometría cíclica en un rango de potenciales entre 0.5 y 1.25 V con una velocidad de barrido de 100mV/s.

Aparece en los voltagramas cíclicos medidos un aumento de corriente con un pico de máximo valor a un potencial $E_p=0.8$ V, que es debido a la oxidación de los grupos amino de la AZT. Sin embargo, se trata de un proceso electroquímicamente irreversible, al no observarse corrientes de reducción en el barrido catódico inverso. Comparando electrodos de trabajo modificados MIP y NIP, en estos últimos no se observaron las corrientes indicadas, por lo que los polímeros NIP carecieron de capacidad de reconocimiento y retención de la AZT. En cuanto a la actividad luminiscente (propia de la molécula de antibiótico) también se obtuvo una intensidad de luz emitida mayor en el caso del MIP con respecto al electrodo NIP. Esta propiedad óptica permite la determinación espectroelectroanalítica de la AZT.

En la Fig. 4 y tabla 1 se muestran las señales obtenidas, y se resumen las propiedades analíticas comparando con otros procedimientos voltamétricos

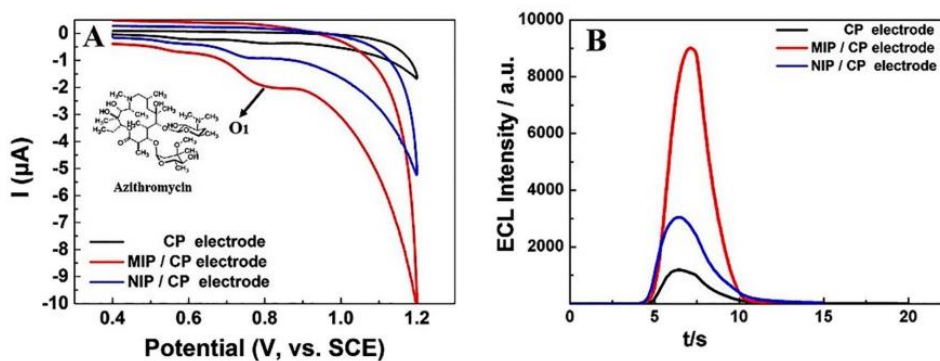


Figura 4.- (A) Curvas CV de azitromicina (0.2 μM) y (B) respuesta de la señal ECL con el complejo de rutenio, en el electrodo de pasta de carbono (línea negra), en el electrodo modificado con MIP (línea roja) y en el electrodo modificado con NIP (línea azul).

Comparison of proposed sensor with other developed methods for AZM determination.

Electrode	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Linear range ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recovery (%)	Technique	Real samples	Ref.
Gr-IL/GCE ^a	0.25	0.65–38.0	97.7–99.5	DPV ^e	Pharmaceuticals	13
MgCr ₂ O ₄ -MWCNT/GCE ^b	0.07	0.25–10.0	98.4–101.5	DPV ^e	–	14
Ag(Hg) film electrode	0.4	1.34–3.3	–	SWV-ADSV ^f	–	15
ZSM-5/Nafion/GCE ^c	0.0013	0.0038–62.5	96.0–102.8	ECL	Tablets	17
Pt disk electrode	0.0012	0.05–50	85.0–104.0	CE-ECL ^g	Urine and tablets	18
MIP/CPE ^d	2.3×10^{-5}	1.0×10^{-4} –0.4	98.4–113.5	ECL	Urine and plasma	This work

^a Graphene-1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate/glassy carbon electrode.

^b MgCr₂O₄ nanoparticle–multiwall carbon nanotube/glassy carbon electrode.

^c Zeolite Socony Mobile-Five nanoparticles/Nafion/glass carbon electrode.

^d Molecularly imprinted polymer/carbon paste electrode.

^e Differential pulse voltammetry.

^f Adsorptive stripping square-wave voltammetric.

^g Capillary electrophoresis electrochemiluminescence.

Tabla 1.- Comparación de la determinación en muestras reales de orina y plasma sanguíneo con otros trabajos

Como conclusión, la modificación con polímeros MIP permite la cuantificación espectro-electroanalítica de AZT de forma sensible y selectiva, pudiendo emplearse para muestras biológicas con un tratamiento muy simple de la muestra.

2.2.- A sensitive and selective voltammetric sensor based on multiwall carbonnanotubes decorated with MgCr2O4for the determination of azithromycin [3]

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.021>

En este trabajo se muestra la determinación voltamétrica de la AZT empleando electrodos modificados con nanotubos de carbono multicapa, junto a nanopartículas de MgCr₂O₄ como mediador de transferencia de carga. Las características de estos materiales compuestos se estudiaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, microscopía de fuerza atómica (AFM) y espectroscopía de impedancia electroquímica.

Propiedades analíticas: rango lineal entre 0.25-4.0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ y 4-10 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Límite de detección 0.07 $\mu\text{mol l}^{-1}$ AZT (pH=7).

Sistema de 3 electrodos: electrodo de trabajo de carbono vítreo modificado con el *composite* MgCr₂O₄-MWCNTs, el electrodo auxiliar de platino y referencia Ag/AgCl (disolución saturada de KCl).

Preparación del electrodo modificado con MWCNTs: se activaron los nanotubos y eliminaron restos metálicos que puedan contener, para ello se mezcló con ácido nítrico y se mantuvo a reflujó durante un tiempo (15 horas). Se separaron los nanotubos y se lavaron repetidas veces con agua. Para preparar la suspensión de nanotubos, se añadió dimetil formamida a los nanotubos secos y se mezclaron mediante ultrasonidos durante 5 minutos. El electrodo se pulió con alúmina y se limpió con una mezcla de agua y metanol.

Finalmente, se depositó la suspensión de los nanotubos en la superficie limpia y seca y se dejó secar con un flujo de aire caliente a 50 grados.

Para el electrodo modificado también con dicromato de magnesio, a los nanotubos activados (con nítrico) se añadió ácido cítrico y una mezcla de nitrato de magnesio y nitrato de cromo (III) manteniendo una relación molar Mg:Cr en 1:2. Después se eleva el pH a 9 añadiendo hidróxido de amonio. Después se seca y se calcina obtenido finalmente los nanotubos modificados con $MgCr_2O_4$ que actuó como electrocatalizador y mediador de transferencia de carga.

Preparación de las muestras biológicas (plasma sanguíneo y orina): primero se realizó una centrifugación para eliminar restos sólidos, después, se diluyó con una solución buffer de pH 7 al 20% de metanol. Se determinó la AZT mediante adición estándar. Para las muestras farmacéuticas, se pulverizó y homogeneizó, después, se disolvió y se filtró, por último, se añadió el buffer de pH 7 de metanol y agua.

Para la determinación electroquímica se utilizó una voltametría de pulso diferencial (DPV). Amplitud del pulso: 200 mV, tiempo de pulso: 5 ms, scan rate: 50 mV/s, tampon fosfato.

En la Fig. 5 se muestran voltagramas DPV típicos (diferencial de pulsos), y en la Tabla X la influencia del pH en las determinaciones voltamétricas. Los valores de E_p de los voltagramas se obtienen sobre +0,75V, valores de potencial no muy altos debido al efecto electrocatalítico de la nanoestructuración del electrodo.

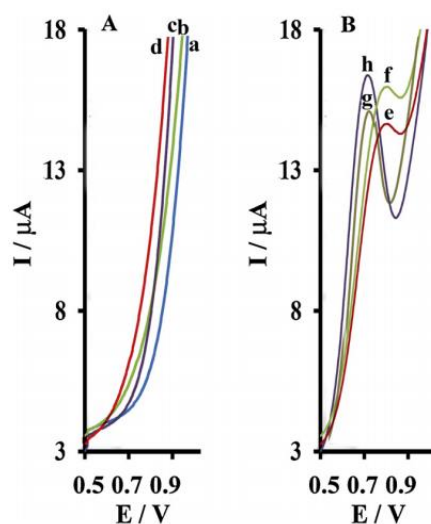


Figura 5.- Voltagramas de pulso diferencial para el blanco (A) y para una solución de 10 $\mu\text{mol/L}$ de AZT (B) con electrodo sin modificar (a, e), modificado con nanotubos (b, f), modificado con $MgCr_2O_4$ (c, g) y modificado con nanotubos y $MgCr_2O_4$ (d, h).

También se realizó un estudio de la influencia del pH en el pico de oxidación tanto en la corriente (A) como en el potencial (B):

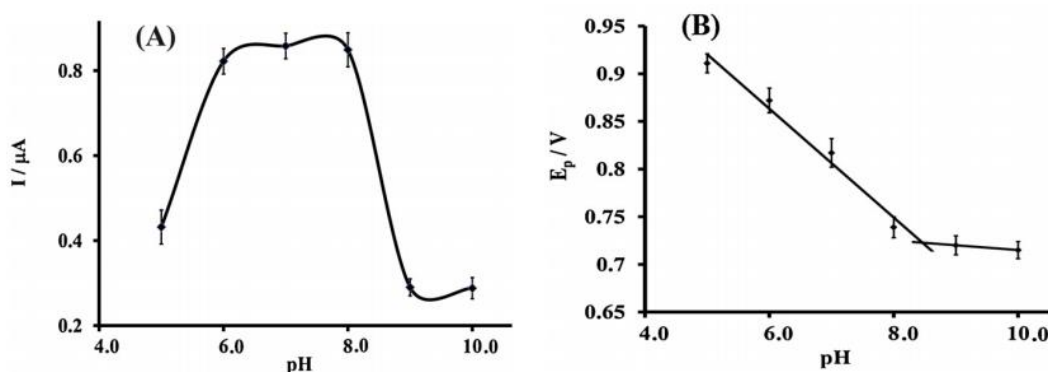


Figura 6.- Influencia del pH en el pico de oxidación en la corriente (A) y en el potencial (B)

En la tabla 2 se muestran los resultados para las muestras reales:

Determination of azithromycin in real sample at pH 7.0 (n=3).

Sample	Azithromycin added ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Azithromycin found ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recovery (%)	HPLC method ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Capsule	-	4.97 ± 0.50	-	5.08 ± 0.90
Capsule	15.00	19.82 ± 0.20	99.1	-
Urine	-	<Limit of detection	-	<Limit of detection
Urine	15.00	15.23 ± 0.60	101.5	14.87 ± 0.50
Urine	30.00	30.37 ± 0.70	101.2	-
Plasma	-	<Limit of detection	-	<Limit of detection
Plasma	10.00	9.84 ± 0.40	98.4	9.54 ± 0.60
Plasma	25.00	24.95 ± 0.30	99.8	-

Tabla 2.- Resultados obtenidos en el trabajo para las muestras reales de cápsulas, orina y plasma sanguíneo.

2.3.- Adsorptive stripping voltammetric determination of azithromycin at a glassy carbon electrode modified by electrochemical oxidation [13]

DOI: [10.2116/analsci.20.639](https://doi.org/10.2116/analsci.20.639)

En este trabajo se muestra una nueva aproximación para la cuantificación voltamétrica de la AZT, como es una técnica de redisolución voltamétrica en la que se preconcentra el antibiótico sobre el electrodo mediante adsorción física. Esto permite su determinación (una vez preconcentrado sobre el electrodo de trabajo) con una gran sensibilidad.

Se estudió en este trabajo el comportamiento adsorbente y electroquímico de la AZT sobre un electrodo de carbono vítreo tratado electroquímicamente por oxidación anódica a un potencial de +1.8V para formar grupos carboxilo con mayor capacidad de retención de la AZT.

En el barrido voltamétrico anódico de redisolución se obtuvo un pico de oxidación a +0.82V ($v=20 \text{ mV s}^{-1}$), un rango de concentraciones de respuesta lineal entre 0.25-2 μg

mL^{-1} y entre $1\text{-}10 \mu\text{g mL}^{-1}$ con tiempos de preconcentración de 240 y 60 segundos, respectivamente.

Sistema de tres electrodos: electrodo de carbono vítreo como electrodo de trabajo, como referencia un electrodo de Ag/AgCl y platino como electrodo auxiliar.

Preparación del electrodo de trabajo de carbono vítreo: en primer lugar, se procedió al pulido de la superficie del electrodo con ayuda de alúmina y después es sometido a ultrasonidos. Se realizó un pretratamiento electroquímico manteniendo el electrodo a $+1.8 \text{ V}$ durante 4 minutos en una solución tamponada de fosfato $\text{pH}=6$, después se realizaron ciclos entre -0.8 y 1 V con $v=100 \text{ mV s}^{-1}$. La determinación voltamétrica se realizó después de una preconcentración (voltametría y redisolución) en primer lugar, aplicando un potencial de electrólisis de $+0.3 \text{ V}$ con agitación de la disolución, después de 10 segundos de reposo se realizó una DPV en dirección anódica hasta 1.0V con $v=20 \text{ mV s}^{-1}$.

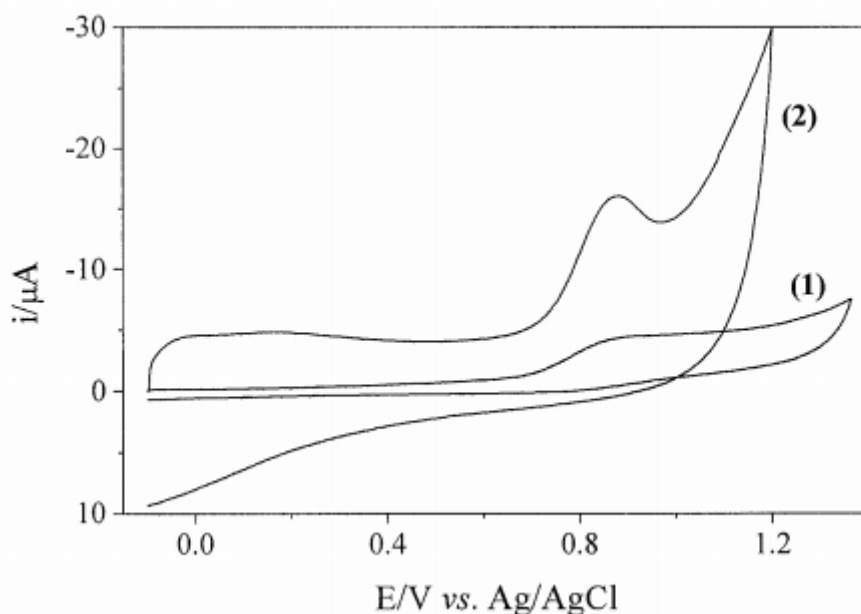


Figura 7.- Voltamperometría cíclica de azitromicina con el electrodo sin modificar (1) y modificado (2)

La preparación de las muestras biológicas consistió de forma simple en su filtración y dilución en tampon de fosfato ($\text{pH}=6$), y las calibraciones se realizaron por adición estándar.

Los resultados que se obtuvieron en muestras de orina se resumen en la tabla 3.

Urine sample ^a	Added/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	Found/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	RSD, %	Average recovery, %
1	0.50	0.467	3.5	93.40
2	1.50	1.445	2.9	96.33
3	2.50	2.439	2.6	97.56
4	3.50	3.427	2.5	97.91

a. Each value is the mean of five experiments.

Tabla 3.- Resultados obtenidos para las muestras reales de orina.

Este trabajo destaca por la determinación de concentraciones muy pequeñas de AZT (del orden de ppb's), debido a su concentración previa por adsorción sobre el electrodo de trabajo modificado.

2.4.- Electrochemical behavior of azithromycin at graphene and ionic liquid composite film modified electrode [14]

DOI: [10.1016/j.talanta.2011.09.005](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.09.005)

En este trabajo se muestra el comportamiento electroquímico de la AZT con un electrodo de carbón vítreo modificado con un composite de grafeno (GR) y un líquido iónico a temperatura ambiente, el 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (BMIMPF₆). La voltametría cíclica indica que la modificación del electrodo mejora la actividad electrocatalítica de la AZT, y este comportamiento es utilizado para la determinación de AZT por DPV. El rango de concentraciones que permite este procedimiento es 0.49-28.57 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y el límite de detección es de 0.19 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Como electrodo de trabajo se utiliza uno de carbono vítreo modificado con IL/Gr, como electrodo de referencia, un electrodo saturado de calomelanos, como electrodo auxiliar un hilo de platino. Son los electrodos habituales que se emplean en la mayoría de estos trabajos.

Preparación del electrodo modificado: antes de la modificación se procedió al pulido de su superficie electródica con alúmina y lavado con agua destilada apoyado con ultrasonidos. Se preparó una dispersión de 2 mg de grafeno y 20 μl de líquido iónico (se entiende por líquido iónico a toda sal formada por iones que se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente, poseen una volatilidad prácticamente nula y son estables en agua, lo que hace que posean numerosas aplicaciones) en 2 ml de N,N-dimetilformamida (DMF). Por último, 5 μl de la mezcla se depositaron sobre el electrodo y se secó con ayuda de una lámpara IR (infrarrojos).

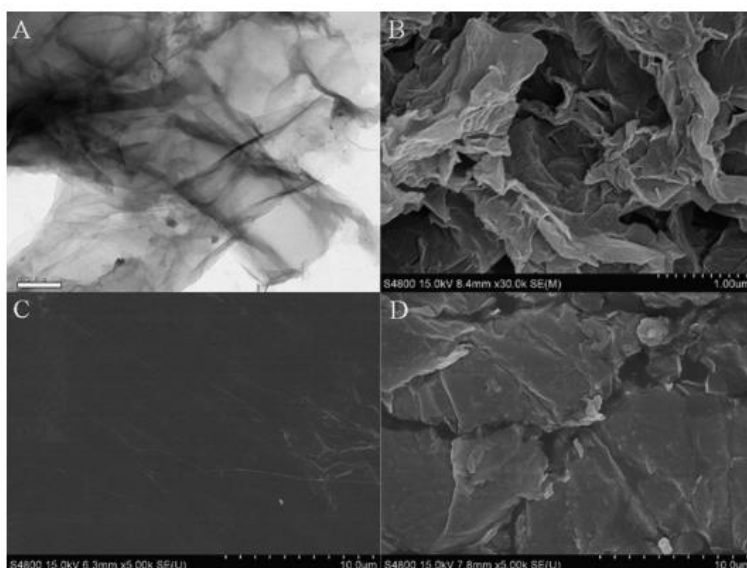


Figura 8.- (A) Imagen TEM de grafeno en DMF, imagen SEM de Gr/GCE (B), IL/GCE (C) y Gr/IL/GCE (D)

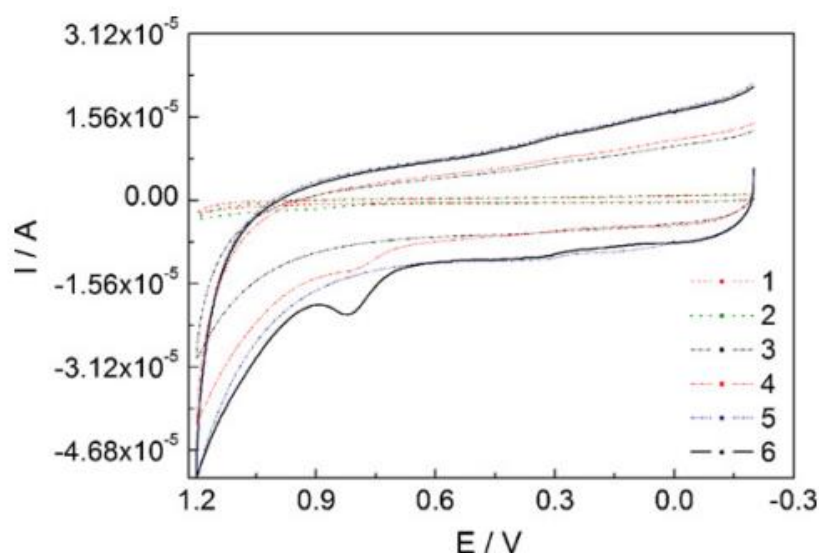


Figura 9.- Los voltogramas 1 y 2 corresponden al electrodo sin modificar, las líneas 3 y 4 al electrodo modificado únicamente con grafeno, 5 y 6 al electrodo modificado tanto con grafeno como con líquido iónico. En 1, 3 y 5 se trata del blanco y en 2, 4 y 6 está presente la azitromicina (16.3 µg/ml)

Todos los experimentos realizados a $\text{pH} = 6$ con un tampón fosfato y $v=50 \text{ mV s}^{-1}$.

Las medidas voltamétricas se realizaron en un tampón fosfato ($\text{pH} = 5.8$) como electrolito soporte, 30 segundos de agitación previo a la medida. DPC entre -0.2 y 1.2 V apareciendo el pico de oxidación por el cual se determina la AZT a 0.81 V . ΔE_p (amplitud de pulso) = 50 mV , t_p (tiempo de pulso) = 0.05 segundos y periodo del pulso = 0.2 segundos.

Preparación de muestras: se estudiaron dos tipos de muestras, tabletas y capsulas de fármacos. Las muestras se trituraron hasta obtener un polvo homogéneo y se disolvieron en etanol (asistido con ultrasonidos).

Los resultados obtenidos se muestran la tabla 4.

Pharmaceutical formulation ^a	Labeled values (mg/tablet)	Reference procedures ^b (mg/tablet)	Proposed procedures ^c (mg/tablet)	Add (mg/tablet)	Found (mg/tablet)	Recovery (%)
Capsules	250	242.3	244.7 ± 2.5	163.3	407.2	99.5
Tablets	250	246.5	246.8 ± 2.1	163.3	406.3	97.7

^a Capsules: batch no. 20100502, expiry date: 04/2012, from Changjiang Pharm; tablets: batch no. 101158, expiry date: 11/2012, from Shijiazhuang No. 4 Pharm.

^b HPLC method.

^c Average of five replicate measurements ± SD.

Tabla 4.- Resultados obtenidos de las muestras farmacológicas.

Como se observa en la tabla, los resultados obtenidos de recuperación son muy buenos destacando especialmente al obtenido con las cápsulas, el cual se acerca al 100%.

2.5.- Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and Hemomycin® at gold electrode in neutral electrolyte [15]

DOI: [10.1016/j.electacta.2005.07.032](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.07.032)

En este artículo se estudian las propiedades electroquímicas de la AZT empleando un electrodo metálico de oro (en lugar del habitual de carbón vítreo). Para ello, se estudió la oxidación de la AZT y su comportamiento electroquímico con voltametría cíclica, de la propia molécula y formando parte de un fármaco junto a con un electrolito neutral utilizando la técnica de la voltamperometría cíclica lineal, tanto de forma pura como formando parte de un fármaco junto a (hemomicina®).

Se emplearon electrodo de trabajo de oro policristalino pulido con pasta de diamante, auxiliar de hilo de oro y referencia, un electrodo saturado de calomelanos.

En estas condiciones, el pico de oxidación de la AZT se muestra a $E_p=0.6$ V (referencia calomelanos) con $v=50\text{mV s}^{-1}$. La respuesta lineal se mantuvo en un rango de concentraciones $0.235\text{-}0.588\text{ mg ml}^{-1}$ de AZT. Los voltagramas obtenidos se muestran en la fig. 10, y una curva de calibrado típica en la fig. 11.

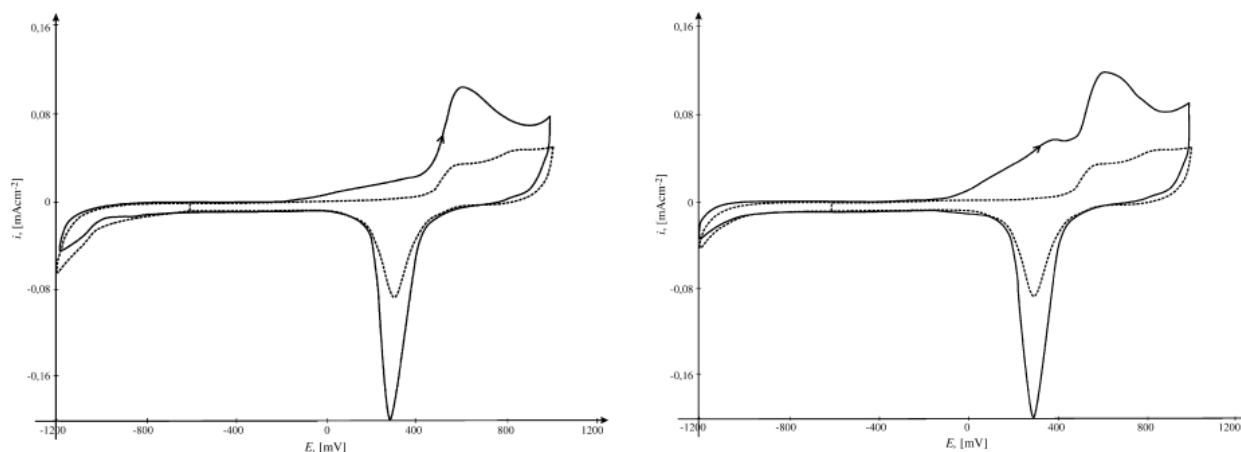


Figura 10.- Voltagrama cíclico del electrodo de oro con 0.05 M NaHCO₃ en línea discontinua y después de añadir 0.588 mg/ml de azitromicina pura (izquierda) y 0.588 mg/ml de Hemomycin® (derecha).

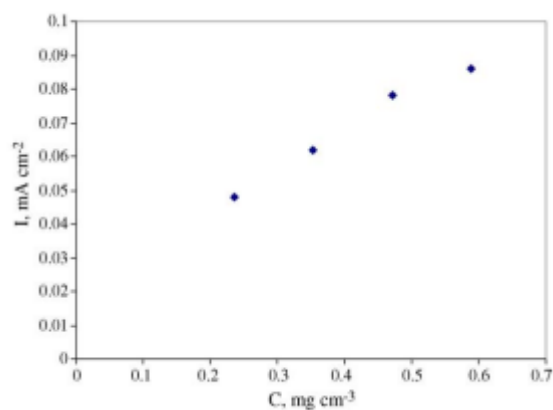


Figura 11.- Dependencia lineal del pico de oxidación a 0.6 V en el rango antes mencionado (0.235-0.588 mg/ml).

En la tabla siguiente se muestra un resumen de los resultados numéricos obtenidos en los diferentes artículos estudiados:

Artículo	Electrodo	Modificación	LOD	Rango lineal
[1]	Pasta de carbono	Polímero de impronta molecular	2.3×10^{-11} M	10^{-10} a 4×10^{-7} M
[3]	Carbono vítreo	Nanotubos de carbono multicapa y MgCr ₂ O ₄	7×10^{-8} M	$0.25-4 \times 10^{-6}$ M $4-10 \times 10^{-6}$ M
[12]	Carbono vítreo	Oxidación electroquímica	2.7×10^{-7} M	3.3×10^{-7} a 2.7×10^{-6} M
[13]	Carbono vítreo	Composite de grafeno y líquido iónico	2.5×10^{-7} M	6.5×10^{-7} a 3.8×10^{-6} M
[14]	Oro policristalino	Pasta de diamante	-----	3×10^{-4} a 7.9×10^{-4} M

Tabla 5.- Resumen de los resultados extraídos de los artículos estudiados

Como se observa en la tabla, con el electrodo de pasta de carbono se obtienen los valores más bajos tanto en el rango lineal como en el límite de detección (LOD), seguidos de los obtenidos con electrodo de carbono vítreo siendo los tres bastante semejantes entre ellos. Por último, los peores resultados son los obtenidos con el electrodo de oro sin modificar.

3.- OBJETIVO DE LA PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Objetivo general:

Optimización de la determinación voltamétrica del antibiótico azitromicina.

3.2.- Objetivos específicos:

1. Estudio del comportamiento voltamétrico de la AZT en condiciones experimentales concretas.
2. Realizar un calibrado para la cuantificación de azitromicina y su comparación con otros rangos de concentración descritos en la bibliografía.
3. Modificar con nanomateriales la superficie del electrodo de trabajo de carbón vítreo, para la mejora de la sensibilidad (electrocatalisis) en la cuantificación de la AZT.

4.- PARTE EXPERIMENTAL

4.1.- INSTRUMENTACIÓN

ELECTROQUÍMICA

Para la realización de las medidas *in-situ* de electroquímica se ha utilizado un potenciostato Autolab PGSTAT12 de Metrohm (AUT71572, Ecochemie, Holanda) el cual posee una sensibilidad de medida de corriente de 0,10nA ($\pm 0,2\%$), una resolución en la aplicación de potencial de $\pm 0,2$ mV y un rango de trabajo de potenciales de ± 12 V. Impedancia de entrada 10^{10} Ω .



Figura 12.- Potenciostato AUTOLAB PGSTAT12 de Metrohm.

Este potenciostato de tres electrodos se conecta a los tres electrodos empleados: carbono vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y un hilo de platino como electrodo auxiliar, como se muestra en la celda voltamétrica de la fig. 13.



Figura 13.- Imagen de la disposición de los tres electrodos en la celda mediante el cual se realizaban los experimentos.

Todas las experiencias, condiciones de los barridos de potencial y de medidas de la corriente se programaron empleando el software de control instrumental Nova v.2.3.



Figura 14.- Lugar de trabajo en el laboratorio

ELECTRODOS DE CARBONO VÍTREO

Los electrodos de carbono vítreo fueron los elegidos para llevar a cabo las medidas (*BASi*, *3.0 mm de diámetro*), están formados por un cuerpo aislante fabricado en plástico, polietereacetona (PEEK) que protege el conector en un extremo y la superficie electródica en el otro. Como se comentará más adelante, es importante tratar la superficie

de carbono vítreo en unas condiciones determinadas (por ejemplo, condiciones del pulido de su superficie) para obtener unos resultados reproducibles y satisfactorios.



Figura 15.- Ejemplo de un electrodo de carbono vítreo (GC) utilizado como electrodo de trabajo.

4.2.- REACTIVOS

- Azitromicina ($C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, 99% *Sigma-Aldrich; USA; Rf: PHR1068-1G*)
- Tampón fosfato (PBS, 0.1M, pH=7)
- Tampón Britton-Robinson (B-R, 0.1M. pH 2-12)
- Todas las disoluciones fueron preparadas utilizando agua desionizada de calidad Mili-Q (Millipore)
- Nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs, *Aldrich Chemistry, 755133-5G*)
- Nanopartículas de oro (AuNPs, *NanoXact, AUCN5-25M*)

Para preparar el tampón fosfato, se disolvió Na_2HPO_4 (*Spectrum*) en agua desionizada con la concentración de 0.1 M para después conseguir un pH de 7 añadiendo una disolución de NaOH 2M (*Sigma Aldrich; USA*).

Para el tampón *Britton-Robinson* se disolvió ácido acético (CH_3COOH , *Merck*), ácido fosfórico (H_3PO_4 , *Merck*) y ácido bórico (H_3BO_3 , *Merck*), y se ajustó hasta el pH deseado añadiendo pequeños volúmenes de disolución concentrada de NaOH (*Sigma Aldrich; USA*) ya que el pH inicial del tampón es de 1,8.

4.3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se muestran en este apartado las condiciones experimentales que se estudiaron en el tiempo que se dispuso de trabajo en el laboratorio antes del Estado de Alarma.

4.3.1.- ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD (ALTURA Y POSICIÓN DE LOS PICOS VOLTAMÉTRICOS) DEPENDIENDO DEL PH DE LA DISOLUCIÓN Y DEL PULIDO DEL ET

Dado que la azitromicina posee dos valores de pK, pK_1 a un $pH=8.6$ y $pK_2=9.3$, el primer paso consistió en registrar los voltagramas de los distintos estados de protonación de la AZT. Se registraron estos voltagramas a pHs de $pH=5 < pK_1=8,6$; a $pH=9$; y a $pH=12 > pK_2=9,3$.

También se ensayó la influencia que tiene el pulido de los electrodos de carbono vítreo. Éste se llevó a cabo en primer lugar utilizando agua ultrapura para pasar después a un pulido con alúmina ($5 \mu m$) mediante movimientos circulares hasta la obtención de una superficie con acabado de “espejo” retirando los restos de alúmina antes de realizar la medida.

Para llegar a los valores deseados de pH se utilizó un tampón *Britton-Robinson* preparado como se ha indicado anteriormente.

4.3.2.- CURVA DE CALIBRADO DE AZITROMICINA

Una vez optimizado el pH de las medidas voltamétricas y el efecto de pulido del electrodo de trabajo, se realizó un calibrado para comprobar el rango de concentraciones de AZT que producen una respuesta voltamétrica lineal en estas condiciones óptimas. Para ello, se prepararon y midieron disoluciones de concentración de AZT 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mM en un tampón fosfato de $pH=7$.

Con estas concentraciones se utilizó una voltametría diferencial de pulsos (DPV) desde un potencial inicial $E_1=0$ V a un potencial final $E_F=+1.2$ V. Las condiciones instrumentales de las medidas voltamétricas DPV fueron las siguientes:

- Aumento escalonado del potencial (ΔE): 2 mV
- Amplitud de modulación del pulso de potencial (ΔE_P): 25 mV
- Tiempo de modulación del pulso de potencial (t_p): 0.05 segundos

- Tiempo de intervalo del potencial escalonado (t_m): 0.2 segundos
- Velocidad de barrido de potenciales (v): 10 mV s^{-1}

Se preparó una disolución patrón de AZT en una mezcla metanol/agua 60% (v/v), mezcla hidro-alcohólica necesaria por la poca solubilidad de la AZT en agua. Las concentraciones en las que se midió la AZT se prepararon posteriormente después de diluir con el volumen adecuado de disolución tampón de fosfato. Estas disoluciones para el calibrado se midieron directamente en la cubeta voltamétrica en la que se introdujeron los tres electrodos de trabajo.

No fue necesario el paso de corriente de N_2 para la desoxigenación de estas disoluciones, al emplear barridos voltamétricos anódicos de oxidación.

Para obtener la reproducibilidad adecuada, los electrodos de trabajo se lavaron y pulieron con alúmina Al_2O_3 (diámetro $5 \mu\text{m}$) en la forma indicada anteriormente, después de cada medida voltamétrica.

4.3.3.- NANOESTRUCTURACIÓN DE LOS ELECTRODOS DE TRABAJO

Una vez medida la recta de calibrado, se ensayó mejorar la sensibilidad de las medidas voltamétricas a través de la nanoestructuración de los electrodos de trabajo (modificación física de los electrodos de carbón vítreo con nanomateriales).

Se emplearon dos tipos de nanoestructuraciones, de tipo orgánico (nanotubos de carbono) y de tipo inorgánico (nanopartículas de oro).

Para ello, se emplearon disoluciones coloidales de nanopartículas de oro (AuNPs) de 50 nm de diámetro, y dispersiones de nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs). Para la nanoestructuración con nanopartículas de oro se diluyó la disolución de nanopartículas 1:10 con agua en un *eppendorf*, después, se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 2 minutos para su completa dispersión. Se depositaron cuidadosamente sobre el electrodo (y cubriendo uniformemente toda su superficie) $10 \mu\text{l}$ de la suspensión con micropipeta. Finalmente se dejó evaporar durante 24 h. a temperatura ambiente, con lo que las AuNPs quedaron fuertemente adheridas al GCE.

Para el depósito de los MWCNTs, en primer lugar, se preparó una disolución 1:1 (v/v) de dimetilformamida (DMF): agua, y en ella se dispersaron 0.5 mg de nanotubos de carbono. La dispersión se sometió a ultrasonidos inmediatamente antes de cada uso (2 min.). Se depositaron $10 \mu\text{l}$ uniformemente sobre la superficie del GCE y se dejó evaporar al aire 24h. a temperatura ambiente.

4.3.4.- TRATAMIENTO DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Para el tratamiento de los datos numéricos se empleó el software Excel® 2017 mientras que, para el control de los experimentos electroquímicos, así como para la visualización de los voltagramas obtenidos se ha utilizado el programa NOVA 2.1.4 2018 de Metrohm Autolab.

5.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1.- INFLUENCIA DEL PULIDO Y EL PH

Se muestran en la fig. 16 los voltagramas anódicos DPV de una disolución de AZT XX mM en los tres pHs indicados anteriormente, en disoluciones tampón Britton-Robinson. En ellos se muestran picos de corriente debidos a la oxidación de las moléculas de AZT, si bien a valores distintos de E_p en función del estado de protonización de la molécula. De acuerdo con los resultados consultados en la bibliografía, esta molécula tiene grupos funcionales amino que proporcionan picos de oxidación voltamétricos. No así en barridos catódicos, en los que no se observó ningún aumento de la corriente en los voltagramas que se midieron entre $E_i=0$ y $E_f=-1,3$ V, por lo que la AZT es inactiva electroquímicamente en su reducción electroquímica.

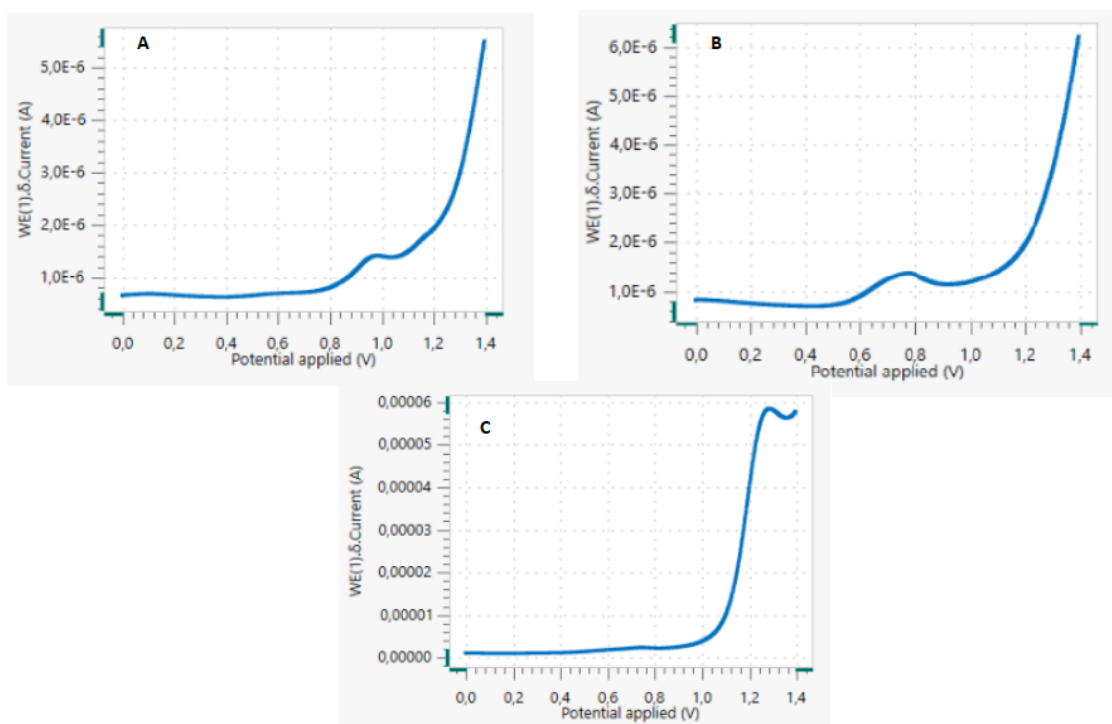


Figura 16.- DPV de AZT 1mM en tampón Britton-Robinson a pH 5 (A), pH 9 (B) y pH 12 (C)

Como puede observarse, el pico de oxidación aparece alrededor de +0.8 V para los dos valores más pequeños de pH, coincidente con los trabajos comentados anteriormente. Sin embargo, a pH 12 el pico se desplaza hasta +1.2 V y no aparece tan bien definido como en los otros casos, al dificultarse la oxidación de la molécula a pHs por encima del pK₂ (variación del E_p a mayores valores).

pH 5 DPV		
Posición del pico (V)	Altura (A)	Área (cu)
0,96207	2,27E-07	2,56E-08
pH 9 DPV		
Posición del pico (V)	Altura (A)	Área (cu)
0,76172	4,06E-07	8,02E-08
pH 12 DPV		
Posición del pico (V)	Altura (A)	Área (cu)
1,2517	2,12E-05	2,91E-06

Tabla 6.- Resultados numéricos de os picos obtenidos para los distintos valores de pH

Por esta razón, se decidió trabajar a pH 7 ya que, menos a valores muy básicos, no se observan grandes diferencias en el pico obtenido y es el valor que ofrece un tampón fosfato cuya señal de blanco es la mejor obtenida en el laboratorio. Para las pruebas a distintos pH se utilizó Britton-Robinson por su facilidad para variar su valor de pH (añadiendo hidróxido de sodio hasta llegar al valor deseado).

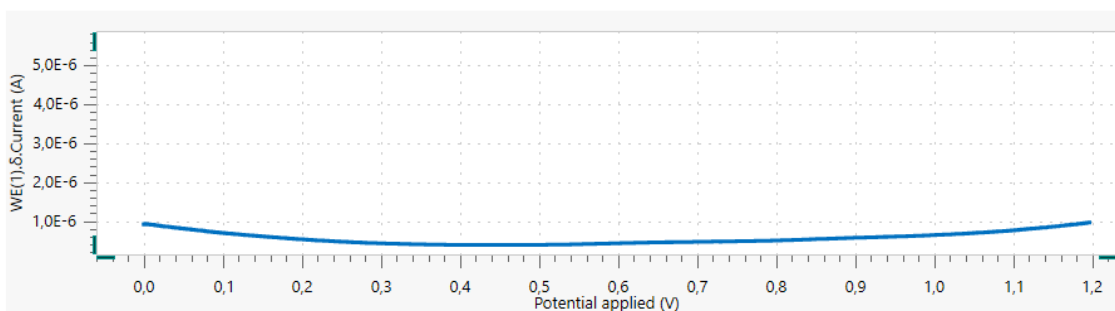


Figura 17.- Señal obtenida del blanco para una DPV del tampón fosfato a pH 7

Para el tampón fosfato (disolución blanco) no se observó ningún pico en toda la amplitud del voltograma DPV (desde 0 a +1.2 V) por lo que se decidió realizar el calibrado con este tampón para regular el pH de los patrones. Al mismo pH=7, no se observaron diferencias de sensibilidad en la cuantificación de la AZT empleando uno u otro tipo de disolución reguladora de pH (tampón BR y fosfato).

En cuanto a la influencia del pulido del GCE en la altura de los picos voltamétricos, se midieron voltagramas repetidos de la misma concentración de AZT con electrodos GCE lavados y pulidos (empleando Al_2O_3 de 5 μm de diámetro), y con electrodos GCE solamente lavados con agua y sin pulir. En la fig. 18 se muestran los voltagramas obtenidos.

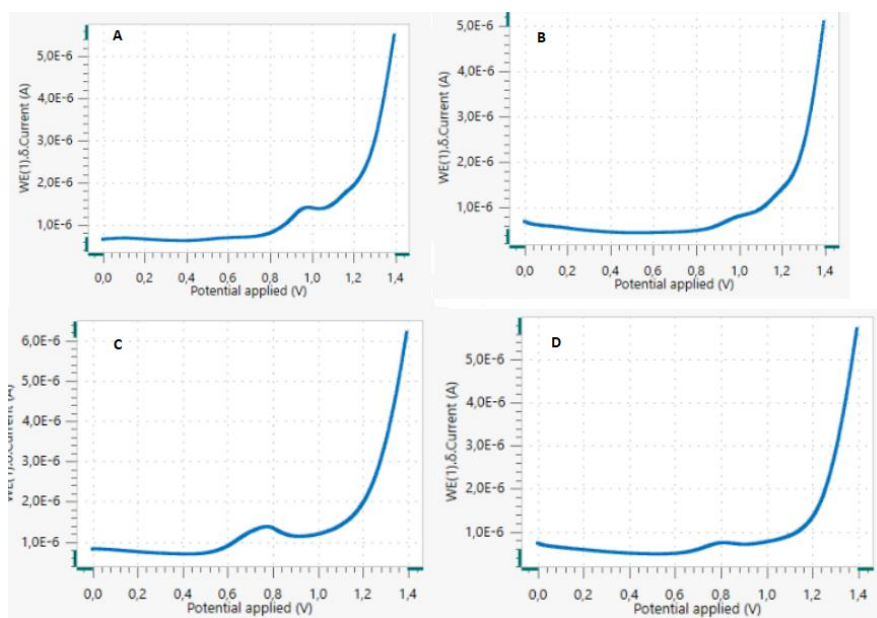


Figura 18.- Voltamperogramas de la azitromicina (0.1 mM) medida a pH 5 (A y B) y pH 9 (C y D) con el electrodo recién pulido (A y C) y sin pulir (B y D)

pH 5 DPV			
	Posición del pico (V)	Altura (A)	Área (cu)
Pulido	0,96207	2,27E-07	2,56E-08
Sin pulir	x	x	x
pH 9 DPV			
	Posición del pico (V)	Altura (A)	Área (cu)
Pulido	0,76172	4,06E-07	8,02E-08
Sin pulir	0,79941	1,19E-07	1,66E-08
pH 12 DPV			
	Posición del pico (V)	Altura (A)	Área (cu)
Pulido	1,2517	2,12E-05	2,91E-06
Sin pulir	1,2299	2,04E-05	3,40E-06

Tabla 7.- Comparación entre las características de los picos obtenidos con el electrodo recién pulido y sin pulir.

Se observa que lo óptimo es el pulido siempre después de cada medida ya que, por ejemplo, a pH=5 no se llega ni a observar el pico cuando se mide con el electrodo sin pulir y a pH=9 el área del pico voltamétrico observado es 5 veces mayor, y la altura se multiplica por 4. Debido a todo esto, el calibrado se realizó con el tampón fosfato, a pH 7 y puliendo el electrodo siempre antes de realizar una medida DPV.

5.2.- CURVA DE CALIBRADO CON ELECTRODOS GCE SIN MODIFICAR

Las medidas de los picos de oxidación obtenidos en el calibrado con electrodos GCE sin modificar se resumen en la Tabla 8. Los datos indicados son el valor medio de 3 medidas repetitivas independientes:

Patrón	Conc (mM)	Posición media (V)	Altura media (A)	Área media (cu)
1	1	0,863546667	3,72E-06	8,22E-07
2	0,5	0,857596667	1,99E-06	4,32E-07
3	0,2	0,80007	9,03E-07	1,38E-07
4	0,1	0,804696667	4,06E-07	5,97E-08
5	0,05	0,754443333	2,43E-07	3,22E-08

Tabla 8.- Posición, altura y área de los picos obtenidos para cada patrón en la realización de la recta de calibrado.

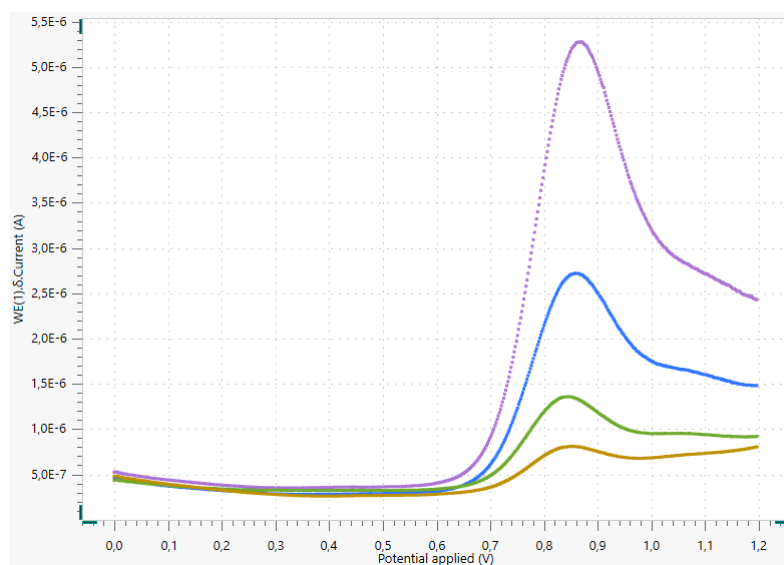


Figura 19.- Perfil de los voltamperogramas obtenidos en el calibrado. Patrón 1 (1 mM, línea morada), patrón 2 (0.5 mM, línea azul), patrón 3 (0.2 mM, línea verde), patrón 4 (0.1 mM, línea amarilla)

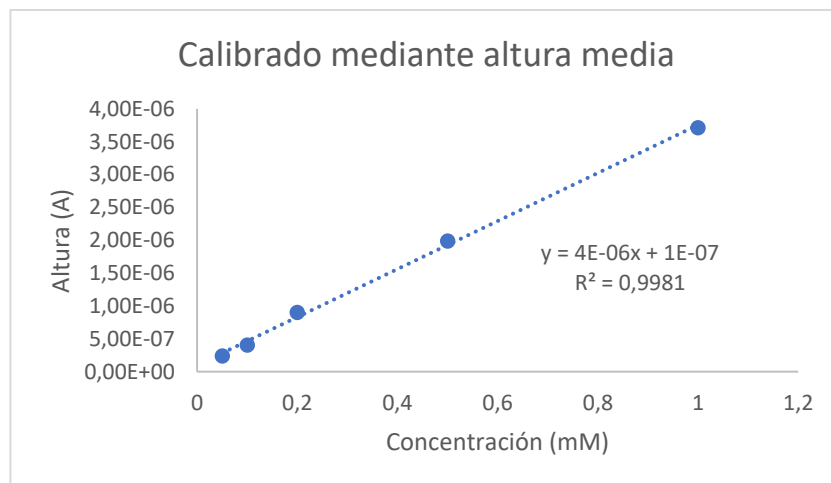


Figura 20.- Recta de calibrado obtenida mediante la altura media (3 mediciones por patrón) frente a la concentración de azitromicina.

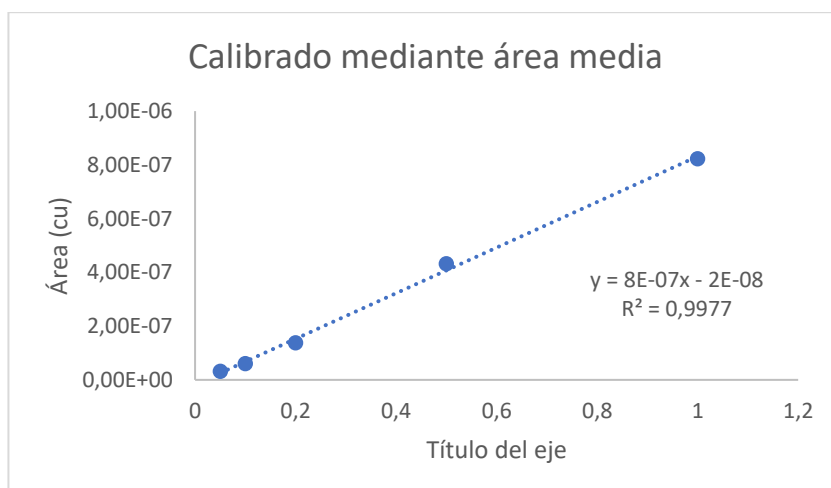


Figura 21.- Recta de calibrado obtenida mediante el área media (3 mediciones por patrón) frente a la concentración de azitromicina.

5.3.- VOLTAGRAMAS DE LA AZT CON ELECTRODOS GCE NANOESTRUCTURADOS

Los resultados para la nanoestructuración con nanopartículas de oro son los siguientes:

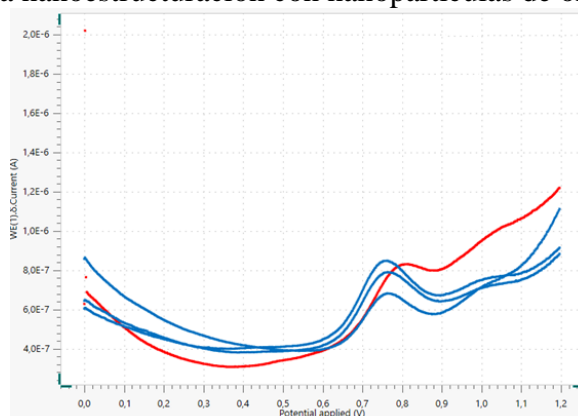


Figura 22.- DPV de azitromicina 0.05 mM en electrodos pulidos de carbono vítreo (líneas azules) y en electrodo nanoestructurado con nanopartículas de oro (línea roja)

<u>Sin nanoestructuración</u>		<u>Con nanoestructuración</u>	
Altura (A)	Área (cu)	Altura (A)	Área (cu)
1,84E-07	2,22E-08	1,76E-07	2,14E-08
2,85E-07	3,84E-08		
2,59E-07	3,61E-08		

Tabla 9.- Características numéricas del pico de azitromicina observado en DPV en la nanoestructuración con nanopartículas de oro.

Los voltagramas medidos de la AZT en PBS (pH=7) con electrodos GCE modificados con CNTs se muestran en la Fig. 23.

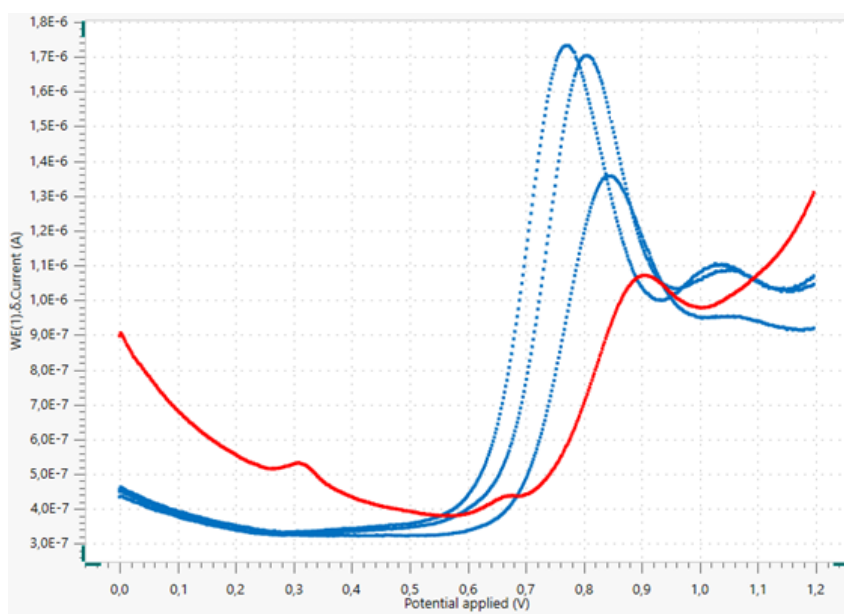


Figura 23.- DPV de azitromicina 0.2 mM en electrodos pulidos de carbono vítreo (líneas azules) y en electrodo nanoestructurado con nanotubos de carbono (línea roja)

<u>Sin nanoestructuración</u>		<u>Con nanoestructuración</u>	
Altura (A)	Área (cu)	Altura (A)	Área (cu)
6,95E-07	1,09E-07	3,28E-07	4,98E-08
1,03E-06	1,57E-07		
9,83E-07	1,47E-07		

Figura 24.- Características numéricas del pico de azitromicina observado en DPV en la nanoestructuración con nanotubos de carbono.

En ambos casos ocurre lo mismo, los picos que se obtienen con el GCE nanoestructurado son peores que cuando se han realizado las medidas voltamétricas únicamente puliendo el electrodo ya que tanto el área como la altura de los picos voltamétricos decrecen. A esto hay que sumar otra desventaja que es el tiempo necesario para la nanoestructuración (evaporación del disolvente) y que para que sea reproducible solamente se puede tener en cuenta la primera medida realizada con cada electrodo.

6.- CONCLUSIONES

- Se han obtenido unas **condiciones experimentales óptimas** (pH, tratamiento y tipo de electrodo de trabajo, condiciones de trabajo electroquímicas...) para la cuantificación del antibiótico de amplio espectro, la azitromicina.
- Las **condiciones óptimas** encontradas para la determinación de la AZT incluyeron el uso de la voltametría diferencial de pulsos, que mejora los límites de detección y la sensibilidad al eliminar la corriente capacitativa no faradaica. Solamente es posible la oxidación de la AZT, y no su reducción electroquímica con los electrodos de trabajo empleados (carbono vítreo y modificaciones de su superficie con nanopartículas de oro y nanotubos de carbono). El pH óptimo de trabajo fue a pH neutro de 7, que se encuentra antes de pK1 y pK2 de la molécula de AZT.
- Se ha realizado un **calibrado** de AZT empleando DPV, en condiciones óptimas de trabajo, con el cual es posible obtener la concentración de una muestra problema de concentración desconocida, en el intervalo de concentraciones 0.05 – 1 M ($R > 0,9971$).
- Al objeto de mejorar la sensibilidad electrocatalítica, se estudió la modificación del electrodo de carbono vítreo llevando a cabo su modificación con **nanomateriales** de tipo orgánico e inorgánico. Sin embargo, tanto con nanopartículas de oro como con nanotubos de carbono las medidas de los picos voltamétricos fueron más pequeñas que con el electrodo sin modificar. Por otro lado, esta modificación no permite la regeneración rápida del electrodo de trabajo de trabajo, además de consumir tiempo en su preparación (24 h. para la evaporación no forzada del disolvente empleado).
- Una posible mejora a la **nanoestructuración** podría haberse conseguido mediante el entrapamiento de las nanoestructuras (sobre todo de los nanotubos de carbono, más afines al antibiótico) con ayuda de algún polímero, incluso de tipo inorgánico, como por ejemplo el nafión. Sin embargo, este objetivo de trabajo experimental no pudo realizarse por el motivo indicado.

- Si bien se ha trabajado experimentalmente en el laboratorio en un inicio, no ha podido acabarse este trabajo de laboratorio para los **objetivos** planteados inicialmente con este TFM, debido al estado de alarma y confinamiento por la crisis sanitaria del COVID-19 que se produjo a mediados de marzo de 2020. Para completar el TFM, se compararon los resultados experimentales obtenidos con la búsqueda y resultados de trabajos relevantes en los que se llevó a cabo la determinación voltamétrica de la AZT con distintas condiciones y tipos de electrodos de trabajo.
- Como se ha visto en esta **revisión bibliográfica**, ya existen bastantes trabajos en los que se ha determinado voltaméricamente la AZT. Las diferencias entre ellos y con nuestro trabajo experimental consiste en distintas condiciones de medida y modificación de los electrodos de trabajo. A lo largo de esta parte de la memoria TFM se comentan y comparan las propiedades analíticas descritas de 5 trabajos escogidos como más relevantes e importantes.
- La diferencia más importante de nuestro **trabajo experimental** con los resultados y conclusiones de los trabajos de la bibliografía comparados es que el método que proponemos es muy rápido (las medidas pueden llevarse a cabo en pocos minutos), y la sensibilidad obtenida es alta, suficiente para intervalos de concentraciones clínicas normales en muestras biológicas. No obstante, este método que proponemos puede mejorarse con un mayor trabajo experimental, y su aplicación en muestras biológicas debe de optimizarse para evitar la interferencia de los componentes de la matriz en este tipo de muestras, lo que podría llevarse a cabo con la simple regeneración del electrodo de trabajo que hemos empleado.

7.- BIBLIOGRAFÍA

[1] Hu, L., Zhou, T., Feng, J., Jin, H., Tao, Y., Luo, D., et al. (2018). A rapid and sensitive molecular imprinted electrochemiluminescence sensor for azithromycin determination in biological samples. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 83, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.02.010>

- [2] <https://www.wipo.int/ipadvantage/en/details.jsp?id=906> «Azithromycin: A world best-selling Antibiotic». www.wipo.int (en inglés). Consultado el 7 de agosto de 2020.
- [3] Ensafi, A.A., Allafchian, A.R., Rezaei, B., (2013). A sensitive and selective voltammetric sensor based on multiwall carbon nanotubes decorated with MgCr₂O₄ for the determination of azithromycin Colloids Surf. B Biointerfaces 103, 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.021>.
- [4] Z. Mandic, Z. Weitner, M. Ilijas, (2003). Electrochemical oxidation of azithromycin and its derivatives, J. Pharm. Biomed. Anal. 33 647–654. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00315-7](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00315-7)
- [5] Chavada, Vijay & Bhatt, Nejal & Sanyal, Mallika & S, Shrivastav. (2018). Simultaneous determination of azithromycin and levofloxacin in pharmaceuticals by charge transfer complexation with alizarin red S using an absorption-factor method. TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY. 42. 36-49. [10.3906/kim-1703-79](https://doi.org/10.3906/kim-1703-79).
- [6] Sun L, et al., (2014), Preparation and evaluation of sustained-release azithromycin tablets in vitro and in vivo, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.03.003>
- [7] Sinha, Neeraj & Balayla, Galit. (2020). Hydroxychloroquine and COVID-19. Postgraduate Medical Journal. 96. postgradmedj-2020. [10.1136/postgradmedj-2020-137785](https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-137785).
- [8] Arif Jamal Siddiqui , Sadaf Jahan , Syed Amir Ashraf , Mousa Alreshidi , Mohammad Saquib Ashraf , Mitesh Patel , Mejdi Snoussi , Ritu Singh & Mohd Adnan (2020): Current status and strategic possibilities on potential use of combinational drug therapy against COVID-19 caused by SARS-CoV-2, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, DOI: [10.1080/07391102.2020.1802345](https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1802345)
- [9] J. Sastre Toraño, H. -J. Guchelaar, Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high - performance liquid chromatography using pre -column derivatization with 9 - fluorenylmethyloxycarbonyl chloride and fluorescence detection, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 720 (1998) 89. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00456-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00456-3)
- [10] R. Shepard, G. Duthu, R. Ferraina, M. Mullins, High-performance liquid chromatographic assay with electrochemical detection for azithromycin in serum and tissues, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 565 (1–2) (1991) 321–337. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(91\)80393-Q](https://doi.org/10.1016/0378-4347(91)80393-Q)
- [11] Grujić, Svetlana & Vasiljević, Tatjana & Laušević, Mila. (2009). Determination of Multiple Pharmaceutical Classes in Surface and Ground Waters by Liquid Chromatography-Ion-Trap-Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A. 1216. 4989-5000. [10.1016/j.chroma.2009.04.059](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.059).
- [12] Santos, Lúcia & Gros, Meritxell & Rodríguez-Mozaz, Sara & Delerue-Matos, Cristina & Pena, Angelina & Barcelo, Damia & Montenegro, Maria. (2013). Contribution

of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *The Science of the total environment*. 461-462C. 302-316. [10.1016/j.scitotenv.2013.04.077](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077).

[13] Nigović B. (2004). Adsorptive stripping voltammetric determination of azithromycin at a glassy carbon electrode modified by electrochemical oxidation. *Anal Sci*; 20(4):639-643. [doi:10.2116/analsci.20.639](https://doi.org/10.2116/analsci.20.639)

[14] Peng JY, Hou CT, Liu XX, Li HB, Hu XY. (2011) Electrochemical behavior of azithromycin at graphene and ionic liquid composite film modified electrode. *Talanta*; 86:227-232. DOI: [10.1016/j.talanta.2011.09.005](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.09.005).

[15] Ivić, M. & Petrović, S. & Mijin, D. & Živković, P. & Kosović, I. & Drljević, K. & Jovanović, M.. (2006). Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and Hemomycin ® at gold electrode in neutral electrolyte. *Electrochimica Acta - ELECTROCHIM ACTA*. 51. 2407-2416. [10.1016/j.electacta.2005.07.032](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.07.032).

GLOSARIO:

AuNPs: Nanopartículas de oro

CV: Voltametría cíclica

DPV: Voltametría de pulso diferencial

AZT: Azitromicina

GCE: Electrodo de carbono vítreo

HPLC: Cromatografía líquida de altas prestaciones

LC: Cromatografía líquida

ERY: Eritromicina

MAA: Ácido metacrílico

EGDMA: Etilenglicol dimetacrilato

AIBN: 2,2-azobisisobutironitrilo

MWCNTs: Nanotubos de carbono mltipared

PBS: Disolución de tampón fosfato