



|                                                               |                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Universidad:</b>                                           | UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE                                                                                                 |
| <b>Facultad/Centro/Instituto:</b>                             | FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y AGRIMENSURA / LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA INSTRUMENTAL                            |
| <b>Autor/es:</b>                                              | Mario Raul Delfino<br>Laura Asturias Arribas                                                                                      |
| <b>Director/es:</b>                                           | María Julia Arcos Martinez                                                                                                        |
| <b>Título del trabajo:</b>                                    | Desarrollo de un Sensor Electroquímico con Nanotubos de Carbono para la Determinación Voltamétrica del Antirretroviral Nelfinavir |
| <b>Núcleo Disciplinario / Comité Académico / Otros temas:</b> | QUIMICA                                                                                                                           |
| <b>Dirección electrónica:</b>                                 | mariodelfino@exa.unne.edu.ar                                                                                                      |
| <b>Palabras claves:</b>                                       | antirretroviral, nelfinavir, voltametría de onda cuadrada, sensor electroquímico                                                  |

El nelfinavir (NFV) es un antirretroviral perteneciente al grupo de los inhibidores de proteasa que se suministra a pacientes pediátricos para el tratamiento del SIDA. Todavía no se estableció una metodología oficial para su determinación en comprimidos pero la USP propone como método de referencia HPLC-UV. El objetivo del presente trabajo fue proponer un método electroquímico para la determinación de NFV en comprimidos. Se desarrolló un electrodo serigrafiado descartable, cuyo electrodo de trabajo fue modificado con nanotubos de carbono (NTC). El análisis se realizó mediante voltametría de onda cuadrada (VOC), y se optimizaron las variables pH del medio, tiempo y potencial de acumulación. Se realizaron estudios para caracterizar el electrodo y la metodología de trabajo. La determinación de NFV resultó lineal en el rango de concentraciones de 10 a 120  $\mu\text{M}$ . El coeficiente de variación entre electrodos fue de 5,05% ( $n=5$ ). La capacidad de detección (para  $\alpha = \beta = 0,05$ ) fue de  $10.99 \pm 0,87$  mg. Debido a que la molécula de NFV no fue estudiada electroquímicamente en profundidad se realizaron los ensayos para proponer un mecanismo de oxidación de NFV sobre NTC. Estos, permitieron inferir que el proceso de oxidación ocurre en el oxidrilo fenólico de la molécula de NFV, y que en el proceso participan un electrón y un protón. Las muestras de comprimidos analizadas contenían  $249,26 \pm 2,92$  mg ( $n = 5$ ,  $\alpha = 0,05$ ) para los comprimidos comerciales. Se comparó el método con uno de referencia mediante las pruebas F y t. Los resultados fueron satisfactorios, ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos, para un nivel de confianza del 95%. No se necesitaron pretratamientos previos al procedimiento de medida.



## 12. Química

### **DESARROLLO DE UN SENSOR ELECTROQUÍMICO CON NANOTUBOS DE CARBONO PARA LA DETERMINACIÓN VOLTAMÉTRICA DEL ANTIRRETROVIRAL NELFINAVIR**

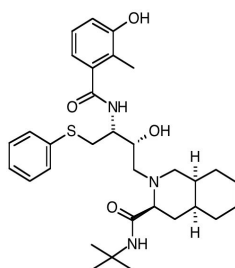
-Delfino, Mario Raúl (h); Asturias Arribas, Laura; Arcos Martínez, María Julia

- mariodelfino@exa.unne.edu.ar; lasturias@ubu.es; jarcos@ubu.es

-Palabras claves: antirretroviral, nelfinavir, voltametría de onda cuadrada, sensor electroquímico.

#### **-INTRODUCCIÓN:**

Durante los últimos años, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ha sido la principal causa de muerte referida a enfermedades infecciosas en el mundo y se estima que 34 millones de personas conviven con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en todo el globo. Además, se calcula que cada año ocurren 2,5 millones de infecciones nuevas, de las cuales al menos el 10% corresponden a niños [1]. A pesar del esfuerzo y las iniciativas para evitar la transmisión madre-hijo, sólo un tercio de los niños infectados recibe algún tipo de tratamiento [2]. El mismo, denominado Terapia Antirretroviral Altamente Activa consiste en la administración oral diaria de un conjunto de varias drogas antirretrovirales (ARV). El Nelfinavir (NFV, Fig.1) es una droga perteneciente al grupo de los Inhibidores de Proteasa, y es el más utilizado, para tratamientos pediátricos.



**Fig. 1:** Estructura química del nelfinavir ( $C_{32}H_{45}N_3O_4S$ , PM 567,78)

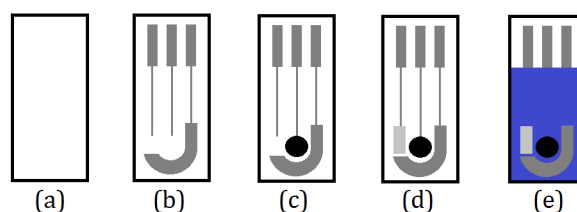
Se han reportado varios métodos para la determinación de NFV, pero la mayoría de ellos utilizan técnicas cromatográficas complejas. Todas estas metodologías incluyen una instrumentación muy costosa y pretratamientos, como extracciones en fase sólida, que incrementan los tiempos de análisis y la manipulación de las muestras, lo que puede conducir a errores y contaminación. Hasta la fecha, no se han descrito métodos electroquímicos para la determinación de NFV. Estos métodos presentan importantes ventajas, como su alta sensibilidad, bajos límites de detección, respuesta rápida, relativa simpleza y bajo costo de equipamiento [3]. Los electrodos serigrafiados (ES) han hecho posible la producción en masa de electrodos descartables para su utilización en instrumentos electroquímicos portátiles y de bajo costo. La versatilidad de los ES reside en su amplio rango de posibles modificaciones [4-6].

El objetivo del presente trabajo consistió en diseñar, optimizar, validar y proponer un método electroquímico para la cuantificación de NFV en formulaciones farmacéuticas comerciales y en muestras biológicas, utilizando ES modificados con nanotubos de carbono (NTC).



## **-MATERIALES Y MÉTODOS:**

Los ES utilizados fueron construidos en el laboratorio mediante la deposición secuencial de las diferentes tintas comerciales sobre placas poliméricas, seguidas por un proceso de curado que consistió en colocar las placas en estufa a 60 °C durante 90' [7]. Se construyeron dispositivos con arreglos de 3 electrodos (de trabajo, de referencia e indicador), todos de 12,6 mm<sup>2</sup> de superficie. Para ello se siguieron los procedimientos descritos en los trabajos de Arcos Martínez y colaboradores (Fig. 2) [8-10].



**Fig. 2:** Construcción de los electrodos serigraviados: (a) placa polimérica limpia, lista para imprimir; (b) con tinta de carbono platinizado se establecen los conectores, las vías y el electrodo auxiliar; (c) se imprime el electrodo de trabajo con tinta de carbono; (d) se imprime el electrodo de referencia con tinta de Ag/AgCl; por último (e) se aplica la tinta aislante.

Para la modificación de la superficie de los electrodos de trabajo se preparó una dispersión de NTC en dimetilformamida 3 mg/mL en un tubo eppendorf. Se agitó vigorosamente y se sonicó durante 150'. Luego se tomaron 5 µL, se depositaron sobre los electrodos de trabajo y se dejó reposar a temperatura ambiente bajo campana hasta la evaporación del solvente (3 h aprox.).

Las mediciones se realizaron mediante voltametría de onda cuadrada (VOC) en una celda electroquímica conteniendo 5 mL de solución de electrolito soporte al



pH seleccionado (KCl 100 mM en solución buffer fosfato 50 mM). Los parámetros experimentales fueron: potencial aplicado, +0,5 a +1,5 V; frecuencia, 25 Hz; salto de potencial, 12 mV; y amplitud, 25 mV. Adicionalmente, se optimizó el proceso de acumulación, que resultó en la aplicación de +200 mV (contra Ag/AgCl) durante 50'' bajo agitación, y 10'' de reposo previo a la VOC. Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente.

Para el análisis cromatográfico se utilizó HPLC-UV a 225 nm; flujo de 1,0 mL/min, modo isocrático y columna RP-C18 de 15 × 4,6 mm. El volumen de inyección fue 20 µL. La fase móvil consistió en una mezcla de dimetilamina 0,05% p/v disuelta en acetato de amonio 10 mM, metanol y acetonitrilo en una proporción 35:20:45, respectivamente. El estándar consistió en solución 0,3 mg/mL de NFV disuelto en fase móvil. Para la muestra, se pesó una cantidad adecuada de pool de comprimidos tal que permita preparar una solución aproximada de 0,3 mg/mL de NFV. Se agito 10' y una porción de la misma se centrifugó a 2000 rpm durante 10'. El sobrenadante fue inyectado directamente en el cromatógrafo.

## **-RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

### **Optimización**

La respuesta electroquímica del NFV es función del pH de la solución y del proceso de acumulación. A fin de obtener una buena señal analítica que permita la cuantificación de NFV, las variables: pH, tiempo de acumulación ( $t_{ac}$ ) y potencial de acumulación ( $E_{ac}$ ), fueron optimizadas mediante diseño experimental. Los datos obtenidos fueron procesados con Statgraphic Plus. Se realizó un diseño central



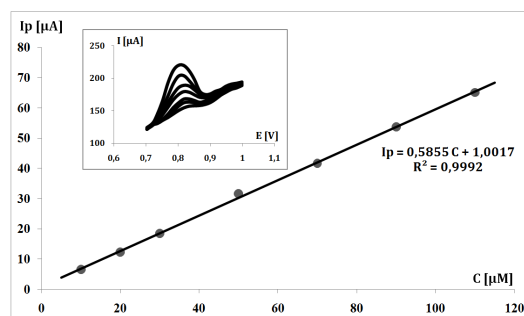
compuesto 23, que permitió analizar 5 niveles de cada una de las 3 variables de influencia. Se seleccionaron dos niveles para cada variable: alto (+) y bajo (−). Luego, se realizaron 17 experimentos correspondientes a las posibles combinaciones.

|                                |                             |                     |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| $E_{ac} (+) = +300 \text{ mV}$ | $t_{ac} (+) = 90 \text{ s}$ | $\text{pH} (+) = 4$ |
| $E_{ac} (-) = +100 \text{ mV}$ | $t_{ac} (-) = 30 \text{ s}$ | $\text{pH} (-) = 2$ |
| $E_{ac} (0) = +200 \text{ mV}$ | $t_{ac} (0) = 60 \text{ s}$ | $\text{pH} (0) = 3$ |

Los valores óptimos obtenidos a partir del diseño experimental fueron  $E_{ac} = +200 \text{ mV}$ ;  $t_{ac} = 50 \text{ s}$ ; y  $\text{pH} = 2$ .

### Linealidad, precisión y capacidad de detección

Se registraron varias curvas de calibrado en el rango de 10 a 110  $\mu\text{M}$  de NFV en condiciones óptimas (Fig.3). Los datos que no se ajustaban correctamente fueron descartados mediante el programa PROGRESS, que evalúa la presencia de puntos anómalos utilizando regresión de mínimos cuadrados de las medianas [11].



**Fig. 3:** Curva de calibrado para la determinación de NFV por VOC con ES/NTC. Inserto, voltamogramas para diferentes concentraciones de NFV en condiciones óptimas.



Para estimar la reproducibilidad de los electrodos desarrollados, en términos de coeficiente de variación (CV), se utilizaron las pendientes de las curvas de regresión. La reproducibilidad obtenida fue de 5,05% ( $n = 5$ ) para un rango lineal de 10 a 110  $\mu\text{M}$ .

Para la repetibilidad se llevó a cabo el mismo procedimiento que para la reproducibilidad, pero utilizando un mismo electrodo. Se observó que no resultaba posible realizar más de una curva de calibrado con el mismo electrodo, posiblemente debido a la adsorción del producto oxidado de NFV en la superficie del electrodo de trabajo, disminuyendo considerablemente la sensibilidad del mismo. De todas maneras, este hecho no resultó significativo debido a la naturaleza descartable del dispositivo y a su buena reproducibilidad.

La capacidad de detección fue calculada para una probabilidad de falso positivo ( $\alpha$ ) y falso negativo ( $\beta$ ). La mínima concentración detectada para  $\alpha=\beta=0,05$  fue de  $10,99 \pm 0,87 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ).

### **Aplicación del método a muestras de orina y de comprimidos comerciales**

Para la cuantificación de NFV en muestras de orina y de comprimidos comerciales se utilizaron los métodos de adición estándar y curva de calibrado, respectivamente, mediante VOC con los electrodos desarrollados.

Para los comprimidos de Viracept<sup>®</sup>, la cantidad de NFV encontrada fue de  $249,26 \pm 2,92 \text{ mg/comp}$  ( $n = 5$ ,  $\alpha = 0,05$ ). Esta cantidad es acorde con los valores rotulados por el laboratorio farmacéutico, y los valores de tolerancia concuerdan con los establecidos por el compendio médico de la USP ( $\pm 10\%$  del valor declarado).



Para comprobar la robustez del método propuesto se realizaron cinco determinaciones por VOC y HPLC. Los resultados de ambos métodos (propuesto y de referencia) se compararon mediante una prueba F para precisión y prueba t para las medias. Estadísticamente, no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos para un nivel de confianza del 95%.

El análisis de NFV en muestras de orina provenientes de individuos sanos se realizó mediante sobreagregado de cantidades establecidas de la droga en orina. Estos ensayos fueron realizados en dos niveles de concentración, de 40 y 50  $\mu\text{M}$ , realizando tres replicas por cada nivel. Los resultados obtenidos, en términos de porcentaje de recuperación, fueron 99,7 – 100,6 %.

### **-CONCLUSIONES:**

El uso de un sensor basado en un electrodo de trabajo de carbono modificado con nanotubos de carbono permitió la determinación voltamétrica de NFV en muestras de orina y de comprimidos comerciales. Se logró la optimización de las principales variables experimentales mediante un diseño central compuesto, que incluyó la interacción entre variables. De esta manera, la señal voltamétrica obtenida resultó óptima. La reproducibilidad de los electrodos fue satisfactoria. Se propuso un mecanismo de oxidación del NFV basado en la oxidación del grupo fenólico de la molécula, en el cual participan un electrón y un protón. No fueron necesarios tratamientos previos al procedimiento de medida.





## **-BIBLIOGRAFÍA:**

- [1] Doherty, M.; Ford, N.; Victoria, M.; Weiler, G.; Hirnschall, G. Curr Opin HIV AIDS, 8 (2013) 528-534.
- [2] Chiappini, E.; Berti, E.; Giancesin, K.; Petrara, M.R.; Galli, L.; Giaquinto, C.; de Martino, M.; De Rossi, A. Cancer Lett, 347 (2014) 38-45.
- [3] Zhu, Y.; Zeng, G.; Zhang, Y.; Tang, L.; Chen, J.; Cheng, M.; Zhang, L.; He, L.; Guo, Y.; He, X.; Lai, M.; He, Y. Analyst, 139 (2014) 5014-5020.
- [4] Molinero Abad, B.; Alonso Lomillo, M.A.; Domínguez Renedo, O.; Arcos Martínez, M.J. Anal Chim Acta, 812 (2014) 41-44.
- [5] Asturias Arribas, L.; Alonso Lomillo, M.A.; Domínguez Renedo, O.; Arcos Martínez, M.J. Anal Chim Acta, 834 (2014) 30-36.
- [6] Calvo Pérez, A.; Domínguez Renedo, O.; Alonso Lomillo, M.A.; Arcos Martínez, M.J. Anal Chim Acta, 833 (2014) 15-21.
- [7] Domínguez Renedo, O.; Arcos-Martínez, M.J. Anal Chim Acta, 589 (2007) 255-260.
- [8] Alonso Lomillo, M.A.; Yardimci, C.; Domínguez Renedo, O.; Arcos-Martínez, M.J. Anal Chim Acta, 633 (2009) 51-56.
- [9] del Torno de Román, L.; Alonso Lomillo, M.A.; Domínguez Renedo, O.; Arcos Martínez, M.J. Sensor Actuat B-Chem, 176 (2013) 858-862.
- [10] del Torno de Román, L.; Alonso Lomillo, M.A.; Domínguez Renedo, O.; Merino Sánchez, C.; Merino Amayuelas, M.P.; Arcos Martínez, M.J. Talanta, 86 (2011) 324-328.
- [11] P.J. Rousseeuw, A.M. Leroy, Robust Regression and Outlier Detection. Wiley, New York, 1989.