

Análisis Voltamétrico para la cuantificación de Aciclovir

Carolina Ordóñez Huertas

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Química

Programa de Química con énfasis en bioquímica

2017

Análisis Voltamétrico para la cuantificación de Aciclovir

Carolina Ordóñez Huertas

Alonso Jaramillo A., Ph. D.
Director

Giovanni Rojas, Ph. D.
Codirector

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Química

Programa de Química con énfasis en bioquímica

2017



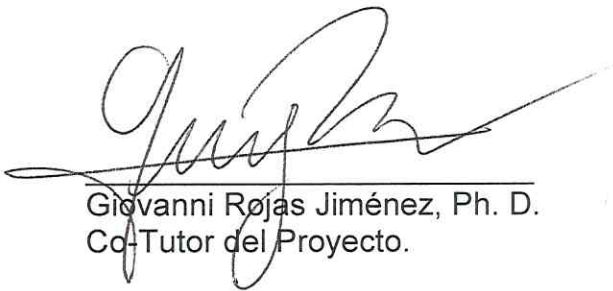
APROBADO POR:



Carlos A Arango Mambuscay, Ph. D.
Evaluador



Alonso E. Jaramillo Aguirre, Ph. D.
Tutor del Proyecto.



Giovanni Rojas Jiménez, Ph. D.
Co-Tutor del Proyecto.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible, todo su apoyo incondicional a lo largo de mi vida empieza a rendir frutos, juntos me educaron y me enseñaron a ser una mejor persona y una mejor estudiante día a día. A mi hermana por estar conmigo en los momentos más difíciles, alentándome a seguir adelante siendo perseverante y ayudándome a cumplir mis sueños, y a toda mi familia. A mis tutores Alonso Jaramillo y Giovanni Rojas, sin ellos nada de esto hubiera sido posible, gracias por todas sus enseñanzas, por su tiempo y por su paciencia para lograr este proyecto. A Harold Díaz por todo su apoyo y por todas sus enseñanzas. A la Universidad Icesi por haberme abierto las puertas para poder obtener mis conocimientos y crecer como científica. A mis profesores, que me brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante. Por último, quiero agradecer a mis amigas y amigos, que sin esperar nada a cambio, siempre estuvieron conmigo, apoyándome y ayudándome a crecer no sólo profesionalmente, sino también como persona en estos últimos años de mi vida, sin ustedes nada sería lo mismo.

Contenido

Contenido	4
Figuras	6
Gráficas	7
Tablas.....	8
1. Resumen del proyecto	9
2. Descripción del proyecto.....	10
2.1 Planteamiento del problema de investigación.....	10
2.2 Marco teórico	11
2.3 Objetivos	19
2.4 Metodología propuesta.....	20
2.4.1 Identificación del electrodo de trabajo.	20
2.4.2 Determinación de la frecuencia y la amplitud en voltametría de onda cuadrada y pH del medio.	20
2.4.3 Modificación del electrodo	22
2.4.4 Determinación de la concentración del electrolito de soporte, de aciclovir y de pirrol para la electropolimerización.....	22
2.4.5 Limpieza del electrodo	23
2.4.6 Cuantificación de Aciclovir en preparaciones farmacéuticas comerciales	25
2.4.7 Cálculo área del electrodo	25
2.5 Resultados y discusión.....	27
2.5.1 Identificación y caracterización del electrodo de trabajo.	27
2.5.2 Caracterización del proceso electrodo	30
2.5.3 Determinación de las condiciones óptimas para la cuantificación	33
2.5.4 Selección de las condiciones experimentales para electropolimerizar pirrol	35
2.5.5 Comparación entre electrodo desnudo, modificado con plantilla (MIP) y sin plantilla (NMIP).....	37
2.5.6 Límite de detección y de cuantificación, linealidad, repetibilidad y reproducibilidad	41
2.5.6 Cuantificación de Aciclovir en preparaciones farmacéuticas comerciales	42
2.6 Conclusiones.....	44

2.7 Recomendaciones.....	45
2.8 Referencias	46

Figuras

Figura 1 Estructura química de aciclovir	11
Figura 2 Esquema de una celda electroquímica para electropolimerización	17
Figura 3 Cronocoulombimetría.....	17
Figura 4 Estación de trabajo	20
Figura 5 Parámetros para a) Polimerización b) Sobreoxidación	22
Figura 6 Parámetros para limpieza electroquímica en buffer fosfato pH 7.0	24
Figura 7 Voltamograma cíclico de limpieza voltamétrica del electrodo de trabajo. 24	
Figura 8 Voltamograma cíclico con electrodo de oro.	27
Figura 9 Voltamograma cíclico con platino como electrodo de trabajo.....	28
Figura 10 Voltamograma cíclico empleando como electrodo de trabajo carbono vítreo.	29
Figura 11 Voltamogramas cíclicos de ferricianuro a diferentes velocidades de barrido.	32
Figura 12 Voltametría cíclica para ferricianuro después de polimerizar	36
Figura 13 Voltamograma electrodo desnudo, solución de aciclovir 10.0 μM	37
Figura 14 Voltamograma electrodo modificado con template de aciclovir 5.0 μM .37	
Figura 15 Comparación entre electrodo desnudo y modificado con plantilla.	38
Figura 16 Comparación entre electrodo modificado con y sin plantilla..	39
Figura 17 Esquema electropolimerización-sobreoxidación	39

Gráficas

Gráfica 1. a) corriente contra raíz cuadrada de la velocidad de barrido. b) Logaritmo de la corriente contra logaritmo de la velocidad de barrido	31
Gráfica 2. Determinación del área efectiva del electrodo de carbono vítreo.....	32
Gráfica 3. Determinación pH.....	33
Gráfica 4. Determinación de las variables para cuantificación de aciclovir por voltametría de onda cuadrada	34
Gráfica 5. Determinación de las mejores condiciones para electropolimerización	35
Gráfica 6. Curva de calibración.....	41
Gráfica 7. Curva de calibración por adición múltiple de estándar.....	43

Tablas

Tabla 1. Señal de excitación y respuesta electroquímica al aplicar una técnica voltamétrica en particular	14
Tabla 2. Valores de frecuencia y amplitud empleados en voltametría de onda cuadrada	21
Tabla 3. Valores empleados para la polimerización	23
Tabla 4. Resultados repetibilidad.....	42
Tabla 5. Resultados reproducibilidad	42
Tabla 6. Resultados peso tabletas	43

1. Resumen del proyecto

El consumo inadecuado de Aciclovir puede generar reacciones adversas en el organismo, por esto, es necesario disponer de una nueva técnica que permita su cuantificación de manera sensible y confiable en preparaciones farmacéuticas y biológicas. Esta investigación consistió en optimizar parámetros voltamétricos para la construcción de un electrodo químicamente modificado que permita la cuantificación de aciclovir.

Se encontró que el electrodo de trabajo es el de carbono vítreo, el cual se modificó por medio de cronocoulombimetría empleando una solución de perclorato de litio 0.10 M como electrolito de soporte, pirrol 20.0 mM como monómero para el polímero y aciclovir 3.0 mM como plantilla, posteriormente se sobreoxidó en una solución de hidróxido de sodio 0.10 M, esto permitió disminuir el límite de cuantificación.

Se determinó que la sensibilidad y la selectividad se mejoraron con el electrodo de carbono modificado con plantilla, comparado con el electrodo desnudo y el electrodo modificado sin plantilla. Las condiciones experimentales óptimas para el análisis cuantitativo fueron con un buffer acetato 0,10 M a pH 4.50; la amplitud y la frecuencia de para voltametría de onda cuadrada fueron de 40 mV y 50 Hz respectivamente. Se determinó un límite de detección de 1.67 μ M, y un límite de cuantificación de 5.0 μ M. Al cuantificar aciclovir en preparaciones farmacéuticas por medio de una curva de calibración por adición múltiple de estándar, empleando voltametría de onda cuadrada, se determinó una concentración en una preparación comercial de 206 ± 4.214 mg con error de 3.0%, teniendo en cuenta que la proclama del medicamento es de 200 mg

Este trabajo nos permitió evaluar y caracterizar un método de fácil aplicación, más rápido, menos costoso y que requiere personal menos especializado para las cuantificaciones de aciclovir.

Se recomienda, realizar estudios posteriores para lograr emplear el electrodo para la cuantificación de este fármaco y otros en muestras biológicas.

2. Descripción del proyecto

2.1 Planteamiento del problema de investigación

Actualmente, el uso no controlado de medicamentos es un problema común, muchos de éstos producen reacciones adversas cuando se exceden ciertos límites de consumo. El aciclovir es un fármaco antiviral que se usa en el tratamiento de las infecciones producidas por el virus varicela-zóster y el virus del herpes simple. Si su consumo es inadecuado, pueden presentarse reacciones adversas, por ejemplo, neurotoxicidad, urticaria, fleboglobina, diarrea y desmayo. Además, los pacientes con insuficiencia renal pueden agravar su condición, es por esto necesario lograr su cuantificación en orina y sangre. Comúnmente, para la determinación cuantitativa de aciclovir se usan técnicas como cromatografía, espectroscopia IR, espectrofotometría, electroquimioluminiscencia y espectrofluorimetría. Sin embargo, estas técnicas son laboriosas, costosas y requieren personal calificado y en algunos casos implican procedimientos demorados.

Con esta investigación nos queremos preguntar si ¿Existe algún otro método para cuantificar aciclovir que brinde bajos límites de detección, alta sensibilidad, reproducibilidad y selectividad? Se espera que este nuevo método sea electroquímico y emplee un electrodo químicamente modificado para él. Dicho método debe lograr los límites alcanzados ya por otros procedimientos y además debe ser selectivo, confiable, rápido, menos costoso y necesitar personal menos especializado.

2.2 Marco teórico

Aciclovir (acicloguanosina-9-carboximetoximetilguanina; figura 1) es el fármaco antiviral análogo de guanina más usado (Heli, Zarghan, Jabbari, Parsaei, & Moosavi-Movahedi, 2010). Es altamente efectivo *in vitro* en contra de los virus del herpes simple tipos 1 y 2 y el virus de la varicela zoster, se ha utilizado en infecciones por herpes simple en piel y mucosas. El Aciclovir se utiliza por sí solo o como ayudante en el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y en el complejo relacionado con SIDA, eccema herpético y hepatitis crónica. Se utiliza en la prevención de la infección clínica por el virus varicela zoster (varicela) en niños expuestos a pacientes con la enfermedad (Universidad Nacional Autónoma de México, n.d.)

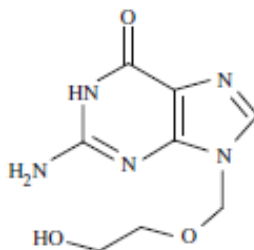


Figura 1 Estructura química de aciclovir

Si el consumo de aciclovir excede ciertos límites, pueden presentarse reacciones adversas, como neurotoxicidad, urticaria, fleboglobina, diarrea, cefalalgia y desmayo. En algunos casos, los pacientes con insuficiencia renal pueden agravar su condición. La situación de uso irracional de drogas sigue existiendo, así como la urgencia del estudio de la farmacocinética, por lo que es necesario controlar la concentración de aciclovir en el suero sanguíneo y en la orina después de su administración oral (Dorraji & Jalali, 2016).

Comúnmente, para la determinación cuantitativa de aciclovir se usan cromatografía, espectroscopia IR, espectrofotometría, electroquimioluminiscencia y espectrofluorimetría. Todos estos métodos se caracterizan por su alta sensibilidad y selectividad. Sin embargo, se están buscando métodos alternativos porque éstos son laboriosos y costosos, el instrumento es complicado y se deben emplear operadores altamente cualificados (Shaidarova, Gedmina, Zhaldak, Chelnokova, & Budnikov, 2015). Actualmente, se han realizado algunos estudios electroquímicos para la determinación de aciclovir en fármacos y muestras biológicas mediante técnicas voltamétricas con electrodos químicamente modificados debido a su alta

sensibilidad, simplicidad, rapidez y bajo costo (Renjini & Girish, 2011; Parisa, S. Dorraji, Fahimet Jalali, 2016).

La electroquímica estudia los fenómenos físicos y químicos de transferencia de carga en la interfase electrodo-solución. Las técnicas electroquímicas son poderosas y versátiles, ofrecen alta sensibilidad, exactitud y precisión, así como un amplio rango dinámico lineal, con instrumentación relativamente de bajo costo. Dichas técnicas se pueden clasificar dependiendo de la señal de excitación que se suministra al electrodo de trabajo: cuando un potencial es aplicado (método potencioestático), la corriente resultante es la señal analítica y la técnica electroanalítica se considera como un método voltamétrico a potencial controlado; cuando se aplica una corriente, el potencial resultante es la señal analítica y la técnica se considera como un método galvanostático (Menosalina, 2004).

Las distintas técnicas voltamétricas que existen se diferencian entre sí en la función de potencial que se aplica al electrodo sólido de trabajo. Entre las técnicas voltamétricas se encuentran cronoamperometría, voltametría de barrido lineal, voltametría cíclica, voltametría de pulso normal, voltametría de pulso diferencial, voltametría de onda cuadrada y voltametría de preconcentración y redisolución.

En la voltametría de barrido lineal se varia el potencial del electrodo de trabajo a una velocidad constante, los parámetros más importantes son el potencial pico (E_p) y la intensidad de corriente pico (I_p) (Ortíz, Martínez, & Hernández, 2006). En la voltametría cíclica se aplica al electrodo de trabajo una señal de excitación triangular. Se lleva a cabo un barrido de potencial desde un valor inicial (E_i) donde no hay electrólisis y diferente de E° hasta un valor, denominado potencial de cambio o de inversión, E_c en el que se invierte la dirección del barrido. El margen de potenciales elegidos debe ser aquel en el que tenga lugar la oxidación o la reducción del analito. Las voltametrías cíclicas múltiples permiten determinar el desarrollo Nernstiano o no-Nernstiano de un acoplamiento redox, el número de electrones transferidos en una reacción, los potenciales formales, el mecanismo de reacción y determinar si el sistema es reversible (Adelaide & Ferreira, n.d.).

En voltametría de pulso normal la forma de la onda de potencial consta de una serie de pulsos de amplitud creciente, con el potencial retornando al valor inicial después de cada pulso. En la voltametría de pulso diferencial la señal de excitación consiste en una serie de pulsos a manera de escalera, donde el potencial de base aumenta gradualmente en pequeños intervalos entre 10 y 100 mV (ancho de pulso = ΔE_s), la amplitud de pulso ΔE_p se mantiene constante con respecto al potencial de base. La corriente resultante se mide justo antes de la aplicación del pulso (1) y al final de

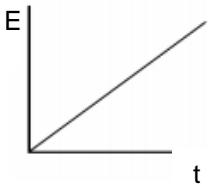

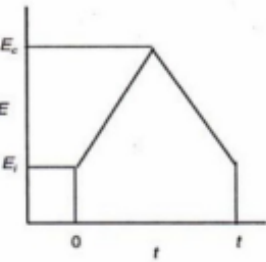
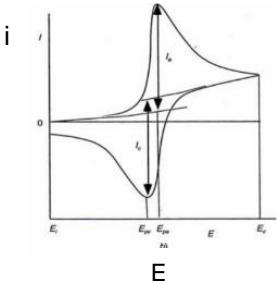
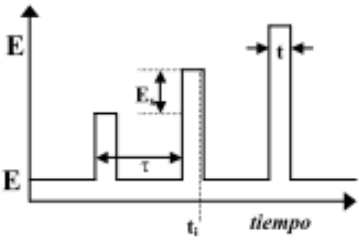
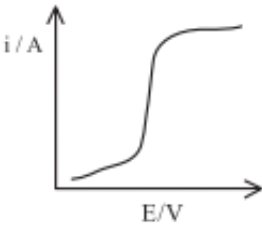
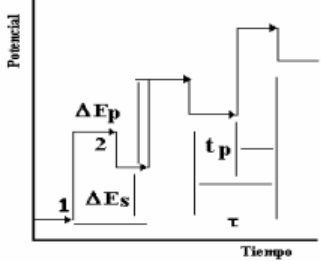
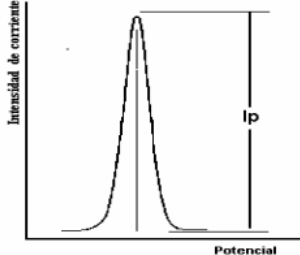
la aplicación del mismo, de esta manera al graficar la diferencia de corrientes obtenidas ($I_1 - I_2$) en función del potencial aplicado (usualmente el potencial en 1), se obtienen respuestas típicas como la mostrada en la tabla 1, donde la intensidad máxima de corriente (I_p) es proporcional a la concentración de la especie reaccionante (Ortíz et al., 2006).

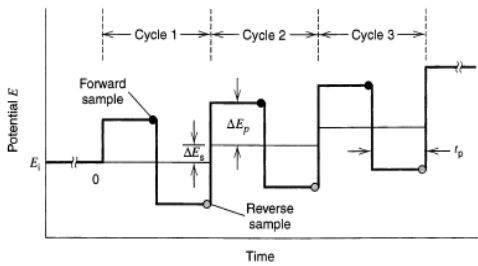
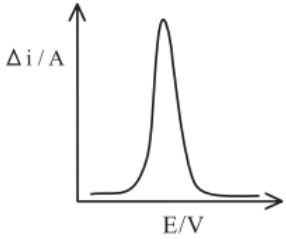
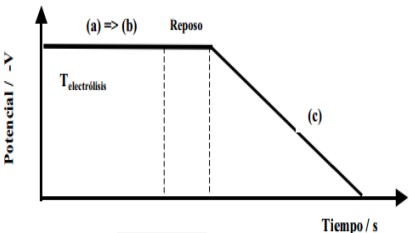
La voltametría de onda cuadrada utiliza la forma de onda mostrada en la tabla 1, consiste en una onda cuadrada superpuesta a una de tipo escalera. La corriente es medida durante intervalos de tiempo muy cortos en la parte final de la onda positiva, al tiempo t_{i1} , y en la parte final de la onda negativa, al tiempo t_{i2} , de cada onda cuadrada. La diferencia entre las intensidades de corriente, $i_1 - i_2$, se registra en función del potencial en escalón y el voltamograma obtenido es un pico simétrico similar al obtenido en la voltametría de pulso diferencial. Esta técnica es más sensible que la voltametría de pulso diferencial pues permite discriminar mejor la corriente faradaica de la corriente capacitiva (Carbó, n.d.).

Por último, la voltametría de preconcentración y redisolución se basa en la aplicación de un potencial constante lo suficientemente negativo como para depositar un metal sobre el electrodo (etapa de acumulación o electrodeposición), seguida de una etapa de determinación por aplicación de un barrido de potencial en sentido positivo en el que se registra la altura del pico de redisolución (stripping) correspondiente a la oxidación del depósito metálico previamente formado (Carbó, n.d.).

Para caracterizar el sistema electroquímico bajo estudio se emplea voltametría cíclica y en estudios de cuantificación las voltametrías de pulso diferencial y de onda cuadrada ofrecen mayor sensibilidad con límites de detección bajos. La tabla 1 enseña de manera resumida la señal de excitación y la respuesta electroquímica (voltamograma, gráfica corriente vs potencial).

Tabla 1 Señal de excitación y respuesta electroquímica al aplicar una técnica voltamétrica en particular (Bard & Faulkner, 2001)

Técnica	Señal de excitación	Señal de respuesta
Voltametría de barrido lineal		
Voltametría cíclica		
Voltametría de pulso normal		
Voltametría de pulso diferencial		

<p>Voltimetría de onda cuadrada</p>		
<p>Voltimetría de preconcentración y redisolución</p>		<p>-</p>

Para realizar estas técnicas se emplea una celda con tres tipos de electrodos: electrodo de referencia, contraelectrodo y electrodo de trabajo. El electrodo de referencia es usado para controlar el potencial en el electrodo de trabajo, su potencial de semicelda debe ser conocido, constante y completamente insensible a la composición de la disolución en estudio; además debe ser reversible y obedecer la ecuación de Nernst (ecuación 1), los más comúnmente usados son el de Plata-Cloruro de Plata (Ag/AgCl) y el electrodo saturado de calomel. El contraelectrodo o electrodo auxiliar se usa para que la corriente que se origina en la celda electroquímica pase a través de éste y el electrodo de trabajo, y no por el electrodo de referencia evitando su polarización (Menosalina, 2004). En el electrodo de trabajo es donde ocurre la reacción electroquímica de interés, es decir, donde el analito es oxidado o reducido. Los más empleados son el de carbono vítreo, pirolítico rugoso, fibra de carbono, platino, mercurio y oro.

$$E_{cel} = E_{cel}^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Red]}{[Oxi]} \quad (1)$$

Un área activa de investigación en electroquímica es el desarrollo de electrodos de trabajo químicamente modificados para mejorar la detección de moléculas orgánicas o compuestos farmacéuticos. Las modificaciones incluyen la aplicación irreversible de sustancias adsorbentes con las funcionalidades deseadas, la unión covalente de componentes a la superficie y el revestimiento del electrodo con películas de polímeros conductores (Skoog & West, 2014). Los electrodos modificados tienen muchas aplicaciones potenciales. Una de ellas es en la electrocatálisis, se han buscado electrodos capaces de reducir el oxígeno a agua para que sean usados en pilas de combustible y baterías. Otra aplicación está en la producción de dispositivos electrocrómicos que cambian de color en la oxidación y en la reducción; estos dispositivos pueden ser usados en pantallas inteligentes. Finalmente, el uso analítico más importante para tales electrodos es su uso como sensores analíticos que están preparados para ser selectivos para una especie o grupo funcional en particular (Bard & Zoski, 2012).

La modificación con la película polimérica se realiza depositándola en la superficie del electrodo por electropolimerización, las ventajas de esta técnica incluyen que el proceso de fabricación es fácil, se aumenta la capacidad electroquímica catalítica y mejora la estabilidad física del electrodo. Mejora la transferencia de electrones sobre la superficie del electrodo de trabajo lo que refleja mayores corrientes de respuesta, tiene alta selectividad y sensibilidad debido a la homogeneidad de la película en la deposición electroquímica (Can, Yilmaz, Saglikoglu, Sadikoglu, & Menek, 2015). Cuando se habla de polímeros conductores, en realidad se trata de polímeros oxidados, esta oxidación supone la generación de radical-cationes o dicationes a lo largo de la cadena polimérica (polarones o bipolarones).

En una electropolimerización, el monómero, disuelto en un solvente apropiado que contiene la sal de dopaje aniónica deseada (Figura 2), se oxida en la superficie de un electrodo mediante la aplicación de un potencial de oxidación. La elección del solvente y electrólito es de particular importancia en electroquímica ya que deben ser estables al potencial de oxidación del monómero y deben proporcionar un medio conductor de iones. Los solventes orgánicos como acetonitrilo o el carbonato de propileno tienen ventanas de potenciales muy grandes y permitividades relativas altas que permiten una buena disociación del electrolito y por tanto buena conductividad iónica. Dado que el pirrol tiene un potencial de oxidación relativamente bajo, la electropolimerización puede llevarse a cabo en electrolitos acuosos. Como resultado de la oxidación inicial, se forma el catión radical del monómero y reacciona con otros monómeros presentes en solución para formar productos oligómeros y luego el polímero (Sabouraud, Sadki, & Brodie, 2000).

La electropolimerización se logra generalmente mediante métodos potenciostáticos (potencial controlado) o galvanostáticos (corriente controlada). La voltametría cíclica se ha utilizado principalmente para obtener información cualitativa sobre los procesos redox implicados en las etapas iniciales de la reacción de polimerización y para examinar el comportamiento electroquímico de la película de polímero después de la electrodeposición (Bard & Faulkner, 2001).

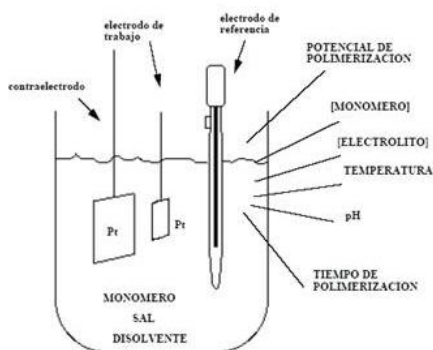


Figura 2 Esquema de una celda electroquímica para electropolimerización

En nuestro caso, la electropolimerización se realizará por medio de la técnica de cronocoulombimetría, en la cual se mide la carga (coulombs) en función del tiempo (crono). En la figura 3a, se muestra la forma de la señal aplicada, y en la figura 3b se muestra la respuesta del sistema. La corriente que fluye por el electrodo de trabajo es integrada para cada tiempo obteniendo así la carga (Bott & Heineman, 2013).

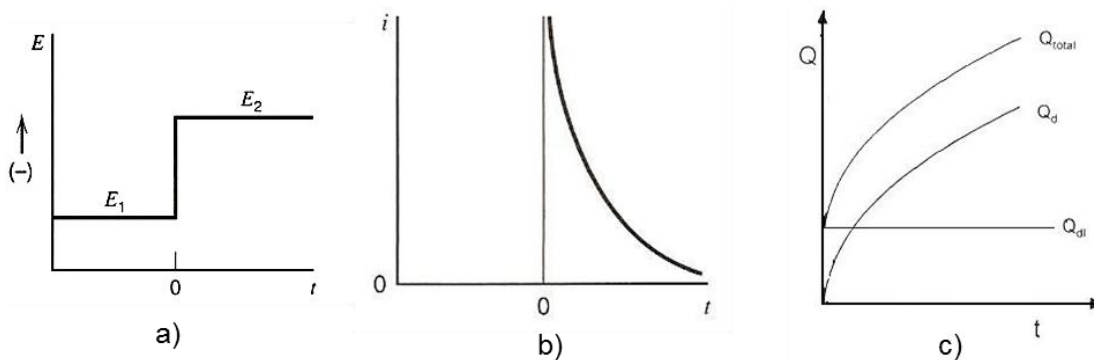
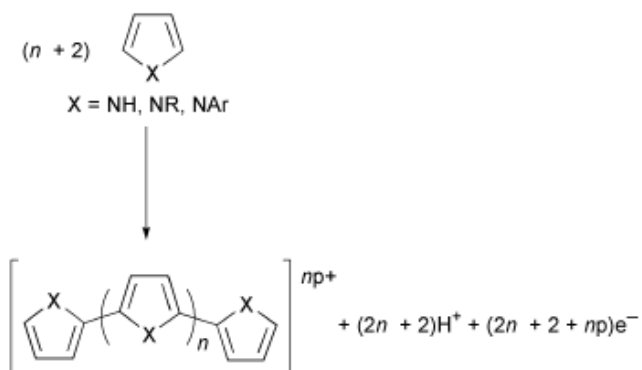


Figura 3 Cronocoulombimetría a) Señal de excitación escalón de potencial. b) Señal de respuesta del sistema c) Comportamiento de la carga a través del tiempo

Existen diversos mecanismos de electropolimerización de pirrol, sin embargo, el mecanismo propuesto por Díaz es el más aceptado; en el esquema 1 se muestra la reacción global (Sabouraud et al., 2000):



Esquema 1

El número de electrones donados por cada molécula se encuentra entre 2 y 2,7, donde 2 electrones sirven en la formación de la película y la carga en exceso es consumida por la oxidación del polímero. Este número está normalmente de acuerdo con el número de aniones encontrados en el polímero por análisis elemental.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Definir y optimizar los parámetros voltamétricos para la construcción de un electrodo químicamente modificado para la cuantificación de Aciclovir

2.3.2 Objetivos específicos:

2.3.2.1 Identificar el electrodo de trabajo que brinde la mejor respuesta (corriente) para la cuantificación reproducible de Aciclovir

2.3.2.2 Determinar la concentración de electrolito de soporte y el pH que proporcionen una respuesta óptima, reversible, sensible con un rango lineal amplio.

2.3.2.3 Validar la metodología para la cuantificación de Aciclovir optimizada en preparaciones farmacéuticas comerciales

2.4 Metodología propuesta

2.4.1 Identificación del electrodo de trabajo.

Para la identificación del electrodo de trabajo, se realizó voltametría cíclica, a dos soluciones diferentes, empleando 3 electrodos de trabajo: oro, platino y carbono vítreo. La primera solución fue buffer acetato pH 4.66, y la segunda Aciclovir 1.00 mM en buffer acetato pH 4.66.

Se trabajó con un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata, y un electrodo auxiliar de platino.

En la figura 4 se muestra la celda voltamétrica empleada para en los ensayos. Las conexiones son: el cable verde corresponde al electrodo de trabajo; el cable rojo con el contraelectrodo y el cable blanco con el electrodo de referencia. También se puede observar el equipo empleado, Potenciostato *CHI660E*

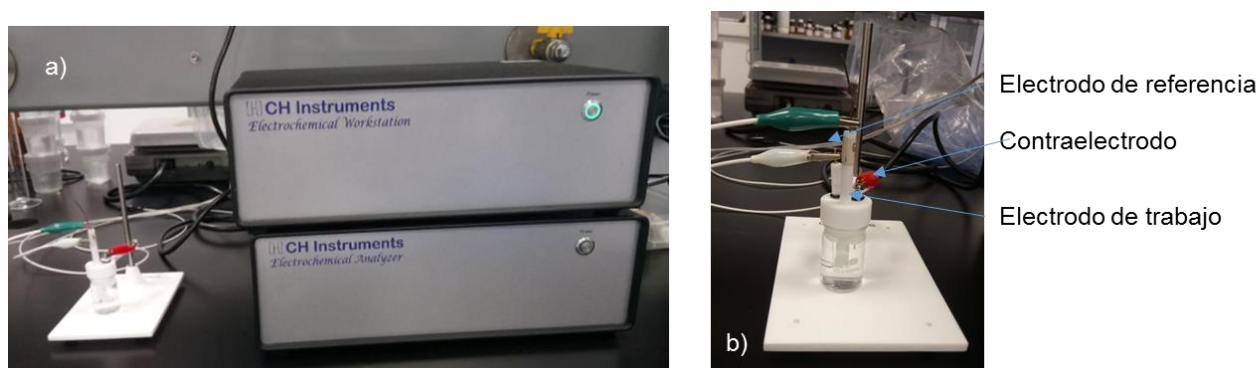


Figura 4 Estación de trabajo

2.4.2 Determinación de la frecuencia y la amplitud en voltametría de onda cuadrada y pH del medio.

Para la determinación de la frecuencia y la amplitud de trabajo adecuadas en voltametría de onda cuadrada se utilizó una solución 1.00 mM de Aciclovir en buffer acetato pH 4.66, primero con diferentes valores de frecuencia, manteniendo la amplitud constante, y viceversa. En la tabla 2 se muestran los valores utilizados y las corrientes medidas. Se realizó una gráfica de intensidad de corriente contra frecuencia o amplitud para observar cual valor presenta la mayor respuesta.

Tabla 2 Valores de frecuencia y amplitud empleados en voltametría de onda cuadrada

	Frecuencia (Hz)	Amplitud (V)
Determinación de la mejor frecuencia	5	0.040
	10	
	20	
	30	
	40	
	50	
	60	
	70	
	80	
	90	
Determinación de la mejor amplitud	50	0.015
		0.020
		0.025
		0.030
		0.035
		0.040
		0.045
		0.050
		0.100

Para estudiar el efecto del pH en la oxidación de aciclovir, se prepararon soluciones del analito 1.00 mM en buffer acetato a 6 valores diferentes de pH: 4.00, 4.50, 4.66, 5.00, 5.50 y 6.00. Empleando voltametría de onda cuadrada se midió la corriente de cada solución y ésta se graficó contra su respectivo valor de pH y así seleccionó el pH que produjo la mayor respuesta de corriente.

2.4.3 Modificación del electrodo

Se realizaron dos tipos de modificaciones, una con plantilla (template) de aciclovir y la otra sin plantilla. Para modificar el electrodo con la película polimérica de pirrol con plantilla se preparó 10.0 mL de solución 0,10M de perclorato de litio, 0.020 M de pirrol, 3.0 mM de aciclovir y con 200 μ L de agua, diluyendo con acetonitrilo. Esta se desgasificó por 5 minutos con nitrógeno y se electropolimerizó usando la técnica de cronocoulombimetría, en la figura 5a se observan los parámetros empleados. El sistema se llevó hasta una carga promedio de 35.0 μ C/cm². La sobreoxidación de la película de pirrol se realizó en una solución de hidróxido de sodio 0.10 M (Figura 5b). Este procedimiento se repitió hasta que la respuesta por voltametría cíclica de ferricianuro 0.10 M en KCl se suprimió. Lo cual indica que el polímero, PPy, deja de ser conductor y se convierte en un polímero de intercambio iónico, OPPy.

Para la modificación sin plantilla, se realizó el procedimiento anterior, pero sin aciclovir en la solución.

Parameter	Value (a)	Value (b)
Init E (V)	0	0
Final E (V)	0.75	0.95
Number of Steps	1	1
Pulse Width (sec)	1	0.8
Sample Interval (sec)	0.00025	0.00025
Quiet Time (sec)	2	2
Sensitivity (C or A/V)	1.e-003	1.e-003

Figura 5 Parámetros para a) Polimerización b) Sobreoxidación

2.4.4 Determinación de la concentración del electrolito de soporte, de aciclovir y de pirrol para la electropolimerización

Para determinar la concentración de trabajo que brindaba las mejores respuestas para la polimerización de Py, se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de electrolito de soporte, manteniendo constante la de pirrol y la de aciclovir. Estas soluciones fueron electropolimerizadas y sobreoxidadas. El mismo procedimiento se siguió para pirrol y aciclovir. En la tabla 3 se enseñan los valores empleados.

Con el electrodo modificado con OPPy con plantilla y por medio de voltametría de onda cuadrada, se midió la corriente anódica a una solución 50.0 μM de aciclovir en buffer acetato pH 4.50. Se graficó la corriente contra concentración y se determinó en donde se presenta la mayor respuesta.

Tabla 3. Valores empleados para la polimerización

	Concentración de pirrol (mM)	Concentración de aciclovir (mM)	Concentración de perclorato de litio (M)
Determinación mejor concentración de pirrol	2.0	5.0	0.10
	3.0		
	4.0		
	5.0		
	6.0		
	10.0		
	20.0		
	30.0		
Determinación mejor concentración de aciclovir	20.0	3.0	0.10
		5.0	
Determinación mejor concentración de perclorato de litio	20.0	3.0	0.050
			0.10
			0.20

2.4.5 Limpieza del electrodo

El electrodo de trabajo se limpió siguiendo dos procedimientos: el primero es el método mecánico, en el cual el electrodo se limpió con una malla de nylon y en una de felpa por dos minutos en cada una. A cada malla se adicionó alúmina (*micro polishing powder*) de 0.025 μm . Posteriormente, el electrodo de trabajo se llevó al baño ultrasonido y se limpió con isopropanol y luego con agua doblemente destilada por tres minutos, en cada caso.

El segundo método es el electroquímico, se realiza usando voltametría cíclica (Figura 6) a una solución de buffer fosfato 0.10 M pH 7.0. En la figura 7 se observa como debe ser la señal de respuesta en el electrólito para garantizar que la superficie del electrodo esté limpia.

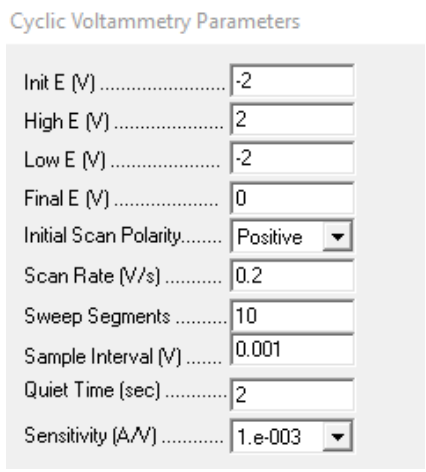


Figura 6 Parámetros para limpieza electroquímica en buffer fosfato pH 7.0

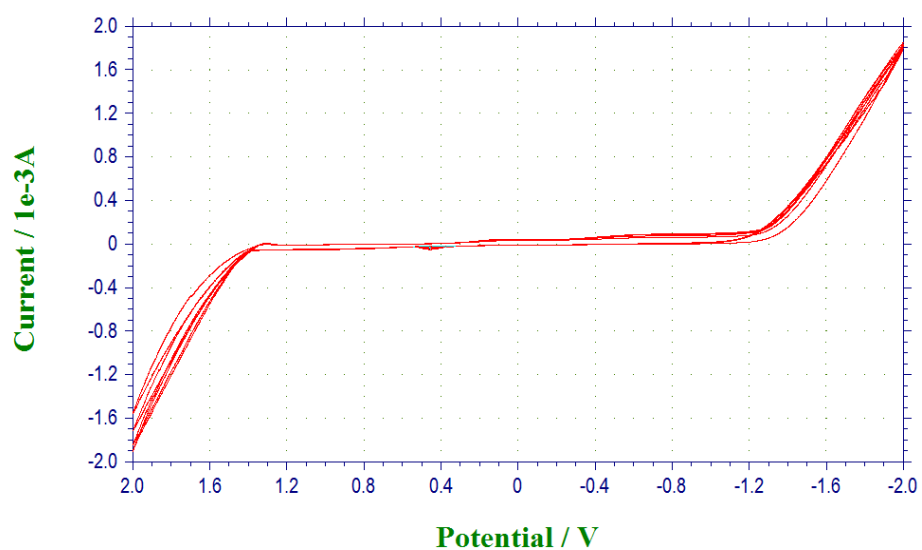


Figura 7 Voltamograma cíclico de limpieza voltamétrica del electrodo de trabajo.

2.4.6 Cuantificación de Aciclovir en preparaciones farmacéuticas comerciales

El procedimiento para cuantificar aciclovir en tabletas comerciales de este fármaco de 200 mg, se realiza empleando dos procedimientos diferentes: En el primero se empleó el método de adición múltiple de estándar. En el segundo procedimiento, se construyó una curva de calibración con patrones de aciclovir a concentraciones de 5.0 μM , 10.0 μM , 50.0 μM , 100.0 μM , 200.0 μM , 500.0 μM y 1.00 mM.

2.4.6.1 Límite de detección y de cuantificación, linealidad, repetibilidad y reproducibilidad

La linealidad se evalúa con la curva de calibración realizada a partir de soluciones patrón de aciclovir a diferentes concentraciones: 5.0 μM , 10.0 μM , 50.0 μM , 0.100 mM, 0.200 mM, 0.500 mM y 1.00 mM

Para el límite de detección se emplea la ecuación (2), donde s es la desviación estándar del blanco y b es la pendiente de la curva de calibración

$$LOD = \frac{3s}{b} \quad (2)$$

Para el límite de cuantificación se emplea la ecuación (3).

$$LOQ = \frac{10s}{b} \quad (3)$$

Para la repetibilidad se ensayó una preparación comercial de Aciclovir a diferentes horas en un mismo día. La reproducibilidad fue determinada midiendo la corriente de oxidación de aciclovir en la muestra durante 7 días.

2.4.7 Cálculo área del electrodo

Para la determinación del área del electrodo, se realizó voltametría cíclica a una solución de ferricianuro 0.10 M a diferentes velocidades de barrido. Posteriormente, se graficó la corriente resultante contra la raíz cuadrada de la velocidad. De acuerdo con la ecuación de Randles-Sevcick (Ecuación 4), de la pendiente se obtiene el área del electrodo (ecuaciones 5 y 6), teniendo en cuenta que el coeficiente de difusión del ferricianuro es $7,63 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y el número de electrones es 1 (Brajter et al., 1996).

$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0^* v^{1/2} \quad (4)$$

$$m = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0^* \quad (5)$$

$$A = \frac{m}{2,69 \times 10^5 n^{3/2} D_0^{1/2} C_0^*} \quad (6)$$

Donde i_p es la corriente de oxidación de ferricianuro, n el número de electrones transferidos, A el área del electrodo de trabajo en cm^2 , D_0 el coeficiente de difusión en cm^2/s , C_0^* la concentración de ferricianuro en mol/cm^3 , v la velocidad de barrido en V/s y m la pendiente de la gráfica.

2.5 Resultados y discusión

2.5.1 Identificación y caracterización del electrodo de trabajo.

En la figura 8 se muestra el voltamograma cíclico realizado con el electrodo plano de oro. El azul corresponde a la señal del buffer acetato de sodio pH 4.66; mientras que la señal roja corresponde a una solución 0.10 M de aciclovir en esta misma solución buffer. Debido a que los potenciales pico anódico y pico catódico se solapan y que la solución buffer exhibe señales voltamétricas, el electrodo de Au no es adecuado para trabajar con soluciones de aciclovir en este medio.

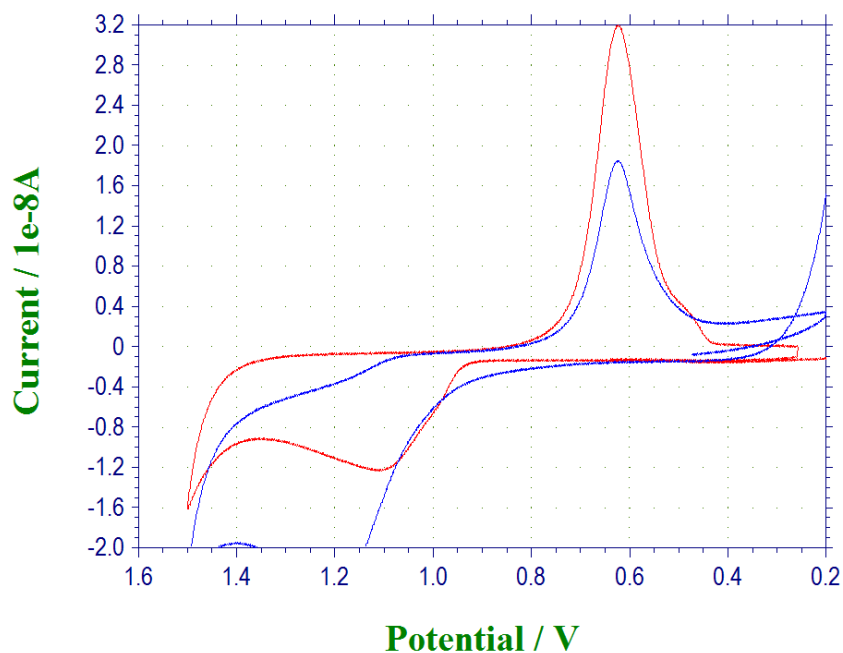


Figura 8 Voltamograma cíclico con electrodo de oro. La curva azul corresponde a la solución del buffer acetato, mientras que la roja es la solución de aciclovir

El segundo electrodo de trabajo que se ensayó fue el de platino. Los picos anódico y catódico del buffer acetato y de la solución de aciclovir aparecen en la misma región en el voltamograma cíclico (Figura 9). Se consideró por tanto descartar el electrodo de Pt en este trabajo investigativo.

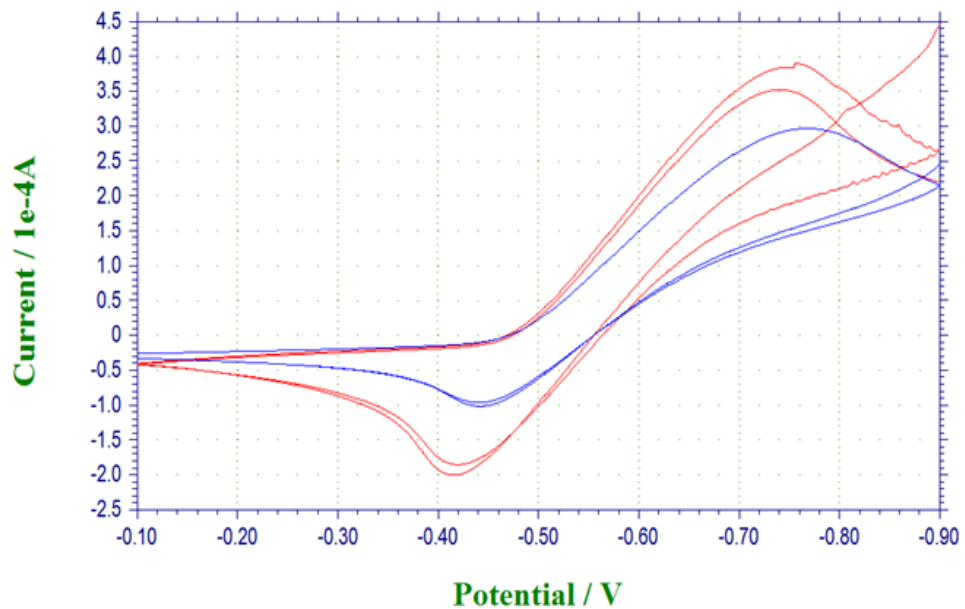


Figura 9 Voltamograma cíclico con platino como electrodo de trabajo. La curva azul corresponde a la solución de buffer de acetato, mientras que la roja es la solución de aciclovir en buffer de acetato.

Se realizó igualmente voltametría cíclica con el electrodo de carbono vítreo. La solución reguladora de acetato no mostró señal ciclovoltamétrica (color azul) mientras que la solución de aciclovir en este medio si exhibió un pico de oxidación alrededor de 1.0 V vs el electrodo de Ag/AgCl, KCl (sat) (color rojo), como se ilustra en la figura 10, en este caso no existe una interferencia entre el buffer acetato, con la señal del aciclovir.

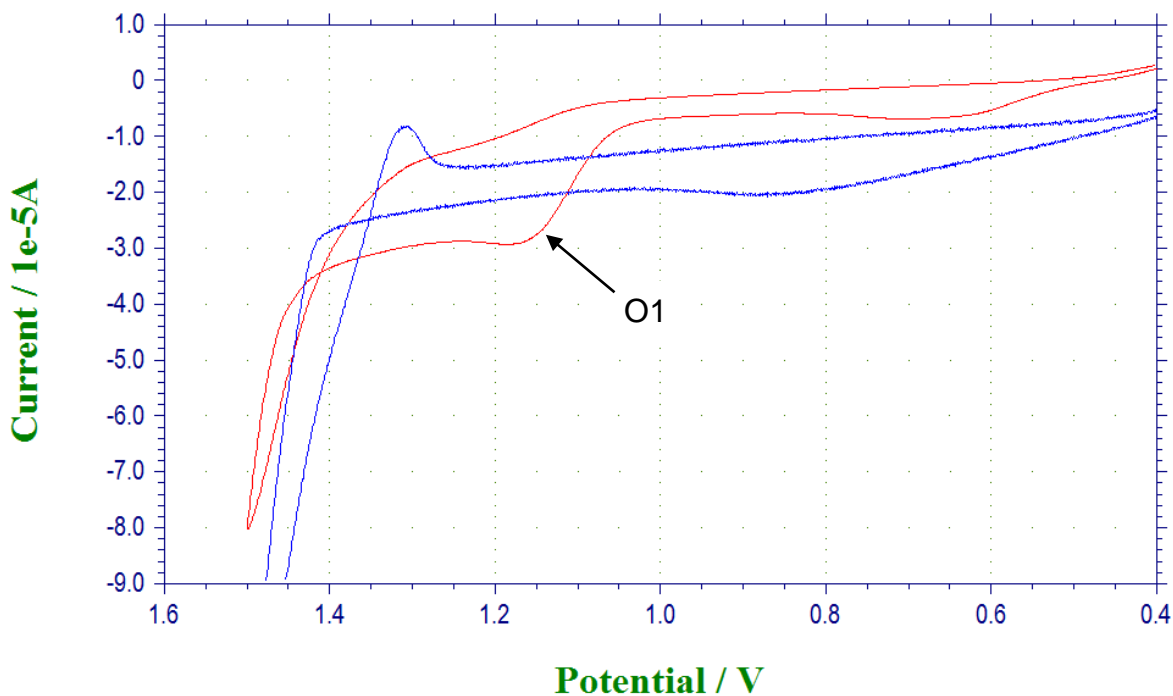
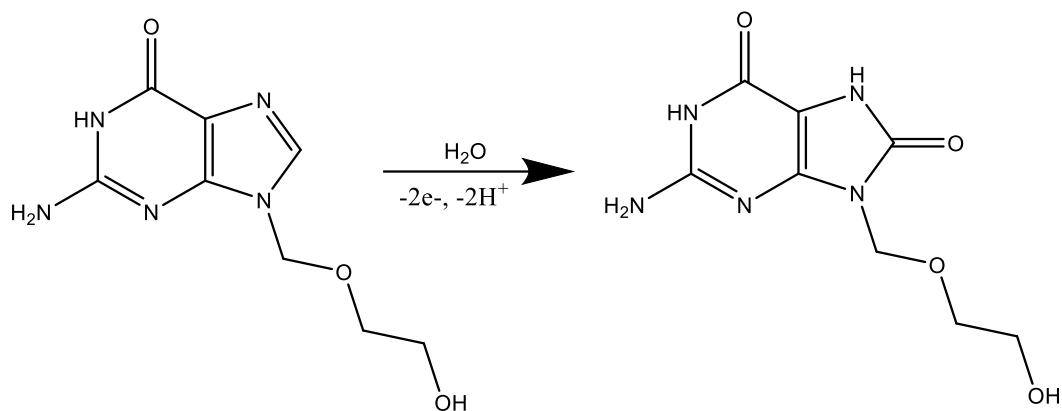


Figura 10 Voltamograma cíclico empleando como electrodo de trabajo carbono vítreo. La curva azul corresponde a la solución buffer de acetato, mientras que la señal roja corresponde a la solución de aciclovir

En la figura 10 (rojo) se muestran voltamogramas cíclicos sucesivos de una solución 0.10 M de aciclovir en buffer acetato (pH 4,66). En el barrido de +0.4 a +1.5 V vs Ag/AgCl se observa un pico de oxidación (el análisis va en sentido positivo del potencial), bien definido (O1) a 1.0V. En el barrido negativo, no aparece el pico de reducción correspondiente, implicando que el proceso es irreversible.

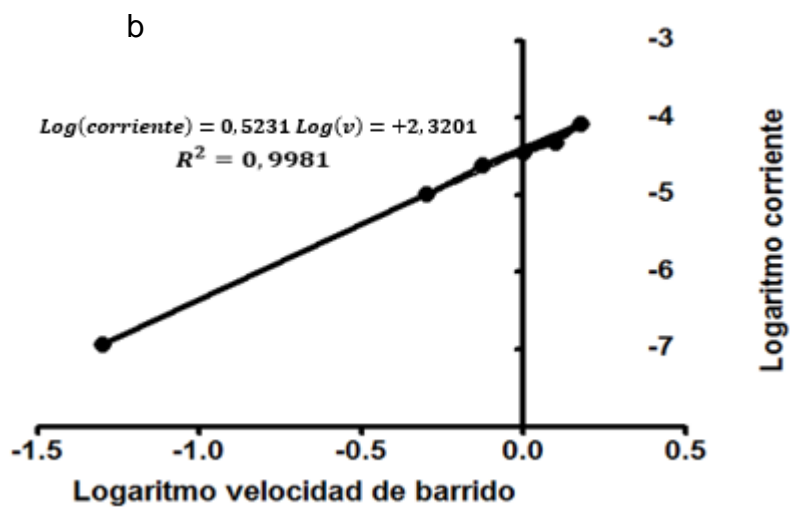
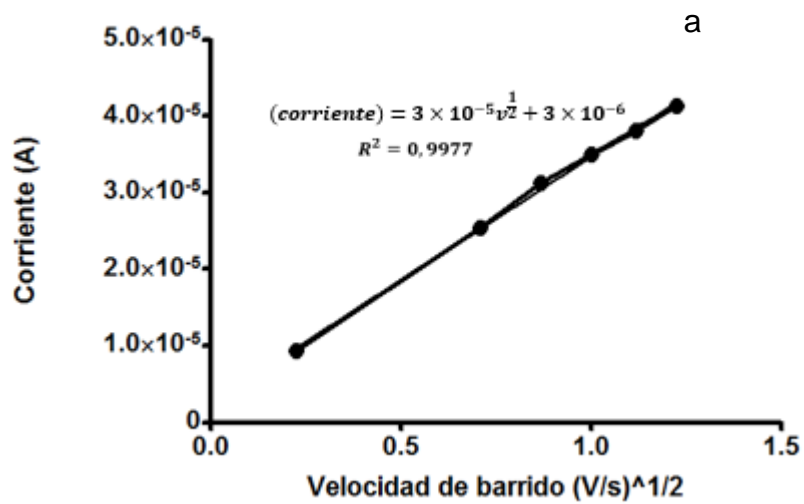
En el proceso de oxidación de aciclovir se ve involucrado la transferencia de dos electrones y dos protones, tal como se muestra en el esquema 2.



Esquema 2 Oxidación del aciclovir propuesta por Shahrokhian et al.

2.5.2 Caracterización del proceso electroquímico

Se realizaron estudios de la velocidad de barrido para evaluar si el proceso en el electrodo de trabajo estaba controlado por difusión, o por adsorción o si había una contribución de ambos procesos. Se ensayaron dos pruebas para evaluar lo anterior. Una de ellas es que existe una relación lineal entre la corriente máxima o pico y la velocidad de barrido. Se determinó la relación entre 5.0 y 125 mV/s (Gráfica 1a). Dado que el coeficiente de correlación obtenido es muy cercano a uno (0,9977), se entiende que el proceso está controlado por difusión. Otro criterio es que una gráfica del logaritmo de la corriente pico versus el logaritmo de la velocidad de barrido debe dar una pendiente muy cercana a 0.5 (Gráfica 1b). Los resultados experimentales dieron una pendiente de 0.523, indicativo de un proceso controlado por difusión (Sadikoglu et al., 2011).



Gráfica 1 a) corriente contra raíz cuadrada de la velocidad de barrido. b) Logaritmo de la corriente contra logaritmo de la velocidad de barrido

En la figura 11 se muestra una serie de voltamogramas cíclicos de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ en KCl 0.10 M a diferentes velocidades de barrido para determinar el área superficial efectiva del electrodo de carbono vítreo. Empleando la pendiente de la gráfica 2 y la ecuación 6, se calculó el área del electrodo el cual dio un valor de 0.0673 cm^2

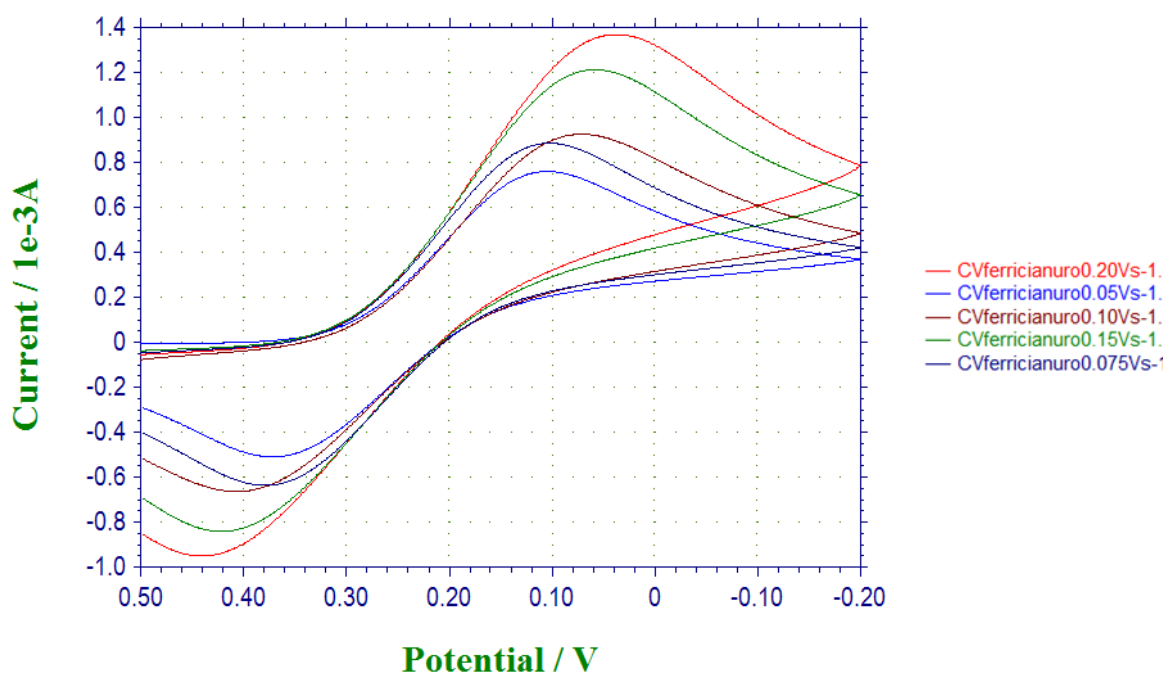
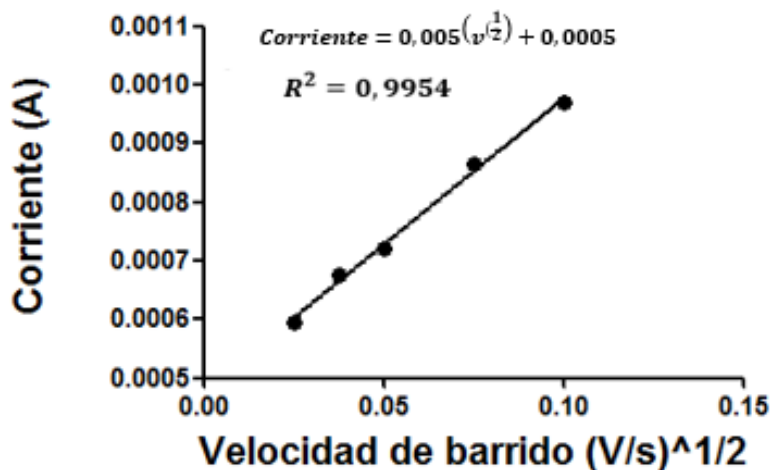


Figura 11 Voltamogramas cíclicos de ferricianuro a diferentes velocidades de barrido.



Gráfica 2 Determinación del área efectiva del electrodo de carbono vítreo

$$A = \frac{m}{2,69 \times 10^5 n^{3/2} D_0^{1/2} C_0^*} \quad (6)$$

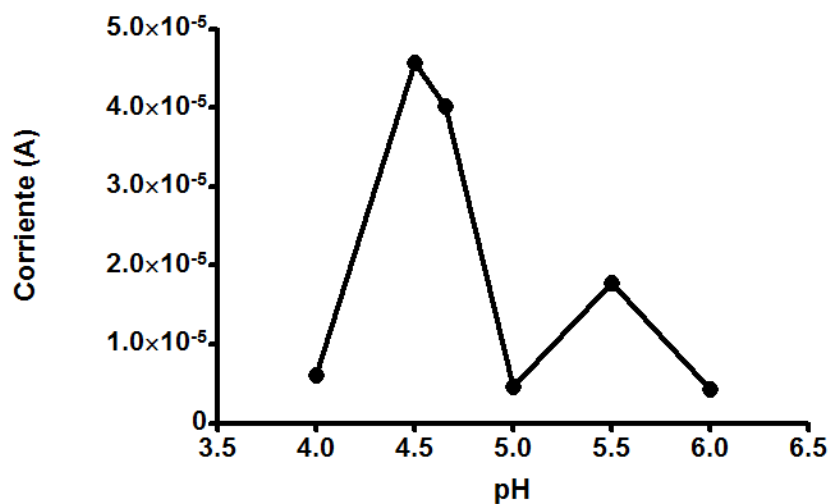
$$A = \frac{0,005 \pm 0,001969}{2,69 \times 10^5 (1)^{3/2} (7,63 \times 10^{-6})^{1/2} (0,1 \times 10^{-3} \pm 0,00016)}$$

$$= 0,0673 \pm 0,0089 \text{ cm}^2 \quad (6)$$

2.5.3 Determinación de las condiciones óptimas para la cuantificación

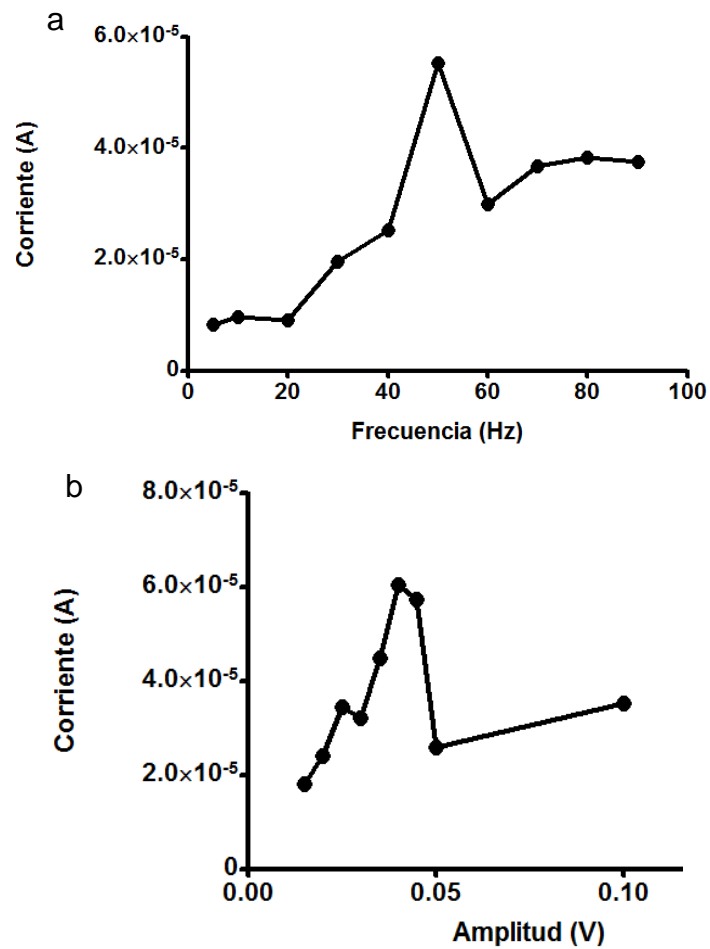
Con el fin de establecer las condiciones experimentales más apropiadas para la determinación de aciclovir, se estudiaron las variables que ejercen el mayor efecto en la corriente pico de oxidación, como son pH, tipo y concentración del electrolito de soporte, amplitud y frecuencia en voltametría de onda cuadrada, para la solución de aciclovir 1.0 mM en buffer acetato.

La respuesta voltamétrica se vio influenciada fuertemente por el pH. La corriente anódica fue máxima a pH 4.50, en buffer acetato 0.10 M. Aumentos mayores de pH causaron una disminución de la corriente pico. (Gráfica 3). Este pH fue seleccionado para realizar los análisis de aciclovir.



Gráfica 3 Determinación pH

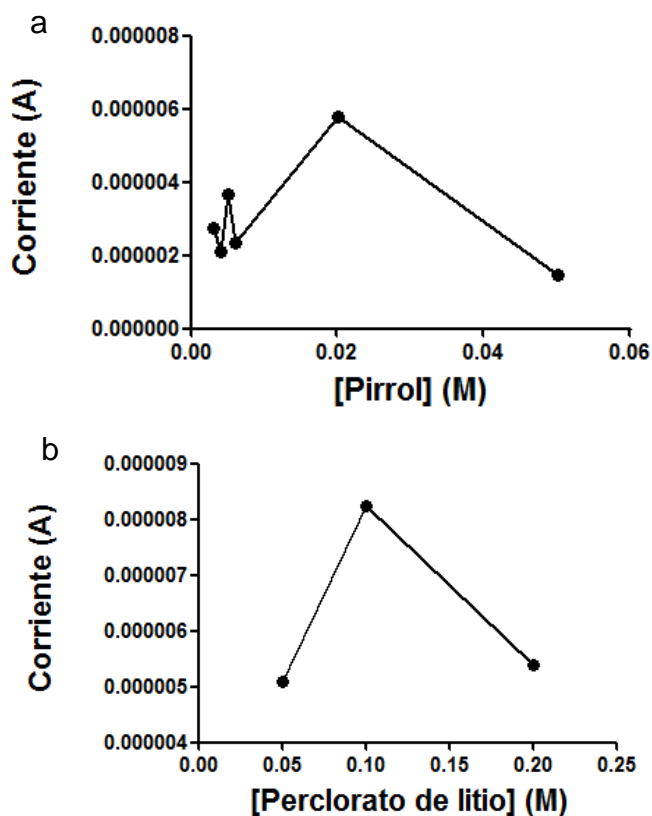
Para mejorar la intensidad de la señal analítica de corriente, se evaluaron los parámetros que causan un cambio en la misma, debido a la variación momentánea de las especies electroactivas presentes en la superficie del electrodo (Bard & Faulkner, 2001). Estos son la frecuencia y la amplitud empleadas en voltametría de onda cuadrada. En la gráfica 4a se muestra que la mejor frecuencia fue 50 Hz y en la gráfica 4b se observa que la mejor amplitud fue 0.040 V



Gráfica 4 Determinación de las variables para cuantificación de aciclovir por voltametría de onda cuadrada

2.5.4 Selección de las condiciones experimentales para electropolimerizar pirrol

Con el propósito de obtener una superficie modificada y estable del polímero en la superficie del electrodo de trabajo, fue necesario evaluar tres parámetros: la concentración de pirrol que permitió una mayor corriente anódica de respuesta (Gráfica 5a) y ésta fue 0.020 M; la concentración óptima de aciclovir fue 3.0 mM y la concentración del electrolito de soporte (perclorato de litio) fue de 0.10 M, aquí se redujo al mínimo la resistencia de la solución y por tanto se generó la mayor corriente pico (Gráfica 5b).



Gráfica 5. Determinación de las mejores condiciones para electropolimerización

Para asegurarse que se realizó una correcta polimerización, es decir, que no existen partes de la superficie del electrodo sin polímero conductor, se aseguró que la carga de deposición siempre llegara a $35\mu\text{C}/\text{cm}^2$, esto corresponde a la formación de una monocapa (la cobertura de monocapa se define como 0.15 a $0.3\text{ nmol}/\text{cm}^2$) teniendo en cuenta que en la polimerización se involucran 2.25 electrones (Brajter et al., 1996). Además, se realizó voltametría cíclica a una solución de ferricianuro, para asegurarse que con la deposición de la película de polipirrol y con la sobreoxidación, la respuesta disminuyó gradualmente (Figura 12), se necesitó un promedio de 4 ciclos para completar la supresión de la respuesta. Este mismo comportamiento se observa con la sobreoxidación de PPy sin plantilla.

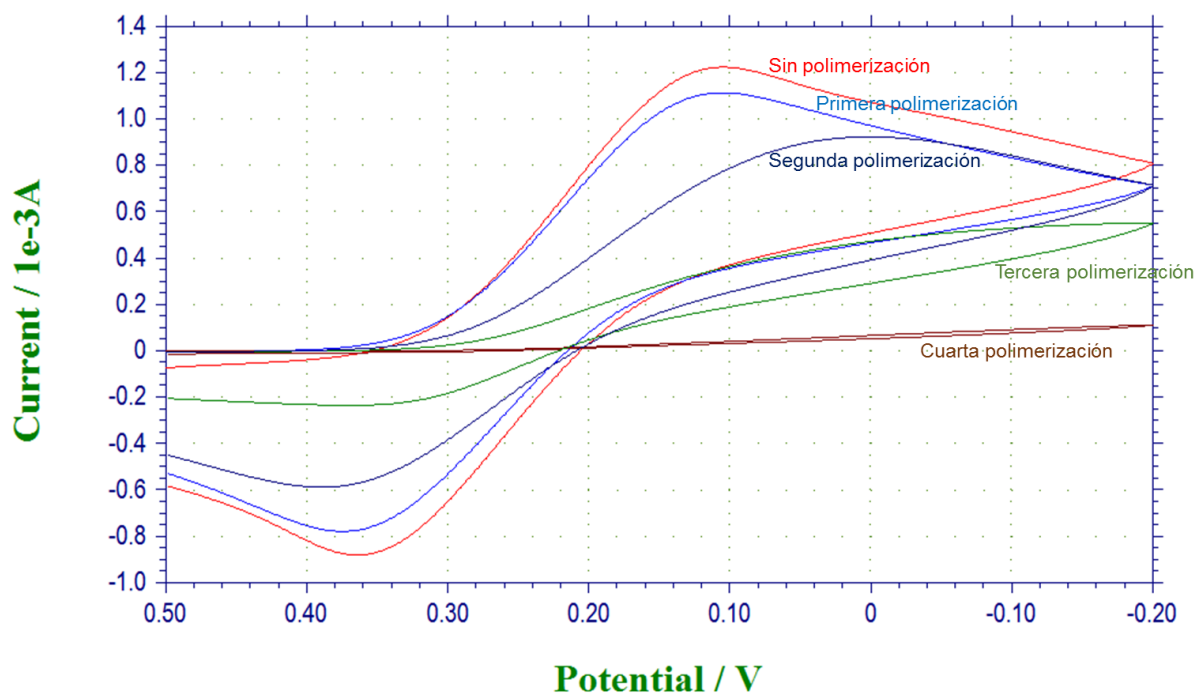


Figura 12 Voltametría cíclica para ferricianuro después de polimerizar

2.5.5 Comparación entre electrodo desnudo, modificado con plantilla (MIP) y sin plantilla (NMIP)

En la figura 13 se observa el voltamograma realizado con el electrodo de trabajo desnudo, es decir, sin modificaciones a una solución 10.0 μM de aciclovir. Al compararlo con el voltamograma de la figura 14, realizado con una solución 5.0 μM , se observa un pico con una corriente que se pudo cuantificar. Además, la corriente aumentó en 44.9 μA como se muestra en la figura 15, y los picos mejoraron también con la modificación con la plantilla de aciclovir.

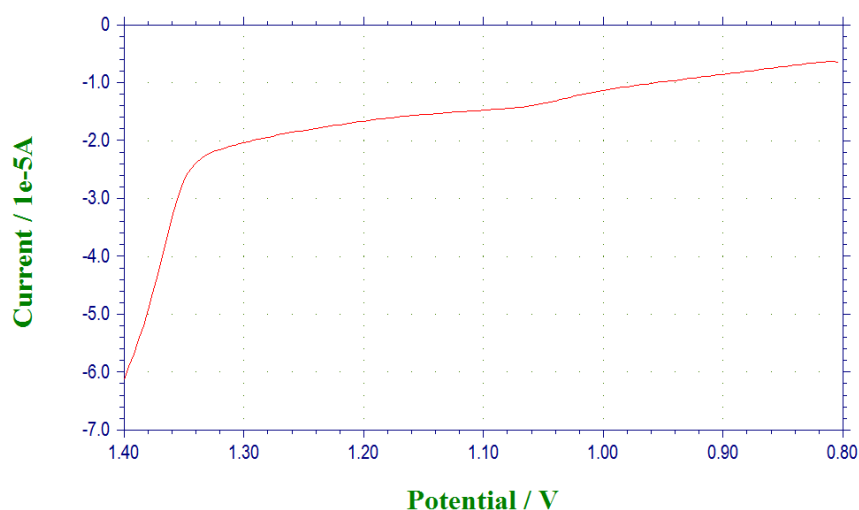


Figura 13 Voltamograma electrodo desnudo, solución de aciclovir 10.0 μM

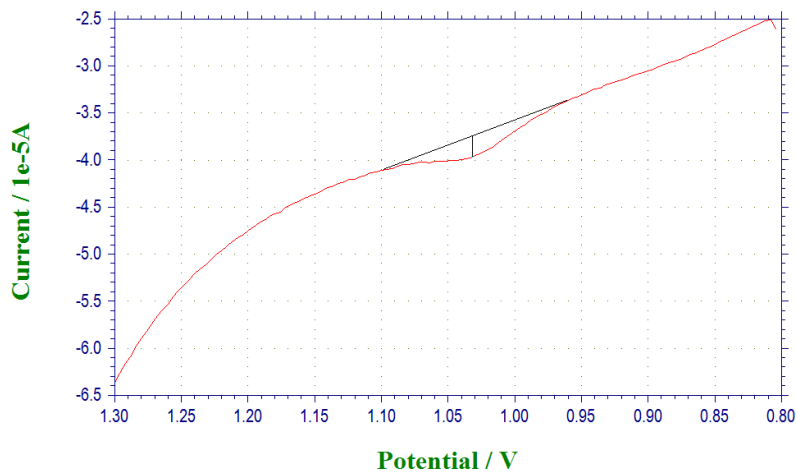


Figura 14 Voltamograma electrodo modificado con template de aciclovir 5.0 μM

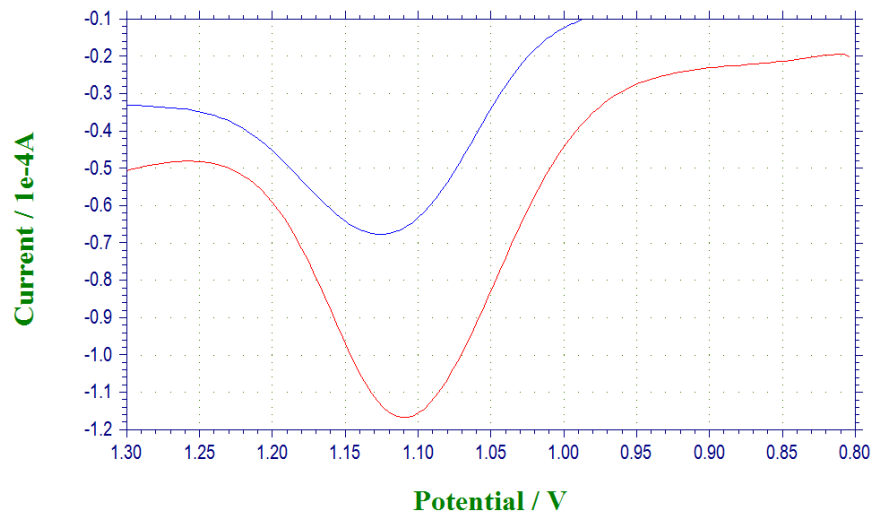


Figura 15 Comparación entre electrodo desnudo y modificado con plantilla. La figura azul corresponde al electrodo desnudo, la roja es del electrodo modificado con plantilla. Las soluciones corresponden a 1.00 mM de aciclovir. La corriente aumentó en un 100% aproximadamente

Por otro lado, para confirmar que al polimerizar se está formando la huella molecular del aciclovir, se realizó una modificación sin template. Como se ve en la figura 16, al realizar voltametría de onda cuadrada con el electrodo modificado sin huella (voltamograma azul), no se registra ninguna señal, porque el aciclovir no puede entrar y hacer contacto con la superficie del electrodo, caso contrario a lo que ocurre con la plantilla (voltamograma rojo).

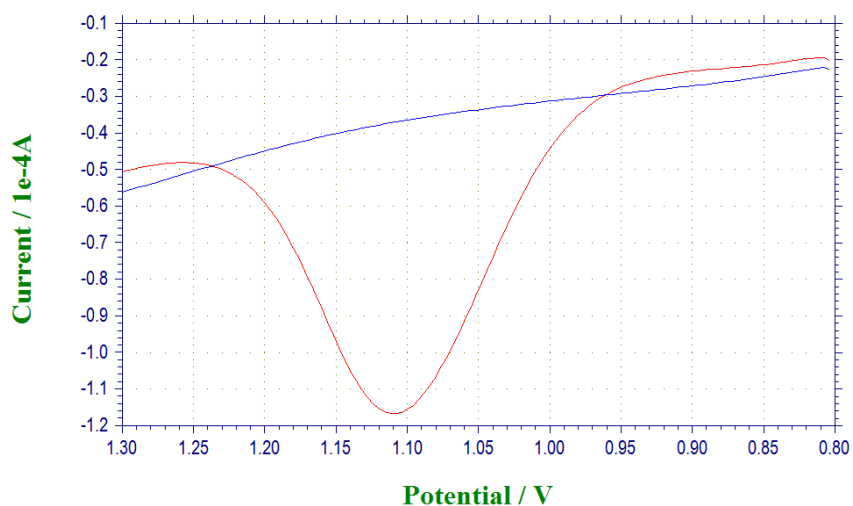


Figura 16 Comparación entre electrodo modificado con y sin plantilla. La figura azul corresponde al electrodo modificado sin plantilla, la roja es del electrodo modificado con plantilla. La solución corresponde es aciclovir 1.00 mM.

La formación de la huella molecular es lo que permite que el método sea selectivo, en la figura 17 se muestra el esquema molecular de la electropolimerización y de la sobreoxidación. Es selectivo debido a que en la huella molecular se conservan las interacciones que se generaron con el aciclovir, al sobreoxidar, este se elimina, pero las interacciones se conservan, y solamente otra molécula de aciclovir puede interactuar de la misma manera.

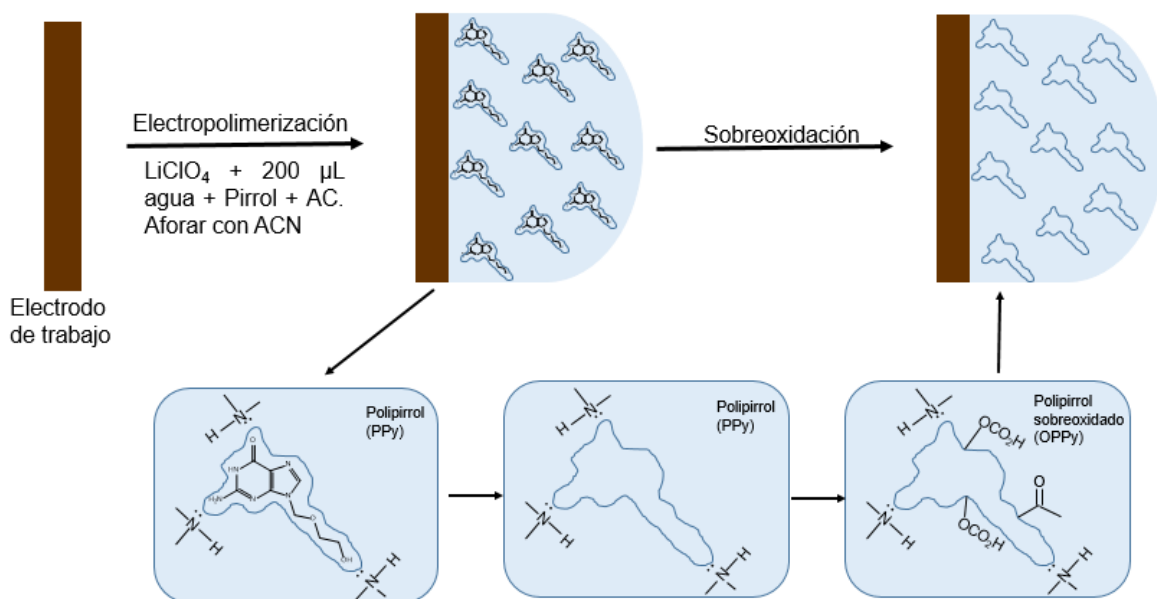
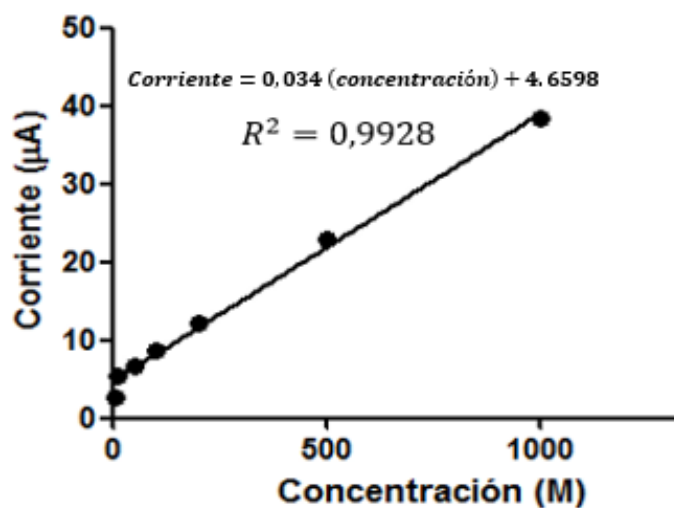


Figura 17 Esquema electropolimerización-sobreoxidación

Una ventaja de los electrodos recubiertos con película de polipirrol es que son significativamente más estables que el desnudo. Los electrodos con la película pueden usarse para al menos 40 mediciones sin mostrar signos de pérdida de película mientras la precisión de la respuesta permanece constante, esto se puede comprobar debido a que el potencial de cada medida se mantiene constante en un rango de 1.000 a 1.300 V.

2.5.6 Límite de detección y de cuantificación, linealidad, repetibilidad y reproducibilidad

En la gráfica 6 se observa la curva de calibración 5.0 μM , 10.0 μM , 50.0 μM , 100.0 μM , 200.0 μM , 500.0 μM y 1.00 mM, la desviación entre los 3 puntos fue tan baja, que no se observan en la gráfica. Con esta curva fue posible calcular que el límite de cuantificación, es decir la mínima concentración de aciclovir que pudo ser cuantificada, fue 4.29×10^{-5} mg/mL y que la concentración mínima de aciclovir que puede ser detectada con fiabilidad por este método analítico, es decir, el límite de detección es 1.29×10^{-5} mg/mL. La linealidad se cumple en todos los puntos de la curva que se emplearon para el análisis.



Gráfica 6 Curva de calibración

El método cumple el criterio de repetibilidad, dado que en un mismo día se realizaron varias mediciones a una muestra; la corriente y el potencial pico no variaron significativamente con el tiempo (Tabla 4), lo que demuestra que el electrodo modificado es estable en el tiempo. La reproducibilidad se comprobó por 5 días en el cual se observaba el mismo patrón anterior (Tabla 5).

Tabla 4 Resultados repetibilidad

Hora	Corriente (μA)	Potencial (V)
8:00 am	0.1386	1.061
10:00 am	0.1414	1.063
12:30 pm	0.1318	1.061
3:00 pm	0.1339	1.064
7:00 pm	0.1312	1.060

Tabla 5 Resultados reproducibilidad

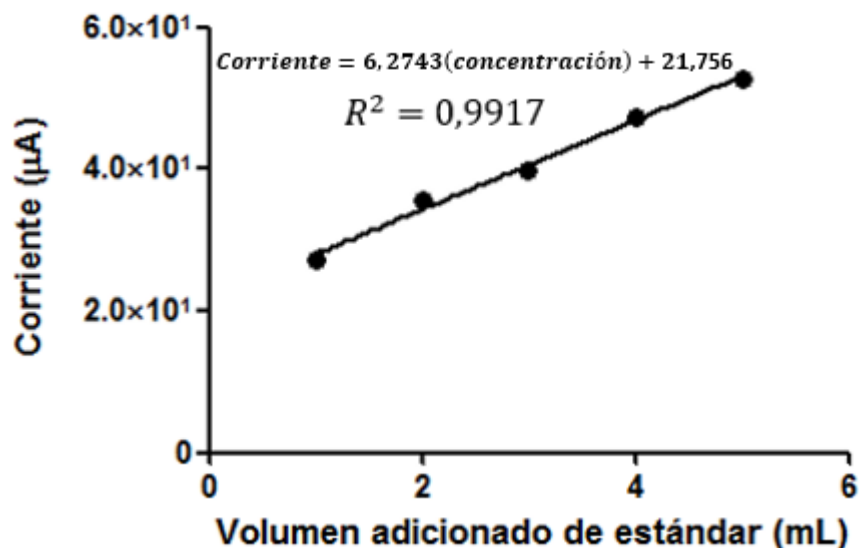
Día	Corriente (μA)	Potencial (V)
1	0.1386	1.063
2	0.1500	1.063
3	0.1296	1.059
4	0.1254	1.058
5	0.1152	1.060

2.5.6 Cuantificación de Aciclovir en preparaciones farmacéuticas comerciales

Se construyó una curva de calibración para determinar la concentración de aciclovir en una preparación comercial, ver la gráfica 6 y ésta fue de 208 ± 4.23 mg de aciclovir por tableta, que corresponde a un error del 4.0% (Cada tableta contiene 200 mg de aciclovir). De igual modo se determinó aciclovir por el método de adición múltiple de estándar (gráfica 7). Por este método el valor fue de 206 ± 4.214 mg, con un porcentaje de error de 3.0%. Para realizar los cálculos se emplearon los resultados de la tabla 6 y la corriente promedio de la muestra fue de $1.3877 \times 10^{-5}A$

Tabla 6 Resultados peso tabletas

Tabletas de aciclovir	Peso (g)
1	0.3186
2	0.3184
3	0.3186
4	0.3185
5	0.3187
Promedio	0.3186
Desviación	0.000102



Gráfica 7 Curva de calibración por adición múltiple de estándar.

Cabe resaltar, que estos resultados están en el rango de lo permitido por la farmacopea, no reportan valores inferiores al 90.0% ni valores superiores al 110.0% de la cantidad declarada de aciclovir, es decir, 200 mg (USP, 2013).

El valor obtenido por el método voltamétrico se comparó con el método por HPLC reportado en la USP. El procedimiento cromatográfico emplea guanina como estándar interno y dio como resultado 195 mg de aciclovir en la tableta comercial, lo cual corresponde a un error del 2.5% que es comparable con el error obtenido por el método voltamétrico. La fase móvil empleada fue ácido acético 0.02 M: metanol HPLC en una proporción 95:5, y con una columna cromatográfica C₁₈

2.6 Conclusiones

Se ha implementado un método voltamétrico exacto, simple, reproducible, sensible y de bajo costo para cuantificar aciclovir (ACY). Los parámetros empleados fueron un electrodo de carbono vítreo modificado con polipirrol sobreoxidado y con plantilla de ACY. Como electrólito de soporte para la cuantificación se usó una solución buffer de acetato de pH 4.50. Se polimerizó con la técnica de cronocoulombimetría empleando una solución de pirrol 0.020 M, agua 250 μ L, perclorato de litio 0.1 M, acetonitrilo y aciclovir 0.003 M como plantilla y sobreoxidó con la misma técnica en una solución de hidróxido de sodio 0.10 M. Los valores obtenidos de corriente anódica después de la modificación permitieron alcanzar un límite de cuantificación de 4.29×10^{-5} mg/mL y un límite de detección de 1.29×10^{-5} mg/mL. El sensor se aplicó a una formulación farmacéutica, el promedio obtenido fue de 206 ± 4.214 mg con un porcentaje de error relativo de 3.0%, comparado con la proclama del medicamento de 200 mg

La linealidad del método está en el rango de 1.122×10^{-6} - 2.243×10^{-6} mg/mL y presenta un coeficiente de correlación de 0.9988. Los resultados son satisfactorios y el método voltamétrico es adecuado para cuantificar aciclovir en preparaciones comerciales usando GCE/OPPy + plantilla.

2.7 Recomendaciones

En futuros trabajos se sugiere validar completamente esta metodología además de implementarla no sólo a preparaciones farmacéuticas, sino también a muestras biológicas como plasma sanguíneo u orina. Adicionalmente, se puede utilizar otros polímeros conductores como poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) buscando mejorar el límite de cuantificación. Se puede también ensayar otro tipo de electrodo de trabajo, los ultramicroelectrodos que poseen unas ventajas inherentes debido a su tamaño.

2.8 Referencias

- Adelaide, M., & Ferreira, A. (n.d.). Capítulo 10 Técnicas electroquímicas para la determinación y especiación de arsénico en aguas. <https://doi.org/10.1>.
- Bard, A., & Faulkner, L. (2001). *Electrochemical methods fundamentals and applications*. 2 edición, Estados Unidos: John Wiley & Sons, inc.
- Bard, A., & Zoski, C. (2012). *Electroanalytical chemistry vol 24*. Estados Unidos: CRC Press.
- Bott, A., & Heineman, W. (2013). Chronocoulometry. Universidad de Cincinnati.
- Brajter, A., Spurlock, L., Jaramillo, A., Praserthdam, A., & Lewis, J. (1996). Selectivity and sensitivity of ultrathin purine-templated overoxidized polypyrrole film electrodes. *Analytica Chimica Acta* 336, 37-46
- Can, S., Yilmaz, S., Saglikoglu, G., Sadikoglu, M., & Menek, N. (2015). Electrocatalytic Oxidation of Acyclovir on Poly(p-Aminobenzene Sulfonic Acid) Film Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*, 27(10), 2431–2438. <https://doi.org/10.1002/elan.201500102>
- Carbó, A. D. (n.d.). METODOS ELECTROQUIMICOS APLICADOS AL ANALISIS MEDIOAMBIENTAL. Retrieved from <http://catcemexsost.webs.upv.es/wp-content/uploads/CONANTONIOPOWER.pdf>
- Dorraj, P. S., & Jalali, F. (2016). Differential pulse voltammetric determination of nanomolar concentrations of antiviral drug acyclovir at polymer film modified glassy carbon electrode. *Materials Science and Engineering C*, 61, 858–864. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.030>
- Farmacopea de los Estados Unidos de América (2013). *USP 36 NF 31*. (Volumen 2).

- Heli, H., Zarghan, M., Jabbari, A., Parsaei, A., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2010). Electrocatalytic oxidation of the antiviral drug acyclovir on a copper nanoparticles-modified carbon paste electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 14(5), 787–795. <https://doi.org/10.1007/s10008-009-0846-x>
- Menosalina, S. (2004). *Fundamentos y aplicaciones de electroquímica*. Venezuela: Universidad de los Andes.
- Ortíz, Y., Martínez, R., & Hernández, R. (2006). Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Análisis Instrumental, Técnicas Electroanalíticas. Parte II Voltamperometría. Retrieved from http://webdelprofesor.ula.ve/ciencias/rmhr/Index_archivos/GuiAIV2.pdf
- Renjini, J., & Girish, K. (2011). Electrochemical Sensing of Acyclovir at a Gold Electrode Modified with 2-Mercaptobenzothiazole-[5,10,15,20-tetrakis-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl) porphyrinato]copper(II). *Analytical Sciences*, 27, 67–72.
- Sabouraud, G., Sadki, S., & Brodie, N. (2000). The mechanisms of pyrrole electropolymerization. *Chemical Society Reviews*, 29(5), 283–293. <https://doi.org/10.1039/a807124a>
- Sadikoglu, M., Saglikoglu, G., Yagmur, S., Orta, E., & Yilmaz, S. (2011). Voltammetric Determination of Acyclovir in Human Urine Using Ultra Trace Graphite and Glassy Carbon Electrodes. *Analytical Chemistry*, 7(2), 130-135. <https://doi.org/10.2174/157341111794815011>
- Shaidarova, L. G., Gedmina, A. V., Zhaldak, E. R., Chelnokova, I. A., & Budnikov, H. K. (2015). Voltammetric Determination of Acyclovir in Drugs Using an Electrode Modified by Ruthenium Hexachloroplatinate or Hexacyanocobaltate Film. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48(11), 747–752. <https://doi.org/10.1007/s11094-015-1186-z>
- Shrahrokhian, S., Azimzadeh, M., & Amini, M. (2015) Modification of glassy carbon electrode with a bilayer of multiwalled carbon nanotube/tiron-doped polypyrrole:

Application to sensitive voltammetric determination of acyclovir. *Materials Science and Engineering*, 53, 134-141.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.030>

Skoog, D., & West, D. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (Novena Ed). Estados Unidos: Brooks/Cole Cengage Learning.

Universidad Nacional Autónoma de México. (n.d.). Aciclovir. Retrieved May 4, 2017, from http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Aciclovir.htm