

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



Cuantificación Voltamétrica de Contaminantes Orgánicos de Origen Industrial

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERÍA

ALAN GABRIEL AYALA BAUTISTA

DIRECTOR DE TESIS

Margarita Stilianova Stoytcheva

CODIRECTOR

Roumen Koytchev Zlatev



Mexicali, B. C.

A agosto de 2021

INSTITUTO DE INGENIERÍA
Universidad Autónoma de Baja California
EXCELENCIA E INNOVACIÓN EN INGENIERÍA

Índice

Capítulo 1. Introducción General	13
1.1 Introducción General	13
1.2 Justificación	14
1.3 Hipótesis de Investigación	15
1.4 Objetivo de la investigación	16
1.5 Objetivos específicos	16
Capítulo 2. Revisión de literatura.....	17
2.1 Introducción a la determinación de contaminantes orgánicos en medios acuosos	17
<i>2.1.1 Contaminantes orgánicos</i>	<i>19</i>
<i>2.1.2 Contaminantes dihidroxibenzoicos</i>	<i>20</i>
<i>2.1.2 Contaminantes nitrofenólicos</i>	<i>22</i>
<i>2.1.3 Contaminantes monoclorofenólicos y diclorofenólicos.....</i>	<i>24</i>
2.2 Los métodos electroanalíticos – bases teóricas y aplicación	26
<i>2.2.1 Métodos electroanalíticos</i>	<i>28</i>
<i>2.2.2 Estrategias contra la pasivación del electrodo de trabajo</i>	<i>29</i>
<i>2.2.3 Voltametría Cíclica</i>	<i>32</i>
<i>2.3.4 Voltametría Diferencial de Pulsos Alternativos (DAPV)</i>	<i>36</i>
<i>2.4.5 Amperometría</i>	<i>37</i>

2.3 Diseño de una celda electroquímica	38
2.3.1 Selección de electrodos	40
2.4 Biosensores electroquímicos	42
2.4.1 Clasificación de los biosensores.....	46
2.4.2 Biosensores electroquímicos.	48
2.5 Inmovilización del agente de biorreconocimiento.....	49
2.5.1 Adsorción.....	51
2.5.2 Unión covalente.....	52
2.5.3 Microencapsulación	53
2.5.4 Atrapamiento.....	53
2.5.5 Reticulación.....	54
2.6 Método de inmovilización	55
2.6.1 Plataformas poliméricas fotosensibles.....	56
Capítulo 3. Metodología.....	57
3.1 Determinación simultánea de isómeros dihidroxibenzoicos	60
3.1.1 Estudios sobre la composición del electrodo.....	61
3.1.2 Estudios sobre el pH de la solución en la celda electroquímica.....	63
3.1.3 Determinación de Catecol e Hidroquinona por Voltametría Diferencial de Pulsos Alternativos (DAPV)	64
3.1.4 Estudios de interferentes fenólicos en la determinación de Catecol e Hidroquinona ..	67
3.2 Determinación de un sistema isomérico de mononitrofenoles	69

3.2.1 Caracterización electroquímica del electrodo de trabajo (GCE) sin modificación y con modificación	69
3.2.2 Efecto del pH en la determinación del sistema isomérico de nitrofenoles.	75
3.2.3 Determinación de los isómeros nitrofenólicos por DAPV.	78
3.3 Determinación de sistemas diclorofenólicos utilizando un electrodo de pasta de carbono.....	84
3.3.1 Estudios de Adsorción.....	85
3.3.2 Caracterización electroquímica del electrodo.....	87
3.3.3 Rendimiento teórico del electrodo	93
3.3.4 Estudios de interferentes fenólicos.	97
3.4 Aplicación de un biosensor para determinación de contaminantes orgánicos por DAPV	101
3.4.1 Caracterización morfológica del electrodo	103
3.4.2 Evaluación de la actividad enzimática	104
3.4.3 Comportamiento electroquímico del catecol utilizando GCE/MWCNT-DiaUV	107
3.4.4 Rendimiento analítico del electrodo con tirosinasa inmovilizada por métodos fotopoliméricos mediante amperometría	109
3.4.5 Aplicación del biosensor con la plataforma de inmovilización de Diazirina para la determinación de un neurotransmisor	111
3.4.5 Estudios de interferentes para la determinación de dopamina utilizando el biosensor GCE/MWCNT-DiaUV.....	113
Capítulo 4. Resultados y Discusión.....	116

4.1 Sistema de isómeros dihidroxibenzoicos utilizando un electrodo de grafito espectroscópico.....	116
4.2 Sistema de isómeros mononitrofenólicos utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado	118
4.3 Sistema de contaminantes clorofenólicos utilizando un electrodo de pasta de grafito.	120
4.4 Construcción de un biosensor como aplicación para la determinación de contaminantes	122
Capítulo 5. Conclusiones	124
Capítulo 6. Trabajos futuros.....	125
Capítulo 7. Referencias	126
Producción Científica	146

Índice de Figuras

Capítulo 2. Revisión de literatura

Figura 2.1 Estructura química de los isómeros dihidroxibenzoicos: 1) catecol; 2) resorcinol; 3) hidroquinona.	22
Figura 2.2 Estructura química de los isómeros mononitrofenólicos: 1) o-nitrofenol; 2) m-nitrofenol; 3) p-nitrofenol.	23
Figura 2.3 Estructura química de los isómeros monoclorofenólicos y diclorofenólicos: 1) 2-clorofenol; 2) 3-clorofenol; 3) 4-clorofenol; 4) 2,4 – Diclorofenol.	25
Figura 2.4. Diagrama donde visualmente se expresa la adherencia de diversas especies químicas que afectan las mediciones voltamétricas.	29
Figura 2.5 Diagrama que representa el movimiento correcto para el pulimiento mecánico del electrodo. El electrodo se somete a movimientos en forma de ocho bajo un papel abrasivo con agua para pulir su superficie.	31
Figura 2.6 Diagrama de voltametría cíclica presentando los picos de oxidación y reducción de Hidroquinona.	33
Figura 2.7 Convención de Estados Unidos para designar los picos de oxidación y reducción en un voltamograma cíclico	34
Figura 2.8 Diagrama representando una celda electroquímica para diversos métodos electroanalíticos donde se describen sus componentes.	38
Figura 2.9 Diagrama representando un electrodo de referencia de AgCl/Ag. El cable de plata se encuentra sumergido en una solución de AgCl y al final del tubo de vidrio se encuentra el filtro poroso para el contacto correcto con la solución de trabajo.	41
Figura 2.10 Esquema simple del funcionamiento de un biosensor	45

Capítulo 3. Metodología

Figura 3.1 Curvas teóricas (A) y experimentales (B) de la técnica de voltametría diferencial de pulsos alternativos, en la curva A se muestra el cambio de la respuesta en función de la amplitud de los pulsos mientras que en la curva B es la determinación simultánea de diferentes iones..59

Figura 3.2 Voltamogramas cíclicos presentando los picos anódicos y catódicos de hidroquinona y catecol en electrodos de Au y Pt; la solución inicial tiene 0.5 mM de hidroquinona y 0.5 mM de catecol, para después aumentar la concentración de catecol a 1 mM. Las curvas CV fueron realizadas en una celda electroquímica con buffer de pH 7.0, de composición PBS 0.1 M.62

Figura 3.3. Voltamogramas cíclicos presentando la variación del potencial de los procesos de oxidación y reducción del catecol a 0.5 mmol L⁻¹ en función de la variación del pH de la solución buffer PBS 0.1 mol L⁻¹, la serie de color negro representa la gráfica del pH 7.0, siendo quien presentó mayores valores de las corrientes de los picos.63

Figura 3.4 Voltamogramas de DAPV para HQ y CC donde se aprecia el incremento de la corriente de los picos tanto anódicos como catódicos en función de la concentración; para la gráfica a: a) 10 µM; b) 20 µM; c) 30 µM; d) 40 µM y e) 50 µM; para la gráfica b: a) 70 µM; b) 80 µM; c) 90 µM; d) 100 µM; e) 110 µM.....65

Figura 3.5 Voltamogramas de DAPV HQ y CC en la determinación simultánea con sus respectivas curvas de calibración. Para las dos graficas tenemos una concentración de HQ y CC respectivamente de a) 10 µM; b) 20 µM; c) 30 µM; d) 40 µM y e) 50 µM; mientras que el otro isómero se mantiene a 20 µM.66

Figura 3.6 Voltamogramas de DAPV para la determinación de HQ (15 µM) y CC 2.5 µM) en presencia de los interferentes RC (300 µM), F (300 µM) y PNP (300 µM).....68

Figura 3.7 Voltamogramas Cíclicos para el estudio del comportamiento del sistema isomérico de o-NP (100 µM), m-NP (100 µM) y p-NP (100 µM) utilizando un electrodo de carbón vítreo (GCE)

en una solución de pH 6.0; la línea punteada representa el primer barrido mientras que la continua el segundo.	71
Figura 3.8 Voltamogramas Cíclicos que muestran el comportamiento de los isómeros nitrofenólicos y sus picos de reducción / oxidación.	72
Figura 3.9 Aumento de la corriente de los picos catódicos en la determinación voltamétrica de los isómeros nitrofenólicos dependiendo de la modificación del electrodo; la concentración de los isómeros es de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$	75
Figura 3.10 Voltamogramas Cíclicos que muestran el cambio de la corriente y el potencial al cambiar el pH de la solución PBS 0.1 M en la celda electroquímica, la concentración de los isómeros en cada ensayo fue de 0.2 mmol L^{-1} ; también la sección de la regresión en función del cambio del potencial del pico anódico y catódico.	77
Figura 3.11 Determinación de los isómeros por DAPV en conjunto con sus curvas de calibración para los picos de reducción y oxidación; a) $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; b) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; c) $75 \mu\text{mol L}^{-1}$; d) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e) $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ f) $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ g) $175 \mu\text{mol L}^{-1}$ h) $200 \mu\text{mol L}^{-1}$	79
Figura 3.12 Determinación de los isómeros por DAPV en presencia simultánea, se incluyen sus curvas de calibración para los picos de reducción y oxidación; las concentraciones son: a) $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; b) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; c) $75 \mu\text{mol L}^{-1}$; d) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e) $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ f) $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ g) $175 \mu\text{mol L}^{-1}$ h) $200 \mu\text{mol L}^{-1}$; mientras que el isómero no estudiado se mantiene a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$	81
Figura 3.13 Determinación del isómero o-NP por DAPV en presencia simultánea, se incluye la curva de calibración para los picos de reducción y oxidación en un rango lineal de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$; las concentraciones son: a) $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; b) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; c) $75 \mu\text{mol L}^{-1}$; d) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e) $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ f) $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ g) $175 \mu\text{mol L}^{-1}$ h) $200 \mu\text{mol L}^{-1}$; mientras que el isómero no estudiado se mantiene a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$	82
Figura 3.14 Determinación del sistema isomérico en forma simultánea mediante DPV, todos los nitrofenoles están en una concentración de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$	83

Figura 3.15 Isotherma de Harkin – Jura obtenido mediante el estudio cinético de adsorción mediante espectrofotometría.....	86
Figura 3.16 Resultados de la aplicación de la ecuación de Randles – Sevcik, en la gráfica a) (15% L) se aprecia que, al electrodo contener una cantidad de laponita, la magnitud de la corriente de oxidación es mayor a la de no contener laponita que corresponde a la gráfica b) (0%).	88
Figura 3.17. Voltamogramas cíclicos de las diferentes formulaciones (0 al 15% de laponita) mostrado por el software CHI440A	89
Figura 3.18 Gráficas para la optimización del contenido de laponita en donde se obtiene el valor óptimo de la composición.....	90
Figura 3.19 Voltamogramas cíclicos que muestran el comportamiento de la corriente de oxidación variando el pH de la solución en los ensayos con una concentración de 20 μ M de 2,4 – DCP dentro de la celda y Gráfica de optimización para encontrar el pH que optimiza la variable de respuesta, la corriente del pico anódico.	92
Figura 3.20 Gráfica de optimización para encontrar el tiempo de adsorción que maximiza la cantidad de analito que pudo adsorberse a la superficie del electrodo de pasta de grafito. La corriente del pico anódico es una manera indirecta para cuantificar el incremento proporcional de la cantidad de analito difundido por cada minuto.....	94
Figura 3.21 Voltamograma de la voltametría diferencial de pulsos con el electrodo de pasta de grafito, con condiciones de la celda de pH 5.5 y concentración 20 μ M en la celda. En este voltamograma, se aprecia como hay una respuesta en el valor de voltaje donde el 2,4 – DCP se oxida al tener 4 minutos de tiempo de adsorción en la superficie del electrodo.....	95
Figura 3.22 Determinación por Voltametría Diferencial de Pulsos (DPV) para la curva de calibración de 2,4 – DCP utilizando un electrodo de pasta de grafito modificado con laponita ($R^2=0.9915$).	96
Figura 3.23 Voltametría diferencial de pulsos (DPV) mostrada en el software CHI440A de una solución con el analito en conjunto con algunos interferentes coexistentes; las especies químicas	

orgánicas son: Catecol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), para – nitrofenol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) y 2,4 – Diclorofenol ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$).....	98
Figura 3.24 Voltametría diferencial de pulsos (DPV) con los datos tratados de una solución con el analito en conjunto con algunos interferentes coexistentes; las especies químicas orgánicas son: Catecol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), para – nitrofenol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) y 2,4 – Diclorofenol ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), aquí se indica a quien corresponde cada pico anódico.	99
Figura 3.25 Voltametría diferencial de pulsos (DPV) con los datos tratados de una solución con el analito en conjunto con algunos interferentes coexistentes; las especies químicas dentro de la solución son: Resorcinol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), 2 – Clorofenol($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), 4 – Clorofenol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) y 2,4 – Diclorofenol ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$).	100
Figura 3.26 Imágenes SEM mostrando la morfología del electrodo GCE modificado con MWCNT, a) resolución de 500 nm; b) resolución de 10 μm	104
Figura 3.27 Gráficas de Absorbancia vs Tiempo para cada uno de los electrodos modificados y sin modificación. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por 15 minutos, con 50 μL de CC 0.1 mmol L^{-1} y 950 μL de buffer PBS 0.1 mol L^{-1} pH 6.5.....	106
Figura 3.28 Curvas de voltametría cíclica de Catecol 1 mmol L^{-1} donde se presentan los electrodos con diferentes modificaciones y método de inmovilización, siguiendo el orden: a) GCE; b) GCE/MWCNT; c) GCE/MWCNT-DiaVis; GCE/MWCNT-DiaUV	108
Figura 3.29 Respuesta amperométrica del biosensor GCE/MWCNT/Dia-UV al catecol y su correspondiente curva de calibración.....	110
Figura 3.30 Curvas de DAPV sobre la respuesta del biosensor estructurado GCE/MWCNT-DiaUV a dopamina y a la izquierda es su respectiva curva de calibración; cada curva de DAPV tiene un incremento de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre la concentración de DA.	112
Figura 3.31 Curvas de DAPV sobre la respuesta del biosensor estructurado GCE/MWCNT-DiaUV a dopamina y con interferentes Norepinefrina (NEPN), Epinefrina (EPN) y Ácido úrico (UA). .	114

Figura 3.32 Curvas de DAPV sobre la respuesta del biosensor estructurado GCE/MWCNT-DiaUV a dopamina con el interferente ácido úrico y a la izquierda es su respectiva curva de calibración, en esta gráfica se presenta simultáneamente la correspondiente a DA y DA+UA. cada curva de DAPV tiene un incremento de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre la concentración de DA y 100 mmol L^{-1}115

Que tus sueños siempre sean a la altura de una estrella del cielo.

Aspira a lo alto, la capacidad para lograrlo reside en ti.

Alan Gabriel Ayala Bautista

Capítulo 1. Introducción General

1.1 Introducción General

La contaminación por agentes químicos en agua es uno de los mayores problemas ambientales a nivel mundial; el agua contaminada representa un riesgo a la salud y bienestar humano que afecta al desarrollo sostenible de la sociedad y su economía. La presencia de diversos agentes químicos contaminantes, como los compuestos orgánicos que son productos de procesos artificiales o naturales [1], deben llevar un monitoreo constante para asegurar que su concentración no sobrepasen lo dispuesto en la normatividad. En este trabajo de investigación se plantea la utilización de un método electroanalítico para la determinación de contaminantes orgánicos utilizando la voltametría diferencial de pulsos alternativos, teniendo por ventajas su alta resolución, el hecho de que es un proceso relativamente sencillo, que requiere de poco tiempo durante la experimentación y el bajo costo de las determinaciones [2]; se analizarán diversas muestras acuosas sintéticas de desechos industriales utilizando la voltametría diferencial de pulsos alternativos que tiene como ventaja una resolución mayor a los métodos de segundo orden como la polarografía de onda cuadrada o la polarografía diferencial de pulsos para determinar diversos analitos en la misma muestra [3].

1.2 Justificación

En las últimas décadas, la creciente actividad industrial en diversos países aumentó la preocupación por los efectos tóxicos de agentes contaminantes orgánicos e inorgánicos que están presentes en el ambiente por residuos industriales, sean orgánicos e inorgánicos; de modo que surge la necesidad de monitorear los niveles de contaminación en diversos lugares, como en el proceso industrial que involucra metales pesados, o el efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales que únicamente se enfoca en inactivar la actividad bacteriana pero no en remoción de contaminantes químicos. Aunque existen alternativas para la cuantificación de contaminantes ambientales, los métodos voltamétricos ofrecen ventajas únicas que otro tipo de determinaciones no lo hacen, por ejemplo, la voltametría utiliza un potencial aplicado a un sensor llevando a una alta selectividad y especificidad; cada especie química, así como cada elemento u estado de oxidación, tiene un potencial de oxidación y/o reducción asociado [4].

Una de las principales desventajas de utilizar métodos electroanalíticos es la pasivación del electrodo, que es el ensuciamiento debido a los productos generados de la reacción electroquímica siendo adheridos a la superficie del mismo, creando una caída del potencial por la película electrodepositada en la superficie del electrodo [5, 6]. Se propone la implementación de modificaciones nanoestructuradas para disminuir los efectos de la pasivación del electrodo y aumentar la sensibilidad de éste; así, al adherirse los subproductos a la superficie del electrodo, se plantea la limpieza física y química de este eliminar la pasivación en los análisis voltamétricos. Durante este proyecto doctoral, se utilizó la técnica electroanalítica de Voltametría Diferencial de Pulsos Alternativos (DAPV) como estrategia para determinar simultáneamente diferentes sistemas de contaminantes orgánicos, en su mayoría isómeros, que comparten potenciales de oxidación cercanos.

Existen otras estrategias para la determinación simultánea de analitos, sin embargo, también provocan desventajas considerables al analizar los resultados, por ejemplo el tratamiento matemático de la información disminuye la precisión de los resultados [7]. Aquí se propone la determinación simultánea con o sin modificación del electrodo mediante DAPV.

Es importante destacar que comparados con los métodos instrumentales convencionales como los cromatográficos o espectrofotométricos, los métodos electroquímicos son más sencillos de operar, tiene menor costo de instrumentación, tiempos de respuesta más rápidos, así como la ventaja de aplicarse *in situ*. Por estas razones, añadiendo las que se estudiarán individualmente en cada sistema de isómeros, se propuso el estudiar la cuantificación de estos contaminantes orgánicos de origen industrial utilizando DAPV

1.3 Hipótesis de Investigación

La voltametría diferencial de pulsos alternativos es una técnica electroanalítica sencilla, sensible y precisa con una resolución elevada que resulta de la forma de un voltamograma que contiene picos anódicos y catódicos registrados para cada analito, que permite su aplicación en la cuantificación simultánea de contaminantes orgánicos en soluciones industriales de manera directa o través de su aplicación en biosensores.

1.4 Objetivo de la investigación

- Desarrollar un método sensible, preciso y con alta resolución para la determinación de contaminantes orgánicos que pertenecen a los tres grupos principales de contaminantes: los isómeros dihidroxibenzoicos, los mononitrofenoles y los clorofenoles aplicando la técnica electroanalítica de voltametría diferencial de pulsos alternativos mediante diferentes métodos de modificación de la superficie del electrodo para aumentar la sensibilidad de la cuantificación.

1.5 Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones de operación durante los ensayos voltamétricos.
- Caracterizar los parámetros analíticos para las determinaciones (Limite de detección, rango dinámico lineal, resolución, sensibilidad, reproducibilidad).
- Caracterizar los parámetros dependientes de la morfología estructural de los electrodos derivado de la modificación con materiales nanoestructurados.
- Aplicación de la voltametría diferencial de pulsos alternativos para la determinación simultánea de contaminantes en muestras acuosas.
- Implementar la voltametría diferencial de pulsos alternativos en un biosensor aplicado a la determinación de dopamina.

Capítulo 2. Revisión de literatura

2.1 Introducción a la determinación de contaminantes orgánicos en medios acuosos

La tecnología de producción industrial de la iniciativa privada puede fabricar cualquier peculiaridad, tal es el caso de microelectrónicos, macroestructuras, plantas para la producción o síntesis de sustancias y alimentos industrializados, entre otros. Todas estas ventajas tienen un costo: la generación de residuos tóxicos que se transportan a lo largo del planeta.

La contaminación ambiental es un problema de interés global; cada día por causas antropológicas se liberan millones de compuestos contaminantes en diferentes cuerpos de agua, al aire por la combustión incompleta de vehículos de transporte urbano e industrial y al suelo por diversas actividades agrarias, produciendo una acumulación de especies químicas que pueden ser tóxicas para los ecosistemas acuáticos y terrestres que rodean las ciudades con gran actividad urbana.

Con el incremento de las actividades económicas e industriales en ciudades grandes y las actividades agropecuarias se ha hecho un gran esfuerzo mediante entidades de protección al ambiente el control de la cantidad de contaminantes que se difunden a través de los cuerpos de agua, aire y suelo así como diferentes investigadores desarrollan modelos novedosos para

predecir la acumulación de estos compuestos [8], algunas de estas variables incluidas en el análisis computacional son los factores socio económicos, la actividad industrial y la localización geográfica por mencionar algunas.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que cada año se emiten diferentes compuestos químicos nuevos de toxicidad desconocida que pueden alterar la salud humana al ser liberados al medio ambiente. Recientemente se realiza un esfuerzo para determinar los tipos de contaminantes, entre ellos los disruptores endócrinos, que constituyen una gran variedad de contaminantes ambientales que pueden alterar el sistema endócrino de los organismos vivos y algunos son bioacumulables.

La determinación de estos tipos de contaminantes es un área de interés para muchos investigadores en diferentes campos de la ciencia, desde ciencias ambientales hasta la química aplicada y un método para la determinación de diferentes niveles de disruptores endócrinos es utilizar biosensores.

La contaminación de agua ocurre cuando los efluentes de diversos orígenes se difunden en un lago, río, océano, etc. provocando que cambie la calidad del agua. Las principales fuentes de agentes contaminantes son las naturales, derivados de efluentes térmicos y ácidos que provienen de áreas volcánicas, fuentes domésticas como los flujos del alcantarillado, productos de lavandería y los desechos industriales, los cuales varían de localidad a localidad e incluso de industria a industria [9]. Es de interés este último debido a la gran diversidad que presentan los efluentes industriales; una empresa que tiene como enfoque productos alimenticios, por ejemplo, sus desechos serían mayormente orgánicos mientras que una industria minera o siderúrgica sus contaminantes serían principalmente metales y/o compuestos inorgánicos [10].

2.1.1 Contaminantes orgánicos

Este tipo de contaminantes son moléculas que están compuestas mayoritariamente de carbono e hidrogeno mientras algunos otros en menor traza como el nitrógeno, azufre, cloro, entre otros. Entre la lista de ejemplos se pueden nombrar los pesticidas, solventes, desengrasantes, derivados del petróleo y algunos compuestos presentes en desechos industriales. A diferencia de los contaminantes inorgánicos, los orgánicos son biodegradables, pero presentan un alto riesgo de carcinogenicidad [11]. Algunos ejemplos de estos compuestos son el catecol y la hidroquinona, siendo estos dos isómeros del dihidroxibenceno. Estos compuestos se emplean en diversas industrias como la cosmética, en pesticidas, pinturas, farmacéuticas, como antioxidantes y aditivos alimentarios; siendo altamente tóxicos para el medio ambiente [12].

A pesar de presentar biodegradabilidad estos contaminantes orgánicos, las condiciones ecológicas dificultan el grado de degradación. Su alta toxicidad y baja degradabilidad hacen del catecol y la hidroquinona compuestos de interés, siendo estos considerados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, Environmental Protection Agency) de Estados Unidos contaminantes ambientales [13].

Durante la aplicación y el proceso de manufactura de estos compuestos se liberan inevitablemente al ambiente, contaminando ríos, lagos y aguas subterráneas por lo que en una gran diversidad de efluentes industriales, se presentan muchos de los isómeros del dihidroxibenceno [14].

De los diversos métodos presentes que actualmente se utilizan para la determinación de estos isómeros está la cromatografía líquida [15], los métodos luminiscentes como la fosforescencia [16], espectroscopia [17], electroforesis [18] y los métodos electroanalíticos [27,28]. Debido a las

similitudes de sus estructuras y características, estos isómeros coexisten en diversas muestras, interfiriendo en los ensayos para su determinación [21].

Existe una lista amplia de compuestos orgánicos encontrados en cuerpos de agua y lodos residuales del tratamiento de esta, suficientes como para notar la importancia de la cuantificación y remediación de estos componentes [21–30]. En este trabajo doctoral se estudiará la determinación de contaminantes orgánicos por métodos electroanalíticos, específicamente se estudiarán los isómeros dihidroxibenzoicos, los isómeros nitrofenólicos y los isómeros clorofenólicos.

2.1.2 Contaminantes dihidroxibenzoicos

El desarrollo industrial llevó a la difusión de contaminantes de preocupación global, entre ellos, algunas sustancias químicas aromáticas se propagaron en los cuerpos de agua. Algunos de importancia relevante son el benceno y sus derivados, como la hidroquinona. Este compuesto es de carácter tóxico en el medio ambiente, logró esparcirse a lo largo de los cuerpos importantes de agua de forma antropogénica; es utilizado en la industria como agente en la fotografía, intermediario en la producción de pigmentos en la pintura, en los aceites para barnices de madera, así como en los aceites para los motores de combustión interna. Adicionalmente, se utiliza como agente antioxidante en procesos con caucho mientras que, en el pasado, se utilizaba como aclarador de piel en productos cosméticos, uso que actualmente no es permitido [32].

La hidroquinona también puede formar parte de moléculas de peso molecular alto como las resinas, o aparecer en la degradación de productos generados al transformar compuestos aromáticos. Algunos procesos de oxidación avanzados de sustancias aromáticas,

particularmente el fenol, tienen como productos derivados del benceno: catecol, hidroquinona y resorcinol. Es conocido que el benceno requiere actividad metabólica antes de que logre provocar efectos tóxicos en los organismos vivos [33], ocurriendo la producción de metabolitos genotóxicos bioacumulables [34]. En resumen, los derivados del benceno por actividad industrial antes mencionados también se generan si se sigue la ruta metabólica del benceno, por lo que es un contaminante de interés.

Por otro lado, la formación de hidroquinona y *p*-benzoquinona en las primeras etapas de la oxidación del fenol por procesos industriales incrementa la toxicidad del residuo generado por la producción del fenol en aguas residuales, mostrando que estos compuestos disminuyen la capacidad de degradación del contaminante original [35].

Este compuesto aromático consiste en un anillo de benceno con dos grupos OH en posición *para*. Se encuentra disponible como cristal blanco, aunque el utilizado en grado industrial puede ser un gris claro. Es soluble en agua, metanol y éter, pero es menos soluble en agua que sus otros dos isómeros, el catecol y resorcinol. La hidroquinona tiene la capacidad de autooxidarse en dos procesos sucesivos de oxidación que involucran un electrón, produciendo una semiquinona extremadamente reactiva como producto intermedio. Los compuestos dihidroxibenzoicos, así como las quinonas son conocidas por causar en los organismos un estrés oxidativo y la unión específica de DNA a diversas proteínas [36]. También las hidroquinonas pueden formar complejos con varios metales di y tri valentes como el cobre y el hierro. En el caso del cobre, el complejo formado incrementa la producción de H₂O₂ por hidroquinona y promueve la autooxidación a benzoquinona [37].

La hidroquinona también puede originarse durante la biotransformación del benceno o del fenol; primero se metaboliza el benceno dentro del organismo para después llevar una hidroxilación

por varios procesos enzimáticos en las rutas de desintoxicación del hígado que a su vez producen hidroquinona, la cual se acumula en la médula ósea [38].

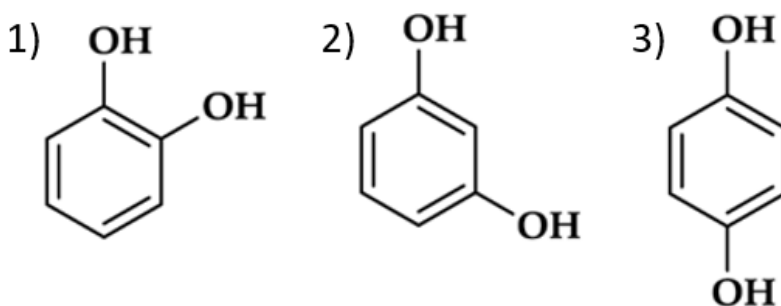


Figura 2.1 Estructura química de los isómeros dihidroxibenzoicos: 1) catecol; 2) resorcinol; 3) hidroquinona.

Por las propiedades tóxicas de estos contaminantes en medios acuosos, es de interés proponer diferentes técnicas analíticas para su determinación a las propuestas en la literatura que varían desde las técnicas espectrométricas, espectrofotométricas, fluorométricas, cromatográficas hasta electroanalíticas [36 – 43]. El reto es proponer técnicas novedosas, con buena relación costo – beneficio, así como de fácil implementación en estaciones de monitoreo para su uso en el control de la contaminación del ambiente por especies dihidroxibenzoicas.

2.1.3 Contaminantes nitrofenólicos

Los nitrofenoles son compuestos orgánicos que se han utilizado ampliamente por la industria de fabricación de pesticidas, pigmentos y farmacéuticos. Uno de los isómeros nitrofenólicos más estudiados es el *para* – nitrofenol (4 – nitrofenol), al ser un derivado de la producción del

insecticida paratión, logra tener una difusión en diversos mantos acuíferos como agua residual, ríos, agua subterránea, suelo tratado con el pesticida y la atmosfera [47]. Este isómero es cancerígeno, mutagénico y tóxico para los mamíferos [48]. Debido a su potencial de toxicidad, los compuestos nitroaromáticos están en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA.

Los mononitrofenoles tienen la capacidad de acumularse en diferentes tejidos de órganos de animales de sangre caliente. Pueden tener efectos crónicos, así como dañar severamente el sistema nervioso central, el hígado, el riñón y la sangre [49]. Estos compuestos aromáticos son frecuentemente detectados en efluentes industriales, en cuerpos de agua como ríos y lagos urbanos, en ecosistemas marinos y en la atmosfera.

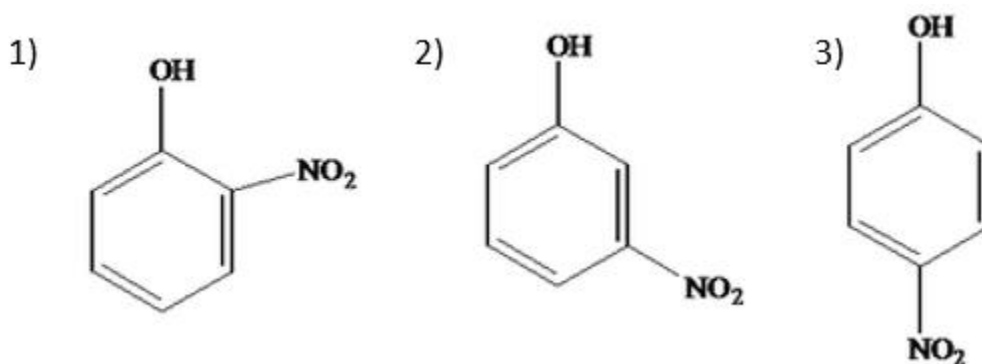


Figura 2.2 Estructura química de los isómeros mononitrofenólicos: 1) *o*-nitrofenol; 2) *m*-nitrofenol; 3) *p*-nitrofenol.

Al igual que los isómeros dihidroxibenzoicos, los isómeros mononitrofenólicos tienen diversas estrategias para cuantificación reportadas en la literatura variando desde métodos convencionales espectrométricos, espectrofotométricos, cromatográficos y hasta electroquímicos [47–52].

2.1.4 Contaminantes monoclorofenólicos y diclorofenólicos

Los clorofenoles se aplican ampliamente en la industria y comercialmente. Se utilizan como desinfectantes, conservadores de madera, blanqueadores, pigmentos, fibras vegetales y pieles debido a sus propiedades antimicrobianas. Consecuentemente, también poseen una toxicidad elevada. Por la frecuencia y el giro de los efluentes industriales, estos contaminantes también llegan a invadir las aguas superficiales de zonas industrializadas o urbanizadas. La toxicidad elevada tiene un efecto inhibitor debido a la resistencia a biodegradarse y al efecto antimicrobiano. Cuando las aguas residuales contienen altas concentraciones de estos contaminantes orgánicos son descargadas a cuerpos de agua naturales causando severos efectos ambientales, así como problemas ecotóxicos por la presunción que muchos de estos compuestos y sus isómeros son carcinógenos y mutagénicos [56].

Es de relevancia comprender que la evaluación de los clorofenoles en los ecosistemas y en la cadena alimenticia es un asunto de interés global por la bioacumulación que éstos producen al no existir rutas eficientes de biodegradación [57]. Como consecuencia, clorofenoles pueden originarse a partir de la degradación anaerobia de los fenoles policlorados mientras que las mismas condiciones de generación no permiten que se degraden en moléculas más simples, por lo que los monoclorofenoles permanecen en el ambiente. A pesar de esto, la principal razón de su presencia en el medio ambiente es por efluentes industriales del giro industrial y comercial [58].

Por todas estas razones, los clorofenoles constituyen una amenaza a los ecosistemas terrestres y acuáticos conocidos, perteneciendo a la lista de contaminantes prioritarios de la EPA.

Al igual que los dos grupos de isómeros anteriores, los isómeros monoclorofenólicos y diclorofenólicos (figura 2.3), los métodos espectrométricos, espectrofotométricos,

cromatográficos y hasta biosensores electroquímicos [56–60] han sido reportados para su cuantificación..

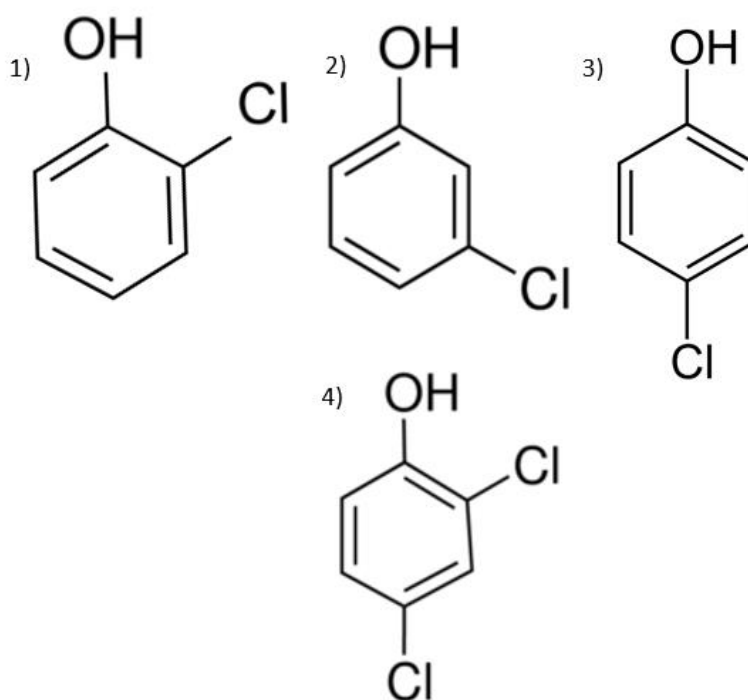


Figura 2.3 Estructura química de los isómeros monoclorofenólicos y diclorofenólicos: 1) 2-clorofenol; 2) 3-clorofenol; 3) 4-clorofenol; 4) 2,4 – Diclorofenol.

Estos son los contaminantes orgánicos que se evaluaron en el presente proyecto doctoral, por lo que se explicarán las diversas técnicas electroanalíticas empleadas en a su determinación electroquímica.

2.2 Los métodos electroanalíticos – bases teóricas y aplicación

En esta sección de la revisión se analiza el motivo de utilizar los métodos electroanalíticos para la cuantificación de contaminantes orgánicos industriales mencionados en la sección 2.1, así como la parte metodológica que involucra utilizar este tipo de técnicas. El que las moléculas a estudiar sean electroactivas es un factor determinante para decidir cómo cuantificarlas si se plantea utilizar este tipo de estrategias analíticas. Analizaremos las características de la electroquímica, así como sus aplicaciones.

La electroquímica es la rama de la química encargada de interrelacionar los efectos químicos y eléctricos de la materia. Una gran cantidad de fenómenos en este campo se dan por los cambios causados al transportarse corriente eléctrica y la producción de energía eléctrica por reacciones químicas. Los investigadores realizan mediciones electroquímicas de sistemas químicos por diversas razones; pueden estar interesados en obtener información termodinámica de la reacción, también les es necesario estudiar la cinética del transporte de cargas o electrones de los compuestos analizados o necesitan estudiar una solución de agua residual para observar si no existen contaminantes metálicos u orgánicos.

En los ejemplos descritos anteriormente, se utilizan los métodos electroanalíticos como herramienta para el estudio de sistemas químicos de interés, así como otras técnicas sofisticadas espectrométricas.

La aplicación de los métodos electroquímicos requiere un entendimiento de los principios fundamentales de las reacciones que ocurren en las interacciones con los electrodos incluyendo las propiedades eléctricas de las interfases electrodo-solución. En química inorgánica, el cambio químico que existe al llevarse a cabo una reacción es generalmente la oxidación o reducción de un complejo metálico.

Este transporte de los electrones que ocurre entre dos moléculas en una solución da origen a una reacción redox. Es importante notar que existen dos tipos de reacciones redox: las químicas y las electroquímicas. Para comprender la diferencia entre estos tipos de reacción se debe estudiar el proceso de transferencia de electrones; en el caso de la reacción química la transferencia de electrones ocurre por la diferencia de niveles energéticos en los orbitales, siendo termodinámicamente favorable y espontánea siendo el motor para esta reacción la diferencia de niveles energéticos. En la reacción electroquímica la reducción ocurre por una transferencia heterogénea de electrones por un electrodo; al usar una fuente de poder externa (potenciostato) se aplica voltaje al electrodo, modulando la energía de los electrones en el electrodo. El motor para este tipo de reacciones es la diferencia de energía entre el electrodo y el orbital donde ocurre la reacción [64].

La capacidad que tiene la electroquímica como ciencia aplicada reside en la simplicidad en la que la fuerza responsable de provocar la reducción puede ser controlada con facilidad y los parámetros tanto termodinámicos como cinéticos pueden ser medidos dependiendo del experimento diseñado para la determinación, así como la técnica electroanalítica a utilizar.

El aplicar este conocimiento del área de electroquímica para la determinación de diversos tipos de contaminantes es parte del objetivo de este proyecto doctoral; se propone utilizar los métodos electroanalíticos para el estudio y la cuantificación de contaminantes orgánicos. A continuación, se describen los métodos electroquímicos utilizados.

2.2.1 Métodos electroanalíticos

Los métodos electroquímicos han sido ampliamente usados para la detección de compuestos orgánicos electroactivos, teniendo sobre los métodos convencionales como cromatografía de gases, espectrometría de masas. Como ejemplos están la rápida respuesta a la detección de cambios de corriente con respecto a la concentración de analito en la microcelda, reactor o recipiente que contenga la solución y también el uso relativamente sencillo de operación [65], esto debido a que el equipo a utilizar es manejable, pequeño (si se utilizan microceldas el análisis se puede realizar con volúmenes tan pequeños en el orden de microlitros, facilitando la manera en que se utiliza la muestra) y los electrodos son relativamente baratos, adicionando que su manejo es simple [66].

Aun con estas cualidades, existen desventajas al usar estos métodos para la detección electroquímica de componentes orgánicos utilizando electrodos sólidos, uno de ellos es el amplio rango de detección en el electrodo de potenciales de oxidación, de manera que pueden detectarse otros compuestos electroactivos que influyen en el cambio de la corriente eléctrica y voltaje [67]. Otro factor es la formación de radicales fenólicos durante la reacción electroquímica, que se van polimerizando en la superficie del electrodo, provocando un tipo de pasivación al formar una película muy fina de especies químicas adheridas a la superficie del electrodo [68].

La pasivación del electrodo es un fenómeno que es consecuencia de la adsorción de las especies químicas a la superficie de un electrodo, ocurriendo frecuentemente en macromoléculas [69] y reacciones electroquímicas durante el periodo de detección, llevando a la oligomerización de estructuras poliméricas más grandes [70]. También puede provocar la formación de enlaces covalentes en la superficie al formar radicales *in situ* [71]. Al existir este tipo de adsorción tanto física como química provoca una disminución en la corriente observada en los análisis; esta película de polímeros puede provocar una interferencia directa en el suministro de reactivos en

la solución de la celda, remover productos de los sitios activos de reacción o disminuir el potencial disponible para ejercer en la reacción [72].

Es bien conocido que este tipo de procesos de adsorción interfieren en la determinación electroquímica de diferentes especies que son particularmente difíciles de determinar, entre ellos orgánicos contaminantes.

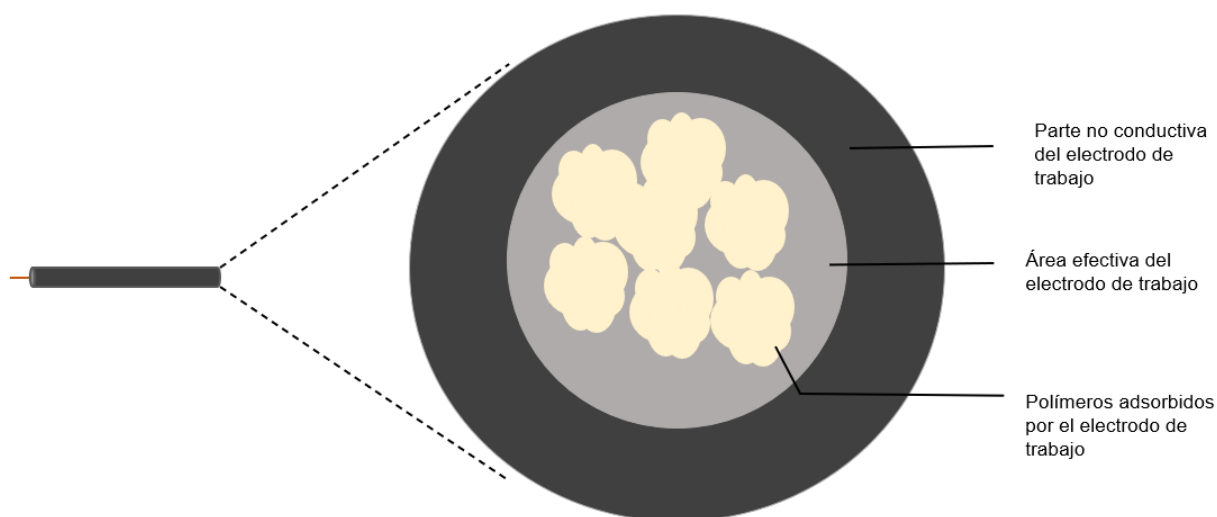


Figura 2.4. Diagrama donde visualmente se expresa la adherencia de diversas especies químicas que afectan las mediciones voltamétricas.

2.2.2 Estrategias contra la pasivación del electrodo de trabajo

Diversas estrategias se han empleado en la disminución de los efectos de la pasivación en determinaciones electroquímicas; muchas de ellas dependen del material del electrodo y el revestimiento que éstos tengan en su superficie. Al utilizar electrodos sólidos a base de carbono,

se pueden modificar las superficies de ellos con nanotubos de carbono, grafeno, diamante, nanopartículas de oro y algunos otros minerales [38 – 40].

La implementación de diferentes nanomateriales se estudiará en esta tesis doctoral, proponiendo métodos y estrategias para combatir la pasivación del electrodo incluyendo el material de este. Por otro lado, es importante notar que en la literatura se presentan numerosas alternativas para la modificación de la superficie de los electrodos y evitar la pasivación. Al utilizar electrodos de carbón vitreo o platino es importante limpiar la superficie mediante un pulimiento mecánico y para remover partículas adheridas por los procesos electroquímicos se puede realizar un baño ultrasónico en agua pura [76]. El pulimiento debe ser sencillo y poco agresivo, se suelen utilizar almohadillas para pulir o papel abrasivo para ciertos materiales en presencia de agua para no dañar estructuralmente el electrodo; los movimientos mecánicos deben ser circulares. También, es importante que los movimientos tomen forma de ocho, tomando una superficie nivelada como lo muestra la figura 2.5.

En ocasiones es necesario un tratamiento extra para las especies químicas que han logrado adherirse fuertemente al material sólido; para estos casos se utiliza voltametría cíclica armando la celda electroquímica con únicamente solución electrolítica en ella, este proceso requerirá varios escaneos en un rango de potencial amplio para poder remover cualquier especie adsorbida que el proceso de pulimiento no fue capaz de remover. Este proceso se puede realizar hasta que los voltamogramas cíclicos muestren un comportamiento idéntico entre sí, o se traslapen [77].

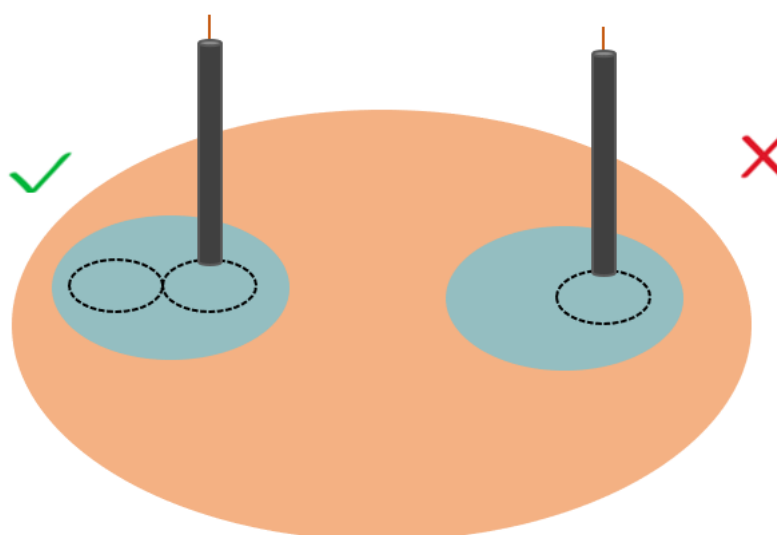


Figura 2.5 Diagrama que representa el movimiento correcto para el pulimiento mecánico del electrodo. El electrodo se somete a movimientos en forma de ocho bajo un papel abrasivo con agua para pulir su superficie.

A este proceso completo se le conoce como un pretratamiento del electrodo. Al realizar esta estrategia en electrodos de carbón vítreo aumenta la reactividad de la superficie. Otro aspecto para considerar al eliminar impurezas es analizar que pueden provenir de la solución electrolítica, buffer o tampón; si existen semejantes moléculas dentro de la celda electroquímica interferirá en los voltamogramas por la facilidad de adherirse a los electrodos de carbono.

Otra estrategia para mitigar los efectos de la pasivación del electrodo por subproductos no deseados es utilizar componentes biológicos para inmovilizar en la superficie del electrodo, así se logra reducir el efecto de pasivación al proporcionar una capa de material reactivo para que interactúe con el analito de interés; se abordará este tema más adelante al hablar de biosensores.

2.2.3 Voltametría Cíclica

La voltametría cíclica es una técnica electroanalítica ampliamente utilizada; aplicada para investigar los procesos de reducción y oxidación de especies químicas. Esta técnica también tiene aplicación en el estudio cinético de la transferencia de electrones en las reacciones químicas, incluyendo la catálisis.

Esta técnica también se utiliza para estudiar el comportamiento de electrodos hechos con materiales modificados, con analitos que se sospecha que sean electroactivos. Los materiales comunes que se utilizan en estas microceldas son electrodos de platino, carbón vítreo, pasta de carbono, grafito, oro, diamante y nanotubos de carbono.

Su funcionamiento se basa en la percepción de la señal de la corriente durante un cambio lineal del voltaje en el electrodo de trabajo, muy similar al barrido lineal con excepción de que en voltametría cíclica el potencial regresa a su valor inicial; en otras palabras, se grafica la corriente en función del cambio del potencial aplicado al electrodo; durante la operación, la microcelda no agitarse, pues se alteran las condiciones normales difusivas y comienzan a presentarse los fenómenos difusivos por convección.

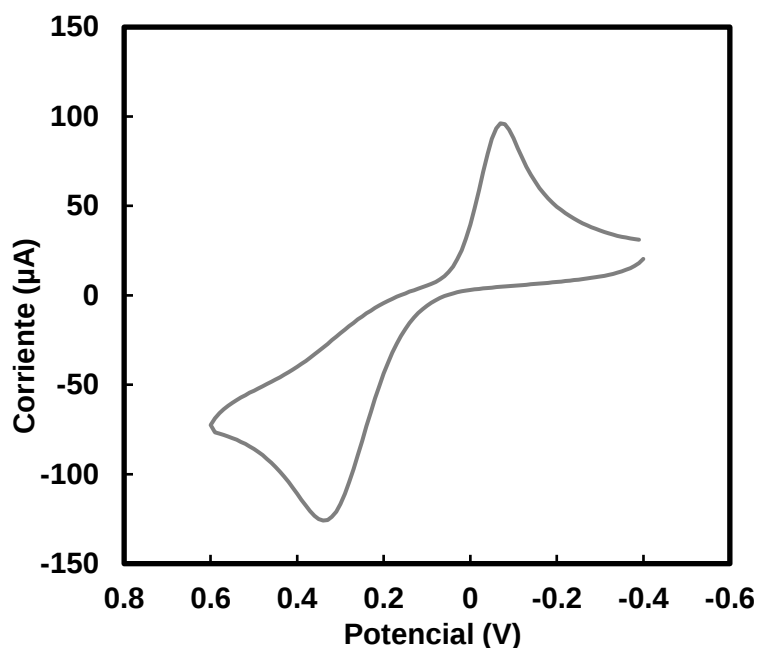


Figura 2.6 Diagrama de voltametría cíclica presentando los picos de oxidación y reducción de Hidroquinona.

La figura 2.6 se le conoce como voltamogramas o voltamogramas cíclicos por ser el diagrama resultante de esta técnica. El eje de las X representa el potencial aplicado en el sistema mientras que el eje de las Y es la variable de respuesta, la corriente resultante que se produce. En este documento se utiliza la convención de Estados Unidos para dictaminar la dirección del potencial, comenzando desde los potenciales altos hasta los potenciales bajos.

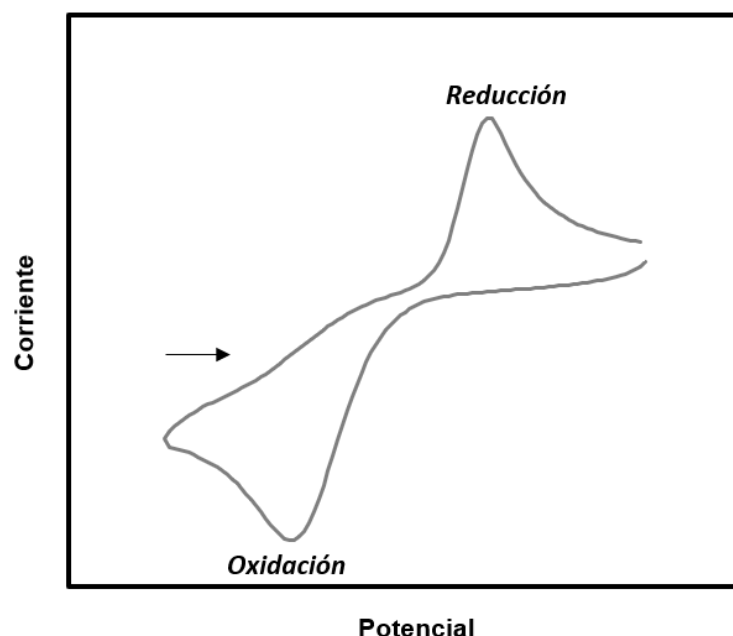


Figura 2.7 Convención de Estados Unidos para designar los picos de oxidación y reducción en un voltamograma cíclico

La figura 2.7 muestra la convención empleada en esta tesis; la otra convención es la de IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, por sus siglas en inglés) la cual su única diferencia es que la información aparecerá como rotada en 180° C al tener el pico de oxidación y reducción invertido. La flecha indica la dirección en donde se realizará el barrido de potencial del primer segmento, para que después comience con el barrido inverso. Un parámetro importante es la velocidad de barrido (en inglés llamado scan rate) que durante un experimento indica la variación lineal del potencial con respecto al tiempo.

Los picos mostrados en los voltamogramas son muestra del equilibrio descrito por la ecuación de Nernst

$$E = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \left| \frac{Ox}{Red} \right| \quad (1)$$

Donde E es el potencial de la celda (V), E^o es el potencial estándar de la celda (V), R es la constante de los gases ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T es la temperatura (K), n es el número de electrones transferidos de una semirreacción a otra, F es la constante de Faraday ($C \text{ mol}^{-1}$), Ox y Red son las actividades de la especie química que se oxida o reduce, respectivamente. Esta ecuación provee una forma de predecir cómo un sistema electroquímico responde en función del cambio de las concentraciones en la solución o el cambio del potencial del electrodo.

Los procesos catódicos se presentan cuando el potencial es escaneado hacia valores negativos (o más negativos) y existe un punto máximo al que se le conoce como la corriente del pico catódico (i_{pc}). Al invertir el escaneo del potencial, comienza a ir hacia los valores más positivos, resultando en los procesos anódicos; cuando llega a su valor máximo se le conoce como la corriente del pico anódico (i_{pa}).

El conocer el comportamiento de los procesos de catódicos y anódicos nos ayuda para entender si existe reversibilidad química junto con la electroquímica. La diferencia entre el potencial de los picos anódicos y catódicos se le conoce separación de los picos, la cual tiene un valor teórico de 57 mV a 25° C. Si el experimento de voltametría cíclica presenta este valor de separación, se dice que existe reversibilidad y el analito es estable al reducirse; provocando que puede reoxidarse más adelante en su proceso reversible [78].

Es importante mencionar que un proceso de transferencia de electrones reversible involucra la difusión libre de las especies químicas reaccionantes, de manera que la velocidad de barrido controla el incremento o decremento de la capa difusiva en el sistema. Esta relación se describe de manera oportuna por la ecuación de Randles – Sevcik que relaciona cómo la corriente del pico incrementa linealmente con varios factores, descritos a continuación:

$$i_p = 2.69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A D^{\frac{1}{2}} C v^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

Donde i_p es la corriente del pico (A), n es el número de electrones transferidos, A es el área efectiva del electrodo (cm^2), D es el coeficiente de difusión del analito ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C es la concentración del analito (mol cm^{-3}) y v es la velocidad de barrido (V s^{-1}). Esta ecuación nos puede dar indicaciones de los procesos de transferencia de masa que ocurren dentro de la celda electroquímica. Una aplicación de esta ecuación es el determinar el coeficiente de difusión de un analito mediante voltametría cíclica, detallando la descripción de los fenómenos de transferencia de masa conforme cambia la velocidad de barrido.

Esta técnica tiene como propósito estudiar un solo analito en solución, sus limitaciones ocurren cuando se presenta una muestra con varios componentes cuyos potenciales de oxidación y reducción son cercanos, ocurriendo traslapes de las curvas e impidiendo que sea posible tomar una medición correcta. Cuando se tienen componentes que comparten potenciales cercanos se vuelve un reto su determinación, aunque las técnicas voltamétricas tengan alta resolución. Debido a eso, estudiaremos los conceptos de la voltametría diferencial de pulsos alternativos.

2.2.4 Voltametría Diferencial de Pulsos Alternativos (DAPV)

El reto de tener muestras multicomponentes se puede superar al utilizar técnicas de separación químicas sofisticadas, aunque también se pueden aplicar soluciones electrolíticas que formen complejos con los agentes interferentes para resolver el problema. Esto, sin embargo, provoca que la determinación del analito sea compleja, consumidora de tiempo y en ocasiones menos precisa [79]. Debido a todas estas razones, se diseñó la voltametría diferencial de pulsos

alternativos (DAPV por sus siglas en inglés) proveyendo una alta resolución comparada con las técnicas voltamétricas de segundo orden. La técnica ha sido aplicada en diversas publicaciones con anterioridad, incluidos algunos de los trabajos de esta tesis, en diferentes muestras con éxito [3, 48–52]. Esta técnica será explicada con detalle en la sección de metodología, donde se justifican las razones de su uso para la metodología de este trabajo doctoral.

2.2.5 Amperometría

La amperometría es una técnica electroanalítica que se utiliza, al igual que la voltametría, para analizar el comportamiento de un analito en función del potencial aplicado al electrodo de trabajo [85]. El análisis amperométrico es distintivo por su objetivo principal: relacionar los cambios de concentración de la sustancia electroactiva con los cambios de corriente. Cuando inicia el ensayo no existe concentración del componente electroactivo dentro de la microcelda, mientras avanza el tiempo se agrega una concentración conocida del analito e inmediatamente el equipo detecta el cambio de corriente debido al incremento de la especie electroactiva [86]. En la superficie del electrodo de trabajo, la reacción redox ocurrida con el analito toma lugar dependiendo del potencial aplicado, esto se traduce a que también para la amperometría es importante tomar en cuenta el material utilizado en la superficie del electrodo.

Todos estos métodos comparten una importante cuestión: la selección de los materiales a utilizar durante los ensayos electroquímicos. Debido a esto, es de relevancia comentar cómo diseñar una celda electroquímica, las decisiones que se deben tomar dependiendo del analito, tipos de electrodo, etc. La siguiente sección dará una pauta para tomar este tipo de decisiones a la hora de realizar ensayos electroquímicos.

2.3 Diseño de una celda electroquímica

En los métodos electroanalíticos se utilizan celdas electroquímicas en las determinaciones al estar conectadas a un potenciostato que realiza las mediciones de la variable de respuesta, aplicando un voltaje determinado y midiendo una corriente. Todos los experimentos reportados en la literatura detallan una breve descripción de las condiciones experimentales de la celda, para poder replicar el experimento, así como conocer qué materiales fueron utilizados en los métodos. En este apartado se describirán los componentes relevantes para la preparación de una celda y su uso para voltametría.

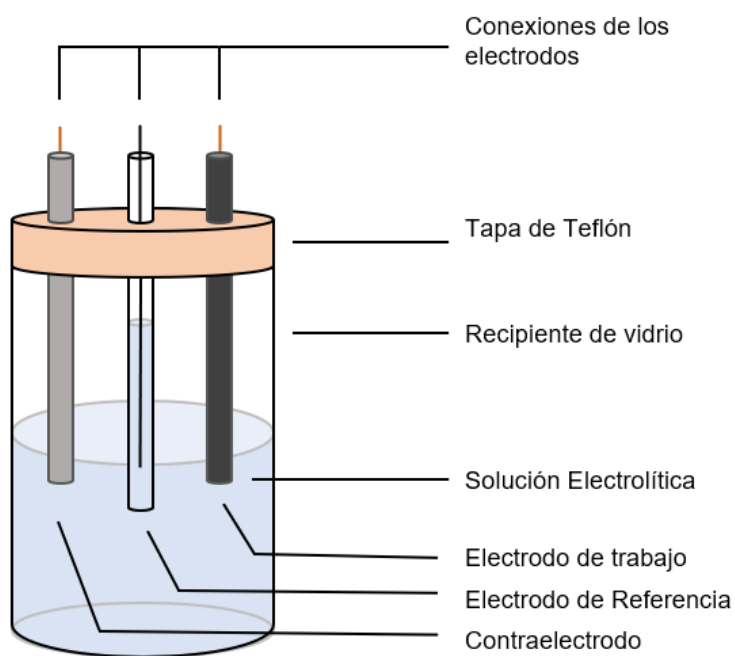


Figura 2.8 Diagrama representando una celda electroquímica para diversos métodos electroanalíticos donde se describen sus componentes.

Para el diseño de la celda es importante seleccionar correctamente los materiales y soluciones a utilizar dependiendo del objetivo de los experimentos voltamétricos; un claro ejemplo es cómo considerar el pH de la solución electrolítica, qué buffer utilizar, qué solvente será óptimo, etc. Una estrategia para la selección de la solución electrolítica es utilizar buffers de diferente composición acorde a los análisis a realizar y optimizar el pH de acuerdo con el analito a estudiar. También, debe cumplir con las siguientes características:

- La solución debe contener una sal que funcione como electrolito soporte para aumentar la conductividad eléctrica y a su vez debe ser capaz de disolver el analito.
- Es estable en los rangos de oxidación y reducción que se utilizaran en la prueba electroquímica.
- Es inerte respecto a los componentes involucrados en las reacciones electroquímicas.

Se requiere una concentración considerable de electrolito soporte para mantener niveles correctos de conductividad en la solución. Los fenómenos electroquímicos ocurren por la transferencia de electrones en los electrodos; el electrolito soporte es encargado de mover las cargas y balancearlas para completar el circuito eléctrico, una concentración no adecuada provocaría mayor resistencia eléctrica que tiene como consecuencia una menor cantidad de electrones en movimiento. El traslado del analito a la superficie del electrodo está regido principalmente por los fenómenos de transporte de masa descritos como los procesos difusivos, convectivos y migratorios.

El movimiento del analito por convección involucra que exista una fuerza externa que se ejerza para el movimiento de este, generalmente es la agitación mediante un agitador magnético o el vórtice formado por un electrodo rotatorio; éste último involucra fenómenos reológicos interesantes por lo que una cantidad considerable de literatura lo recomienda con respecto a la agitación convencional [87]. Para evitar todo efecto de transferencia de masa se necesita la

ausencia de cualquier causa que provoque vibraciones o agitaciones a la solución (exceptuando en amperometría, donde es importante homogenizar la concentración en la solución al añadir la alícuota), así como para la migración el uso de un electrolito a concentraciones altas [88].

2.3.1 Selección de electrodos

En la sección anterior se abordaron las características del electrodo de trabajo; aquí se analiza el electrodo de referencia y el contraelectrodo. El electrodo de referencia debe contar con un potencial bien definido y equilibrado; es utilizado como punto de referencia en comparación con los electrodos que realizarán las mediciones dentro de la celda electroquímica.

Existen algunos electrodos de referencia comúnmente utilizados en los ensayos que también están disponibles para su adquisición comercial, su característica es mantener el potencial del electrodo independientemente del electrolito utilizado en la solución. Algunos ejemplos utilizados en la literatura incluyen el electrodo de calomelanos o electrodo saturado de calomelanos (SCE por sus siglas en inglés), el electro estándar de hidrógeno y el electrodo de AgCl/Ag.

Los electrodos de referencia descritos en el párrafo anterior generalmente son separados de la solución por un filtro poroso de cerámica o vidrio por donde se presenta el intercambio de cargas. En solventes no acuosos es frecuente utilizar electrodos de referencia basados en Ag/Ag⁺; Estos consisten en un pequeño cable de plata en una solución electrolítica que contenga el catión de plata (Ag⁺), generalmente se utiliza AgNO₃ como la sal para proveer la especie iónica. A la hora de la interpretación de los datos experimentales, los investigadores utilizan tablas de conversión descritas en la literatura para cambiar la información obtenida por este electrodo de referencia a otros tipos de combinaciones de electrodos, sales de plata, solventes o concentraciones [89].

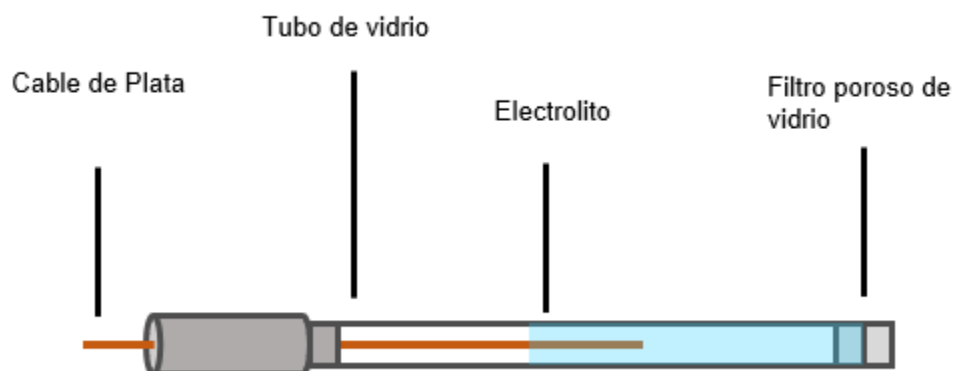


Figura 2.9 Diagrama representando un electrodo de referencia de AgCl/Ag. El cable de plata se encuentra sumergido en una solución de AgCl y al final del tubo de vidrio se encuentra el filtro poroso para el contacto correcto con la solución de trabajo.

Los electrodos de referencia descritos en la figura 2.3.2 suelen tener algunas dificultades al utilizarse en determinaciones de voltametría como lo son la fuga de Ag^+ en la solución de trabajo, pudiendo interferir en las mediciones electroquímicas. Como resultado de este acontecimiento se debe tomar precaución a la hora de escoger el electrodo de referencia referente a los demás sistemas de la celda; una estrategia es utilizar una sal con plata como electrolito soporte y un cable de plata dentro de la solución, haciendo el trabajo de un pseudo electrodo de referencia.

El propósito del tercer electrodo dentro de la celda, el contraelectrodo, es mantener cerrado el circuito eléctrico. Al aplicar un potencial de trabajo dentro de la celda electroquímica con el potencióstato utilizado para las mediciones comienza a fluir la corriente eléctrica; esta corriente es registrada como los electrones que fluyen del electrodo de trabajo y el contraelectrodo.

Es importante notar que en la superficie del contraelectrodo ocurren algunas reacciones de reducción/oxidación dependiendo del potencial; la cinética de la reacción puede inhibir o competir con las que ocurren en la superficie del electrodo de trabajo. Para evitar esto, se debe procurar que la superficie del contraelectrodo sea mucho mayor a la que se tiene en el electrodo de trabajo. Al estudiar una reacción de reducción en el electrodo de trabajo provoca que ocurra una reacción de oxidación en el contraelectrodo; por lo que se debe procurar mantener el material del contraelectrodo lo más inerte posible. Un material común para el contraelectrodo es utilizar un alambre o disco de platino o también grafito espectroscópico.

Existen casos particulares en donde se pueden generar subproductos en la reacción de oxidación que ocurre en la superficie del contraelectrodo dependiendo del analito, así como la naturaleza del experimento llevado a cabo en la celda electroquímica; una medida para estos casos es utilizar un compartimiento exclusivo para el contraelectrodo en donde exista suficiente conducción para que ocurra el transporte de cargas pero se reduzca la difusión hacia el electrodo de trabajo, similar a una celda voltaica.

La siguiente sección detallará una aplicación de los métodos electroanalíticos al modificar el electrodo de trabajo en su superficie con material de biorreconocimiento, a estos se les conoce como biosensores electroquímicos los cuales tienen una aplicación importante para estudiar analitos que al inicio no son electroactivos, pero con una interacción con la modificación el producto de una reacción se vuelve electroactivo.

2.4 Biosensores electroquímicos

Un sensor químico es un dispositivo que transforma o convierte la información de una reacción química o de un analito presente en una solución a una señal que puede ser eléctrica, óptica o

térmica. Este tipo de sensor contiene un receptor y un transductor, la diferencia entre un sensor químico y un sensor bioquímico o biosensor es la naturaleza del receptor.

Un biosensor electroquímico se puede definir de diversas formas, existen dos clases de sensores, entre ellos los sensores químicos y los biosensores, la organización IUPAC define a los biosensores de la siguiente manera: “Un sensor electroquímico es un dispositivo autónomo que es capaz de proveer información analítica específica cuantitativa o semi cuantitativamente usando un elemento de reconocimiento biológico (un receptor bioquímico) que permanece contenido y tiene contacto físico directo con un elemento electroquímico transductor” [90]; otra definición utilizada es: “Son dispositivos que transforman información bioquímica como lo es la concentración de analitos en una señal analíticamente útil como voltaje o corriente” [91]. Usualmente contienen dos componentes básicos: un elemento de reconocimiento biológico (receptor) y un transductor físico.

El propósito de usar diferentes elementos de reconocimiento biológico (enzimas inmovilizadas, tejidos, organelos, anticuerpos, ADN, células enteras, etc.) es tener una mejor selectividad y especificidad al analizar una muestra. Es importante tener en cuenta que un biosensor es un dispositivo completo, lo que significa que todas las partes deben estar juntas en la misma unidad, tener contacto espacial con la muestra y el elemento de reconocimiento biológico debe estar inmovilizado dentro del dispositivo para interactuar con el analito de interés en la muestra. El dispositivo debe tener tres componentes básicos:

1. Elemento de reconocimiento biológico: una de las características del componente biológico es su afinidad con el analito, es importante seleccionar el elemento de reconocimiento de acuerdo con el analito que se encuentra en la muestra.
2. Dispositivo transductor: esta parte de un biosensor es responsable de traducir la información bioquímica producida por las interacciones entre el biocomponente y el

analito y convierte esa información en una señal eléctrica; también puede convertir la señal eléctrica en señal no eléctrica convirtiéndolo en un dispositivo bidireccional. Algunos de los nombres de un transductor son detector, sensor o electrodo, pero el término transductor es más general para todos los tipos de biosensores.

3. Dispositivo lector: es una parte multicomponente que combina diferentes microelectrónicos para mostrar los resultados de la señal de una manera fácil de usar.

El biocomponente limita la vida útil del biosensor, también su estabilidad y calibración, a diferencia del transductor físico. Los receptores más comúnmente utilizados en los biosensores electroquímicos son enzimas. Debido a que sus centros activos están relativamente escondidos en la molécula, la transferencia directa de electrones entre el sitio activo y la superficie del transductor (electrodo) no es posible; por lo que se utilizan mediadores de electrones orgánicos para ese propósito [92]. Un ejemplo de este funcionamiento es la enzima oxidoreductasa que reconoce el sustrato con el cual tiene afinidad, después el sitio activo de la enzima oxida al sustrato (también puede reducirlo, dependiendo del sustrato y la reacción). La forma oxidada del mediador regenera (oxida) al sitio activo de la enzima, mientras que la superficie del electrodo (transductor) regenera (oxida) al mediador de electrones orgánico. Al final la corriente que se utiliza para la oxidación del mediador es medida, y relacionada con la cantidad de sustrato en la solución de la microcelda.

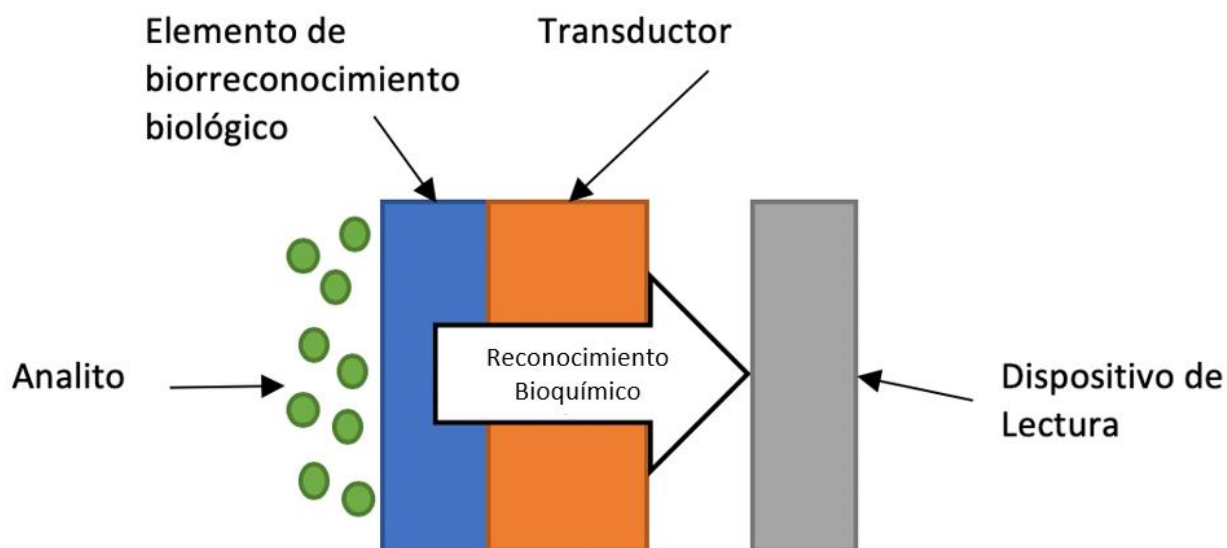


Figura 2.10 Esquema simple del funcionamiento de un biosensor

En contraste con los biosensores, muchos sensores químicos contienen especies no biológicas como elementos activos para su determinación, mostrando una mayor sensibilidad y selectividad para la detección de diversos analitos [93]. Los sensores electroquímicos utilizan electrodos modificados para determinar diversos elementos. Estos electrodos pueden formarse a base de diversos materiales orgánicos e inorgánicos caracterizados por una conductividad eléctrica óptima o de buen rendimiento y asimismo ayuda si el material cuenta con propiedades catalíticas para cierto tipo de determinaciones [94].

En investigaciones recientes, para mejorar el rendimiento de los sensores electroquímicos sobre todo en sus propiedades catalíticas, en su sensibilidad y selectividad, utilizando materiales a nanoescala como nanopartículas, los nanotubos y nanocables [95], o utilizando materiales de membrana (hidrogeles, membranas lipídicas) para la inmovilización de la enzima [96]. Muchos de los biosensores electroquímicos que se han probado para la determinación de compuestos orgánicos utilizan enzimas.

Las aplicaciones de los biosensores se basan en el tipo de elemento de reconocimiento biológico que se necesita durante el proceso de dimensionamiento del este; desde aplicaciones médicas para el punto de atención en determinaciones de proteínas y diagnóstico de enfermedades [97], hasta análisis y monitoreo ambiental [98]. Para describir mejor la aplicación de biosensores, necesitamos clasificarlos de acuerdo con los transductores y el tipo de elemento de reconocimiento biológico utilizado.

2.4.1 Clasificación de los biosensores

Una de las ventajas de usar un biosensor sobre otros métodos tradicionales es que son flexibles, lo que significa que la señal bioquímica se puede convertir en una señal eléctrica cuantificable y la naturaleza del mecanismo de transducción se puede diversificar dependiendo de la estrategia a utilizar en la medición, algunos ejemplos de la aplicación de esto serían en imanes, eléctricos, reacciones electroquímicas, termométrico, piezoeléctrico u óptico [99].

Los biosensores termométricos están basados en un principio termodinámico aplicado en una solución electrolítica donde ocurre una reacción bioquímica en presencia de un biosensor, El cambio de temperatura en la solución por la entalpía de reacción. La reacción bioquímica puede ser exotérmica o endotérmica, lo que aumenta o disminuye la temperatura de la muestra que contiene el analito; por lo tanto, el cambio de entalpía molar en el fluido puede correlacionarse con la concentración del analito. El transductor en este caso es un termistor con enzima inmovilizada en la superficie llamada ET (termistor enzimático) [100]. Los dispositivos utilizados para las mediciones deben estar perfectamente aislados para la transferencia de calor desde o hacia los alrededores. Los dispositivos convencionales usan materiales aislantes como el poliuretano y pueden tener un mecanismo de inyección para hacer que la enzima fluya desde un

depósito a la cámara de reacción donde se encuentra el analito, evitando el contacto directo, contacto antes de que comience la medición.

Los biosensores ópticos extraen información de un sistema bioquímico que mide fotones y relaciona la señal con la emisión de absorbancia, reflectancia o fluorescencia en el espectro electromagnético, pero solo en la región visible y ultravioleta [101]. Es importante analizar la naturaleza del sistema en el cual se llevará a cabo una medición debido a que algunos biosensores se aprovechan de las propiedades ópticas de las biomoléculas como resultado de su interacción con el analito, la variable de respuesta (absorbancia, reflectancia, polarización, luminiscencia) generalmente no es muy sensible, que debido a las interacciones moleculares que tienen lugar en la región UV, el análisis de sistemas complejos como una muestra ambiental no es adecuado para este tipo de biosensor. Hay otro tipo de biosensor óptico adecuado para el análisis y monitoreo ambiental que consiste en hacer etiquetas ópticas y sondas que requieran inmovilizar covalentemente el biomarcador o elemento de biorreconocimiento a la superficie del transductor, de la misma manera que funcionan los otros biosensores, la función del transductor es para recopilar toda la información analítica obtenida por el contacto del elemento de biorreconocimiento y el analito en la muestra que hace una señal y es registrada por un fotodetector y transformada en una señal eléctrica legible por un microprocesador [102].

2.4.2 Biosensores electroquímicos.

Los biosensores electroquímicos son dispositivos integrados autónomos que extraen la información de un sistema biológico que tiene naturaleza electroquímica. Típicamente en este tipo de sistema, la reacción que ocurre con el elemento de biorreconocimiento y el analito generaría una corriente medible, potencial, carga o las propiedades conductoras de un medio entre los electrodos, que en este dispositivo son los transductores [103]. También existen otros tipos de técnicas para extraer información de un sistema biológico como los biosensores impedimétricos [10,11], además, el analito y el elemento de biorreconocimiento solo se pueden detectar cerca de la superficie del electrodo, esto es una ventaja y una desventaja en Al mismo tiempo, debido al contacto directo con la superficie del electrodo con el analito, puede modificarse químicamente para aumentar varios parámetros, desde la superficie de contacto hasta la corriente máxima [106] y cuando la reacción ocurre en la superficie del electrodo, algunos coproductos pueden ser adherido a la superficie, creando una película de resistencia que confunde la medición [107]. La mayoría de los biosensores usan transductores electroquímicos debido al bajo costo, facilidad de operación, son portátiles y el dispositivo autónomo es fácil de construir.

Se necesitan resolver algunos problemas al momento de diseñar un biosensor para la detección de contaminantes orgánicos:

- Dependencia del oxígeno: si se plantea utilizar una enzima como agente de biorreconocimiento, el oxígeno molecular juega un papel importante en la regeneración a su forma activa. Controlar los niveles de oxígeno en diversas muestras contenidas en una celda electroquímica puede ser difícil, y esto ocasionar limitaciones a la eficiencia del biosensor.

- Inmovilización de la enzima y eliminación de moléculas interferentes: Es necesario realizar una inmovilización enzimática estable y mantener su actividad enzimática al máximo, de esta manera el método que se elija debe de cumplir con parámetros óptimos al suspender la enzima en la superficie del electrodo. Se debe realizar un análisis para tener en cuenta cómo se suspenderá, sea por absorción o por adsorción, dependiendo de las características en los ensayos electroquímicos como lo es la difusión. Esta variable depende de la inmovilización, si se usan polímeros, suspensiones o incluso adsorciones habrá obstaculización para el transporte de materia. Uno de los propósitos entonces, es que el método maximice la difusividad de la enzima a la solución de la celda electroquímica [108].

Durante este proyecto doctoral se utilizó un biosensor electroquímico con la finalidad de caracterizarlo y aplicarlo a la determinación de contaminantes orgánicos. En el siguiente apartado se describirá brevemente algunas de las técnicas de inmovilización enzimática, así como su importancia.

2.5 Inmovilización del agente de biorreconocimiento

La inmovilización del agente de biorreconocimiento dependerá de la naturaleza de la sustancia, sea anticuerpo, enzima, DNA, etc. Es una metodología que atrapa al bioreceptor a un material inerte, en este caso el transductor, haciéndolos insolubles, mejorando sus capacidades de estabilidad, así como su actividad. La flexibilidad y porosidad de la capa del bioreceptor inmovilizado debe permitir una difusión libre entre los sustratos y productos que a traviese la capa. Los biosensores a base de enzimas ofrecen algunas ventajas sobre los métodos químicos,

como lo son su especificidad, su selectividad y la habilidad de operar por condiciones debajo de las mínimas requeridas en estos métodos [109].

Las técnicas de adsorción son relativamente sencillas de realizar, sin embargo, la adhesión de la enzima a superficie del transductor frecuentemente es débil. Por otro lado, los métodos que utilizan enlaces covalentes son más complejos ya que los compuestos involucrados usualmente inactivan o reducen la actividad enzimática [110].

El atrapamiento en geles permite la retención de agua en la capa donde permanece el bioreceptor y promueve la estabilidad a largo plazo de la enzima, sin embargo, las películas resultantes son susceptibles a rompimientos [111]. De los diversos métodos para inmovilizar la enzima se busca uno que mejore la actividad y estabilidad enzimática sin comprometer la transferencia de masa de los analitos a través de la capa del bioreceptor. Adicionalmente el proceso debe ser práctico y barato para permitir una producción favorable de biosensores a base de enzimas para análisis *in situ*.

La eficiencia de un proceso de inmovilización se puede medir con los siguientes criterios:

- 1) Un porcentaje alto de la enzima que inicialmente se inmovilizo debe permanecer después del proceso.
- 2) Las enzimas deben de ser mecánicamente estables y detenidas físicamente para evitar que se difundan de nuevo en el sustrato en un momento posterior.
- 3) Las enzimas deben tener biocompatibilidad con el medio de inmovilización.
- 4) Los fenómenos de transferencia de masa de los analitos a través de la película de inmovilización no deben ser limitados.

Debido a que las enzimas son catalizadores biológicos que promueven la velocidad de reacción y no se consumen en las reacciones que participan, pueden emplearse en repetidas ocasiones mientras estas permanezcan activas. En la mayoría de los procesos industriales, ensayos

analíticos y procesos clínicos, las enzimas son mezcladas en una solución con sustratos y no pueden ser recuperadas después de que se termina su sustrato. Esto es una desventaja si se considera el costo de las enzimas en el proceso [112].

Los métodos de inmovilización pueden clasificarse en cinco categorías: Adsorción, microencapsulación, atrapamiento en matriz, reticulación y unión covalente.

2.5.1 Adsorción

La inmovilización por adsorción es el método más simple e involucra interacciones reversibles entre la enzima y el material de soporte. Las fuerzas involucradas son mayormente electroestáticas, como las fuerzas intermoleculares de Van der Waals, iónicas e interacciones de puentes de hidrógeno, siendo débiles todas ellas, pero lo suficientemente grandes en número como para crear una unión razonable. La superficie existente entre la enzima y el soporte se utiliza para que no se requiera una activación química que modifique la estructura de la enzima [113].

El proceso consiste en mezclar los componentes biológicos y la matriz de adsorción por un periodo de incubación, seguido de lavados extensivos para remover cualquier componente biológico que no se unió. Este proceso ofrece diversas ventajas como el poco o nulo daño a la enzima, es simple, económico y rápido, no se presentan cambios químicos para fijar la enzima al electrodo y tiene un grado de reversibilidad, de tal manera que permite una regeneración de la enzima [114].

Una desventaja de este método de inmovilización es la fuga de la enzima a través de la matriz, al ser la unión poco específica, se presenta una sobrecarga e incluso el efecto estérico. Los enlaces poco específicos ocurren si el sustrato, producto o contaminante residual obtienen una

carga eléctrica e interactúan con la matriz. Esto puede llevar a limitaciones en los fenómenos de transferencia de masa como la difusión y a ciertos problemas en la cinética de la reacción. Sobrecargar la matriz conlleva una baja actividad catalítica por parte de la enzima, pero también la ausencia de un espacio adecuado entre la molécula de la enzima y la matriz, esto puede producir problemas relacionados con el efecto estérico [115].

2.5.2 Unión covalente

Este tipo de inmovilización involucra un cuidadoso diseño en los enlaces que existen entre el grupo funcional de la enzima o biomaterial y la matriz de soporte. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas [116]. Esta unión normalmente se forma entre los grupos funcionales presentes en la superficie de la matriz y los grupos funcionales que pertenecen a los aminoácidos residuales que están presentes en la superficie de la enzima [117].

Uno de los agentes más comunes para este tipo de inmovilización son las llamadas perlas amoni-epóxidas comerciales (amino-epoxy-Sepabeads®). Este compuesto tiene una película de etilendiamina que se encarga de realizar la unión covalente con la matriz de soporte [118].

Algunas de las propiedades que se adquieren por medio de la inmovilización usando este reactivo son las siguientes:

- 1) La inmovilización tiene una fuerza iónica baja
- 2) La inmovilización suele ser más rápida que utilizando la matriz de epóxidos convencionales.
- 3) La estabilidad de la enzima inmovilizada suele ser más elevada que utilizando los métodos tradicionales de epóxidos hidrofóbicos.

2.5.3 Microencapsulación

En la microencapsulación, la enzima se coloca detrás de la membrana quedando una estrecha cercanía entre esta y el transductor. Esta interacción no afecta a la enzima, asegurando la confiabilidad, evitando la contaminación y la biodegradación. Este método se basa en el confinamiento del agente de bioreconocimiento o enzima en una membrana que se coloca sobre la superficie del electrodo [119]. Esta retiene a la enzima en una posición fija presentando una porosidad controlada para permitir una difusión libre entre el sustrato y los productos de la reacción (una membrana semipermeable). Se han utilizado numerosas membranas, como el nylon, nitrato de celulosa, acetato de celulosa, resinas epóxicas, colágeno, polisulfonatos, poliacrilatos, policarbonatos, entre otros polímeros [120].

Algunas de las desventajas de este método de inmovilización se asocian con los fenómenos difusivos de transferencia de masa de los sustratos, los productos de la reacción enzimática y de los inhibidores a través de la membrana; así como que existe crecimiento microbiano en la superficie de esta, provocando una inhibición de la capa enzimática, como consecuencia el biosensor presenta errores en la identificación del analito [121].

2.5.4 Atrapamiento

Enzimas inmovilizadas por atrapamiento son libres en la solución, pero se restringe su movimiento por la estructura de un gel. Este proceso es sencillo y reproducible, y no requiere equipo costoso. Se basa en el atrapamiento de la biomolécula en una matriz polimérica, esto restringe algunos movimientos rotacionales y de despliegue, pero permite el reconocimiento del sustrato, así como la acción catalítica [122].

Algunas de sus ventajas son: permeabilidad de las matrices poliméricas, que permiten el transporte de moléculas de bajo peso molecular sin que existan grandes fugas de las enzimas atrapadas, la porosidad manejable del material, que permite un arreglo de biomoléculas de diferente tamaño, la posibilidad de modificar químicamente la matriz, propiedades ópticas que permiten el análisis de absorbancia como los fluorométricos y la resistencia a la degradación térmica, química y biológica [123].

El atrapamiento depende del entrelazamiento de las moléculas y este a su vez depende de la polimerización del polímero, así como el grado de la formación de la matriz. Es inevitable tener fugas de la enzima inmovilizada debido a que gradualmente se difunden al exterior de la matriz, aunque esto depende del tamaño de la malla polimérica [124]. Debido a esto, se presentan pérdidas en la actividad enzimática mientras más tiempo se tenga usando el biosensor, lo cual hace necesario sustituirlo o remover completamente la matriz y realizar nuevamente el proceso de inmovilización.

El atrapamiento puede lograrse por diversos métodos, como la solidificación inducida por temperatura, la polimerización orgánica por medio de una reacción química o fotoquímica o con una precipitación por un solvente inmiscible. El tamaño de los poros en la superficie del gel y sus propiedades mecánicas son determinadas por la cantidad de monómeros y su forma de reja en el espacio [125].

2.5.5 Reticulación

Ocurre cuando se crean enlaces covalentes o iónicos para enlazar un polímero con otro polímero, en el área bioquímica la interacción sería polímero – proteína, que nos habla de un atrapamiento dentro de las cadenas poliméricas ya establecidas [126]. Un ejemplo de este tipo de reacciones es la utilización de glutaraldehído para la reticulación de enzimas con el polímero [127].

2.6 Método de inmovilización

Se busca que el método a emplear durante la inmovilización en la superficie del electrodo cumpla con las siguientes características:

1. Que permita una difusión libre del sustrato hacia la enzima.
2. Que exista una fijación sobre la superficie del electrodo y se eviten las fugas de enzima.
3. Que sea poca o nula la pérdida de actividad enzimática.
4. El método debe tener una alta reproducibilidad.

Un aspecto importante de analizar individualmente es la estabilidad de la enzima que principalmente se determina por su posición dentro de la matriz de la inmovilización, en donde depende de varios factores, que son:

- La cantidad de enlaces que tienen lugar en la matriz.
- El ambiente en donde se localiza la molécula de la enzima.
- La estructura química y física del agente de inmovilización.
- Las propiedades del agente como si está cargado, si es hidrófilo, hidrofóbico, la longitud de la matriz, etc.

Debido a las razones mencionadas, se estudió la utilización de un método de inmovilización novedoso basándose en la técnica *photografting*, que involucra la utilización de luz para la formación de matrices poliméricas con enzima dentro de su estructura adheridas por unión covalente en la superficie del transductor [128].

2.6.1 Plataformas poliméricas fotosensibles

Las técnicas de polimerización por luz en una superficie se utilizan para el estudio de polímeros más complejos, específicamente en biomateriales. Consiste en la incorporación por enlaces covalentes de los grupos funcionales de una matriz polimérica en una superficie utilizando mecanismos de luz en el rango de UV-Vis [129]. Un material estudiado en el presente trabajo de tesis doctoral fue la diazirina (Sulfo-NHS-Diazirina; sulfosuccinimidil 4,4'-azipentanoato) que, al reaccionar con luz ultravioleta, conjuga las biomoléculas en la superficie del transductor. Este método promueve la estabilidad y actividad del agente biológico de reconocimiento en el lugar de adherencia [130]. La irradiación de este polímero provoca que se generen derivados de la diazirina, siendo estos altamente reactivos, provocando una alta tasa de generación de enlaces covalentes con las biomoléculas [131].

Otra ventaja de este proceso es de que no requiere una exposición prolongada a la radiación UV, minimizando la degradación por fotones. Al resumir todas las características de la matriz polimérica, se puede concluir que la técnica presenta ventajas importantes pues no requiere un pretratamiento inicial o modificación química del agente de biorreconocimiento para la inmovilización en el transductor lo que eficientiza la inmovilización en las superficies de los electrodos para análisis electroquímicos [132].

Con este marco de conceptos teóricos y estudios analizados, adentraremos a la explicación de las actividades experimentales realizadas durante el proyecto doctoral descrito en esta tesis; detallando cada decisión de la selección de materiales, así como los resultados.

Capítulo 3. Metodología

La cuantificación de un contaminante sea, orgánico o inorgánico, por un método electroanalítico implica tener las condiciones de muestra ideales para que no existan interferentes entre las valoraciones. Debido a esto, generalmente se emplean muestras con niveles de pureza altos en donde solo se presenta el analito en conjunto con el solvente. Los contaminantes orgánicos se presentan en muestras de agua a concentraciones extremadamente bajas, pero la muestra que se toma nunca es pura con respecto al analito de interés.

Este trabajo doctoral propone utilizar la técnica de DAPV diseñada y patentada por el Dr. Roumen Zlatev [3] para la determinación de contaminantes ambientales cuando las muestras contienen el analito de interés e interferentes dentro de la solución.

La voltametría diferencial de pulsos alternos es un método electroanalítico novedoso basado en la relación no lineal de la corriente versus potencial característicos de un sistema electroquímico; esta relación se describe en la siguiente ecuación:

$$E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{I_l - I_t}{I_t} \quad (3)$$

Donde E es el potencial de la celda, $E_{1/2}$ es el potencial de media onda, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta, n es el número de electrones transferidos,

F es la constante de Faraday, I_l es la corriente límite y I_t es la corriente instantánea [133]. Las pequeñas desviaciones presentes en el potencial superpuestas en su valor original toman forma en un voltamograma de pulsos rectangulares, u ondas sinusoidales para las técnicas de segundo orden, generando así respuestas de corriente cuya amplitud sigue la pendiente de esta relación no lineal, mostrando picos en la gráfica.

Estas técnicas se basan en el fenómeno de la rectificación farádica resultando en la superposición de un voltaje sinusoidal en el electrodo principal, mostrando una influencia en la amplitud de respuesta [134].

De este modo, cada periodo de voltaje sinusoidal superpuesto son pulsos sucesivos que toman la misma forma, duración y amplitud, pero con polaridad inversa. Debido a que la rectificación farádica depende del componente no lineal de la relación corriente – potencial, se pueden obtener varias respuestas iguales si se superponen los potenciales del electrodo principal como pulsos sucesivos teniendo amplitudes y duraciones iguales, pero polaridades opuestas, con un ligero retraso entre cada pulso [82].

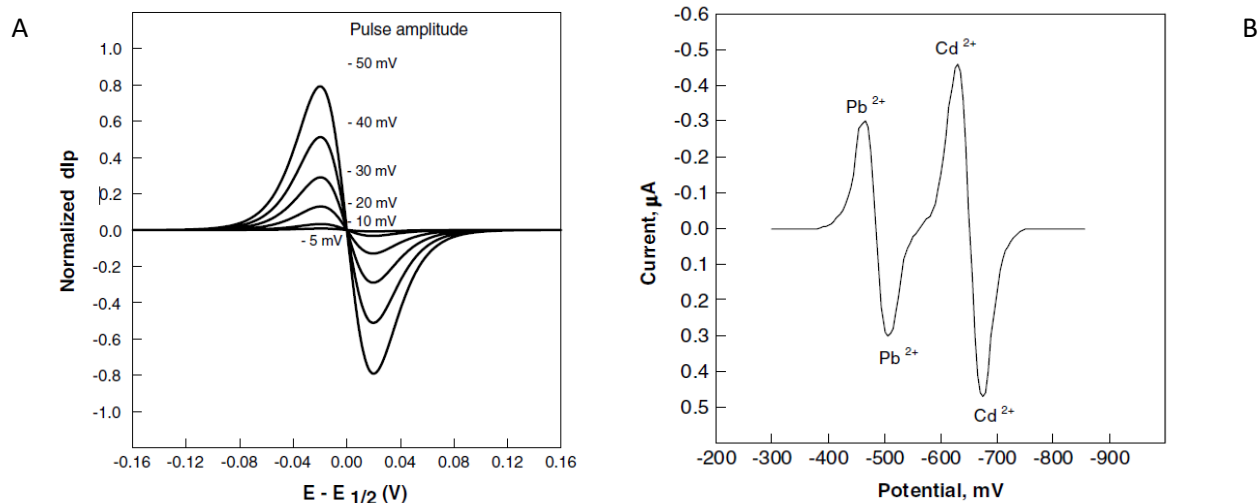


Figura 3.1 Curvas teóricas (A) y experimentales (B) de la técnica de voltametría diferencial de pulsos alternativos, en la curva A se muestra el cambio de la respuesta en función de la amplitud de los pulsos mientras que en la curva B es la determinación simultánea de diferentes iones.

Basados en la figura 3.1, se muestra que el método es apto para la determinación simultánea de diversos analitos en la muestra; pudiendo diferenciar cada uno de ellos por su respuesta en la corriente. La voltametría diferencial de pulsos alternativos muestra en la literatura una gran resolución, siendo del rango de 28 a 50 mV, y un límite de detección de 54 nmol L^{-1} [3].

Bajo esta técnica se diseñaron diversos experimentos con sistemas de contaminantes que, con la voltametría diferencial de pulsos convencional, no sería posible obtener un valor preciso de algún constituyente de las muestras, pero en premisa podrían obtenerse con DAPV.

Los sistemas están descritos a continuación:

1. El primer sistema estudiado es un sistema de contaminantes que se constituye por hidroquinona, catecol y resorcinol, siendo estos isómeros difenólicos. También se estudiaron los efectos de sus interferentes como el ácido úrico y el ácido ascórbico, debido a que generalmente en las muestras donde se encuentran estos contaminantes existe la presencia de estas especies orgánicas.
2. El segundo sistema estudiado es un sistema de nitrofenoles constituido por el orto-nitrofenol, meta-nitrofenol y para-nitrofenol; siendo estos compuestos aromáticos nitrogenados. Su estructura consiste en un anillo fenólico con un grupo nitro (NO_2) sustituyente en diferentes posiciones dependiendo del isómero.
3. El tercer sistema busca determinar el 2,4 – Diclorofenol, siendo su estructura la de un compuesto aromático fenólico con doble halogenación de cloro; se conocen 6 isómeros de este contaminante donde su principal diferencia la ubicación del carbono de sustitución

del cloro. Para este grupo de contaminantes se estudia un sistema adaptativo en donde se pueda determinar el 2,4 -Diclorofenol en presencia de otros contaminantes comunes, como el 4- Clorofenol, 2- Clorofenol y Resorcinol.

4. El cuarto sistema es una extensión del método DAPV para otro tipo de sistemas que no involucran la determinación de contaminantes, en este caso se plantea el uso de biosensores para la determinación de compuestos fenólicos con aplicación médica. Se utilizó una matriz fotopolimérica para la inmovilización del agente de biorreconocimiento mientras que el analito a estudiar fue dopamina. Este neurotransmisor en las muestras biológicas contiene interferentes orgánicos, como el ácido ascórbico, el ácido úrico, la epinefrina y la norepinefrina. La aplicación de la técnica voltamétrica DAPV para la determinación de un compuesto de interés en presencia de interferentes muestra cómo puede ser utilizada no solamente para la determinación de contaminantes y abre el campo para otros tipos de análisis.

3.1 Determinación simultánea de isómeros dihidroxibenzoicos

La hidroquinona y el catecol son compuestos fenólicos con un rango amplio de aplicaciones industriales y farmacéuticas, desde cosméticos, pesticidas hasta diferentes giros sobre la fabricación de pigmentos y solventes. Estos dos compuestos son isómeros dihidroxibenzoicos en conjunto con resorcinol. Todos ellos son electroquímicamente activos por lo que podemos utilizar métodos electroanalíticos para su caracterización y cuantificación en medios acuosos. En esta sección estudiaremos las ventajas de utilizar el método DAPV para la determinación de los

isómeros dihidroxibenzoicos de manera individual, así como de manera simultánea y analizar si existen interferencias que impidan la validación del método.

3.1.1 Estudios sobre la composición del electrodo

Para la determinación simultánea de hidroquinona y catecol se necesita diseñar un experimento lo suficientemente sensible en el ambiente microscópico de la interfase electrodo y la celda electroquímica. Durante el diseño de experimentación se planteó el uso de electrodos de platino, un electrodo de oro, así como un electrodo de grafito espectroscópico. La utilización de estos diversos electrodos fue para encontrar quién de ellos presentaba mejor sensibilidad en el análisis por sus propiedades catalíticas y conductoras, sin embargo, durante el transcurso de los ensayos se optó por utilizar grafito espectroscópico por su conveniencia, fácil manejo en los análisis, nula corrosión, facilidad de limpieza y bajo costo.

Para esos experimentos se utilizaron electrodos sin modificación en su superficie esto con el objetivo de encontrar el material que optimizará la señal y no utilizar métodos sofisticados. La voltametría cíclica fue la técnica por excelencia para analizar el comportamiento de los compuestos fenólicos tanto individuales como en conjunto. Los ensayos involucraron la utilización de una celda electroquímica con solución buffer PBS 0.1 mol L⁻¹ pH 7.0 y con concentración de 0.5 mmol L⁻¹ para cada isómero. Los electrodos utilizados en los análisis voltamétricos son: el electrodo de trabajo es el objeto de estudio, el electrodo de referencia es un electrodo de Ag, AgCl/KCl_{sat} mientras que el contraelectrodo es un alambre de platino, el potencióstato utilizado es un 440 A Electrochemical Analyzer (CH Instruments Inc., USA) modelo CompactStat.h 20250 mientras que para la técnica DAPV se utilizó un potencióstato de Ivium Technologies, Netherlands; controlado por el software IviumPulse.

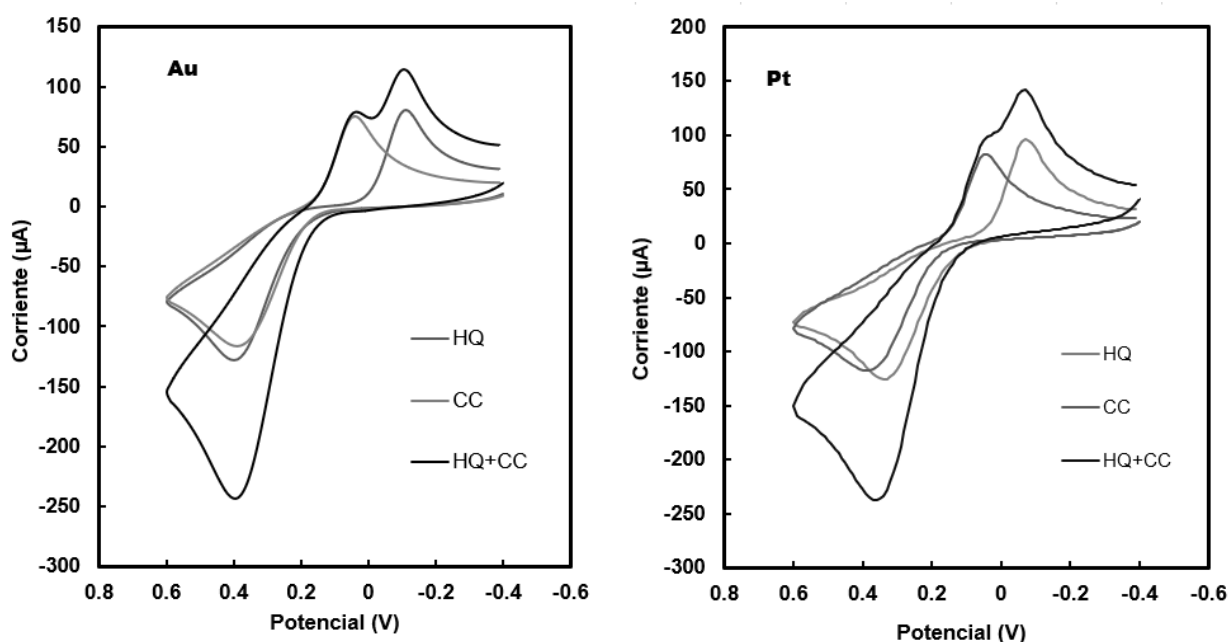


Figura 3.2 Voltamogramas cíclicos presentando los picos anódicos y catódicos de hidroquinona y catecol en electrodos de Au y Pt; la solución inicial tiene 0.5 mM de hidroquinona y 0.5 mM de catecol, para después aumentar la concentración de catecol a 1 mM. Las curvas CV fueron realizadas en una celda electroquímica con buffer de pH 7.0, de composición PBS 0.1 M.

Observando las curvas de voltametría cíclica podemos notar quiénes presentan una mejor sensibilidad y separación de los picos a la hora de realizar las mediciones de catecol e hidroquinona, quien favorece una separación mayor de los picos de los dos componentes sería el electrodo de grafito espectroscópico (no mostrado), siendo el principal interés a la hora de estudiar simultáneamente estos contaminantes.

3.1.2 Estudios sobre el pH de la solución en la celda electroquímica

Es de relevancia analítica obtener el pH donde se favorecen los procesos de oxidación y reducción, para ello se utilizó voltametría cíclica utilizando un electrodo de grafito espectroscópico. Se analizaron los diferentes valores de pH y se observó que las corrientes del pico catódico tanto de la hidroquinona como del catecol se incrementan en un rango de pH desde el 5.0 hasta el 7.0. el incremento arriba de pH 7.0 mostró un decremento en la corriente de los picos. El aumento del pH del rango 4.0 hasta 8.0 mostró un incremento en el potencial del pico anódico y catódico; mostrados en las siguientes gráficas.

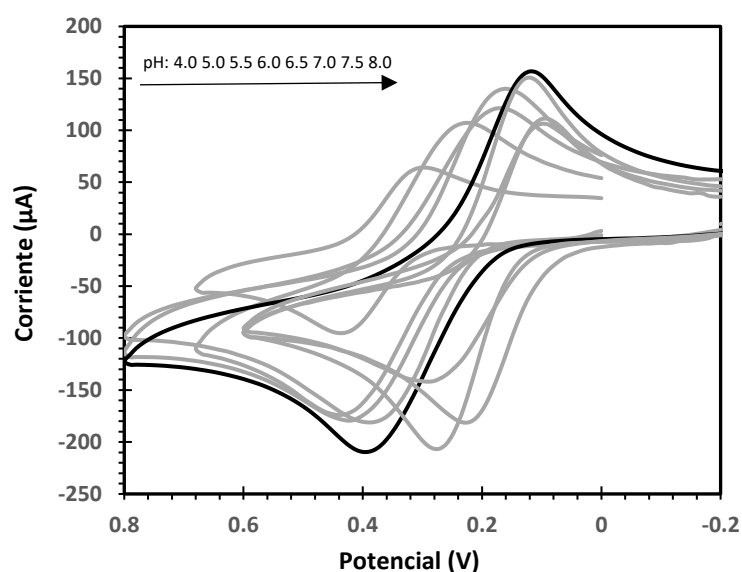


Figura 3.3. Voltamogramas cíclicos presentando la variación del potencial de los procesos de oxidación y reducción del catecol a 0.5 mmol L^{-1} en función de la variación del pH de la solución buffer PBS 0.1 mol L^{-1} , la serie de color negro representa la gráfica del pH 7.0, siendo quien presentó mayores valores de las corrientes de los picos.

En la figura 3.3, se puede apreciar un cambio del potencial de los procesos de oxidación y reducción, así como de la corriente de los picos anódicos y catódicos del catecol, siendo su valor máximo el de pH 7.0. Se utilizará este valor de pH para los ensayos siguientes al tener mejor efecto en los picos de las corrientes.

3.1.3 Determinación de Catecol e Hidroquinona por DAPV

Inicialmente, para la cuantificación voltamétrica de catecol e hidroquinona utilizando el método DAPV se analizó para cada contaminante en una muestra sintética independiente, donde no existiera interferente para obtener su respectiva curva de calibración y validación del método; después, era necesario probar si al mezclar los isómeros dihidroxibenzoicos existía una interferencia real en los picos anódicos y catódicos. La sensibilidad de la determinación de los compuestos fenólicos estudiados en este apartado fue similar, los picos de oxidación y de reducción fueron incrementando linealmente con respecto al incremento de la concentración en la celda electroquímica, como era de esperarse, de modo que tanto el pico anódico como el catódico pueden utilizarse con fines analíticos. Para estos ensayos, es importante notar que se cambia el potencióstato al IviumSoft; debido que es quien tiene programada la técnica DAPV; las demás condiciones son iguales a los ensayos anteriores incluyendo el electrodo de trabajo.

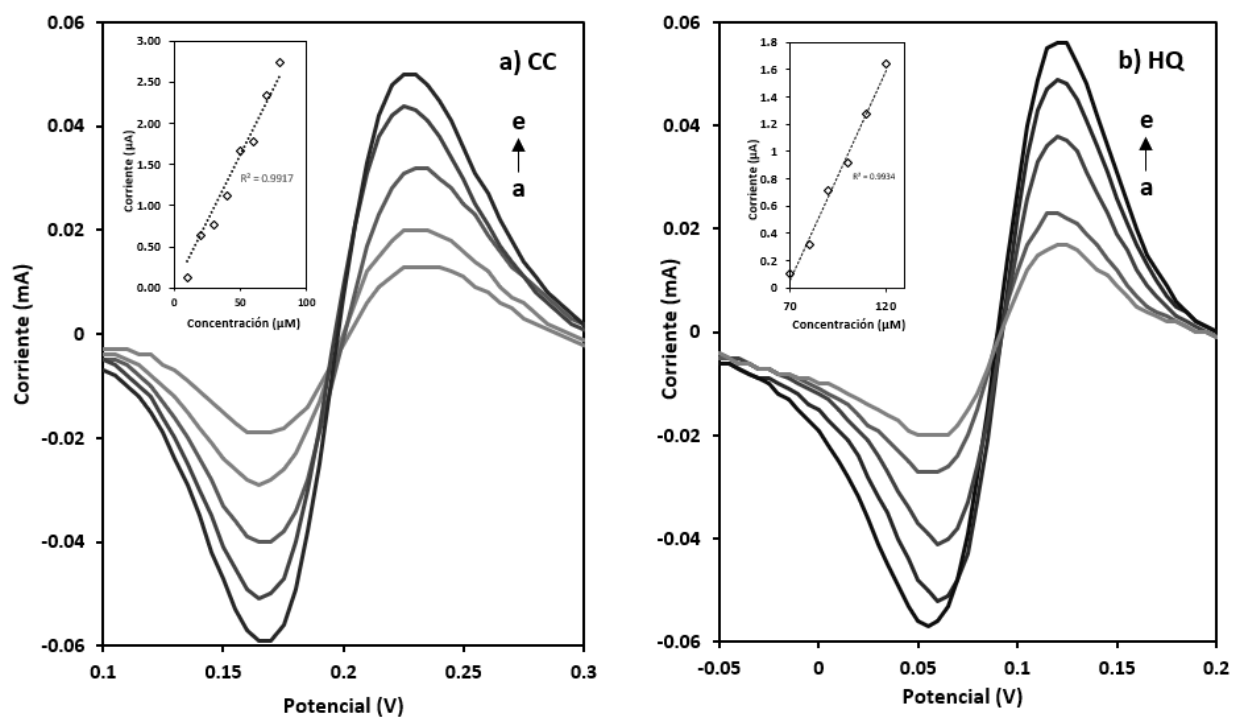


Figura 3.4 Voltamogramas de DAPV para HQ y CC donde se aprecia el incremento de la corriente de los picos tanto anódicos como catódicos en función de la concentración; para la gráfica a: a) 10 μM ; b) 20 μM ; c) 30 μM ; d) 40 μM y e) 50 μM ; para la gráfica b: a) 70 μM ; b) 80 μM ; c) 90 μM ; d) 100 μM ; e) 110 μM .

Las curvas de calibración construidas en la figura 3.4 muestran el rango lineal dentro de la determinación de los isómeros. A continuación, se ponen las ecuaciones que describen la curva de calibración para la determinación de hidroquinona y catecol por DAPV sin interferentes

$$I_{CC} = 0.0324C_{CC}; R^2 = 0.9917 \quad (4)$$

$$I_{C_{HQ}} = 0.0094C_{HQ}; R^2 = 0.9934 \quad (5)$$

Bajo las mismas condiciones de ensayo se planteó el análisis de los dos isómeros dihidroxibenzoicos de forma simultánea aprovechando las ventajas del método DAPV para la separación de los picos, las condiciones del ensayo son idénticas a las determinaciones anteriores con la diferencia de que, para un caso, se varía la concentración de un analito de manera gradual para la construcción de la curva de calibración mientras se mantiene constante la del otro compuesto fenólico.

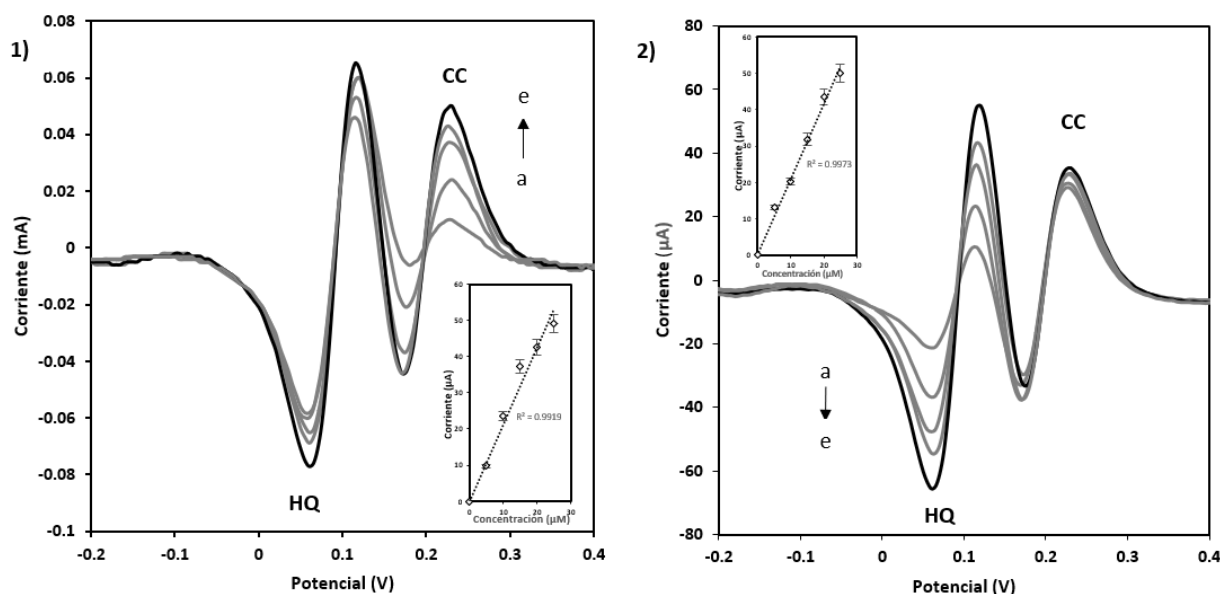


Figura 3.5 Voltamogramas de DAPV HQ y CC en la determinación simultánea con sus respectivas curvas de calibración. Para las dos graficas tenemos una concentración de HQ y CC respectivamente de a) 10 μM; b) 20 μM; c) 30 μM; d) 40 μM y e) 50 μM; mientras que el otro isómero se mantiene a 20 μM.

En las curvas de DAPV que muestran la figura 3.5 se aprecia que existe un traslape en el pico catódico de hidroquinona con el pico anódico de catecol; esto no impide que se pueda realizar una curva de calibración con el pico anódico de hidroquinona y el pico catódico de catecol. Las ecuaciones que relacionan la concentración con la corriente del pico son las siguientes:

$$I_{CC} = 2.1279C_{CC}; R^2 = 0.9919 \quad (6)$$

$$I_{HQ} = 2.0854C_{HQ}; R^2 = 0.9973 \quad (7)$$

3.1.4 Estudios de interferentes fenólicos en la determinación de Catecol e Hidroquinona

Al analizar los compuestos fenólicos dihidroxibenzoicos se planteó analizarlos también en presencia de fenol, resorcinol y para – nitrofenol; compuestos que estructuralmente tienen similitudes con los analitos estudiados en esta determinación; sin embargo, notamos que en los ensayos no se presenta interferencia significativa para la determinación de hidroquinona y catecol, teniendo estas especies químicas coexistiendo en la misma muestra. La figura 3.1.5 muestra las curvas de DAPV donde se puede apreciar los potenciales donde aparecen los picos tanto de oxidación como de reducción de CC y HQ mantenidos en el rango de 0.0 y +0.2 V mientras que los interferentes se encuentran desde +0.5 V hasta 0.9 V.

Las condiciones experimentales fueron las mismas que los ensayos anteriores, teniendo una celda electroquímica con buffer PBS 0.1 M con pH de 7 y las alícuotas de cada uno de los compuestos. Se realizaron cuatro experimentos, uno con las cinco especies químicas simultáneamente (no presentado) y los demás con al menos tres especies químicas para superponer los picos individuales de cada interferente, presentadas en la figura 3.1.5.

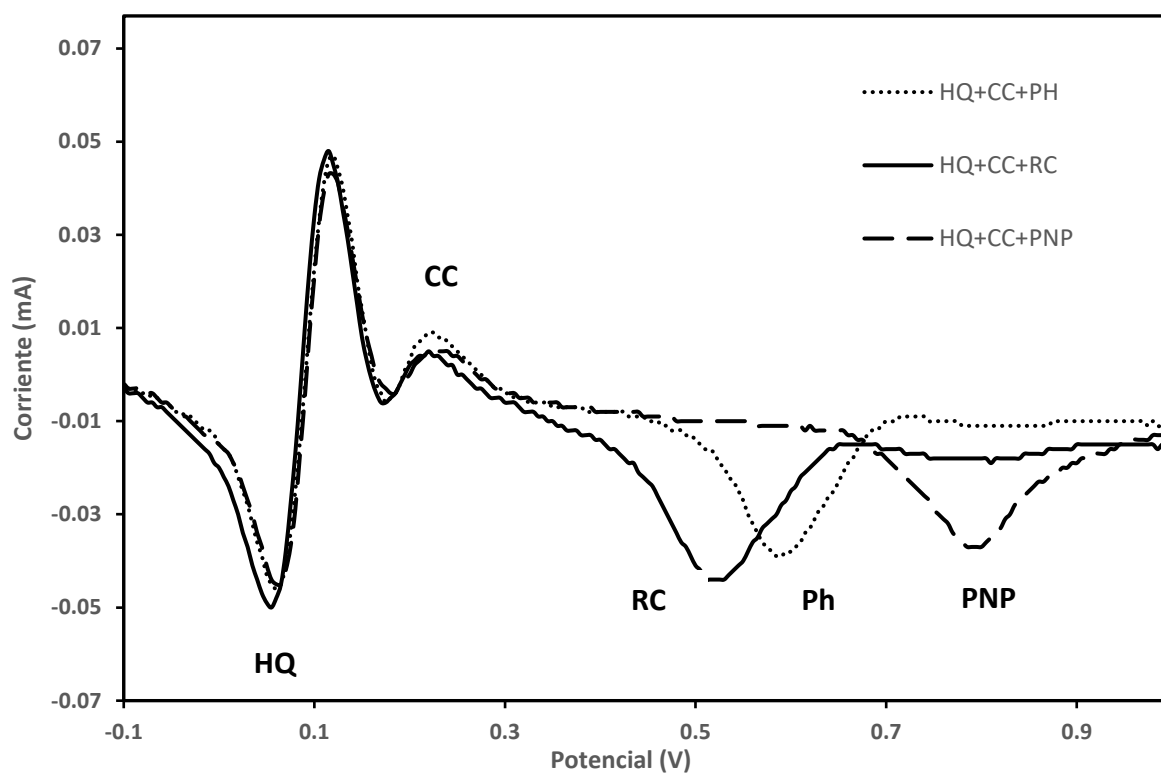


Figura 3.6 Voltamogramas de DAPV para la determinación de HQ ($15 \mu\text{M}$) y CC ($2.5 \mu\text{M}$) en presencia de los interferentes RC ($300 \mu\text{M}$), F ($300 \mu\text{M}$) y PNP ($300 \mu\text{M}$)

Este trabajo experimental mostró un acercamiento diferente al convencional para la determinación de isómeros dihidroxibenzoicos, promoviendo la determinación por métodos electroanalíticos sin modificaciones sofisticadas de la superficie del electrodo.

3.2 Determinación de un sistema isomérico de mononitrofenoles

Los mononitrofenoles son grupos de compuestos aromáticos con un grupo nitro (NO_2), estos incluyen tres isómeros estructurales: el orto – nitrofenol, el meta – nitrofenol y el para – nitrofenol. Una de las dificultades para determinar la concentración de estos compuestos es que en muestras que contengan el contaminante generalmente tienen la presencia de un conjunto de compuestos fenólicos y los tres isómeros, lo que se traduce en no tener la suficiente resolución para determinar el traslape de los picos, esto lleva a tener una precisión para su cuantificación baja. En la literatura se describen diferentes técnicas para mejorar la señal como el utilizar modificaciones morfológicas y químicas en el electrodo de trabajo [102, 103]. Debido a esto, la diferenciación e identificación de la especie química individual sigue siendo un reto.

En esta sección, se propone una técnica que no requiere procesos costosos de fabricación o modificación de las partes dentro de una celda electroanalítica, así como el no requerir equipo sofisticado y personal altamente entrenado para la operación de este.

3.2.1 Caracterización electroquímica del electrodo de trabajo (GCE) sin modificación y con modificación

Existe registro del comportamiento de los isómeros nitrofenólicos en la literatura; estos se han estudiado mostrando una interacción de los componentes de estudio dentro de una celda electroquímica así como su peligrosidad como contaminantes [137]. Es mostrado que, cuando se realizan curvas de voltametría cíclica para cada especie química del sistema isomérico, en la sección del barrido catódico el pico de reducción se encuentra cerca de -0.6 V para el o-NP y el m-NP mientras que el p-NP tiene un valor dentro de -0.7 V. Se realizaron estudios de voltametría

cíclica para comprender el comportamiento y desplazamiento de los potenciales de los picos. Además, los ensayos utilizaron una celda electroquímica con solución buffer PBS 0.1 mol L⁻¹ pH 6.0 y con concentración de 100 μmol L⁻¹ para cada isómero. Los electrodos utilizados en los análisis voltamétricos son: el electrodo de trabajo es un GCE modificado con una suspensión de nanopartículas de oro, grafito y laponita, el electrodo de referencia es un electrodo de Ag, AgCl/KCl_{sat} mientras que el contraelectrodo es un alambre de platino, el potenciostato utilizado es un 440 A Electrochemical Analyzer (CH Instruments Inc., USA) modelo CompactStat.h 20250 mientras que para la técnica DAPV se utilizó un potenciostato de Ivium Technologies, Netherlands; controlado por el software IviumPulse.

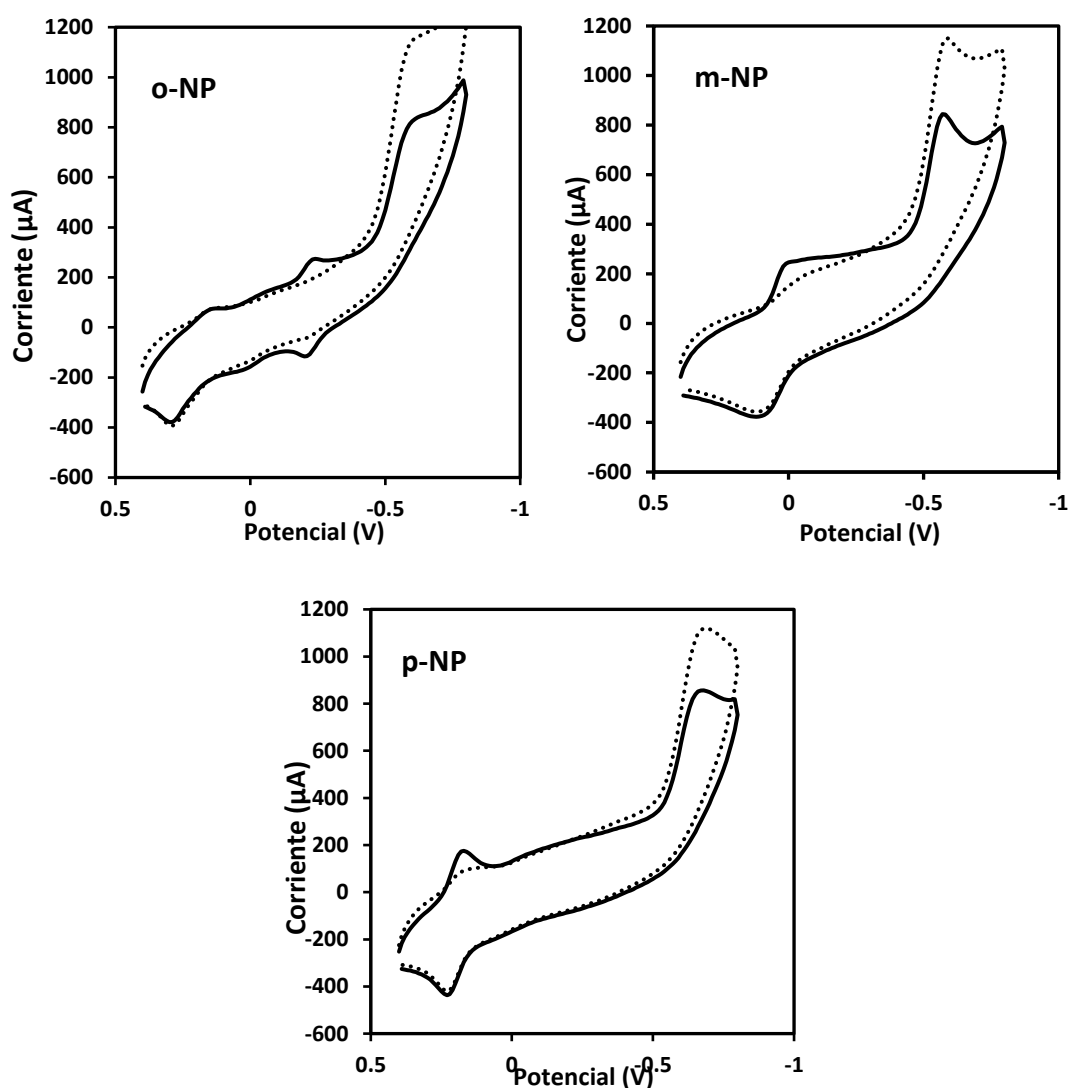


Figura 3.7 Voltamogramas Cíclicos para el estudio del comportamiento del sistema isomérico de o-NP (100 μM), m-NP (100 μM) y p-NP (100 μM) utilizando un electrodo de carbón vítreo (GCE) en una solución de pH 6.0; la línea punteada representa el primer barrido mientras que la continua el segundo.

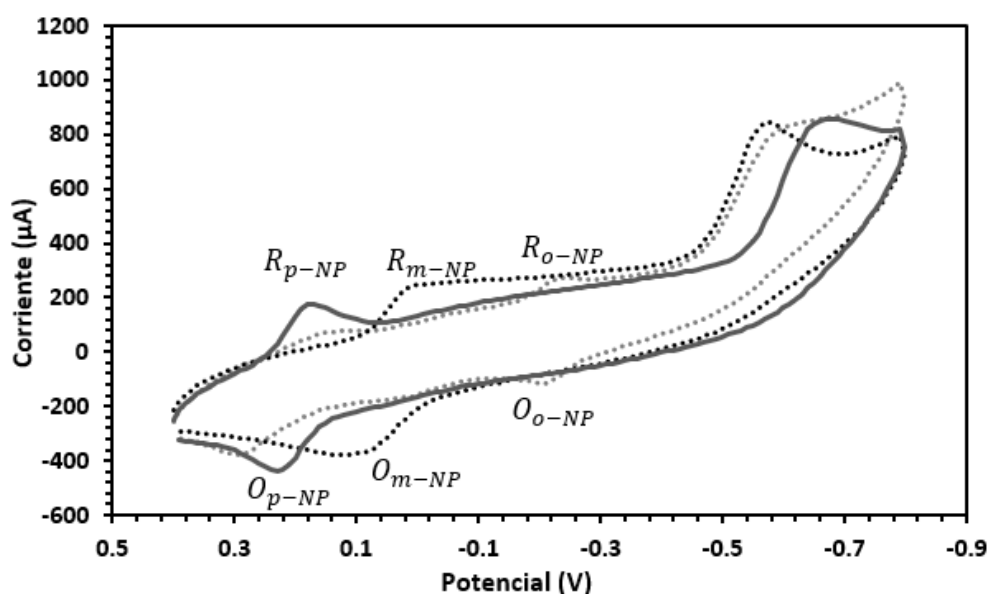


Figura 3.8 Voltamogramas Cíclicos que muestran el comportamiento de los isómeros nitrofenólicos y sus picos de reducción / oxidación.

Bajo la figura 3.8 podemos deducir que es posible separar los picos de reducción y oxidación al aplicar DAPV, siendo viable la determinación simultánea de los nitrofenoles.

Al entender el comportamiento de los isómeros, debemos de caracterizar el electrodo de trabajo para las determinaciones. Es importante notar que las modificaciones que se realicen en la superficie del electrodo provocarían una mejor sensibilidad en el análisis al mejorar la superficie activa del electrodo, así como la constante heterogénea de transferencia de electrones. Utilizando la ecuación (2) podemos determinar el área real, así como al utilizar la ecuación del Nicholson (8) junto con la correlación experimental (9) nos permite calcular k^0 .

$$\psi = k^0 \left[\frac{Dn\nu F\pi}{RT} \right]^{(-\frac{1}{2})} \quad (8)$$

$$\psi = \frac{(-0.6288 + 0.0021X)}{1 - 0.017X} \quad (9)$$

La modificación del electrodo se estableció al preparar una suspensión coloidal de nanopartículas de laponita con oro, otra con la misma concentración de partículas de laponita y grafito en polvo nanoparticulado y la tercera suspensión es la misma concentración de laponita y una mezcla de nanopartículas de oro con grafito nanoparticulado.

A continuación, se describe la elaboración de cada dispersión coloidal:

1. Laponita con nanopartículas de oro: se introducen nanopartículas de oro (2 mg mL⁻¹) y nanopartículas de laponita (1 mg mL⁻¹) a 5 mL de agua junto con un volumen de una solución de borohidruro de sodio 0.0025 M y se dejan en dispersión ultrasónica por 20 minutos, se debe tener una coloración violeta que indica una suspensión coloidal de oro.
2. Laponita con grafito nanoparticulado: La suspensión de grafito nanoparticulado se preparó similarmente como la de oro, siendo el agregar nanopartículas de laponita (1 mg mL⁻¹) a 5 mL de agua, al tener la dispersión se agregó grafito nanoparticulado (2 mg mL⁻¹) y se utilizó una dispersión ultrasónica por 20 minutos.
3. Laponita con oro y grafito nanoparticulado: La suspensión mixta de nanopartículas se preparó similarmente a las anteriores, se agregó grafito nanoparticulado (2 mg mL⁻¹) a una solución de nanopartículas de oro ya preparada y se llevó a dispersión ultrasónica por 20 minutos.

La modificación del electrodo se llevó a cabo siempre con la superficie de un electrodo de carbón vítreo recién pulida utilizando papel abrasivo de 0.05 µm y después se depositan 5 µL de la solución recién dispersa a utilizar seguido con un secado a temperatura ambiente de 45 minutos.

Se utilizó un sistema de celda electroquímica convencional, con el electrodo de trabajo modificado, un electrodo de referencia de Ag, AgCl/KCl y un contraelectrodo de platino. La celda tenía un volumen de 10 mL de solución de KNO₃ 1 M.

Bajo la premisa del aumento de sensibilidad en agregar nanopartículas electrocatalíticas, se analizó el cambio de las propiedades de los electrodos, resumidas en la siguiente tabla:

Tabla 3.2.1. Área electroactiva y constante heterogenia de transferencia de electrones para los electrodos modificados y sin modificación

Electrodo	Área activa (mm ²)	K ^o (cm s ⁻¹)
GCE	2.27	4.3x10 ⁻³
GCE/ L-Au	2.47	5.23x10 ⁻³
GCE/ L-GP	2.68	7.44x10 ⁻³
GCE/ L-GP-Au	3.12	7.9x10 ⁻³

Al analizar los datos obtenidos de los electrodos preparados para la determinación de los nitrofenoles se encuentra que la modificación con mayor sensibilidad es la GCE/L-GP-Au, como se muestra en la figura 3.9

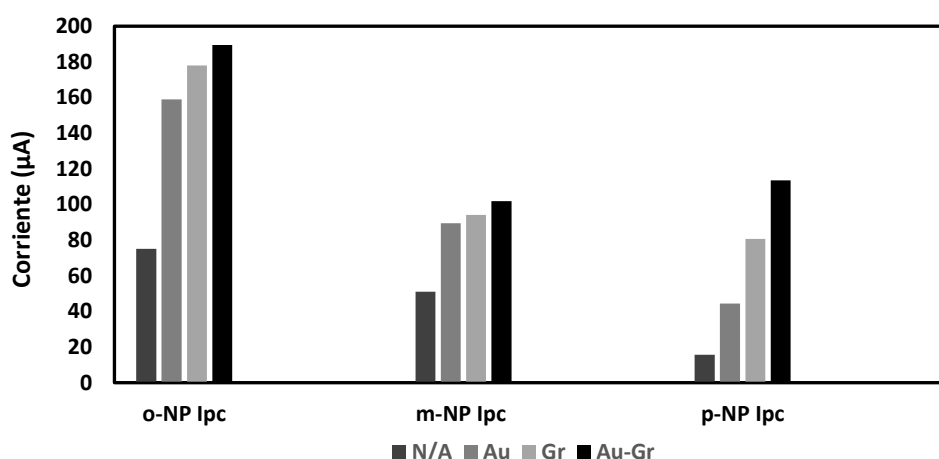


Figura 3.9 Aumento de la corriente de los picos catódicos en la determinación voltamétrica de los isómeros nitrofenólicos dependiendo de la modificación del electrodo; la concentración de los isómeros es de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$

Los resultados obtenidos confirman que la mejora del rendimiento analítico en términos de la sensibilidad en las determinaciones es adjudicable a las modificaciones al electrodo de carbón vítreo y esto, a su parte, es debido al incremento en la superficie electrocatalítica, así como las propiedades de intercambio de electrones.

3.2.2 Efecto del pH en la determinación del sistema isomérico de nitrofenoles.

El efecto del pH en la determinación de los isómeros nitrofenólicos es de relevancia al estudiar la respuesta que se obtiene con las modificaciones del electrodo. Los cambios en los potenciales son de importancia debido a que las corrientes del pico anódico y catódico cambian con respecto a la concentración de iones H^+ . Se estudiaron los efectos del cambio del pH de la solución utilizando una solución buffer PBS 0.1 M con pH variable, desde 5.5 hasta 7.5, cambiando los

valores en incrementos de 0.5. Los tres isómeros mantuvieron una concentración de $125 \mu\text{mol}^{-1}$; las siguientes curvas de voltametría cíclica muestran el cambio de los potenciales de oxidación y reducción, así como el cambio de la sensibilidad de la determinación de las corrientes de los picos en función del pH de la solución buffer.

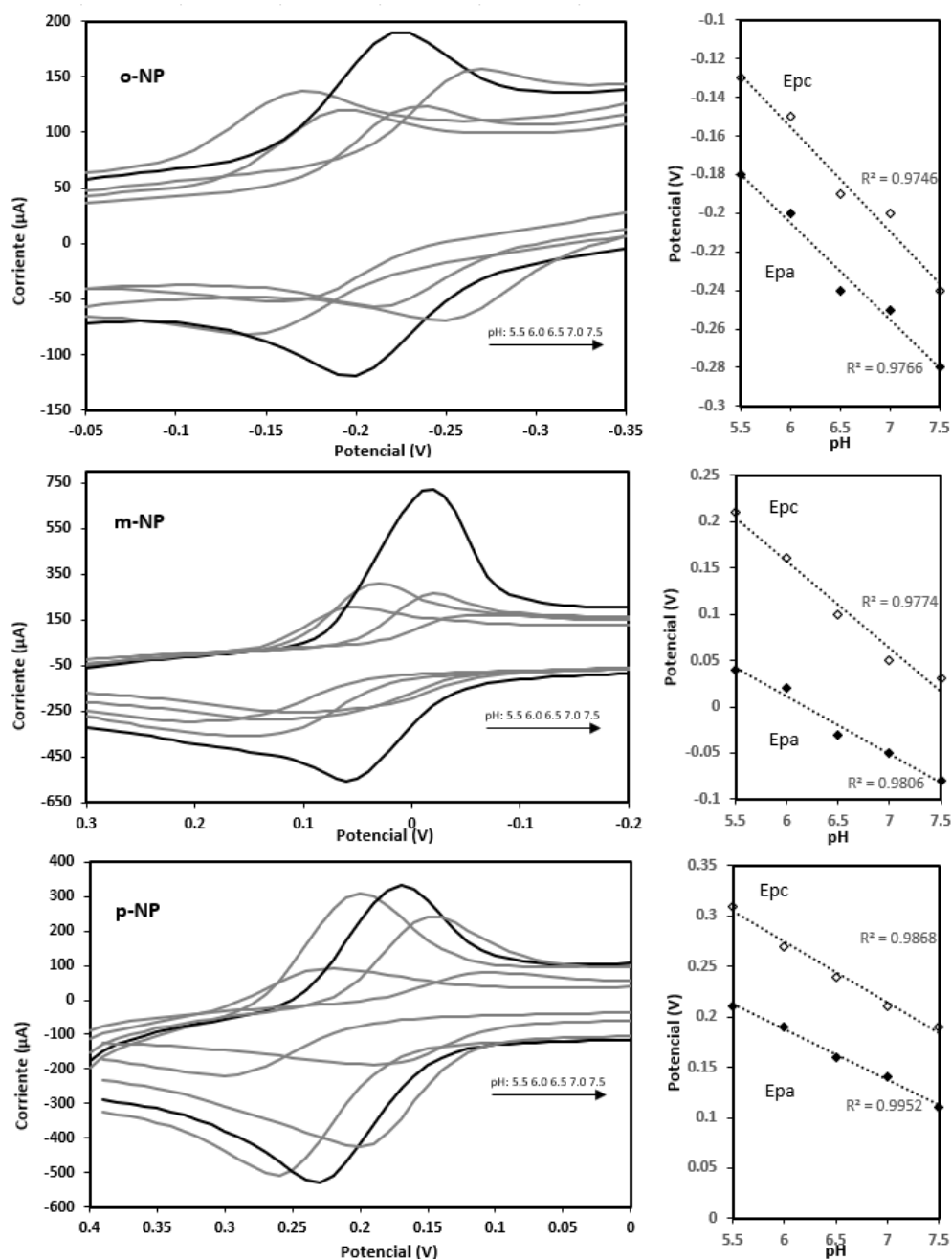


Figura 3.10 Voltamogramas Cíclicos que muestran el cambio de la corriente y el potencial al cambiar el pH de la solución PBS 0.1 M en la celda electroquímica, la concentración de los isómeros en cada ensayo fue de 0.2 mmol L^{-1} ; también la sección de la regresión en función del cambio del potencial del pico anódico y catódico.

Por otro lado, el proceso investigado en la determinación de los nitrofenoles involucra a los protones dentro de la estructura molecular de cada uno [138], por lo que se observa un cambio en los potenciales del pico a valores más negativos. A pesar de esto, se mantiene una relación lineal entre los valores de pH respecto a los potenciales de pico anódico y catódico. Así, el cambio afecta a la cuantificación de los isómeros, mostrando mayor sensibilidad en el ensayo con pH 6.5.

3.2.3 Determinación de los isómeros nitrofenólicos por DAPV.

En el estudio del sistema isomérico de nitrofenoles inicialmente se analizó de manera individual, cada nitrofenol se estudió con la técnica de DAPV y se diseñó el experimento para validar la curva de calibración sin interferentes. Los diversos ensayos fueron planeados con la modificación que otorgara mayor área activa, siendo esta el electrodo de carbón vítreo (GCE) modificado con nanopartículas de grafito y nanopartículas de oro, la celda electroquímica utiliza un buffer PBS 0.1 M con pH de 6.5. Las concentraciones de la celda comprenden un rango desde 25 μM hasta 200 μM en incrementos de 25 μmol dentro de la celda.

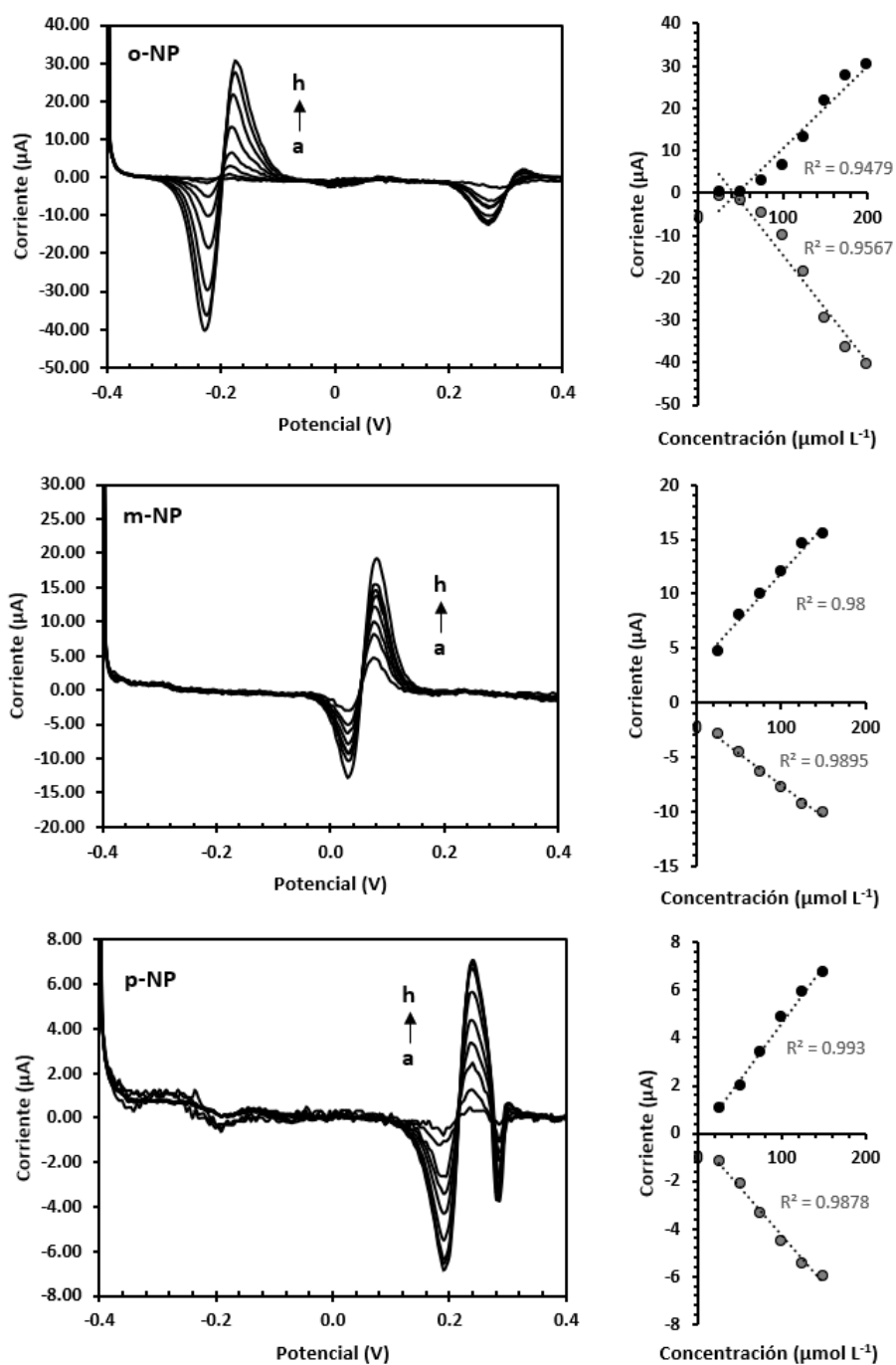


Figura 3.11 Determinación de los isómeros por DAPV en conjunto con sus curvas de calibración para los picos de reducción y oxidación; a) 25 µmol L⁻¹; b) 50 µmol L⁻¹; c) 75 µmol L⁻¹; d) 100 µmol L⁻¹ e) 125 µmol L⁻¹ f) 150 µmol L⁻¹ g) 175 µmol L⁻¹ h) 200 µmol L⁻¹

Después de validar las curvas de calibración para cada uno de los nitrofenoles de manera individual se aplicó DAPV para una mezcla de ellos. Los experimentos constaron de variar la concentración de un isómero en relaciones de 1:5 hasta llegar a 1:1. Se mantendrá fija la concentración de los dos isómeros no estudiados mientras que el tercer isómero variará la concentración similar al experimento anterior con incrementos de 25 μmol dentro de la celda; la concentración fija para cada isómero no estudiado es de 125 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Este experimento debe mostrar el cambio de los picos de oxidación y reducción dependiendo de las interacciones que se presenten a la hora de la determinación simultánea, provocando que este método sea viable y verificable para una muestra que contenga los 3 contaminantes. Se emplearon nuevamente las mismas condiciones de ensayo siendo un GCE como electrodo de trabajo modificado con nanopartículas de grafito y nanopartículas de oro en una celda con solución buffer PBS 0.1 M con pH 6.5.

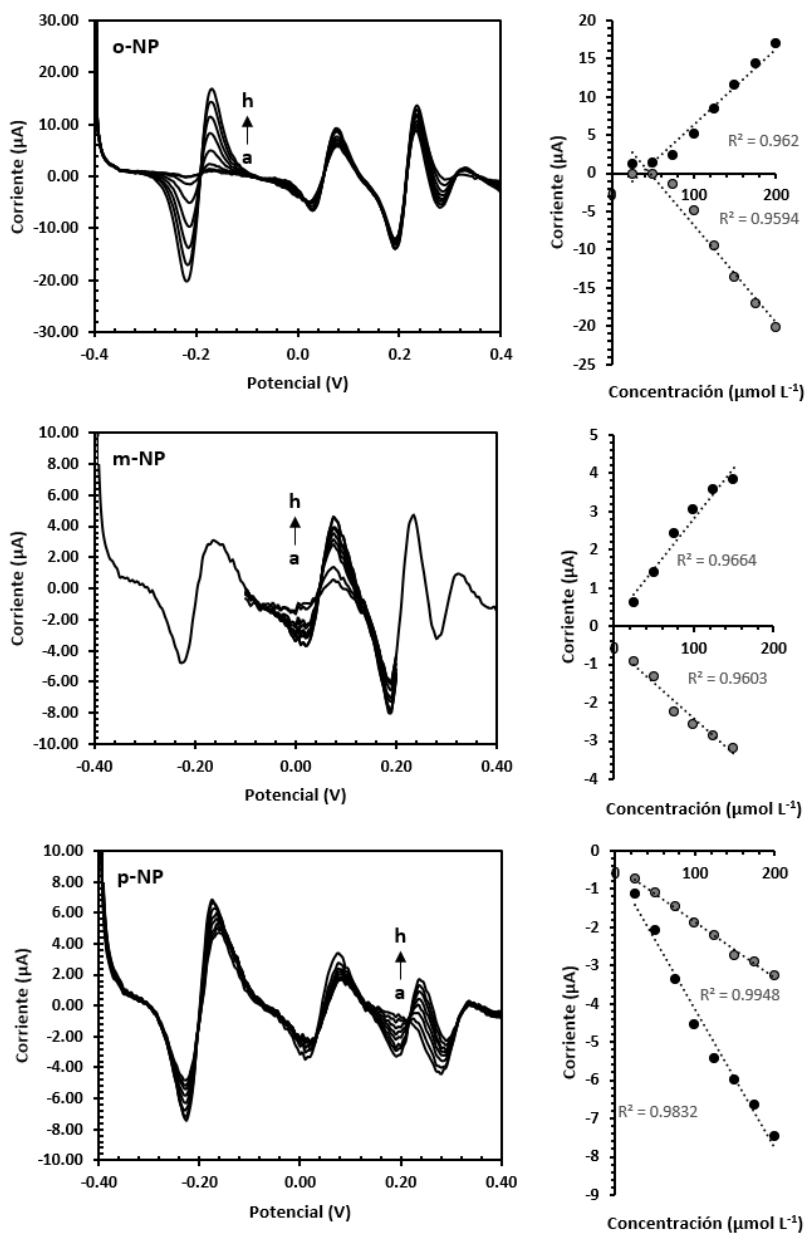


Figura 3.12 Determinación de los isómeros por DAPV en presencia simultánea, se incluyen sus curvas de calibración para los picos de reducción y oxidación; las concentraciones son: a) 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$; b) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; c) 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$; d) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e) 125 $\mu\text{mol L}^{-1}$ f) 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ g) 175 $\mu\text{mol L}^{-1}$ h) 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$; mientras que el isómero no estudiado se mantiene a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

El rango lineal de la determinación para m-NP y p-NP se extendió arriba de los $125 \mu\text{mol L}^{-1}$, sin embargo, en o-NP se presenta que mediante este método se dificulta determinarlo a concentraciones bajas ($25 \mu\text{mol L}^{-1}$ y $50 \mu\text{mol L}^{-1}$); el rango lineal se respeta desde $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ hasta $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ con una R^2 de 0.99 para el pico de oxidación y de reducción.

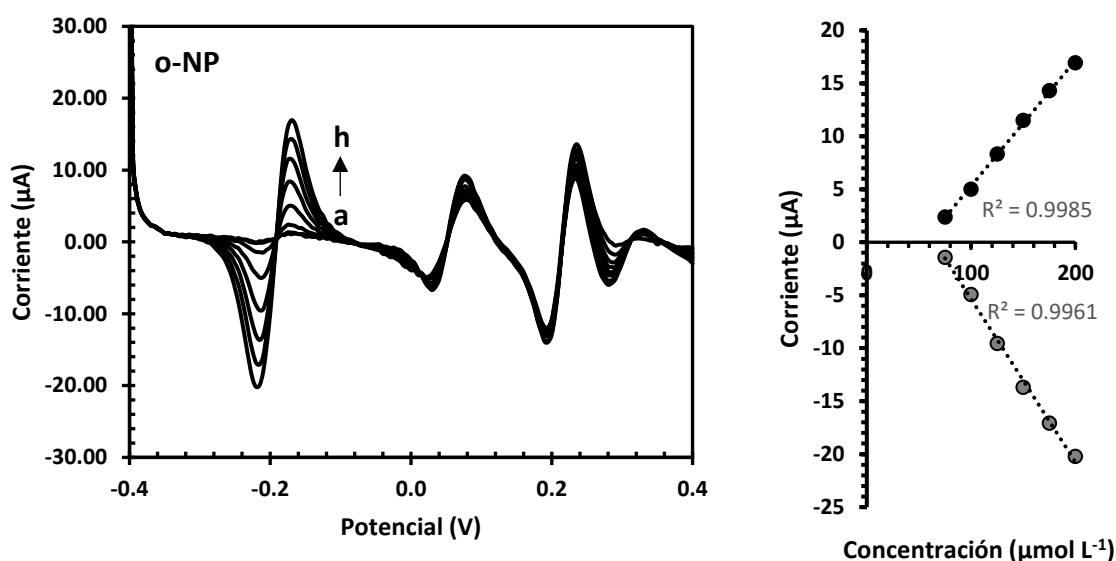


Figura 3.13 Determinación del isómero o-NP por DAPV en presencia simultánea, se incluye la curva de calibración para los picos de reducción y oxidación en un rango lineal de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$; las concentraciones son: a) $25 \mu\text{mol L}^{-1}$; b) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; c) $75 \mu\text{mol L}^{-1}$; d) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ e) $125 \mu\text{mol L}^{-1}$ f) $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ g) $175 \mu\text{mol L}^{-1}$ h) $200 \mu\text{mol L}^{-1}$; mientras que el isómero no estudiado se mantiene a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Se realizaron varios ensayos para probar si era posible determinar los isómeros mediante voltametría diferencial de pulsos convencional en comparación con DAPV y, aunque es posible elaborar curvas de calibración para o-NP y m-NP, no fue posible determinar p-NP en presencia de los demás isómeros por el traslape de los picos de reducción.

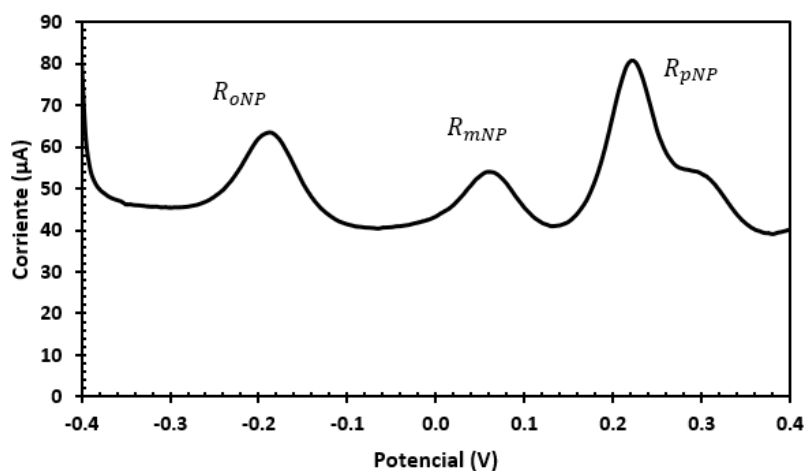


Figura 3.14 Determinación del sistema isomérico en forma simultánea mediante DPV, todos los nitrofenoles están en una concentración de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Con esta información de los ensayos, podemos tener un límite de detección de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ y $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o-NP, m-NP y p-NP respectivamente. Se concluye la parte experimental del sistema isomérico de nitrofenoles con la validación del método de determinación simultánea mediante DAPV al tener un límite de detección similar al que se reporta la literatura y con las ventajas que este propone [104,105].

3.3 Determinación de sistemas diclorofenólicos utilizando un electrodo de pasta de carbono.

Para estudiar los efectos del electrodo en los análisis con DAPV se planteó utilizar carbono grado reactivo y preparar una pasta de este material. El electrodo es preparado mezclando carbono o grafito con parafina en proporciones definidas; esto debido a que la parafina producirá una resistencia a la corriente eléctrica por sus propiedades conductoras. Cuando se prepara la mezcla se adiciona laponita, una zeolita que funciona como una nanoplateforma estructurada que funcionaliza las reacciones con benzofenonas o compuestos fenólicos; lo que se traduce a que funcionan como intermediarios en la formación o reacción de compuestos orgánicos e inorgánicos [141]. Esto ocurre por su capacidad de adsorber el analito de interés al tener una polaridad compatible con los grupos OH en los fenoles [142].

Es importante notar que se debe optimizar las concentraciones de cada uno de los constituyentes de la pasta, mientras más cantidad de parafina se agrega la señal obtenida en el potenciostato disminuirá al provocar una resistencia eléctrica, mientras que al agregar una cantidad pequeña provocaría una mala cohesión de la pasta. Así mismo con la cantidad de carbono.

Para la preparación del electrodo de pasta de grafito modificado con laponita se introduce la pasta a un recipiente similar a una jeringa, ésta cuenta con un émbolo que permite comprimir la pasta para que exista mayor adhesión entre ella. Dentro del recipiente un cable tiene contacto con la pasta y viaja hasta el exterior en donde es conectado al potenciostato para recibir indicaciones mediante el software CH440A utilizando el potenciostato de marca CH Instruments Inc. Modelo 440A.

El diseño experimental constituyó con los siguientes puntos:

1. Estudios de adsorción.
2. Caracterización electroquímica del electrodo
3. Caracterización morfológica de la plataforma de nanomateriales
4. Caracterización de la cinética de adsorción

3.3.1 Estudios de Adsorción

Un entendimiento e interpretación apropiada de la información proporcionada por los isothermas de adsorción es importante para mejorar significativamente el mecanismo de adsorción e implementar un diseño eficaz del proceso global. Se realizaron diversos ensayos con espectrofotometría en sitio UV-VIS con el equipo controlado por computadora 50S UV-VIS spectrophotometer a una longitud de onda de 283 nm a constante agitación (cerca de 150 rpm) con una temperatura de la celda de 25° C.

Los experimentos se llevaron a cabo en una celda espectrofotométrica de cuarzo con 900 µL de una solución de laponita (0.45 g L^{-1}) y 100 µL de 2,4 – DCP para tener una concentración de 1 mmol L^{-1} . Estos ensayos mostraban la capacidad de adsorción del Diclorofenol en las partículas de laponita en dispersiones acuosas con un pH fijo (5.5) variando la concentración de laponita de 0.5 mmol L^{-1} hasta 1.5 mmol L^{-1} .

Se midió la absorbancia a cinco diferentes concentraciones en tiempo cero y cada 5 minutos hasta 100 minutos de medición. Después, se trataron los datos experimentales hasta obtener un ajuste al isoterma correspondiente al proceso de adsorción, que para este sistema corresponde al isoterma de Harkin – Jura. Este isoterma supone la posibilidad de capas múltiples de adsorción en la superficie de los adsorbentes dependiendo de la distribución de los poros; descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{q_e^2} = \frac{B}{A} - \left(\frac{1}{A}\right) \log C_e \quad (10)$$

Donde A y B corresponden a las constantes de Harkin – Jura que pueden obtenerse al realizar un análisis de regresión lineal al graficar $1/q_e^2$ contra el logaritmo de la concentración en el equilibrio (C_e).

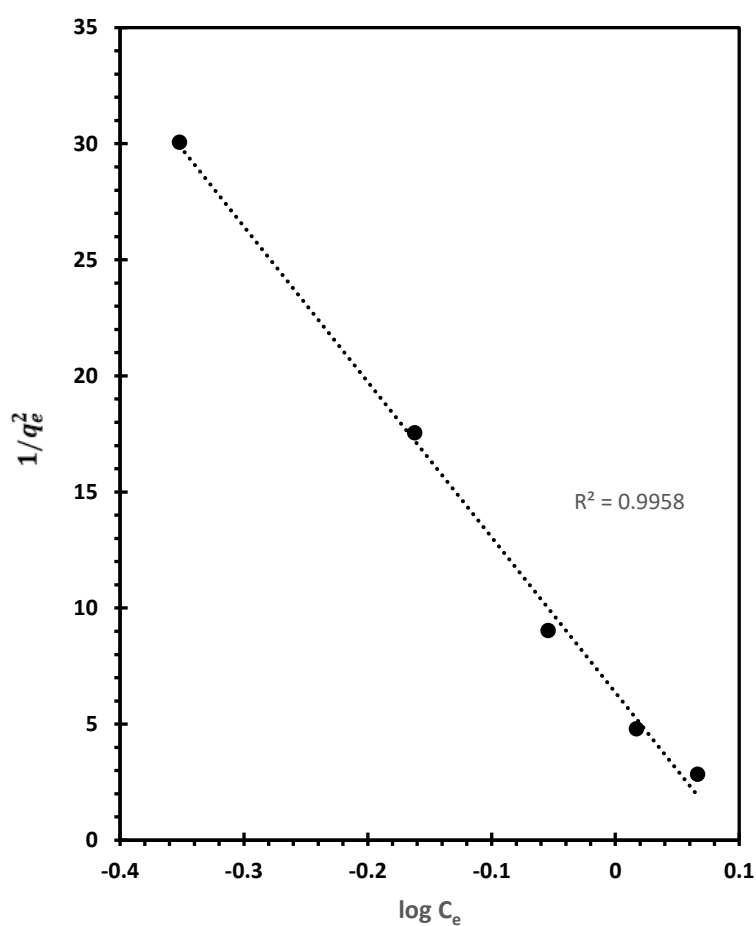


Figura 3.15 Isotherma de Harkin – Jura obtenido mediante el estudio cinético de adsorción mediante espectrofotometría.

Al tener un coeficiente de correlación aceptable ($R^2 = 0.9958$) en comparación de los otros isothermas estudiados durante el análisis, podemos inferir que el proceso de adsorción corresponde a un mecanismo de múltiples capas dentro de los poros como lo describe el isoterma de Harkin – Jura.

3.3.2 Caracterización electroquímica del electrodo

Para determinar si el agregar laponita mejora la variable de respuesta, esto es, la corriente de oxidación del analito; mediante sus propiedades electrocatalíticas, se planteó la utilización de una celda con el estándar electroquímico $K_3Fe(CN)_6$, que a su vez funciona para determinar mediante ensayos difusivos cómo afecta el cambio de las concentraciones de parafina y de carbono. Aplicando voltametría cíclica y variando la velocidad de barrido, se puede obtener suficiente información para caracterizar el electrodo aplicando las ecuaciones de Randles – Sevcik (1), calculando el área efectiva y la constante heterogénea de transferencia de electrones (8,9).

En la celda se añaden 5 mL de KCl 0.1 M como electrolito soporte y 20 μL de alícuota de $K_3Fe(CN)_6$ 2 mM. Como electrodo de trabajo se utiliza el electrodo de pasta de grafito variando su formulación, una con 70% w/w de grafito, 30% w/w de parafina; mientras que la segunda tendrá una formulación de 55% w/w de grafito, 15% de w/w laponita y 30% w/w de parafina; cada una se llamará E70% y E55%, respectivamente, para indicar la concentración del electrodo en relación con la cantidad de grafito. Como electrodo de referencia se utiliza un electrodo de $Ag|AgCl_3$ y un electrodo de platino como contraelectrodo.

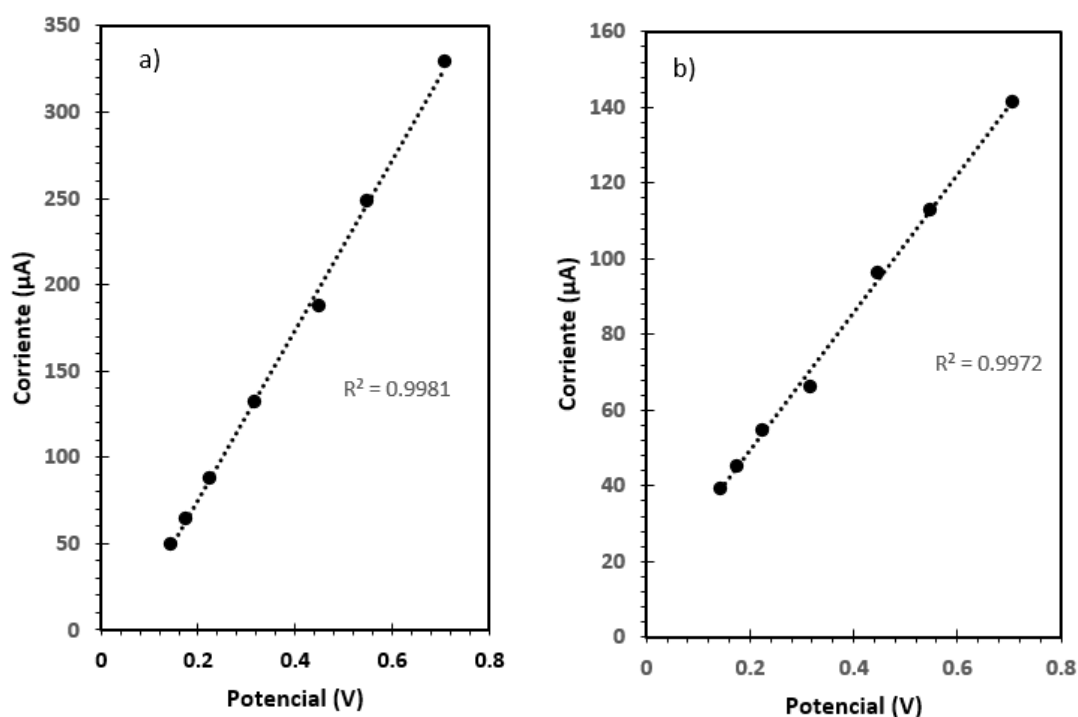


Figura 3.16 Resultados de la aplicación de la ecuación de Randles – Sevcik, en la gráfica a) (15% L) se aprecia que, al electrodo contener una cantidad de laponita, la magnitud de la corriente de oxidación es mayor a la de no contener laponita que corresponde a la gráfica b) (0%).

Como se puede apreciar en la figura 3.16, el agregar una cantidad fija de laponita en la formulación del electrodo de pasta de grafito provoca una mejora en la sensibilidad de la variable de respuesta. Se debe optimizar la cantidad de laponita óptima para desarrollar la formulación adecuada del electrodo, de modo que sea máxima la sensibilidad y no se saturen los poros que se forman dentro de la estructura sólida del electrodo de pasta de carbono. Al diseñar el experimento se plantea el diseño de una celda con 5 mL de KCl 0.1 M como electrolito soporte y 40 μL de alícuota de 2,4 – DCP para tener una celda de concentración 5 mM. Como electrodo de trabajo se utiliza el electrodo de pasta de grafito variando su formulación desde 0 a 20% en

incrementos de 5%, como electrodo de referencia se utiliza un electrodo de $\text{Ag}|\text{AgCl}_3$ y un electrodo de platino como contraelectrodo.

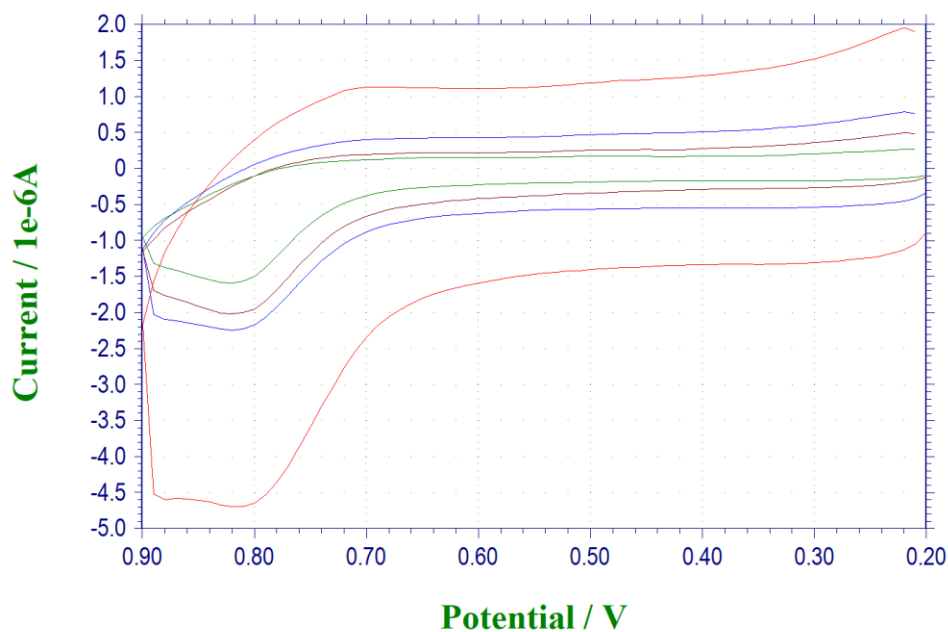


Figura 3.17. Voltamogramas cíclicos de las diferentes formulaciones (0 al 15% de laponita) mostrado por el software CHI440A

Tratando la información obtenida, podemos obtener las diferentes graficas con sus respectivos picos anódicos.

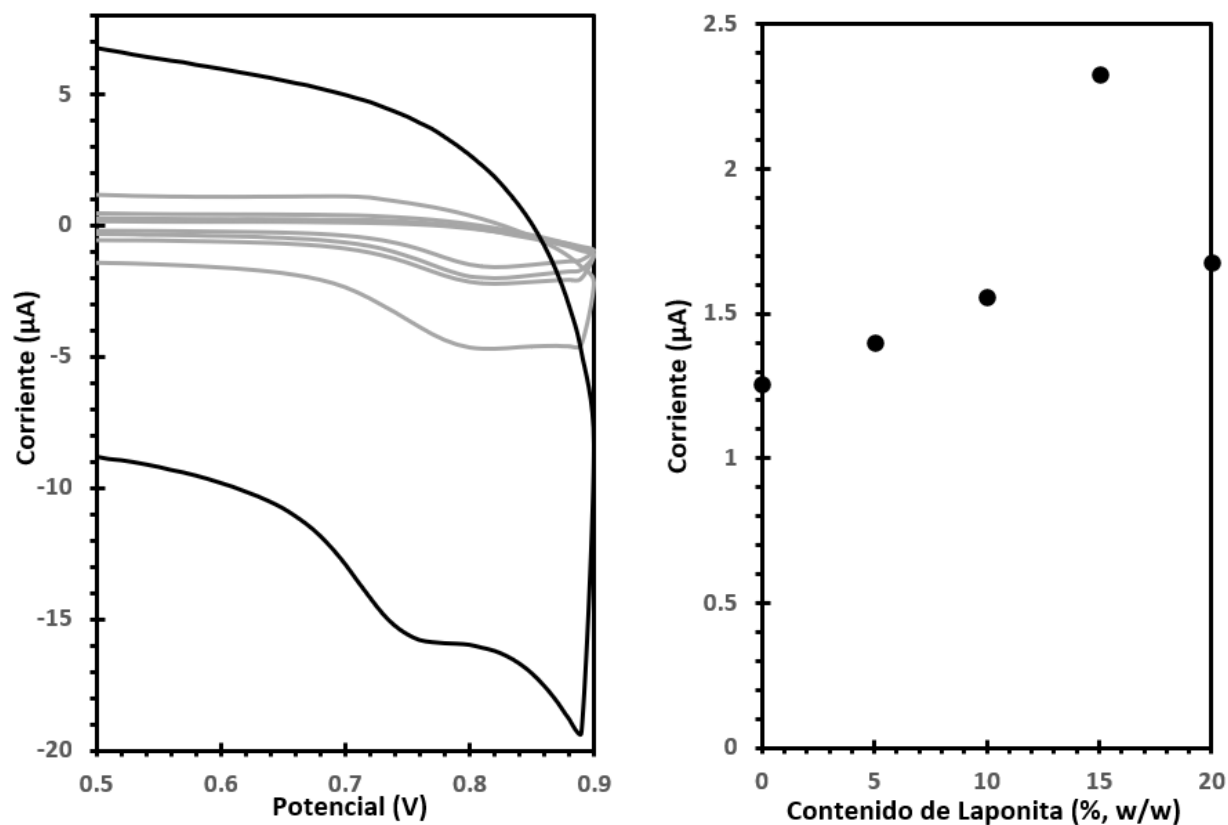


Figura 3.18 Gráficas para la optimización del contenido de laponita en donde se obtiene el valor óptimo de la composición.

En la figura 3.18 quien tiene una mayor sensibilidad en la determinación es la formulación con 15% w/w de laponita; se tomará entonces esa composición de electrodo para realizar los estudios de caracterización.

Al aplicar la ecuación de Nicholson para la determinación de la constante heterogénea de transferencia de electrones, se puede visualizar si existe un aumento significativo en el área efectiva del electrodo de pasta de grafito al agregar laponita.

Tabla 3.3.1. Comparación de las formulaciones de los electrodos con sus propiedades electrocatalíticas.

Formulación del electrodo de pasta de grafito	Área efectiva (mm ²)	R ²	Constante heterogénea de intercambio de electrones k° (cm s ⁻¹)	R ²
E (70%G,0%L,30%P)	1.5	0.986	0.0134	0.998
E (55%G,15%L,30%P)	3.73	0.988	0.1125	0.983

Con los resultados de la tabla 3.3.1 se aprecia que hay un cambio significativo en la constante heterogénea de transferencia de electrones, así como en el área efectiva del electrodo, lo que lleva a concluir que la aplicación de laponita en el electrodo de pasta de grafito aumenta significativamente la variable de respuesta al estudiar un proceso electroquímico de oxidación.

El estudio de los efectos del pH en la respuesta electroquímica nos lleva a diseñar los ensayos modificando el pH y utilizando el electrodo de pasta de grafito con laponita al 15% como electrodo de trabajo. Estos experimentos consistieron en variar el pH con soluciones de PBS 0.1 M para la determinación de 2,4 – Diclorofenol (2,4-DCP) preparando una solución de 20 μ M de 2,4 – DCP en 5 mL. Como electrodo de referencia se utiliza un electrodo de Ag|AgCl₃ y un electrodo de platino como contraelectrodo.

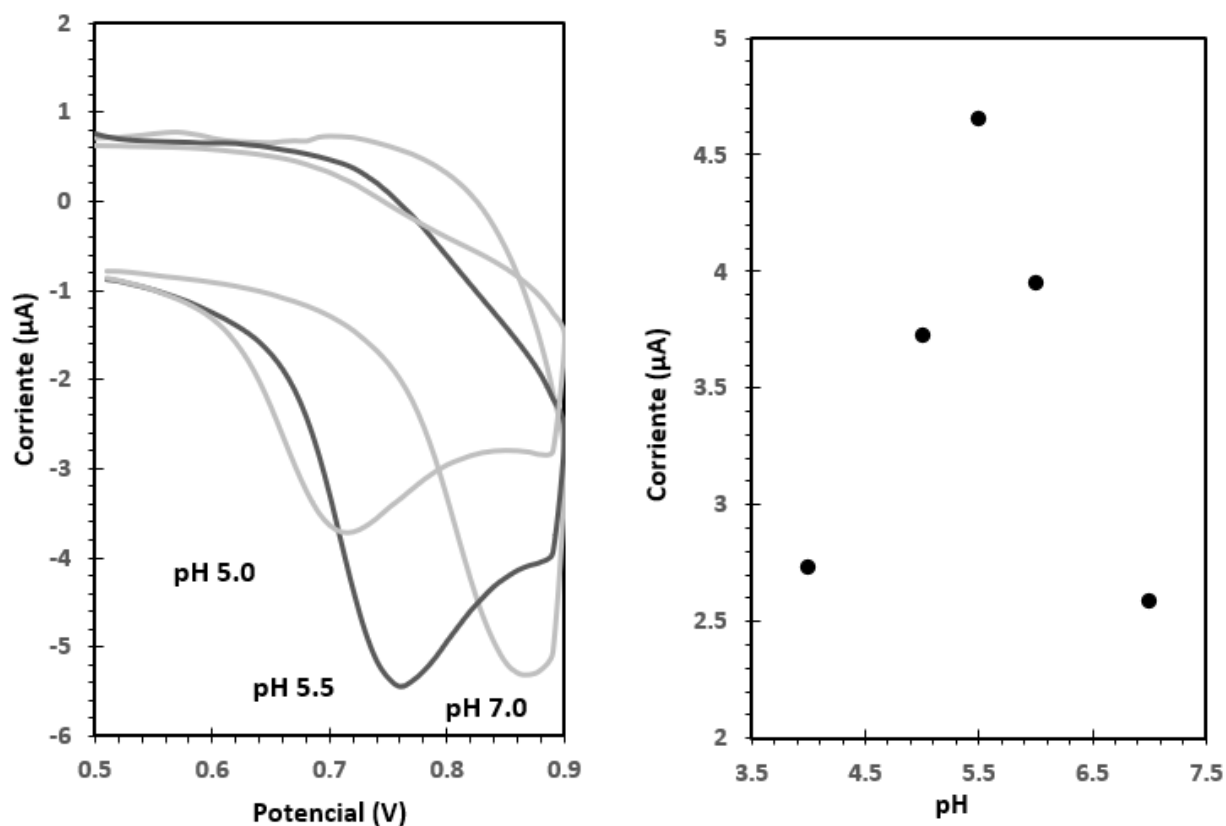


Figura 3.19 Voltamogramas cíclicos que muestran el comportamiento de la corriente de oxidación variando el pH de la solución en los ensayos con una concentración de 20 μM de 2,4 – DCP dentro de la celda y Gráfica de optimización para encontrar el pH que optimiza la variable de respuesta, la corriente del pico anódico.

Se trabajaron diferentes pH, desde 4 hasta el 7 para obtener la corriente del pico anódico y así determinar si el cambio del pH es significativo con respecto a la variable de respuesta. La optimización arroja el valor óptimo de 5.5 de pH para la medición de 2,4 – DCP mediante el electrodo de pasta de grafito modificado con laponita.

3.3.3 Rendimiento teórico del electrodo

Utilizando las condiciones óptimas de pH se buscó optimizar el tiempo de adsorción del 2-DCP sobre la superficie del electrodo de pasta de grafito. Siendo este un proceso de transferencia de masa es importante tener la celda electroquímica acondicionada y una rotación del electrodo estable para fomentar la difusión por convección. Se acondiciona agitando por 400 segundos a 700 rpm, después se agrega el analito y se deja el tiempo en el cual se adsorberá el DCP. La corriente del pico anódico debe aumentar proporcionalmente a la concentración del analito; sin embargo, también debe existir un límite de tiempo en donde se llegue a un equilibrio en la concentración sobre la superficie del electrodo y la solución, por lo que comenzará el proceso de desorción. Es importante buscar el valor máximo de tiempo en donde la concentración de DCP sea mayor y también sea conveniente aplicar para los diversos experimentos. Se utilizará Voltametría diferencial de Pulsos (DPV) para la optimización; siendo primero el acondicionamiento del electrodo en una solución buffer PBS 0.1 M de pH óptimo (5.5) y una concentración de 2- DCP en la celda de 20 μ M.

El experimento debe renovar su superficie cada medición, de modo que se listarán los pasos a seguir para cada prueba de tiempo.

1. Se prepara el electrodo y se acondiciona por 400 segundos.
2. Se introduce el analito por x tiempo de adsorción.
3. Se corre la prueba de DPV 5 veces para estabilizar las moléculas del analito dentro de la estructura porosa del electrodo, tomando el quinto valor en todas las pruebas.
4. Se renueva la superficie pasando ligeramente el electrodo sobre un papel.
5. Se repite el experimento con otro valor de tiempo.

Para cada caso del experimento, se debe tomar importancia en que sea preciso el tiempo de adsorción, de lo contrario la prueba mentiría. Se utilizó un temporizador digital para contar el tiempo exacto de adsorción.

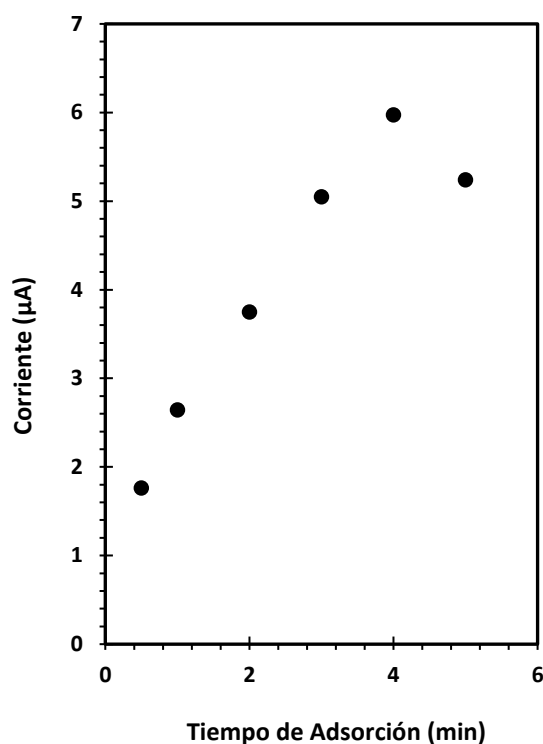


Figura 3.20 Gráfica de optimización para encontrar el tiempo de adsorción que maximiza la cantidad de analito que pudo adsorberse a la superficie del electrodo de pasta de grafito. La corriente del pico anódico es una manera indirecta para cuantificar el incremento proporcional de la cantidad de analito difundido por cada minuto.

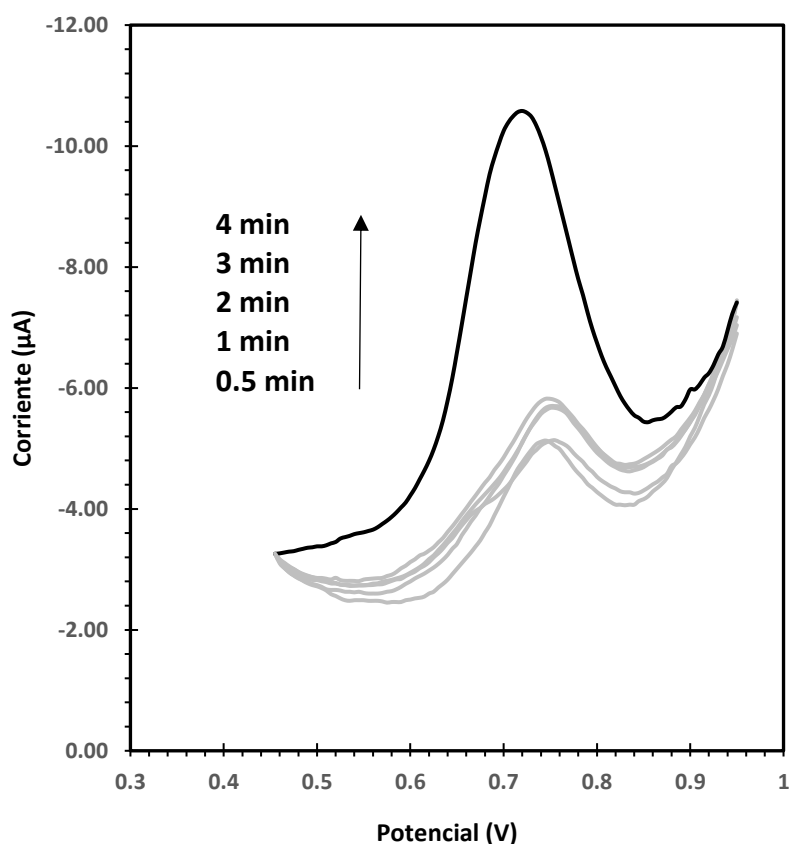


Figura 3.21 Voltamograma de la voltametría diferencial de pulsos con el electrodo de pasta de grafito, con condiciones de la celda de pH 5.5 y concentración 20 μM en la celda. En este voltamograma, se aprecia como hay una respuesta en el valor de voltaje donde el 2,4 – DCP se oxida al tener 4 minutos de tiempo de adsorción en la superficie del electrodo.

Al encontrar el tiempo de adsorción donde la cantidad de analito adherida a la superficie del electrodo es máxima, se puede ahora hacer pruebas para probar el rendimiento analítico del electrodo y realizar una comparación en la literatura de la viabilidad en sus respectivos parámetros como en el límite de detección, sensibilidad y rango lineal, así como una comparativa de las curvas de calibración.

Para la curva de calibración del electrodo de pasta de grafito que se utilizará para la determinación de 2,4 – DCP se emplea el mismo experimento para obtener el tiempo de adsorción, únicamente que ahora se conoce el tiempo donde la adsorción es máxima.

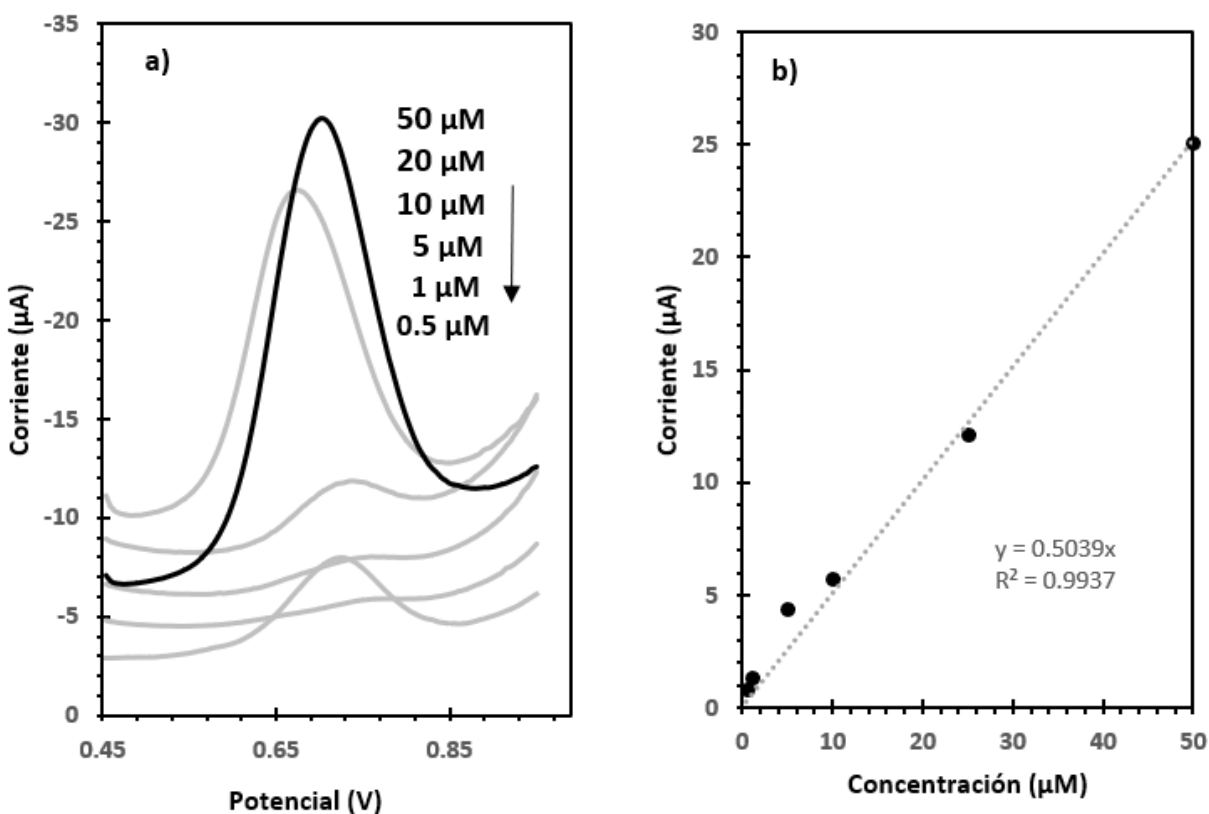


Figura 3.22 Determinación por Voltametría Diferencial de Pulsos (DPV) para la curva de calibración de 2,4 – DCP utilizando un electrodo de pasta de grafito modificado con laponita ($R^2=0.9915$).

De este modo, podemos obtener los parámetros analíticos respectivos a la caracterización del electrodo referente a la determinación de 2,4 – DCP siendo el límite de detección (LOD) de 1.75 µA, la reproducibilidad de 4.20% ($R^2=0.992$) y una sensibilidad de $0.401 \mu A \mu M^{-1}$.

3.3.4 Estudios de interferentes fenólicos.

El estudio de interferentes en los análisis electroquímicos requiere el tratamiento de distintas muestras con o sin preparación para la caracterización de las condiciones fisicoquímicas; al tener ensayos con un solo analito se asegura que la muestra tenga un nivel de pureza necesario para la determinación cuantitativa, sin embargo, al realizar un ensayo donde la solución que contenga el analito tenga otras especies químicas suele provocar interacciones no deseadas, o interferencias, en la respuesta analítica. En el caso del electrodo de pasta de grafito modificado con laponita se preparó un sistema donde se involucraban compuestos orgánicos fenólicos con potenciales de oxidación similares, siendo ellos: 4 – nitrofenol, catecol, 4 – clorofenol, 2 – clorofenol y resorcinol.

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las realizadas para la curva de calibración, únicamente se cambia la solución para adecuar ahora los diversos analitos:

1. Se prepara el electrodo (E55) y se acondiciona en la celda por 400 segundos.
2. Se introduce el analito por 4 minutos de adsorción.
3. Se introducen los interferentes a la celda.
4. Se corre la prueba de DPV 5 veces para estabilizar las moléculas del analito dentro de la estructura porosa del electrodo.
5. Se renueva la superficie pasando ligeramente el electrodo sobre un papel.

Las siguientes figuras muestran un sistema con catecol, para – nitrofenol y 2,4 – DCP donde se pueden apreciar las interacciones en la corriente de los picos para los diferentes compuestos.

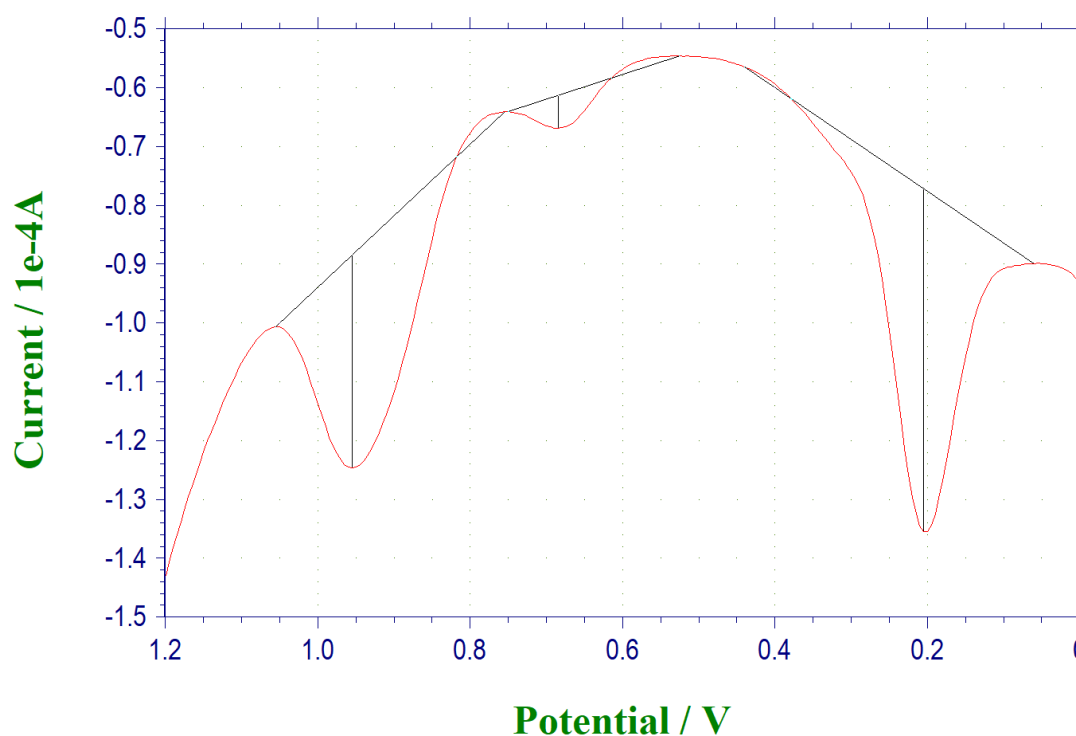


Figura 3.23 Voltametría diferencial de pulsos (DPV) mostrada en el software CHI440A de una solución con el analito en conjunto con algunos interferentes coexistentes; las especies químicas orgánicas son: Catecol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), para - nitrofenol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) y 2,4 - Diclorofenol ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$).

En la figura 3.23 se puede apreciar que no existe un traslape entre los compuestos de los picos, por lo que la determinación de 2,4 - DCP es viable mientras se presente un sistema con estos interferentes.

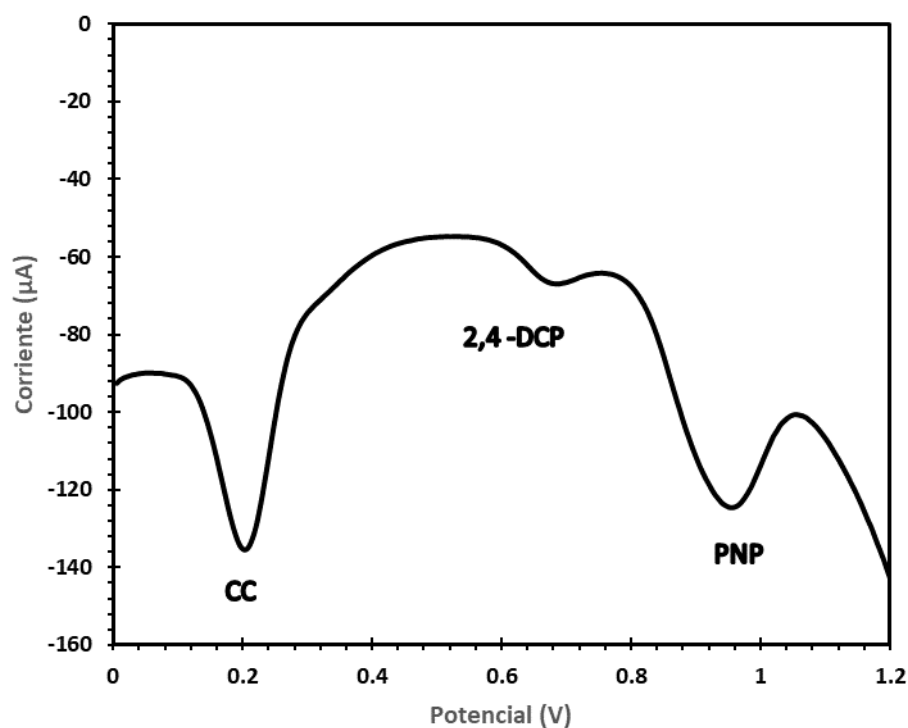


Figura 3.24 Voltametría diferencial de pulsos (DPV) con los datos tratados de una solución con el analito en conjunto con algunos interferentes coexistentes; las especies químicas orgánicas son: Catecol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), para – nitrofenol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) y 2,4 – Diclorofenol ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), aquí se indica a quien corresponde cada pico anódico.

En la figura 3.24 al tratar los datos podemos apreciar a quién corresponde cada pico, siendo el de menor valor el 2,4 – DCP por tener menos concentración dentro de la celda. Nuevamente, se aprecia la separación de los picos lo que permite la determinación en presencia de estos interferentes.

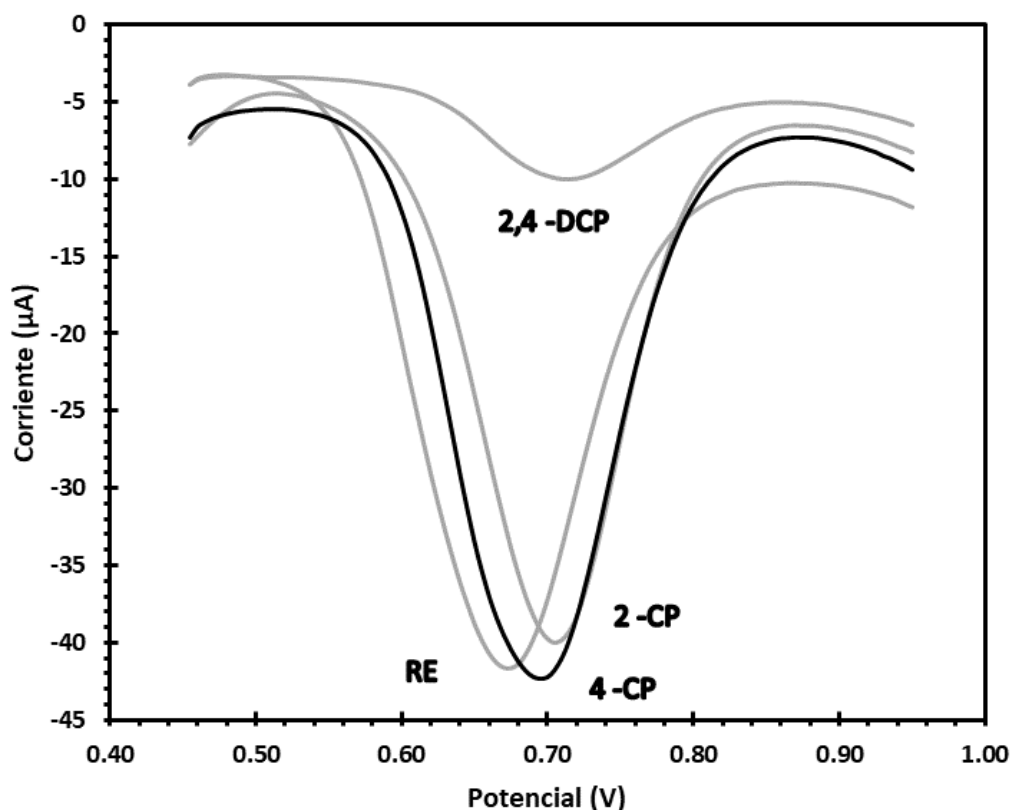


Figura 3.25 Voltametría diferencial de pulsos (DPV) con los datos tratados de una solución con el analito en conjunto con algunos interferentes coexistentes; las especies químicas dentro de la solución son: Resorcinol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), 2 – Clorofenol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), 4 – Clorofenol ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) y 2,4 – Diclorofenol ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$).

La figura 3.25 nos muestra que no es posible cuantificar una muestra de 2,4 – DCP en presencia de algunos de estos interferentes (RE, 2CP y 4CP); de modo que si se obtiene una muestra con presencia de estos interferentes debe ser necesario un pretratamiento antes de cuantificar DCP. Al modificar el electrodo de GCE y utilizarlo para voltametría de adsorción se puede apreciar que la determinación para 2,4 – DCP mejora significativamente al exhibir una mejor sensibilidad y estabilidad, en conjunto con las ventajas de la utilización de un electrodo modificado con procedimientos sencillos y fácil limpiamiento de la superficie.

3.4 Aplicación de un biosensor para determinación de contaminantes orgánicos por DAPV

Los tres sistemas anteriores descritos en este trabajo doctoral proponen la determinación de un conjunto de contaminantes orgánicos mediante la técnica voltamétrica DAPV, en este apartado se investigó una aplicación del mismo método electroanalítico para una aplicación en biosensores con objetivo similar.

Los sensores enzimáticos electroquímicos tienen ventajas considerables a la hora de realizar determinaciones electroquímicas como su gran sensibilidad y especificidad a un sustrato específico. Estas características van de la mano con el método de inmovilización enzimática para tener una respuesta analítica favorable, así como la modificación de la superficie con nanopartículas.

Se diseñó un biosensor cuya plataforma de interacción electrocatalítica es a partir de diazirina, la cual combina propiedades fotoquímicas y electroquímicas para promover los enlaces covalentes entre la película del polímero y la enzima. Esto a su vez con un depositado de una capa de nanotubos de carbono para aumentar el área efectiva del electrodo y su porosidad. Esta técnica presenta numerosas ventajas comparada a la simple adhesión en la superficie del electrodo del agente de biorreconocimiento, promoviendo mayor superficie activa del electrodo, sensibilidad y especificidad, incluyendo las diferentes interacciones que existen al reacomodo espacial de la proteína por la irradiación de UV [143].

Para este biosensor se modificó un electrodo de carbón vítreo (GCE) que puede ser adherido a un sistema de electrodo rotatorio; a continuación, se describirá el proceso de modificación para cada tipo de electrodo, así como el biosensor sin modificación:

1. GCE. Este electrodo únicamente incluye enzima adherida a la superficie al dejar evaporar el agua por 30 minutos después de depositar 3 μL de tirosinasa.
2. GCE/MWCNT. Esta modificación involucra adherir una dispersión de nanotubos de carbono de múltiples paredes (MWCNT por sus siglas en inglés). Esta suspensión fue preparada al dispersar 1 mg de los nanotubos en 1 mL de N, N – dimetilformamida (DMF) que contenga 0.1% (w/w) de nafión y llevar a dispersión ultrasónica por 30 minutos. Se agregan 3 μL de la dispersión en la superficie del electrodo y se deja evaporar por 10 minutos para después agregar la enzima y secar por 30 minutos.
3. GCE/MWCNT-DiaVis. En esta modificación primeramente se debe tener adherida una capa de MWCNT y dejar secar por 30 minutos; después se agregan 3 μL de diazirina 10 mmol L^{-1} , es importante homogenizar el goteo en la superficie del electrodo, nuevamente se deja secar por 30 minutos en la oscuridad para permitir la fotopolimerización y al final se agregan 3 μL de tirosinasa secándose otros 30 minutos.
4. GCE/MWCNT-DiaUV. La preparación de este electrodo es similar a la anterior, la única diferencia es que la fotopolimerización se hace por irradiación con una lámpara UV (36 W, 365 nm de longitud de onda a 5 cm de distancia del electrodo).

Todos los electrodos modificados fueron limpiados con buffer PBS 0.1 mol L^{-1} de pH 6.5 en agitación constante por 5 minutos para eliminar las moléculas que presentaban enlaces débiles.

Los ensayos involucraron la utilización de una celda electroquímica con solución buffer PBS 0.1 mol L^{-1} pH 7.0. Los electrodos utilizados en los análisis voltamétricos son: el electrodo de trabajo se pretende optimizar en la sección 3.4.1, el electrodo de referencia es un electrodo de Ag, $\text{AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ mientras que el contraelectrodo es un alambre de platino, el potenciostato utilizado es un 440 A Electrochemical Analyzer (CH Instruments Inc., USA) modelo CompactStat.h 20250 mientras que para la técnica DAPV se utilizó un potenciostato de Ivium Technologies, Netherlands; controlado por el software IviumPulse.

Primeramente, se estudió el efecto de la capa de MWCNT para conocer si existía un cambio de la superficie activa del electrodo por la modificación de este.

3.4.1 Caracterización morfológica del electrodo

Primeramente, se estudió el efecto de la capa de MWCNT para conocer si existía un cambio de la superficie activa del electrodo por la modificación de este en comparación de tener el electrodo sin modificación. Los ensayos fueron elaborados con voltametría cíclica en donde el estándar electroquímico $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2 mmol L^{-1} en la celda que contenía 10 mL de KNO_3 1 mol L^{-1} como electrolito soporte son analizados con cada electrodo. La ecuación (1) fue utilizada para determinar el área efectiva en la determinación donde en este caso el coeficiente de difusión es de $7.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$

Se encontró que las áreas activas para los electrodos GCE y GCE/MWCNT son de 2.27 mm^2 y 3.03 mm^2 respectivamente; probando entonces que la modificación con nanotubos de carbono favorece el incremento de la superficie electroactiva del electrodo.

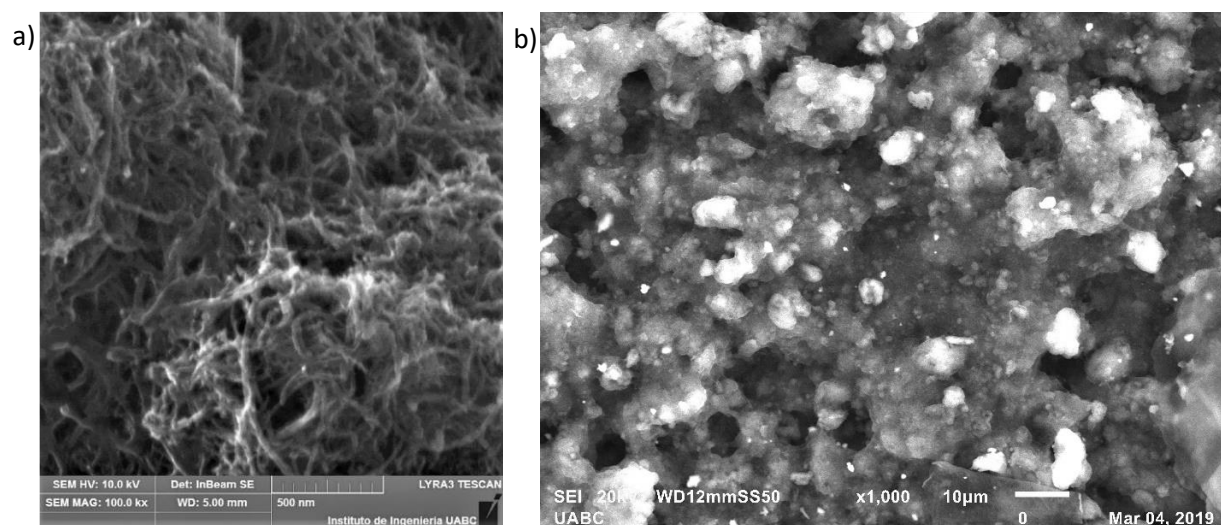


Figura 3.26 Imágenes SEM mostrando la morfología del electrodo GCE modificado con MWCNT, a) resolución de 500 nm; b) resolución de 10 μ m

En la figura 3.26 se muestra que los nanotubos de carbono están dispersos en la superficie de forma homogénea y distribuidos en toda la superficie del electrodo, así como se logra apreciar mayor porosidad por causa de esto. Las imágenes demuestran como la modificación MWCNT promueve el incremento de la superficie del electrodo debido a la formación de una película uniforme.

3.4.2 Evaluación de la actividad enzimática

El estudio de la actividad de tirosinasa es de relevancia para evaluar la matriz de inmovilización enzimática; el incremento de la superficie del electrodo mediante la modificación de nanomateriales y los enlaces covalentes provocados por la reticulación de la enzima con el grupo de NH_2 de la diazirina debe provocar mayor actividad enzimática. Esto se propone estudiar con estudios cinéticos mediante espectrofotometría de absorción.

El estudio de la actividad de tirosinasa es de relevancia para evaluar la matriz de inmovilización enzimática; el incremento de la superficie del electrodo mediante la modificación de nanomateriales y los enlaces covalentes provocados por la reticulación de la enzima con el grupo de NH_2 de la diazirina debe provocar mayor actividad enzimática. Esto se propone estudiar con estudios cinéticos mediante espectrofotometría de absorción.

Los ensayos se realizaron en una cubeta de cuarzo para el espectrofotómetro *Evolution 60S UV-Vis* que contengan 950 μL de solución buffer PBS 0.1 mol L^{-1} de pH 6.5 y 50 μL de sustrato; para estas pruebas se utilizó catecol. La preparación del electrodo se realizó de igual forma como está descrito en el apartado 3.4.1. Al introducir el electrodo dentro del espectrofotómetro debe estar dentro de la celda, pero sin obstruir el paso del haz de luz, el electrodo debe previamente haber llevado las modificaciones antes de introducirse. Los parámetros de absorción configurados en el software Vision Lite fueron de 400 nm para la longitud de onda y una prueba cinética de 15 minutos; primeramente, se dejó una línea de base de absorbancia para mostrar el valor sin sustrato y después de un minuto se introduce el volumen de catecol para ver el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo.

Definiremos la actividad enzimática como

$$U = \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (11)$$

Donde U es la actividad enzimática, $\Delta A / \Delta t$ es el cambio de la absorbancia con respecto al tiempo; en valores equivaldría a 0.001 unidades de actividad enzimática por cada minuto

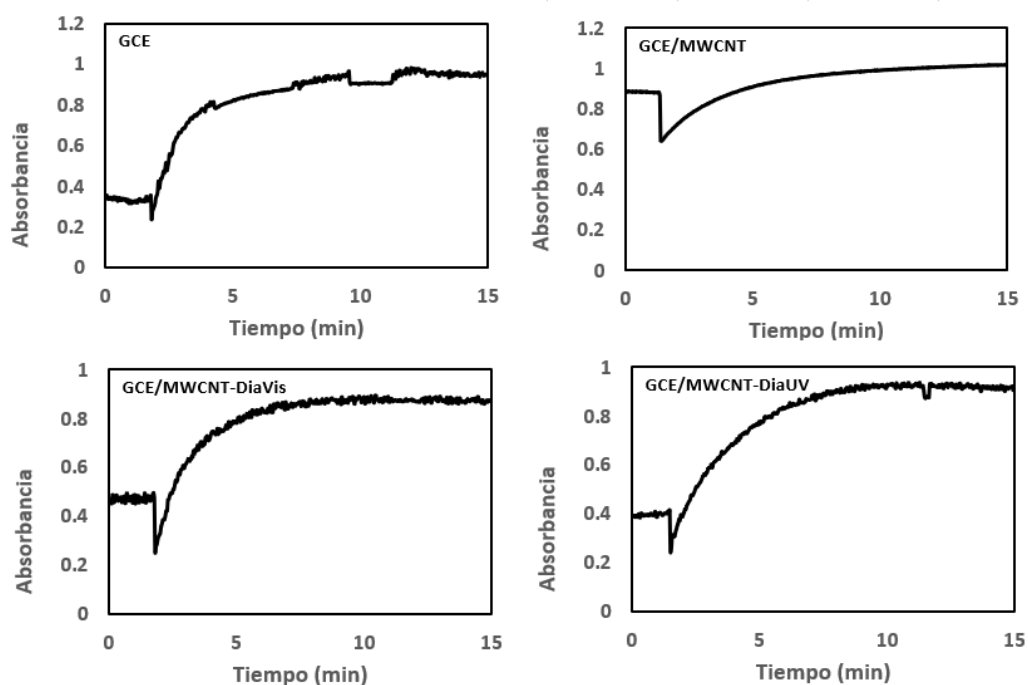


Figura 3.27 Gráficas de Absorbancia vs Tiempo para cada uno de los electrodos modificados y sin modificación. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por 15 minutos, con 50 μL de CC 0.1 mmol L^{-1} y 950 μL de buffer PBS 0.1 mol L^{-1} pH 6.5.

La absorbancia se calcula tomando en cuenta el periodo de tiempo donde la actividad es máxima el cual varía dependiendo del tipo de electrodo y su modificación. En la tabla 3.4.1 se muestra el concentrado de resultados que corresponde al tratamiento de los datos cinéticos, sugiriendo que las modificaciones del electrodo tienen un efecto en la actividad de la enzima.

Tabla 3.4.1. Actividad enzimática de tirosinasa según el tipo de modificación del electrodo.

Electrodo	Actividad (U)
GCE	179
GCE/MWCNT	197
GCE/MWCNT-DiaVis	212
GCE/MWCNT-DiaUV	260

Los resultados muestran que el electrodo que presentó mayor actividad enzimática fue el GCE/MWCNT-DiaUV, El incremento de la superficie activa del electrodo en conjunto con las modificaciones otorgadas por los nanomateriales y la reticulación de la enzima mediante los enlaces covalentes con diazirina en presencia de UV resultaron en el incremento de enzima inmovilizada sobre la superficie del electrodo. De este modo, el electrodo que se utilizará para la determinación de contaminantes y aplicación del biosensor será este.

3.4.3 Comportamiento electroquímico del catecol utilizando GCE/MWCNT-DiaUV

La utilización del biosensor a base de tirosinasa inmovilizada como agente de reconocimiento requiere un sustrato efectivo que también se incluya en la lista de contaminantes orgánicos estudiados. La enzima cataliza la oxidación de catecol a orto – quinona, la cual puede ser reducida por métodos electroquímicos. En esta sección se estudió el comportamiento de catecol utilizando el electrodo con la modificación que maximiza la actividad enzimática mediante voltametría cíclica y se comparó con los demás electrodos las curvas de CV para estudiar si la corriente de los picos se mira afectada por las modificaciones hechas en los electrodos.

En estos ensayos se utilizó catecol 0.4 mol L^{-1} para ser el sustrato de la enzima y se añadirá a una celda electroquímica con 10 mL de solución buffer PBS 0.1 mol L^{-1} pH 6.5 para tener una concentración de 1 mmol L^{-1} dentro de la celda.

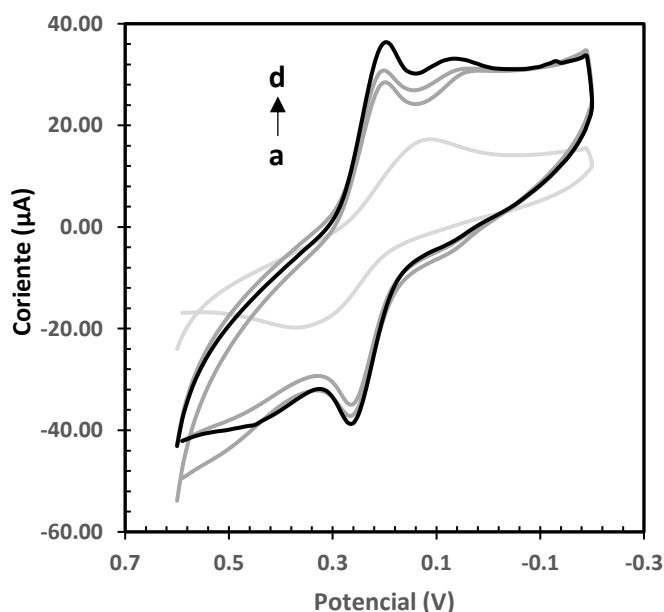


Figura 3.28 Curvas de voltametría cíclica de Catecol 1 mmol L^{-1} donde se presentan los electrodos con diferentes modificaciones y método de inmovilización, siguiendo el orden: a) GCE; b) GCE/MWCNT; c) GCE/MWCNT-DiaVis; GCE/MWCNT-DiaUV

El pico mejorado que se observa dependiendo de la modificación en el electrodo se puede atribuir al incremento de la superficie activa del electrodo resultado de la modificación con nanomateriales, así como al aumento de la capacidad de adsorber enzima por la reticulación de la inmovilización. El electrodo GCE/MWCNT-DiaUV provocó un aumento de la corriente de los picos de cerca de 3 veces (I_{pc} de los electrodos: $9.59 \mu\text{A}$ de GCE contra $26.59 \mu\text{A}$ de GCE/MWCNT-DiaUV), haciendo más sensible la determinación de catecol.

3.4.4 Rendimiento analítico del electrodo con tirosinasa inmovilizada por métodos fotopoliméricos mediante amperometría

El electrodo que presentó mayor respuesta fue el que contenía tirosinasa inmovilizada por métodos fotográficos, en especial con luz ultravioleta; el rendimiento analítico de este tipo de modificación será analizado mediante amperometría. En estos ensayos se evalúa la respuesta amperométrica del biosensor correspondiente al incremento de la concentración de catecol dentro de la solución en la celda; esta relación entre el incremento de la corriente en función de la concentración debe respetar una tendencia lineal. Los experimentos fueron llevados a cabo en un equipo para montar el electrodo rotatorio debido a que la amperometría necesita tener mezcla perfecta constante durante los experimentos y al estar constantemente agregando catecol como sustrato se debe asegurar que la distribución del analito sea homogénea por toda la celda, en especial cerca del electrodo. Este efecto es contrario a una agitación de la celda donde ocurren fenómenos reológicos que no permiten una buena interacción en la interfase solución – electrodo. El experimento inicialmente no contiene sustrato dentro de la celda para después de un tiempo t (un minuto aproximadamente) se agregue el sustrato para tener $5\ \mu\text{mol L}^{-1}$ dentro de la celda y observar el cambio de la corriente, nuevamente se agrega otra cantidad de volumen ($10\ \mu\text{L}$) para tener $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ en la celda, hasta llegar a $50\ \mu\text{mol L}^{-1}$.

La respuesta amperométrica del biosensor construido al incremento de la concentración de catecol, así como su curva de calibración son mostrados en la figura 3.4.4. El rango lineal de la determinación de catecol llegó hasta $25\ \mu\text{mol L}^{-1}$.

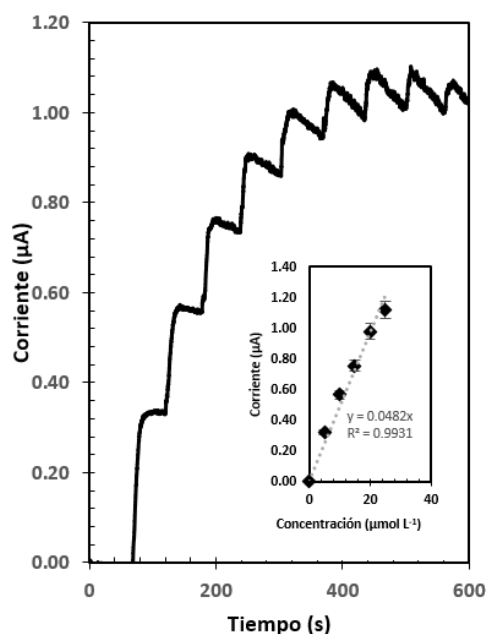


Figura 3.29 Respuesta amperométrica del biosensor GCE/MWCNT/Dia-UV al catecol y su correspondiente curva de calibración

La ecuación presentada en la curva de calibración nos representa la relación lineal entre la corriente al agregar una cantidad específica de sustrato, descrita a continuación

$$I_{cc} = 0.0482C_{cc} (R^2 = 0.9931) \quad (12)$$

Donde I_{cc} (µA) es la corriente al agregar catecol y C_{cc} (µmol L⁻¹) es la concentración de catecol en la celda. El límite de detección para esta determinación se encuentra dentro del rango aceptable siendo de 1.02 µmol L⁻¹

3.4.5 Aplicación del biosensor con la plataforma de inmovilización de Diazirina para la determinación de un neurotransmisor

La aplicación de todas las técnicas utilizadas en este proyecto de doctorado permite utilizar el método DAPV no solo para determinar contaminantes, sino también para la fabricación de un biosensor capaz de ser aplicado en la determinación de dopamina (DA). La dopamina es un neurotransmisor de catecolamina producido por las glándulas suprarrenales que es de relevancia analítica por su papel en las funciones biológicas de los organismos. Al aplicar este electrodo modificado y con enzima inmovilizada con diazirina podemos utilizar el biosensor para la determinación de diferentes catecolaminas de relevancia biológica, como la epinefrina y norepinefrina.

Se utilizó DAPV para determinar las mediciones electroquímicas en diversos ensayos debido a su sensibilidad y selectividad en el estudio del comportamiento con interferentes; se utilizará el potencióstato Ivium para la determinación con DAPV en el electrodo GCE/MWCNT-DiaUV en una celda con 10 mL de buffer PBS 0.1 mol L⁻¹ con pH 6.5 y se adicionarán 5 µL de una solución de Dopamina 10 mmol L⁻¹. Los parámetros deben mantenerse constantes durante todo el ensayo para analizar el comportamiento de DA en la fabricación de una curva de calibración. Es importante mencionar que la concentración de DA dentro de la celda se dará con un rango de 5 hasta 80 µmol L⁻¹. Durante la ejecución de los ensayos, la celda electroquímica no debe removerse para no alterar la posición del electrodo, así como no debe existir agitación en DAPV, únicamente se agita al agregar la alícuota dentro de la celda, pero durante el análisis debe estar en estado estable.

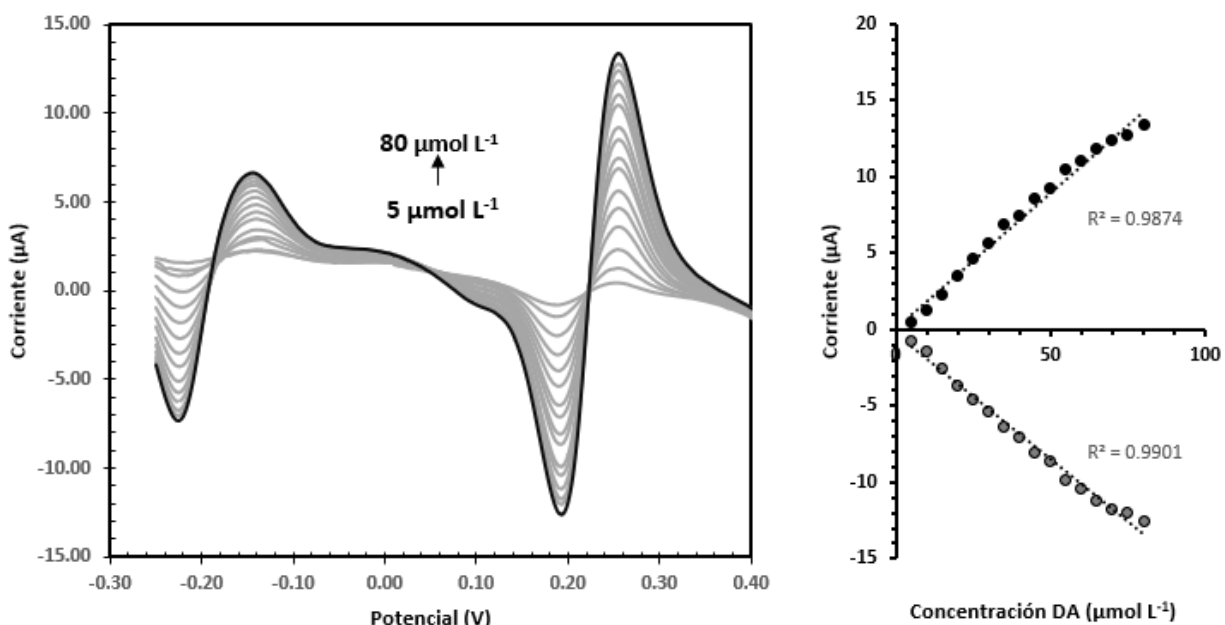


Figura 3.30 Curvas de DAPV sobre la respuesta del biosensor estructurado GCE/MWCNT-DiaUV a dopamina y a la izquierda es su respectiva curva de calibración; cada curva de DAPV tiene un incremento de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ sobre la concentración de DA.

Durante los ensayos con DAPV se logra apreciar un pico de oxidación y reducción dentro del rango de potencial -0.25 a -0.1 V y se le adjudica a un subproducto intermedio entre la oxidación de dopamina a orto quinonas. De los picos de DA podemos discutir que son bien definidos dentro del rango de $+0.15$ a $+0.35$ V así como se conserva la linealidad para cada proceso observado dentro del rango. Las ecuaciones que rigen la correspondencia entre concentración y corriente se describen a continuación:

$$I_{C_{DA}} = 0.1864C_{DA}; R^2 = 0.9969 \quad (13)$$

$$I_{A_{DA}} = -0.177C_{DA}; R^2 = 0.9991 \quad (14)$$

Como se logra apreciar en las ecuaciones anteriores, respetan un rango lineal adecuado en el trayecto de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ y cualquiera de los dos picos se puede utilizar para la determinación de dopamina. El límite de detección se encontró que fue de $0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ para este análisis el cual corresponde a los requerimientos para cuantificar dopamina en análisis farmacéuticos [111–114].

3.4.6 Estudios de interferentes para la determinación de dopamina utilizando el biosensor GCE/MWCNT-DiaUV

El análisis de dopamina por DAPV puede ser interferido por la presencia de otras catecolaminas, como lo son la epinefrina, la norepinefrina y la presencia de ácido úrico. En estos ensayos se planteó dejar fija la concentración del interferente y analizar su comportamiento con una concentración alta de dopamina. Las condiciones de los ensayos fueron idénticas a las de la curva de calibración del apartado 3.4.4 así como las concentraciones de las soluciones de epinefrina (EPN), norepinefrina (NEPN) y ácido úrico (UA) fueron 0.2 mol L^{-1} , 5.91 mmol L^{-1} y 0.1 mol L^{-1} respectivamente.

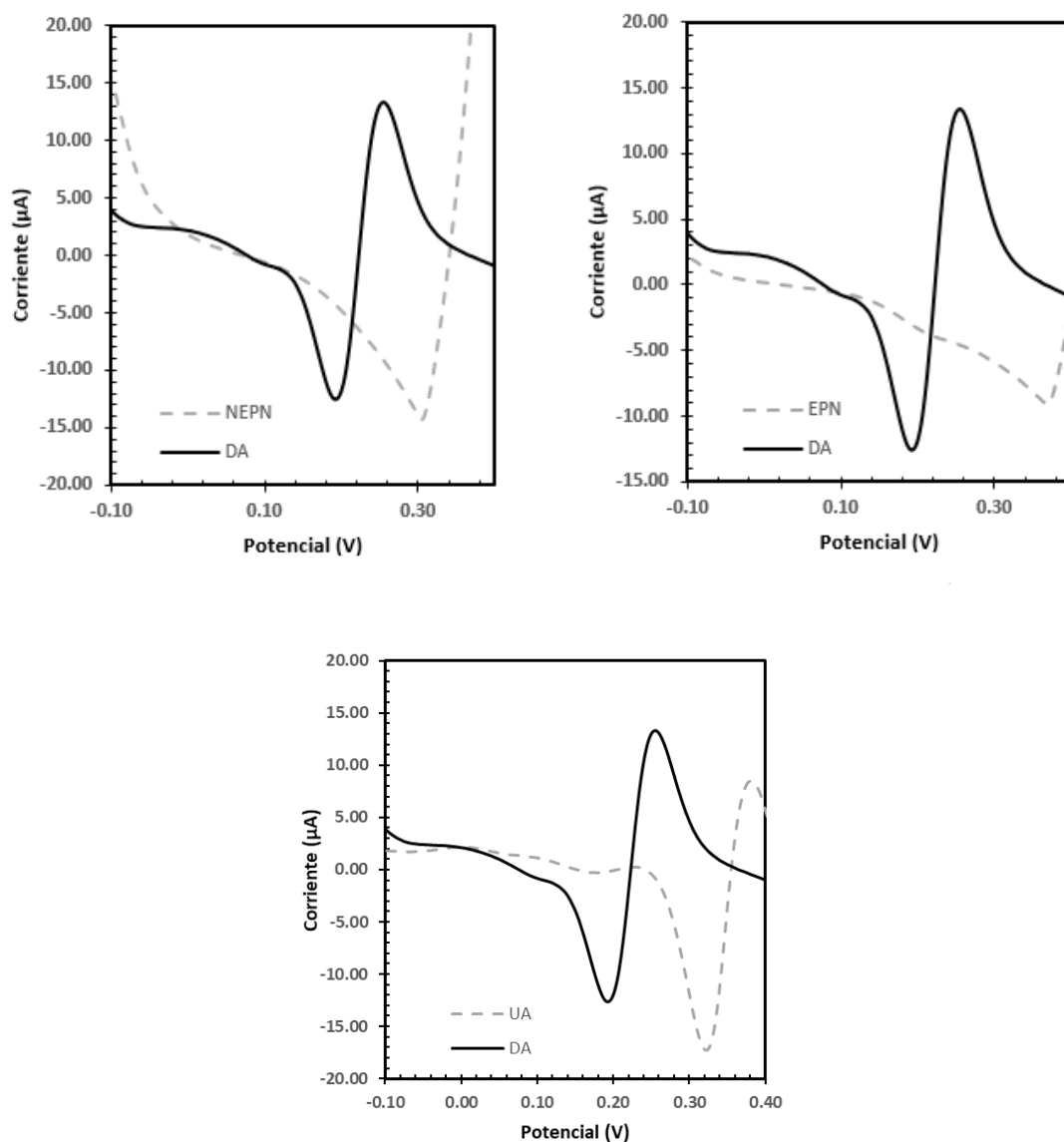


Figura 3.31 Curvas de DAPV sobre la respuesta del biosensor estructurado GCE/MWCNT-DiaUV a dopamina y con interferentes Norepinefrina (NEPN), Epinefrina (EPN) y Ácido úrico (UA).

En la figura 3.31 se puede apreciar que para epinefrina y norepinefrina existe un traslape evidente de los picos tanto anódicos como catódicos, por consecuencia, el análisis de dopamina mediante DAPV es interferido por este tipo de catecolaminas. Al observar detenidamente la curva del ácido úrico, podemos apreciar que existe un traslape del pico anódico del ácido úrico con respecto al

pico catódico de la dopamina, sin embargo, el pico anódico de dopamina donde ocurre el proceso de oxidación queda intacto y es válido para realizar una curva de calibración en presencia de ambos.

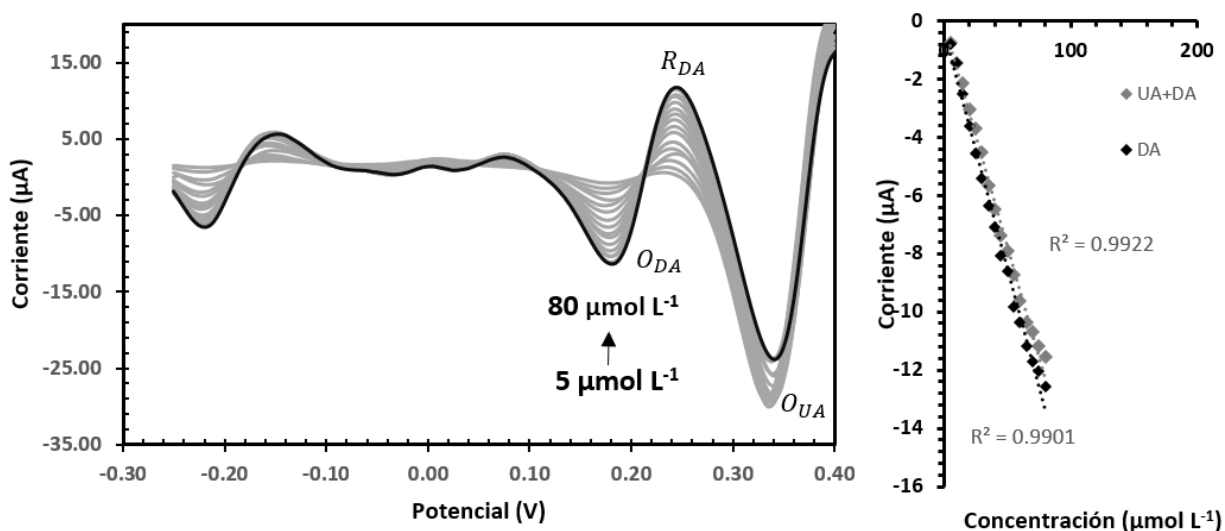


Figura 3.32 Curvas de DAPV sobre la respuesta del biosensor estructurado GCE/MWCNT-DiaUV a dopamina con el interferente ácido úrico y a la izquierda es su respectiva curva de calibración, en esta gráfica se presenta simultáneamente la correspondiente a DA y DA+UA. cada curva de DAPV tiene un incremento de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ sobre la concentración de DA y 100 mmol L^{-1} .

De esta forma, es posible utilizar el electrodo formulado por una plataforma de diazirina en presencia de interferentes como el ácido úrico utilizando la técnica DAPV. La extensión del método para la aplicación en un biosensor deja la puerta abierta para su aplicación en determinación de contaminantes orgánicos.

Capítulo 4. Resultados y Discusión

Durante la metodología se explicó detalladamente los parámetros para caracterizar cada uno de los experimentos para la determinación de los tres sistemas de contaminantes orgánicos. Aquí se discutirán los resultados obtenidos basados en el tipo de electrodo implementado, así como también el sistema isomérico estudiado. La discusión girará en torno a los valores obtenidos para la curva de calibración y su caracterización analítica.

4.1 Sistema de isómeros dihidroxibenzoicos utilizando un electrodo de grafito espectroscópico

Para el sistema de hidroquinona y catecol fue posible su determinación de manera simultánea utilizando un electrodo de grafito espectroscópico sin modificación. Tampoco presentó interferencias a la hora de agregar su tercer isómero estructural, el resorcinol, ya que en muestras contaminantes estas especies químicas frecuentemente coexisten. Entre compuestos contaminantes que presentan potenciales de oxidación/reducción similares si existe interferencia como entre el resorcinol, el fenol y el *para* – nitrofenol.

La información de la caracterización de la determinación, así como sus parámetros analíticos se resumirá en la siguiente tabla.

Tabla 4.1 Resumen de los parámetros analíticos de la determinación del grupo de contaminantes dihidroxibenzoicos utilizando un electrodo de grafito espectroscópico sin modificación

Parámetros	Sistema de contaminantes dihidroxibenzoicos	
	Catecol	Hidroquinona
Rango Lineal	5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Límite de Detección	0.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Reproducibilidad	RSD= 1.86%; n=5	
Repetibilidad	RSD= 3.64%; n=5	
Sensibilidad	$I_{CC} = 2.1279C_{CC}; R^2 = 0.9919$	$I_{HQ} = 2.0854C_{HQ}; R^2 = 0.9973$

4.2 Sistema de isómeros mononitrofenólicos utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado

La determinación simultánea de este grupo de contaminantes mononitrofenólicos fue llevada a cabo mediante DAPV como se mencionó antes, mostrando una gran sensibilidad, definición en los picos de oxidación y un amplio rango lineal. Una gran parte de los buenos resultados se le adjudica a la modificación con nanopartículas de oro y de grafito al aumentar la superficie activa del electrodo, así como la activación electrocatalítica de ella.

El isómero que mayor reto presentó a la hora de su cuantificación tanto individual como simultánea mediante DAPV fue el o-NP; mostró que tiene la tendencia de dos secciones lineales dentro de la determinación a la hora de aumentar la concentración de este, situación que logra alterar el rango lineal significativamente. En general, los tres isómeros presentaron resultados casi idénticos en sus determinaciones individuales y simultáneas, mostrando que la precisión del análisis, independientemente de los interferentes nitrofenólicos de la muestra, son aceptables.

Este trabajo experimental también demuestra que la técnica DAPV es una estrategia prometedora a la hora de tener un traslape en las señales electroquímicas de los picos catódicos y anódicos.

Los resultados de las determinaciones, así como sus parámetros analíticos se concentrarán en la tabla 4.2

Tabla 4.2.2 Resumen de los parámetros analíticos de la determinación del grupo de contaminantes mononitrofenólicos utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con nanopartículas de oro y grafito.

Parámetros	Sistema de contaminantes mononitrofenólicos		
	o-NP	m-NP	p-NP
Rango Lineal	50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - 125 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - 125 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Límite de Detección	2 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Reproducibilidad	RSD= 1.96%; n=5		
Repetibilidad	RSD= 2.45%; n=5		
Sensibilidad	$I_{C_{oNP}} = 0.1315C_{C_{oNP}};$ $R^2 = 0.9211$	$I_{C_{mNP}} = 0.1166C_{C_{mNP}};$ $R^2 = 0.9817$	$I_{C_{pNP}} = 0.0463C_{C_{pNP}};$ $R^2 = 0.9973$

4.3 Sistema de contaminantes clorofenólicos utilizando un electrodo de pasta de grafito.

Este electrodo fue fabricado mediante la utilización de grafito grado reactivo con laponita y parafina. Al optimizarse, se obtuvieron las cantidades correctas en función de la formulación del electrodo de pasta de grafito. Durante los ensayos para la determinación de 2,4 – Diclorofenol utilizando voltametría de adsorción en medio adsorbente de laponita se mostró que la señal fue mejorada significativamente mediante las modificaciones del electrodo, atribuidas al incremento de la superficie activa, la actividad electrocatalítica, así como la capacidad de adsorción del electrodo por su naturaleza de pasta.

El electrodo mostró buenos resultados, teniendo una sensibilidad alta, un límite de detección similar al de la literatura y reproducibilidad. Por todo esto, se puede recomendar la utilización de este electrodo de pasta de grafito modificado con nanopartículas de laponita para la determinación de 2,4 – Diclorofenol, así como sus derivados monoclorofenólicos; estos últimos no fueron llevados al análisis de su determinación ni valoración analítica, sin embargo, es posible determinarlos con certeza como muestra la figura 3.3.11.

Los resultados, así como los rendimientos analíticos y la caracterización del electrodo se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3 Resumen de los parámetros analíticos de la determinación de 2,4 – Diclorofenol (DCP) mediante un electrodo de pasta de grafito modificado con laponita

Sistema de contaminantes clorofenólicos	
Parámetros	2,4 – Diclorofenol
Rango Lineal	0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Límite de Detección	0.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Reproducibilidad	RSD= 3.58%; n=5
Repetibilidad	RSD= 4.22%; n=5
Sensibilidad	$I_{C_{DCP}} = 0.5039C_{DCP}; R^2 = 0.9937$

4.4 Construcción de un biosensor como aplicación para la determinación de contaminantes

El biosensor descrito durante la etapa final de este proyecto de doctorado mostró una técnica sencilla y eficiente para la determinación de especies orgánicas fenólicas. El utilizar nanotubos de carbono de paredes múltiples, así como diazirina funcionalizada y reticulada en la superficie del electrodo junto con enzima tirosinasa demuestra un aumento significativo de la señal electroquímica a determinar. La plataforma caracterizada en el biosensor también presenta ser flexible para la determinación electroquímica de diversos analitos, como se detalló en la metodología. Este biosensor de tirosinasa inmovilizada en un electrodo de carbón vítreo, en combinación con la técnica DAPV logra tener resultados satisfactorios, con parámetros analíticos similares y aceptados en la literatura.

Es importante mencionar que, aunque se utiliza en aplicación de un neurotransmisor, el mismo trabajo experimental se puede desenvolver en contaminantes dihidroxibenzoicos como en el apartado 4.1. Esta sección del proyecto doctoral propone una aplicación más allá de la determinación de contaminantes para el método DAPV, en este caso, con aplicación en muestras biológicas. El que se decidió por utilizar dopamina como analito fue por la versatilidad de la molécula a la hora de manejar biosensores electroquímicos; al ser electroactiva, tiene comportamiento similar a moléculas como el catecol o la hidroquinona.

La caracterización del biosensor, así como sus parámetros analíticos son detallados en la tabla 4.4.

Tabla 4.4 Resumen de los parámetros analíticos del biosensor con aplicación en muestras biológicas (DA) constituido por un electrodo de carbón vítreo (GCE), nanotubos de carbono de pared múltiple y diazirina fotografiada en la superficie del electrodo y reticulada con luz UV.

Parámetros	Analito
	Dopamina (DA)
Rango Lineal	0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ - 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Límite de Detección	0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Reproducibilidad	RSD= 3.57%; n=5
Repetibilidad	RSD= 3.83%; n=5
Sensibilidad	$I_{C_{DA}} = -0.169C_{DCP}; R^2 = 0.9975$

Capítulo 5. Conclusiones

1. Se implementó la técnica DAPV como alternativa a los métodos voltamétricos convencionales cuyas limitaciones son la determinación simultánea de componentes electroactivos con potenciales de oxidación o reducción similares. En función a esto, la utilización directa del método DAPV para la determinación de contaminantes orgánicos de origen industrial mostró que es un método electroanalítico sencillo, sensible, selectivo y de bajo costo aplicable para los tres grupos principales de contaminantes: los isómeros dihidroxibenzoicos, los mononitrofenoles y los clorofenoles.
2. Se logró la implementación de la técnica DAPV en un biosensor para la determinación de una muestra biológica cuya composición estructural es muy similar a los isómeros dihidroxibenzoicos.
3. Se demostró de manera experimental que la técnica voltamétrica DAPV es aplicable para la determinación simultánea de isómeros estructurales, cuyos potenciales de oxidación y reducción son muy similares.
4. Los resultados que se obtuvieron sobre el rendimiento analítico aplicando electrodos sólidos a base de carbono, como el carbón espectroscópico, el carbón vítreo y la pasta de grafito están en armonía con los que reporta la literatura.

Capítulo 6. Trabajos futuros

El utilizar DAPV como una técnica electroanalítica durante este trabajo doctoral abre un nuevo camino a estrategias diferentes a las convencionales para la cuantificación de contaminantes orgánicos industriales. La técnica voltamétrica DAPV es un método prometedor para la determinación simultánea de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos también. Existen algunos trabajos futuros que se pueden realizar en el área, como ampliar el alcance de la dicha técnica en determinación simultanea de complejos inorgánicos.

Capítulo 7. Referencias

- [1] G. Duan, Z. Zhang, J. Zhang, Y. Zhou, L. Yu, and Q. Yuan, "Evaluation of crude toxin and metabolite produced by *Helminthosporium gramineum* Rabenh for the control of rice sheath blight in paddy fields," *Crop Protection*, vol. 26, no. 7, pp. 1036–1041, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.cropro.2006.09.014.
- [2] C. Batchelor-McAuley, E. Kätelhön, E. O. Barnes, R. G. Compton, E. Laborda, and A. Molina, "Recent Advances in Voltammetry," *ChemistryOpen*, vol. 4, no. 3, pp. 224–260, Jun. 2015, doi: 10.1002/open.201500042.
- [3] R. K. Zlatev, M. S. Stoytcheva, B. V. Salas, J.-P. Magnin, and P. Ozil, "Simultaneous determination of species by Differential Alternative Pulses Voltammetry," *Electrochemistry Communications*, vol. 8, no. 11, pp. 1699–1706, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.elecom.2006.07.041.
- [4] C. M. Brett, "Electroanalytical techniques for the future: the challenges of miniaturization and of real-time measurements," *Electroanalysis*, vol. 11, no. 14, pp. 1013–1016, 1999.
- [5] X. Yang, J. Kirsch, Y. Zhang, J. W. Fergus, and A. Simonian, "Potential drop based model to analyze electrode passivation by fouling from phenolic compounds," *ECS Transactions*, vol. 53, no. 35, pp. 1–14, 2013.
- [6] X. Yang, J. Kirsch, J. Fergus, and A. Simonian, "Modeling analysis of electrode fouling during electrolysis of phenolic compounds," *Electrochimica Acta*, vol. 94, pp. 259–268, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.electacta.2013.01.019.

- [7] M. Jakubowska, "Signal Processing in Electrochemistry," *Electroanalysis*, vol. 23, no. 3, pp. 553–572, 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201000465>.
- [8] K. Cebe and L. Balas, "Monitoring and modeling land-based marine pollution," *Regional Studies in Marine Science*, vol. 24, pp. 23–39, Nov. 2018, doi: 10.1016/j.rsma.2018.06.010.
- [9] S. A. Alrumman, A. F. El-kott, and S. M. Keshk, "Water Pollution: Source & Treatment," *American Journal of Environmental Engineering*, vol. 6, no. 3, pp. 88–98, 2016.
- [10] M. Shenoy, "Industrial Ecology in Developing Countries," in *Taking Stock of Industrial Ecology*, R. Clift and A. Druckman, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 229–245. doi: 10.1007/978-3-319-20571-7_11.
- [11] J.-P. W. Desforges, C. Sonne, M. Levin, U. Siebert, S. De Guise, and R. Dietz, "Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals," *Environment International*, vol. 86, pp. 126–139, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.envint.2015.10.007.
- [12] L. K. Wang, *Handbook of industrial and hazardous wastes treatment*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2004. Accessed: Apr. 19, 2017. [Online]. Available: <http://www.crcnetbase.com/isbn/9780824741143>
- [13] S. Suresh, V. C. Srivastava, and I. M. Mishra, "Adsorption of catechol, resorcinol, hydroquinone, and their derivatives: a review," *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, vol. 3, no. 1, p. 32, 2012.
- [14] L. Alshahrani *et al.*, "The Simultaneous Electrochemical Detection of Catechol and Hydroquinone with [Cu(Sal- β -Ala)(3,5-DMPz)₂]/SWCNTs/GCE," *Sensors*, vol. 14, no. 12, pp. 22274–22284, Nov. 2014, doi: 10.3390/s141222274.
- [15] R. E. Shoup, G. C. Davis, and P. T. Kissinger, "Determination of catechol-O-methyltransferase activity in various tissues by liquid chromatography," *Analytical chemistry*, vol. 52, no. 3, pp. 483–487, 1980.

- [16] H.-F. Wang, Y.-Y. Wu, and X.-P. Yan, "Room-Temperature Phosphorescent Discrimination of Catechol from Resorcinol and Hydroquinone Based on Sodium Tripolyphosphate Capped Mn-Doped ZnS Quantum Dots," *Analytical Chemistry*, vol. 85, no. 3, pp. 1920–1925, Feb. 2013, doi: 10.1021/ac303374s.
- [17] G. P. Horsman *et al.*, "Spectroscopic Studies of the Anaerobic Enzyme–Substrate Complex of Catechol 1,2-Dioxygenase," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, no. 48, pp. 16882–16891, Dec. 2005, doi: 10.1021/ja053800o.
- [18] S. R. Wallenborg, L. Nyholm, and C. E. Lunte, "End-Column Amperometric Detection in Capillary Electrophoresis: Influence of Separation-Related Parameters on the Observed Half-Wave Potential for Dopamine and Catechol," *Analytical Chemistry*, vol. 71, no. 3, pp. 544–549, Feb. 1999, doi: 10.1021/ac980737v.
- [19] J. Widera, S. K. Lunsford, and H. Zhang, "Detection of catechol by potentiometric-flow injection analysis in the presence of interferents," *J. Chem. Educ.*, vol. 84, no. 9, p. 1471, 2007.
- [20] R. F. Lane and A. T. Hubbard, "Differential double pulse voltammetry at chemically modified platinum electrodes for in vivo determination of catechol amines," *Analytical chemistry*, vol. 48, no. 9, pp. 1287–1293, 1976.
- [21] W. Liu, L. Wu, X. Zhang, and J. Chen, "Simultaneous Electrochemical Determination of Hydroquinone, Catechol and Resorcinol at Nitrogen Doped Porous Carbon Nanopolyhedrons-multiwall Carbon Nanotubes Hybrid Materials Modified Glassy Carbon Electrode," *Bulletin of the Korean Chemical Society*, vol. 35, no. 1, pp. 204–210, Jan. 2014, doi: 10.5012/bkcs.2014.35.1.204.
- [22] D. Bodzek and B. Janoszka, "Comparison of Polycyclic Aromatic Compounds and Heavy Metals Contents in Sewage Sludges from Industrialized and Non-Industrialized Region," *Water, Air, & Soil Pollution*, vol. 111, no. 1, pp. 359–369, Apr. 1999, doi: 10.1023/A:1005066327712.

- [23] A. C. Petrasek, I. J. Kugelman, B. M. Austern, T. A. Pressley, L. A. Winslow, and R. H. Wise, "Fate of Toxic Organic Compounds in Wastewater Treatment Plants," *Journal (Water Pollution Control Federation)*, vol. 55, no. 10, pp. 1286–1296, 1983.
- [24] L. Carlsen, M.-B. Metzon, and J. Kjelsmark, "Linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in the terrestrial environment," *Sci Total Environ*, vol. 290, no. 1–3, pp. 225–230, May 2002, doi: 10.1016/S0048-9697(01)01087-7.
- [25] A. J. Beck *et al.*, "Long-Term Persistence of Organic Chemicals in Sewage Sludge-Amended Agricultural Land: A Soil Quality Perspective," in *Advances in Agronomy*, vol. 55, D. L. Sparks, Ed. Academic Press, 1995, pp. 345–391. doi: 10.1016/S0065-2113(08)60543-X.
- [26] E. Z. Harrison, S. R. Oakes, M. Hysell, and A. Hay, "Organic chemicals in sewage sludges," *Science of The Total Environment*, vol. 367, no. 2, pp. 481–497, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.04.002.
- [27] R. L. Chaney, J. A. Ryan, and G. A. O'Connor, "Organic contaminants in municipal biosolids: risk assessment, quantitative pathways analysis, and current research priorities," *Science of The Total Environment*, vol. 185, no. 1, pp. 187–216, Jun. 1996, doi: 10.1016/0048-9697(96)05051-6.
- [28] U. Bolz, H. Hagenmaier, and W. Körner, "Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany," *Environ Pollut*, vol. 115, no. 2, pp. 291–301, 2001, doi: 10.1016/S0269-7491(01)00100-2.
- [29] H. R. Rogers, "Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges," *Science of The Total Environment*, vol. 185, no. 1, pp. 3–26, Jun. 1996, doi: 10.1016/0048-9697(96)05039-5.
- [30] K. Quednow and W. Püttmann, "Temporal concentration changes of DEET, TCEP, terbutryn, and nonylphenols in freshwater streams of Hesse, Germany: Possible influence of mandatory

- regulations and voluntary environmental agreements,” *Environmental science and pollution research international*, vol. 16, pp. 630–40, Jun. 2009, doi: 10.1007/s11356-009-0169-6.
- [31] T. W. Constable, L. J. Taylor, and R. J. Rush, “The effect of three sludge processing operations on the fate and leachability of trace organics in municipal sludges,” *Environmental Technology Letters*, vol. 7, no. 1–12, pp. 129–140, Jan. 1986, doi: 10.1080/09593338609384399.
- [32] J. O’Donoghue, “Hydroquinone and its analogues in dermatology - A risk-benefit viewpoint,” *Journal of cosmetic dermatology*, vol. 5, pp. 196–203, Oct. 2006, doi: 10.1111/j.1473-2165.2006.00253.x.
- [33] A. Nakayama, Y. Noguchi, T. Mori, S. Morisawa, and T. Yagi, “Comparison of mutagenic potentials and mutation spectra of benzene metabolites using supF shuttle vectors in human cells,” *Mutagenesis*, vol. 19, no. 2, pp. 91–97, Mar. 2004, doi: 10.1093/mutage/geh009.
- [34] X. Yang *et al.*, “Benzene metabolite hydroquinone promotes DNA homologous recombination repair via the NF- κ B pathway,” *Carcinogenesis*, vol. 40, no. 8, pp. 1021–1030, Aug. 2019, doi: 10.1093/carcin/bgy157.
- [35] A. Santos, P. Yustos, A. Quintanilla, F. García-Ochoa, J. A. Casas, and J. J. Rodríguez, “Evolution of Toxicity upon Wet Catalytic Oxidation of Phenol,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 1, pp. 133–138, Jan. 2004, doi: 10.1021/es030476t.
- [36] M. North *et al.*, “Genome-Wide Functional Profiling Reveals Genes Required for Tolerance to Benzene Metabolites in Yeast,” *PLOS ONE*, vol. 6, no. 8, p. e24205, Aug. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0024205.
- [37] C. Sarkar, P. K. Mitra, S. Saha, C. Nayak, and R. Chakraborty, “Effect of copper-hydroquinone complex on oxidative stress-related parameters in human erythrocytes (in vitro),” *Toxicol Mech Methods*, vol. 19, no. 2, pp. 86–93, Feb. 2009, doi: 10.1080/15376510802164683.
- [38] V. V. Subrahmanyam, P. Kolachana, and M. T. Smith, “Hydroxylation of Phenol to Hydroquinone Catalyzed by A Human Myeloperoxidase-Superoxide Complex: Possible Implications In Benzene-

- Induced Myelotoxicity,” *Free Radical Research Communications*, vol. 15, no. 5, pp. 285–296, Jan. 1991, doi: 10.3109/10715769109105224.
- [39] S. Piña, C. Candia-Onfray, N. Hassan, P. Jara-Ulloa, D. Contreras, and R. Salazar, “Glassy Carbon Electrode Modified with C/Au Nanostructured Materials for Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol in Water Matrices,” *Chemosensors*, vol. 9, no. 5, Art. no. 5, May 2021, doi: 10.3390/chemosensors9050088.
- [40] M. M. Tolba, M. M. Salim, and M. El-Awady, “Simultaneous estimation of troxerutin and calcium dobesilate in presence of the carcinogenic hydroquinone using green spectrofluorimetric method,” *Royal Society Open Science*, vol. 8, no. 2, p. 201888, doi: 10.1098/rsos.201888.
- [41] P. Gimeno *et al.*, “HPLC–UV Method for the Identification and Screening of Hydroquinone, Ethers of Hydroquinone and Corticosteroids Possibly Used as Skin-Whitening Agents in Illicit Cosmetic Products,” *Journal of Chromatographic Science*, vol. 54, no. 3, pp. 343–352, Mar. 2016, doi: 10.1093/chromsci/bmv147.
- [42] J. Wittig, S. Wittemer, and M. Veit, “Validated method for the determination of hydroquinone in human urine by high-performance liquid chromatography–coulometric-array detection,” *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 761, no. 1, pp. 125–132, Sep. 2001, doi: 10.1016/S0378-4347(01)00321-8.
- [43] L. Petit and G. E. Piérard, “Analytic quantification of solar lentigines lightening by a 2% hydroquinone–cyclodextrin formulation,” *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 17, no. 5, pp. 546–549, 2003, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1468-3083.2003.00808.x>.
- [44] K. Jurica, I. B. Karaconji, S. Šegan, D. Milojković-Opsenica, and D. Kremer, “Quantitative analysis of arbutin and hydroquinone in strawberry tree (*Arbutus unedo* L., Ericaceae) leaves by gas

- chromatography-mass spectrometry," *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju-Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, vol. 66, no. 3, pp. 197–202, 2015, doi: 10.1515/aiht-2015-66-2696.
- [45] C. L. Bourvellec and C. M. G. C. Renard, "Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 52, no. 3, pp. 213–248, Mar. 2012, doi: 10.1080/10408398.2010.499808.
- [46] F. R. Gallo, G. Pagliuca, G. Multari, G. Panzini, E. D'amore, and I. Altieri, "New High-performance Liquid Chromatography-DAD Method for Analytical Determination of Arbutin and Hydroquinone in Rat Plasma," *Indian J Pharm Sci*, vol. 77, no. 5, pp. 530–535, 2015.
- [47] R. M. Banik, Mayank, R. Prakash, and S. N. Upadhyay, "Microbial biosensor based on whole cell of *Pseudomonas* sp. for online measurement of p-Nitrophenol," *Sensors & Actuators: B. Chemical*, vol. 1, no. 131, pp. 295–300, 2008, doi: 10.1016/j.snb.2007.11.022.
- [48] P. Fernandez, M. Grifoll, A. M. Solanas, J. M. Bayona, and J. Albaiges, "Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 26, no. 4, pp. 817–829, Apr. 1992, doi: 10.1021/es00028a024.
- [49] M. Trapido and J. Kallas, "Advanced Oxidation Processes for the Degradation and Detoxification of 4-Nitrophenol," *null*, vol. 21, no. 7, pp. 799–808, Jul. 2000, doi: 10.1080/09593330.2000.9618966.
- [50] A. Almási, E. Fischer, and P. Perjési, "HPLC Quantification of 4-Nitrophenol and its Conjugated Metabolites from Bile," *Scientia Pharmaceutica*, vol. 79, no. 4, Art. no. 4, Dec. 2011, doi: 10.3797/scipharm.1106-22.
- [51] R. N. Nuñez, J. Moreno Betancourth, P. I. Ortiz, and V. Pfaffen, "Voltammetric Quantification of 4-Nitrophenol Using a Multivariate Optimized Plated Bismuth Film Electrode," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 58, no. 27, pp. 12411–12418, Jul. 2019, doi: 10.1021/acs.iecr.9b01700.

- [52] A. Almási, E. Fischer, and P. Perjési, "A simple and rapid ion-pair HPLC method for simultaneous quantitation of 4-nitrophenol and its glucuronide and sulfate conjugates," *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 69, no. 1, pp. 43–50, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.jbbm.2006.05.002.
- [53] J. V. Sancho, O. J. Pozo, F. J. López, and F. Hernández, "Different quantitation approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 16, no. 7, pp. 639–645, 2002, doi: <https://doi.org/10.1002/rcm.617>.
- [54] T. Muhammad, O. Yimit, Y. Turahun, K. Muhammad, Y. Uludağ, and Z. Zhao, "On-line determination of 4-nitrophenol by combining molecularly imprinted solid-phase extraction and fiber-optic spectrophotometry," *Journal of Separation Science*, vol. 37, no. 14, pp. 1873–1879, 2014, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201400211>.
- [55] F. Jaber, C. Schummer, J. Al Chami, P. Mirabel, and M. Millet, "Solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for analysis of phenols and nitrophenols in rainwater, as their t-butyltrimethylsilyl derivatives," *Anal Bioanal Chem*, vol. 387, no. 7, pp. 2527–2535, Apr. 2007, doi: 10.1007/s00216-006-1115-9.
- [56] A. Karci, I. Arslan-Alaton, T. Olmez-Hanci, and M. Bekbölet, "Transformation of 2,4-dichlorophenol by H₂O₂/UV-C, Fenton and photo-Fenton processes: Oxidation products and toxicity evolution," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 230, no. 1, pp. 65–73, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.jphotochem.2012.01.003.
- [57] H. E. Ensley, J. T. Barber, M. A. Polito, and A. I. Oliver, "Toxicity and metabolism of 2,4-dichlorophenol by the aquatic angiosperm *Lemna gibba*," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 13, no. 2, pp. 325–331, 1994, doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620130217>.

- [58] A. S. Ucisik and S. Trapp, "Uptake, removal, accumulation, and phytotoxicity of 4-chlorophenol in willow trees," *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 54, no. 4, pp. 619–627, May 2008, doi: 10.1007/s00244-007-9065-6.
- [59] S. R. Yashas, S. Sandeep, B. P. Shivakumar, and N. K. Swamy, "A matrix of perovskite micro-seeds and polypyrrole nanotubes tethered laccase/graphite biosensor for sensitive quantification of 2,4-dichlorophenol in wastewater," *Anal. Methods*, vol. 11, no. 35, pp. 4511–4519, Sep. 2019, doi: 10.1039/C9AY01468C.
- [60] C. Zheng, J. Zhao, P. Bao, J. Gao, and J. He, "Dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of triclosan and 2,4-dichlorophenol in water samples," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 25, pp. 3830–3836, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.04.050.
- [61] E. Laurenti, E. Ghibaudi, S. Ardisson, and R. P. Ferrari, "Oxidation of 2,4-dichlorophenol catalyzed by horseradish peroxidase: characterization of the reaction mechanism by UV–visible spectroscopy and mass spectrometry," *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 95, no. 2, pp. 171–176, Jun. 2003, doi: 10.1016/S0162-0134(03)00101-6.
- [62] M. C. Alonso, D. Puig, I. Silgoner, M. Grasserbauer, and D. Barceló, "Determination of priority phenolic compounds in soil samples by various extraction methods followed by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol. 823, no. 1, pp. 231–239, Oct. 1998, doi: 10.1016/S0021-9673(98)00110-1.
- [63] G. Mascolo, A. Lopez, A. Detomaso, and G. Lovecchio, "Ion chromatography–electrospray mass spectrometry for the identification of low-molecular-weight organic acids during the 2,4-dichlorophenol degradation," *Journal of Chromatography A*, vol. 1067, no. 1, pp. 191–196, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.chroma.2004.12.058.

- [64] E. Boutin and M. Robert, "Molecular Electrochemical Reduction of CO₂ beyond Two Electrons," *Trends in Chemistry*, vol. 3, no. 5, pp. 359–372, May 2021, doi: 10.1016/j.trechm.2021.02.003.
- [65] C. Medina-Plaza *et al.*, "The advantages of disposable screen-printed biosensors in a bioelectronic tongue for the analysis of grapes," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 62, no. 2, pp. 940–947, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.lwt.2015.02.027.
- [66] H. B. Yildiz, J. Castillo, D. A. Guschin, L. Toppare, and W. Schuhmann, "Phenol biosensor based on electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer," *Microchimica Acta*, vol. 159, no. 1–2, pp. 27–34, Jun. 2007, doi: 10.1007/s00604-007-0768-1.
- [67] G. Wang, J. Sun, W. Zhang, S. Jiao, and B. Fang, "Simultaneous determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid with LaFeO₃ nanoparticles modified electrode," *Microchimica Acta*, vol. 164, no. 3–4, pp. 357–362, Mar. 2009, doi: 10.1007/s00604-008-0066-6.
- [68] M. Sajid, M. K. Nazal, M. Mansha, A. Alsharaa, S. M. S. Jillani, and C. Basheer, "Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 76, pp. 15–29, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.trac.2015.09.006.
- [69] B. L. Hanssen, S. Siraj, and D. K. Y. Wong, "Recent strategies to minimise fouling in electrochemical detection systems," *Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 35, no. 1, pp. 1–28, Apr. 2016, doi: 10.1515/revac-2015-0008.
- [70] X. Yang, J. Kirsch, J. Fergus, and A. Simonian, "Modeling analysis of electrode fouling during electrolysis of phenolic compounds," *Electrochimica Acta*, vol. 94, pp. 259–268, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.electacta.2013.01.019.
- [71] A. J. Downard, "Electrochemically Assisted Covalent Modification of Carbon Electrodes," *Electroanalysis*, vol. 12, no. 14, pp. 1085–1096, 2000, doi: [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200010\)12:14<1085::AID-ELAN1085>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200010)12:14<1085::AID-ELAN1085>3.0.CO;2-A).

- [72] M. Ferreira, H. Varela, R. M. Torresi, and G. Tremiliosi-Filho, "Electrode passivation caused by polymerization of different phenolic compounds," *Electrochimica Acta*, vol. 52, no. 2, pp. 434–442, Oct. 2006, doi: 10.1016/j.electacta.2006.05.025.
- [73] "Electrochemical Oxidation of Chlorophenols at a Boron-Doped Diamond Electrode and Their Determination by High-Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection | Analytical Chemistry." <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac010681w> (accessed Apr. 07, 2021).
- [74] T. N. Rao, B. V. Sarada, C. Terashima, and A. Fujishima, "Electrochemical Detection of Carbamate Pesticides at Conductive Diamond Electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 7, pp. 1578–1583, Apr. 2002, doi: 10.1021/ac010935d.
- [75] G. W. Muna, V. Quaiserová-Mocko, and G. M. Swain, "Chlorinated Phenol Analysis Using Off-Line Solid-Phase Extraction and Capillary Electrophoresis Coupled with Amperometric Detection and a Boron-Doped Diamond Microelectrode," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 20, pp. 6542–6548, Oct. 2005, doi: 10.1021/ac050473u.
- [76] S. Ranganathan, T.-C. Kuo, and R. L. McCreery, "Facile Preparation of Active Glassy Carbon Electrodes with Activated Carbon and Organic Solvents," *Anal. Chem.*, vol. 71, no. 16, pp. 3574–3580, Aug. 1999, doi: 10.1021/ac981386n.
- [77] "Electrochemical Reduction of Brønsted Acids by Glassy Carbon in Acetonitrile—Implications for Electrocatalytic Hydrogen Evolution | Inorganic Chemistry." <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ic500770k> (accessed Apr. 07, 2021).
- [78] "Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry: An Electrochemical Approach to Electron Transfer Chemistry By Jean-Michel Savéant (Université de Paris 7, Denis Diderot). J. Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ. 2006. xviii + 486 pp. \$135. ISBN 0-471-44573-8. | Journal of the American Chemical Society." <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja069754p#> (accessed May 04, 2021).
- [79] R. Bock, "A Handbook of Decomposition Methods in Analytical Chemistry, Blackie," Jan. 1979.

- [80] R. Zlatev, M. Stoytcheva, and B. Valdez, "Application of Anodic Stripping Differential Alternative Pulses Voltammetry for Simultaneous Species Quantification," *Electroanalysis*, vol. 30, no. 9, pp. 1902–1905, 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201800291>.
- [81] R. Zlatev, M. Stoytcheva, and B. Valdez, "As(III) Determination in the Presence of Pb(II) by Differential Alternative Pulses Voltammetry," *Electroanalysis*, vol. 22, no. 15, pp. 1671–1674, 2010, doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201000090>.
- [82] R. Zlatev and M. Stoytcheva, "Differential Alternative Pulses Voltammetry Application in Organic and Inorganic Analysis," *Meet. Abstr.*, vol. MA2020-01, no. 45, p. 2560, May 2020, doi: [10.1149/MA2020-01452560mtgabs](https://doi.org/10.1149/MA2020-01452560mtgabs).
- [83] A. Ayala *et al.*, "Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol by Differential Alternative Pulses Voltammetry," *Electroanalysis*, vol. 30, no. 9, pp. 1913–1917, 2018, doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201800240>.
- [84] M. Stoytcheva *et al.*, "Resolution of a Mononitrophenol Isomers Mixture by Differential Alternative Pulses Voltammetry," *Electroanalysis*, vol. 31, no. 4, pp. 652–660, 2019, doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201800762>.
- [85] M. A. Islam, P. Mahbub, P. N. Nesterenko, B. Paull, and M. Macka, "Prospects of pulsed amperometric detection in flow-based analytical systems - A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 1052, pp. 10–26, Apr. 2019, doi: [10.1016/j.aca.2018.10.066](https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.066).
- [86] F. Wachholz, K. Biała, M. Piekarz, and G.-U. Flechsig, "Temperature pulse modulated amperometry at compact electrochemical sensors," *Electrochemistry Communications*, vol. 9, no. 9, pp. 2346–2352, Sep. 2007, doi: [10.1016/j.elecom.2007.06.043](https://doi.org/10.1016/j.elecom.2007.06.043).
- [87] J. Newman, *Electrochemical Systems*, 3rd Edition. Wiley-Interscience, 2004.
- [88] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2nd ed. New York: Wiley, 2001.

- [89] V. V. Pavlishchuk and A. W. Addison, "Conversion constants for redox potentials measured versus different reference electrodes in acetonitrile solutions at 25°C," *Inorganica Chimica Acta*, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0020-1693(99)00407-7.
- [90] K. Jackowska and P. Kryszewski, "New trends in the electrochemical sensing of dopamine," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 405, no. 11, pp. 3753–3771, Apr. 2013, doi: 10.1007/s00216-012-6578-2.
- [91] V. Gaudin, "Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 90, pp. 363–377, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.12.005.
- [92] E. A. Songa and J. O. Okonkwo, "Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review," *Talanta*, vol. 155, pp. 289–304, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2016.04.046.
- [93] X. Bo, M. Zhou, and L. Guo, "Electrochemical sensors and biosensors based on less aggregated graphene," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 89, pp. 167–186, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.05.002.
- [94] S. Liu, B. Yu, W. Zhang, Y. Zhai, and J. Chen, "Electrochemical performance of Co-containing mixed oxides as oxygen electrode materials for intermediate-temperature solid oxide electrolysis cells," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 41, no. 36, pp. 15952–15959, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.05.077.
- [95] A. Hayat and J. Marty, "Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring," *Sensors*, vol. 14, no. 6, pp. 10432–10453, Jun. 2014, doi: 10.3390/s140610432.
- [96] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," *Biotechnology Advances*, vol. 30, no. 3, pp. 489–511, May 2012, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.

- [97] S. A. Boppart *et al.*, “Contributors,” in *Biophotonics for Medical Applications*, I. Meglinski, Ed. Woodhead Publishing, 2015, pp. ix–x. doi: 10.1016/B978-0-85709-662-3.09987-5.
- [98] R. Gul and R. Kumar, “Introduction to Environmental Biotechnology,” in *Advances in Environmental Biotechnology*, R. Kumar, A. K. Sharma, and S. S. Ahluwalia, Eds. Singapore: Springer Singapore, 2017, pp. 1–11. doi: 10.1007/978-981-10-4041-2_1.
- [99] N. Ravindra, C. Prodan, S. Lakshmanan, I. Padron, and S. Sikha, “Advances in the manufacturing, types, and applications of biosensors,” *JOM: the journal of the Minerals, Metals & Materials Society*, vol. 59, pp. 37–43, Dec. 2007, doi: 10.1007/s11837-007-0150-0.
- [100] M. Yakovleva, S. Bhand, and B. Danielsson, “The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 766, pp. 1–12, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.aca.2012.12.004.
- [101] S. M. Borisov and O. S. Wolfbeis, “Optical Biosensors,” *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 423–461, Feb. 2008, doi: 10.1021/cr068105t.
- [102] A. P. F. Turner, I. Karube, and G. S. Wilson, Eds., *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford [Oxfordshire] ; New York: Oxford University Press, 1987.
- [103] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, and E. Reimhult, “Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures,” *Sensors (Basel)*, vol. 8, no. 3, pp. 1400–1458, Mar. 2008, doi: 10.3390/s80314000.
- [104] A. Guiseppi-Elie and L. Lingerfelt, “Impedimetric Detection of DNA Hybridization: Towards Near-Patient DNA Diagnostics,” in *Immobilisation of DNA on Chips I*, vol. 260, C. Wittmann, Ed. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, pp. 161–186. doi: 10.1007/128_006.
- [105] V. M. Mirsky, M. Riepl, and O. S. Wolfbeis, “Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen–antibody reactions on monomolecular alkylthiol films on gold electrodes,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 12, no. 9, pp. 977–989, Nov. 1997, doi: 10.1016/S0956-5663(97)00053-5.

- [106] F.-G. Banica, *Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications*. Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley, 2012.
- [107] J. Wang, T. Martinez, D. R. Yaniv, and L. D. McCormick, "Scanning tunneling microscopic investigation of surface fouling of glassy carbon surfaces due to phenol oxidation," *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, vol. 313, no. 1, pp. 129–140, Sep. 1991, doi: 10.1016/0022-0728(91)85176-P.
- [108] L. Cao, "2.34 - Immobilized Enzymes," in *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, M. Moo-Young, Ed. Burlington: Academic Press, 2011, pp. 461–476. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00168-9.
- [109] Z. Taleat, A. Khoshroo, and M. Mazloum-Ardakani, "Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013)," *Microchimica Acta*, vol. 181, no. 9–10, pp. 865–891, Jul. 2014, doi: 10.1007/s00604-014-1181-1.
- [110] A. Manjón and J. L. Iborra, "Visual Assessment of Enzyme Immobilization," *Immobilization of Enzymes and Cells*, pp. 41–51, 1997.
- [111] M. J. Moehlenbrock and S. D. Minter, "Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization," in *Enzyme Stabilization and Immobilization*, vol. 679, S. D. Minter, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, pp. 1–7. doi: 10.1007/978-1-60761-895-9_1.
- [112] B. Elvers, Ed., *Ullmann's reaction engineering: [2 Volume Set]*, 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH, 2013.
- [113] S. Datta, L. R. Christena, and Y. R. S. Rajaram, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials," *3 Biotech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2013, doi: 10.1007/s13205-012-0071-7.
- [114] T. Jesionowski, J. Zdarta, and B. Krajewska, "Enzyme immobilization by adsorption: a review," *Adsorption*, vol. 20, no. 5–6, pp. 801–821, Aug. 2014, doi: 10.1007/s10450-014-9623-y.

- [115] J. M. Guisan, Ed., *Immobilization of enzymes and cells*, 2nd ed. Totowa, N.J: Humana Press, 2006.
- [116] G. E. A. Awad, A. A. Abd El Aty, A. N. Shehata, M. E. Hassan, and M. M. Elnashar, "Covalent immobilization of microbial naringinase using novel thermally stable biopolymer for hydrolysis of naringin," *3 Biotech*, vol. 6, no. 1, Jun. 2016, doi: 10.1007/s13205-015-0338-x.
- [117] Y. Liu and J. Yu, "Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review," *Microchimica Acta*, vol. 183, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2016, doi: 10.1007/s00604-015-1623-4.
- [118] F. López-Gallego, L. Betancor, A. Hidalgo, C. Mateo, J. M. Guisán, and R. Fernández-Lafuente, "Optimization of an industrial biocatalyst of glutaryl acylase: Stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads," *Journal of Biotechnology*, vol. 111, no. 2, pp. 219–227, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.04.006.
- [119] N. Durán, M. A. Rosa, A. D'Annibale, and L. Gianfreda, "Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review," *Enzyme and microbial technology*, vol. 31, no. 7, pp. 907–931, 2002.
- [120] D. E. Wong, K. J. Senecal, and J. M. Goddard, "Immobilization of chymotrypsin on hierarchical nylon 6,6 nanofiber improves enzyme performance," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 154, pp. 270–278, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.033.
- [121] M. V. Sefton, M. H. May, S. Lahooti, and J. E. Babensee, "Making microencapsulation work: conformational coating, immobilization gels and in vivo performance," *Journal of Controlled Release*, vol. 65, no. 1, pp. 173–186, 2000.
- [122] Y. Shoja, A. A. Rafati, and J. Ghodsi, "Enzymatic biosensor based on entrapment of d -amino acid oxidase on gold nanofilm/MWCNTs nanocomposite modified glassy carbon electrode by sol-gel network: Analytical applications for d -alanine in human serum," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 100, pp. 20–27, May 2017, doi: 10.1016/j.enzmictec.2017.02.001.

- [123] T. Iype *et al.*, “A novel method for immobilization of proteins via entrapment of magnetic nanoparticles through epoxy cross-linking,” *Analytical Biochemistry*, vol. 519, pp. 42–50, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.ab.2016.12.007.
- [124] C. G. Tsiafoulis, M. I. Prodromidis, and M. I. Karayannis, “Development of an amperometric biosensing method for the determination of l-fucose in pretreated urine,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, no. 3, pp. 620–627, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.bios.2004.03.012.
- [125] K. Isaka, Y. Kimura, M. Matsuura, T. Osaka, and S. Tsuneda, “First full-scale nitrification-anammox plant using gel entrapment technology for ammonia plant effluent,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 122, pp. 115–122, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.bej.2017.03.005.
- [126] T. Laothanachareon, V. Champreda, P. Sritongkham, M. Somasundrum, and W. Surareungchai, “Cross-linked enzyme crystals of organophosphate hydrolase for electrochemical detection of organophosphorus compounds,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, no. 12, pp. 3049–3055, Dec. 2008, doi: 10.1007/s11274-008-9851-y.
- [127] A. G. Savelyev *et al.*, “Flavin mononucleotide photoinitiated cross-linking of hydrogels: Polymer concentration threshold of strengthening,” *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 341, pp. 108–114, May 2017, doi: 10.1016/j.jphotochem.2017.03.026.
- [128] S. Gupta, C. N. Murthy, and C. R. Prabha, “Recent advances in carbon nanotube based electrochemical biosensors,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 108, pp. 687–703, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.038.
- [129] B. Rånby and F. Z. Guo, “‘Surface-photografting’: new applications to synthetic fibers,” *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 5, no. 12, pp. 829–836, 1994, doi: <https://doi.org/10.1002/pat.1994.220051210>.
- [130] O. Hosu *et al.*, “Nanostructured photoactivatable electrode surface based on pyrene diazirine,” *Electrochemistry Communications*, vol. 80, pp. 5–8, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.elecom.2017.05.002.

- [131] P. J. Weber and A. G. Beck-Sickinger, "Comparison of the photochemical behavior of four different photoactivatable probes," *J Pept Res*, vol. 49, no. 5, pp. 375–383, May 1997, doi: 10.1111/j.1399-3011.1997.tb00889.x.
- [132] G. Herzog, K. Gorgy, T. Gulon, and S. Cosnier, "Electrogeneration and characterization of photoactivable films and their application for enzyme grafting," *Electrochemistry Communications*, vol. 7, pp. 808–814, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.elecom.2005.05.002.
- [133] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*. John Wiley & Sons, 2006.
- [134] S. Minteer, *Physical and Analytical Electrochemistry (General) - 217th ECS Meeting*. The Electrochemical Society, 2010.
- [135] F. Tahernejad-Javazmi, M. Shabani-Nooshabadi, and H. Karimi-Maleh, "Gold nanoparticles and reduced graphene oxide-amplified label-free DNA biosensor for dasatinib detection," *New J. Chem.*, vol. 42, no. 19, pp. 16378–16383, Sep. 2018, doi: 10.1039/C8NJ03783C.
- [136] R. Emamian, M. Ebrahimi, and H. Karimi-Maleh, "Electrochemical Platform Based on Synergic Effect of Fe₃O₄/SWCNTs and 1-ethyl-3-methyl Imidazolium Chloride as Sensor for Determination of Xanthine and Theophylline in Food Samples," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 165, no. 14, p. B762, Nov. 2018, doi: 10.1149/2.1311814jes.
- [137] D.-P. Zhang, W.-L. Wu, H.-Y. Long, Y.-C. Liu, and Z.-S. Yang, "Voltammetric Behavior of o-Nitrophenol and Damage to DNA," *International journal of molecular sciences*, vol. 9, pp. 316–26, Apr. 2008, doi: 10.3390/ijms9030316.
- [138] C. Yao, H. Sun, H.-F. Fu, and Z.-C. Tan, "Sensitive simultaneous determination of nitrophenol isomers at poly(p-aminobenzene sulfonic acid) film modified graphite electrode," *Electrochimica Acta*, vol. 156, pp. 163–170, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.electacta.2015.01.043.

- [139] G. G. Gerent and A. Spinelli, "Magnetite-platinum nanoparticles-modified glassy carbon electrode as electrochemical detector for nitrophenol isomers," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 330, pp. 105–115, May 2017, doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.02.002.
- [140] T. Wei, X. Huang, Q. Zeng, and L. Wang, "Simultaneous electrochemical determination of nitrophenol isomers with the polyfurfural film modified glassy carbon electrode," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 743, pp. 105–111, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.jelechem.2015.02.031.
- [141] H. Tomás, C. S. Alves, and J. Rodrigues, "Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications?," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 14, no. 7, pp. 2407–2420, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.nano.2017.04.016.
- [142] S. Yariv and H. Cross, *Organo-Clay Complexes and Interactions*. CRC Press, 2001.
- [143] V. Papper, K. Gorgy, K. Elouarzaki, A. Sukharaharja, S. Cosnier, and R. S. Marks, "Biofunctionalization of Multiwalled Carbon Nanotubes by Irradiation of Electropolymerized Poly(pyrrole–diazirine) Films," *Chemistry – A European Journal*, vol. 19, no. 29, pp. 9639–9643, 2013, doi: <https://doi.org/10.1002/chem.201300873>.
- [144] L. Tang *et al.*, "A tyrosinase biosensor based on ordered mesoporous carbon–Au/L-lysine/Au nanoparticles for simultaneous determination of hydroquinone and catechol," *Analyst*, vol. 138, no. 12, pp. 3552–3560, May 2013, doi: 10.1039/C3AN36928E.
- [145] A. Wong, A. M. Santos, O. Fatibello-Filho, and M. D. P. T. Sotomayor, "Amperometric Tyrosinase Biosensor Based on Carbon Black Paste Electrode for Sensitive Detection of Catechol in Environmental Samples," *Electroanalysis*, vol. 33, no. 2, pp. 431–437, 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/elan.202060084>.
- [146] J. M. Lee, G.-R. Xu, B. K. Kim, H. N. Choi, and W.-Y. Lee, "Amperometric Tyrosinase Biosensor Based on Carbon Nanotube-Doped Sol-Gel-Derived Zinc Oxide–Nafion Composite Films," *Electroanalysis*, vol. 23, no. 4, pp. 962–970, 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201000556>.

- [147] Q. Palomar, C. Gondran, J.-P. Lellouche, S. Cosnier, and M. Holzinger, “Functionalized tungsten disulfide nanotubes for dopamine and catechol detection in a tyrosinase-based amperometric biosensor design,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 8, no. 16, pp. 3566–3573, 2020, doi: 10.1039/C9TB01926J.

Producción Científica

Full Paper

Wiley Online Library

ELECTROANALYSIS

DOI: 10.1002/elan.201800240

Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol by Differential Alternative Pulses Voltammetry

Alan Ayala,^[a] Margarita Stoytcheva,^{*[a]} Roumen Zlatev,^[a] Zdravka Velkova,^[b] Velizar Gochev,^[c] Benjamin Valdez,^[a] and Gisela Montero^[a]

Abstract: The second order voltammetric technique of high resolution, Differential Alternative Pulses Voltammetry (DAPV), was applied for the simultaneous determination of hydroquinone (HQ) and catechol (CC) on bare spectroscopic graphite electrode. Well resolved anodic and cathodic peaks situated on both sides of the zero line were obtained, while the differential pulse voltammograms were overlapped. The linear concentration range for HQ and CC quantification by DAPV was extended up

to 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for both the isomers. The sensitivity of the determination was found to be 6.00 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ and 3.61 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$, while the limit of detection reached was 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for HQ and CC, respectively. No interference was observed from the commonly coexisting organic species such as resorcinol, phenol and p-benzoquinone. The great resolution power of DAPV permitted obtaining excellent results without any electrode modification and any mathematical data processing.

Keywords: Hydroquinone · Catechol · Differential Alternative Pulses Voltammetry

1 Introduction

Hydroquinone and catechol are phenolic compounds with a broad range of industrial applications, including pharmaceuticals, cosmetics, pesticides, and dyes production, as well as water treatment [1,2,3]. They are considered as important environmental pollutants [4,5], because of their toxic effects, affecting aquatic and soil organisms, and mammalian and human cells [3,6]. Hydroquinone and catechol, as dihydroxybenzene isomers, have similar structure and properties. They usually coexist in environmental samples and exercise a synergetic action [6].

Hydroquinone and catechol are electrochemically active and can be directly quantified by electrochemical methods, which are more advantageous in comparison to the commonly used chromatographic and spectrophotometric techniques [7], because of their operational simplicity, fast response, and low cost. However, the simultaneous voltammetric determination of hydroquinone and catechol presents some difficulties, because of the overlapping of their redox peaks at conventional solid electrodes [8]. Therefore, two approaches were proposed to overcome this drawback: (i) chemometric resolution and quantification of the hydroquinone and catechol overlapped peaks by semi-derivative [8] or multivariate analysis [9] and (ii) development of chemically modified electrodes with better electrochemical performances, permitting peaks separation [10]. However, the mathematical treatment habitually results in a precision decrease [11,12], while the electrode modification often requires the use of expensive materials and involves sophisticated techniques. Hence, another strategy for the direct simultaneous hydroquinone and catechol determination without any electrode modification and any mathematical data processing is suggested in this work. It

involves the application of Differential Alternative Pulses Voltammetry (DAPV) [13], which provides the great resolution of the second order voltammetric techniques, as Radio-Frequency Polarography [14,15], Second Harmonic AC Voltammetry [16], and Differential Faradaic Rectification Polarography (DFRP) [17], in combination with the high sensitivity, precision, and instrumental and operational simplicity of the most common voltammetric technique, the differential pulse voltammetry (DPV).

1.1 DAPV Principle

The second order voltammetric techniques including DAPV are based on the nonlinearity of the electrochemical system I/E characteristic causing its "electrochemical derivation" which results from the sinusoidal or rectangular bipolar deviations of the DC potential [18,19]. Two single pulses of small amplitude, one cathodic and one anodic are successively applied in DAPV for every value of the scanned DC potential with delay time between the pulses equal to the delay time between the scan step and the first one. The sum of the two pulse faradaic current components with opposite polarities is

[a] A. Ayala, M. Stoytcheva, R. Zlatev, B. Valdez, G. Montero
Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, México
E-mail: margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx

[b] Z. Velkova
Medical University of Plovdiv, Faculty of Pharmacy, Dep. Chemical Sciences, Plovdiv, Bulgaria

[c] V. Gochev
Plovdiv University "P. Hilendarski", Faculty of Biology, Dep. Biochemistry and Microbiology, Plovdiv, Bulgaria

Full Paper

Wiley Online Library

ELECTROANALYSIS

DOI: 10.1002/elan.201800762

Resolution of a Mononitrophenol Isomers Mixture by Differential Alternative Pulses Voltammetry

Margarita Stoytcheva,^{*,[a]} Roumen Zlatev,^[a] Zdravka Velkova,^[b] Velizar Gochev,^[c] Alan Ayala,^[a] Gisela Montero,^[a] and Benjamín Valdez^[a]

Abstract: The high resolution second order voltammetric technique, Differential Alternative Pulse Voltammetry (DAPV), was applied for the simultaneous quantification of the mononitrophenol (NP) isomers. Complete resolution of the three isomers was achieved at concentration ratios as high as 1:5, employing the corresponding anodic and cathodic peaks appeared on the DAPV curve. The working glassy carbon electrode was modified by a nanocomposite of graphite nanopowder and Au nanoparticles to increase the sensitivity. The linear concentration range was found to be extended up to 125 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for both the

m-NP and p-NP isomers, while the o-NP isomer presented calibration plot of two linear sections: up to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and up to 225 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The LOD was found to be as low as 1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 2.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for o-NP, m-NP, and p-NP, respectively. The accuracy of the proposed method was evaluated by quantification of spiked tap waters samples. No interference was observed from a range of phenolic compounds such as phenol, 4-aminophenol, 4-chlorophenol, 2,4-dinitrophenol, and resorcinol.

Keywords: Nitrophenol isomers • Differential Alternative Pulses Voltammetry • Chemically modified electrode sensor

1 Introduction

The mononitrophenols are a group of nitroaromatic compounds, which include three structural isomers: o-nitrophenol (o-NP), m-nitrophenol (m-NP), and p-nitrophenol (p-NP). Two of them, o-NP and p-NP, are considered priority environmental pollutants by the United States Environmental Protection Agency [1]. No natural sources of mononitrophenols are known and the contamination comes from the manufacturing and processing industry. Mononitrophenols are used for the production of drugs, insecticides, and dyes [2] and enter the environment as hazardous waste. As the nitrophenol isomers are coexisting and have similar properties, their simultaneous determination is problematic.

The currently applied analytical methods for nitrophenols quantification are spectrophotometric [3–7], chromatographic [8–14], and electrochemical [15–34], as well as flow-injection analysis [35–37], and capillary electrophoresis [38–41]. Among them the electrochemical techniques and especially the voltammetry attract the attention, due to their cost efficiency, rapid response, simple operation, and on-site application ability. The main difficulty associated with the voltammetric simultaneous determination of the nitrophenol isomers is the insufficient resolution of the nitrophenols overlapped peaks and hence, the low quantification precision. This problem was overcome by signal differentiation or by the application of chemically modified electrodes with improved performances, or both [15–34]. However, the differentiation presents important disadvantages in increased noise level or insufficient number of sampling points [42]. The use of chemically modified electrodes, on the other hand, in spite

of their successful application for simultaneous species determination [43–47], still remains challenging, because of the serious deficiencies of the fabrication procedures, related to the expensive materials and sophisticated techniques required. Therefore, another strategy for the resolution of the mononitrophenol isomers mixture, based on the application of Differential Alternative Pulses Voltammetry (DAPV) is proposed in this work. The technique, introduced by Zlatev [48–50] and theoretically justified by Molina et al. [51,52] provides the great resolution of the second order voltammetric techniques, as Radio-Frequency Polarography [53,54], Second Harmonic AC Voltammetry [55], and Differential Faradaic Rectification Polarography [56], in combination with the high sensitivity, precision, and instrumental and operational simplicity of the most common voltammetric technique, the differential pulse voltammetry (DPV). DAPV has been successfully applied for the simultaneous determination of a range of inorganic species with close $E_{1/2}$ potentials [57–59], as well as for the resolution of the dihydroxybenzene isomers mixtures [60].

[a] M. Stoytcheva, R. Zlatev, A. Ayala, G. Montero, B. Valdez
Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, México
E-mail: margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx

[b] Z. Velkova
Medical University of Plovdiv, Faculty of Pharmacy, Dep. Chemical Sciences, Plovdiv, Bulgaria

[c] V. Gochev
Plovdiv University "P. Hilendarski", Faculty of Biology, Dep. Biochemistry and Microbiology, Plovdiv, Bulgaria

Full Paper

Wiley Online Library

ELECTROANALYSIS

DOI: 10.1002/elan.201900086

Diazirine-Functionalized Nanostructured Platform for Enzymes Photografting and Electrochemical Biosensing

Margarita Stoytcheva,^[a] Roumen Zlatev,^[a] Zdravka Velkova,^[b] Velizar Gochev,^[c] Alan Ayala,^[a] Gisela Montero,^[a] and Benjamín Valdez^[a]

Abstract: A simple technique for the construction of a versatile diazirine-functionalized nanostructured platform for enzymes photografting and electrochemical biosensing was proposed in this work. The feasibility of the approach was proved by photo crosslinking of an enzyme, tyrosinase, to diazirine-activated aminated carbon nanotubes coated glassy carbon electrode. The analytical performances of the realized biosensor were evaluated employing

catechol as analyte. Then the sensor based on the diazirine-functionalized nanostructured platform with photografted tyrosinase was applied together with the high resolution technique Differential Alternative Pulses Voltammetry for dopamine determination in the linear concentration range of 5–25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in the presence of interfering agents as uric acid up to its 100-fold excess.

Keywords: Diazirine · Tyrosinase · Dopamine biosensor · Differential Alternative Pulses Voltammetry

1 Introduction

The electrochemical enzyme-based sensors are user friendly, compact, and portable analytical devices, which combine the sensitivity, the rapidity, and the simplicity of the electrochemical transduction with the catalytic activity and substrate specificity of the biological recognition element. Since the initial biosensors-related researches focused on the improvement of the analytical performances of the biosensors by simplification of the transduction pathway and resulted in the development of the 3rd generation of biosensors, current efforts aim the enhancement of their analytical response by electrode surface modification by using nanomaterials and application of efficient enzyme immobilization strategies. The carbon nanotubes (CNTs) in particular received a considerable attention in the electrochemical biosensing [1–10], because of their biocompatibility and attractive properties as electrode material: large surface area and improved electron transfer properties, which produce, in combination with the increased enzyme load, a high sensitivity.

CNTs biofunctionalization is performed applying various physical and chemical enzyme immobilization procedures, widely discussed in the literature [9–13]. Photografting, among them, appears to be the most efficient approach to fabricate stable covalently bonded enzymes conjugates, due to its simplicity, rapidity, versatility, and enzyme activity preserving ability [14,15]. The covalent coupling reaction is initiated by light activation of photochemical crosslinking reagents, such as benzophenones, arylazides, and diazirines, successfully used for photo-affinity labeling studies to investigate ligand-receptor, ligand-enzyme, protein-protein, and protein-nucleic acid interactions [16–18]. Diazirines progressively substitute the other crosslinking reagents, because of their better stability in the presence of various nucleophiles in both

acidic and alkaline media and the easier activation with long wavelength UV light for a short irradiation time, which prevents the enzyme molecules denaturation [19]. In spite of these advantages, diazirines application for electrochemical biosensors fabrication by photo-induced electrode material biofunctionalization remains still insufficiently explored. Diazirine was used for the synthesis of a pyrrole-diazirine derivative, combining electrochemical and photochemical properties. Covalent binding of biomolecules was achieved by UV activation of the electropolymerized pyrrole-diazirine film, deposited onto a CNTs-coated Pt or glassy carbon electrode [14,20,21]. The potential of this approach for biosensors construction was illustrated with glucose oxidase, laccase, and tyrosinase. The technique presents numerous advantages associated with the electrochemical addressing of the polymer and the spatial localization of the protein by light [20]. However, polypyrrole layer is most stable in the narrow pH range of 5.5–6.0 [22], thus lowering the activity of some enzymes, such as glycerol kinase (pH_{opt} 9.8) and glycerol-3-phosphate oxidase (pH_{opt} 8.1) among other, that favour basic pH [23].

In this context, a novel simple method to prepare a versatile diazirine-functionalized nanostructured platform

[a] M. Stoytcheva, R. Zlatev, A. Ayala, G. Montero, B. Valdez. Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, México
E-mail: margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx

[b] Z. Velkova. Medical University of Plovdiv, Faculty of Pharmacy, Dep. Chemical Sciences, Plovdiv, Bulgaria

[c] V. Gochev. Plovdiv University “P. Hilendarski”, Faculty of Biology, Dep. Biochemistry and Microbiology, Plovdiv, Bulgaria

Adsorptive stripping voltammetric determination of 2,4-dichlorophenol by laponite modified carbon paste electrode

Margarita Stoytcheva,^{*,[a]} Roumen Zlatev,^[a] Zdravka Velkova,^[b] Velizar Gochev,^[c] Alan Ayala,^[a] Gisela Montero,^[a] and Benjamín Valdez^[a]

^a Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ingeniería, Mexicali, México

^b Medical University of Plovdiv, Faculty of Pharmacy, Dep. Chemical Sciences, Plovdiv, Bulgaria

^c Plovdiv University "P. Hilendarski", Faculty of Biology, Dep. Biochemistry and Microbiology, Plovdiv, Bulgaria

* e-mail: margarita.stoytcheva@uabc.edu.mx

Received:

Accepted:

Abstract

A laponite modified carbon paste electrode was prepared, characterized and applied for the 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) voltammetric determination. It takes advantage of the ability of laponite to adsorb phenols, as well as of its availability and very low cost. Kinetic and equilibrium data for 2,4-DCP adsorption by laponite in aqueous dispersions demonstrated that the adsorption process obeyed a pseudo first order kinetic model and was consistent with the formation of adsorbed multilayers on a surface with heterogeneous pore distribution. The composite paste electrode exhibited a heterogeneous surface with 65% increased surface area and 27% enhanced catalytic activity compared to the unmodified one. The adsorptive stripping voltammetric determination of 2,4-DCP at an electrode with an optimized graphite:laponite ratio of 55:15 w% using a 3 min accumulation time at pH 5.5 was found to be suitable for its quantification in the linear concentration range extended up to 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with a sensitivity of 0.56 $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ and a LOD of 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (S/N = 3). The 2,4-DCP electrochemical response was not affected by the presence of some structurally similar phenols, like catechol and p-nitrophenol, while resorcinol, 2-chlorophenol, and 4-chlorophenol presented interferences. The results were validated by 2,4-DCP determination in spiked tap water.

Keywords: 2,4-dichlorophenol • Laponite modified carbon paste electrode • Adsorption studies • Adsorptive stripping voltammetry

DOI: 10.1002/elan.

1 Introduction

Chlorinated phenols (chlorophenols) are organic compounds, used as raw materials or intermediates in the production of antiseptics, pesticides, pharmaceuticals and dyes [1]. Due to the wide spectrum of their industrial applications and miscellaneous origin, the chlorophenols are ubiquitously present in air, waters, soils, and trophic chains, even in sites with low levels of pollution. They constitute a serious risk to the health and the environment, since they are persistent, toxic, carcinogenic, mutagenic, and teratogenic [1-3]. The 2,4-dichlorophenol, as an example, is employed as a precursor of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. It is also produced during chlorine bleaching of

cellulose. Commonly found in industrial effluents, it is considered as a priority environmental pollutant [4, 5]. The principal methods used in chlorophenols determination include gas chromatography with flame ionization, electron capture and mass spectrometer detectors, and high pressure liquid chromatography [1, 2, 6], as well as spectrophotometric [7-10] and electrochemical techniques [11]. Among these methods, the electrochemical ones are growing in importance, because of the advantages they present over the chromatographic and spectrophotometric, such as low cost, simplicity, rapidity, sensitivity and possibility for online and in-field applications. Chlorinated phenols are electrochemically active and can be easily oxidized. The electrochemical signal, i.e. the oxidation current, is used for their quantification. However, phenoxy radicals are generated during the