



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica

Centro de Investigación de los Procesos Redox (CiPRex)

**“COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO
DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO CON
DERIVADOS DE β -CICLODEXTRINA”**

Profesor Patrocinante y Director de Memoria

Dra. Claudia Andrea Yáñez Soto

Memoria para optar al Título Profesional de Químico

KARINA DORIS IRENE SILVA FABRES

Santiago, Chile

2015

RESUMEN

En la presente memoria de título se estudió el comportamiento de electrodos de carbono vítreo modificados con derivados de β -ciclodextrina (β -CD), que presentan uno o más grupos amino terminales, frente a algunos analitos de interés tales como pesticidas (carbarilo y azinfos-metil), y otro utilizado en la formulación de pesticidas (4-nonilfenol). Los electrodos fueron preparados por una oxidación electroquímica directa del grupo amino presente en el derivado de β -CD. La modificación se evaluó mediante voltametría cíclica haciendo uso del mediador electroactivo ferricianuro. La caracterización de los electrodos fue realizada mediante XPS, cuyos resultados confirmaron la unión de la CD con la superficie de carbono. Se caracterizó electroquímicamente cada analito sobre el electrodo sin modificar con el fin de optimizar condiciones de trabajo, para esto se hicieron estudios de velocidad de barrido, pH y concentración. La respuesta de los electrodos modificados frente a los analitos azinfos-metil y carbarilo fue similar con todos los derivados de β -CD usados para modificar la superficie, aunque se obtuvo una mayor interacción con el derivado de β -CD monoamino (CDex-053). 4-nonilfenol presentó una mayor afinidad con la superficie modificada con el derivado de β -CD 7-amino (CDex-021). El tiempo de acumulación óptimo para que la interacción entre el analito y la superficie modificada presente una mayor corriente y, por ende sea más efectiva, fue de 40 minutos para carbarilo y 4-nonilfenol y de 20 minutos para azinfos-metil. Las constantes de asociación para todos los complejos fueron similares, con valores cercanos a 300 M^{-1} .

ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR OF GLASSY CARBON MODIFIED WITH β -CYCLODEXTRIN DERIVATIVES

SUMMARY

In the present report, the behavior of glassy carbon electrodes modified with β -cyclodextrin (β -CD) derivatives, having one or more terminal amino groups, against some analytes of interest such as pesticides (carbaryl and azinphos-methyl), and other used in the formulation of pesticides (4-nonylphenol) was studied. The electrodes were prepared by direct electrochemical oxidation of amino group present in the β -CD derivative. The modification was evaluated by cyclic voltammetry using electroactive ferricyanide mediator. The characterization of the electrodes was carried out by XPS, and the binding between CD and carbon surface was confirmed. The electrochemical behavior of each analyte on the unmodified electrode was performed in order to optimize working conditions for this study (scan rate, pH and concentration). The response of azinphos-methyl and carbaryl on modified electrodes is independent of β -CD derivatives used to modify the surface, although the biggest interaction is obtained using monoamino derivative (CDex-053). 4-nonylphenol showed higher affinity to surface modified with 7-amino β -CD derivative (CDex-021). The optimal accumulation time, where interaction between the analyte and the CD showed a higher current and there for is more effective, was 40 minutes for carbaryl and 4-nonylphenol and 20 minutes for azinphos-methyl. The association constants for all the complexes are similar, which are close to 300 M^{-1} .

***Dedicada a mis padres Doris y Danilo, mi sobrina Antonia
y a Cristian por su apoyo incondicional.***

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer con profundo cariño y aprecio a todas las personas que hicieron posible este momento. Gracias a mis padres Doris y Danilo, mi sobrina Antonia y mi pololo Cristian, por su gran amor, comprensión y apoyo que siempre me brindaron. A la familia Silva Ruz, por la fuerza que siempre me brindaron, por alentarme y darme energía para continuar. A mis perros, Simón Alexis y Princesa Anastasia por su amor incondicional.

Quisiera agradecer de manera especial a mi profesora guía Dra. Claudia Yáñez, por su disposición, paciencia y por darme la oportunidad de realizar mi unidad de investigación y memoria de título bajo su tutela. También a la Dra. Soledad Bollo por su buena voluntad y alegría.

Quiero agradecer también a mis compañeros del Laboratorio de Bioelectroquímica Elizabeth, Camila, Daniela, Paulina, Karina, MaryCarmen, Raúl, Julio, Pablo y Elías por todas las conversaciones, sugerencias, generosidad y apoyo que me brindaron. También a mis amigas de Ciencias quienes han sido fundamentales en mi desarrollo como estudiante, por su apoyo y comprensión.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS DE LA MEMORIA	19
2.1 Objetivo general.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Materiales y Equipos.....	20
3.2 Métodos.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5. CONCLUSIONES	67
6. REFERENCIAS	68

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Condiciones de trabajo para azinfos-metil, carbarilo y 4-nonilfenol.	29
Tabla II. Desplazamiento de la señal de reducción de azinfos-metil (ΔE_p) y razón de corrientes (% I_p) sobre el electrodo modificado con respecto al electrodo no modificado.	50
Tabla III. Desplazamiento de la señal de oxidación de carbarilo (ΔE_p) y razón de corrientes (% I_p) sobre el electrodo modificado con respecto al electrodo no modificado.	53
Tabla IV. Desplazamiento de la señal de oxidación de 4-nonilfenol (ΔE_p) y razón de corrientes (% I_p) sobre el electrodo modificado con respecto al electrodo no modificado.	56
Tabla V. Constantes de asociación para los complejos de inclusión pesticida- β -CD.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación del enlace α (1-4) de la ciclodextrina	12
Figura 2. A. Estructura química de la ciclodextrina (n= 6, 7 u 8, para α -CD, β -CD y γ -CD, respectivamente); B. Representación toroidal de la ciclodextrina donde se muestra el exterior hidrofílico y la cavidad hidrofóbica.	13
Figura 3. Estructuras químicas pesticidas A. Azinfos-metil; B. Carbarilo; C. 4-nonilfenol	16
Figura 4. VC de ferricianuro 1 mM en KCl 1 M a 100 mV/s en el GCE (negro) y en el GCE modificado con β -CD (rojo). A. CDex-021; B. CDex-013; C. CDex-053; D. CDex-012.	33
Figura 5. Estructuras de los derivados aminados de β -CD A. CDex-021; B. CDex-013; C. CDex-053; D. CDex-012.	33
Figura 6. Ruta para la modificación de la superficie de los electrodos de carbón vítreo con derivados aminados de β -CD.	34
Figura 7. A. Espectro XPS de superficies de carbono vítreo modificadas con los derivados aminados de β -CD, monoamino (CDex053) y 7-amino (CDex013). B. Espectro N 1s de carbono vítreo modificado con CDex013. C. Espectro N 1s de carbono vítreo modificado con CDex053.	36

Figura 8. Caracterización electroquímica de los pesticidas en una concentración de 0,07 mM a través de VC a 100 mV/s. A. Azinfos-metil en buffer Britton-Robinson (buffer B-R) pH 6; B. Carbarilo en buffer B-R pH 9; C. 4-nonilfenol en buffer B-R pH 5/etanol 70:30.	38
Figura 9. Curvas VC obtenidas para diferentes velocidades de barrido. A. Azinfos-metil 100 μ M en buffer B-R pH 6; B. Carbarilo 70 μ M en buffer Br-R pH 9; C. 4-nonilfenol 50 μ M en buffer B-R pH 5/etanol 70:30. D. Relación lineal entre $\log I_p$ versus $\log v$ para los tres analitos.	40
Figura 10. Curvas DPV obtenidas para diferentes pH del analito. A. Azinfos-metil 100 μ M en buffer B-R; B. Carbarilo 70 μ M en buffer B-R; C. 4-nonilfenol 50 μ M en buffer B-R /etanol 70:30; D. Relación lineal entre el potencial de pico (E_p) versus el pH de la solución.	43
Figura 11. Curvas DPV obtenidas para diferentes concentraciones de analito. A. Azinfos-metil en buffer B-R pH 6; B. Carbarilo en buffer B-R pH 9; C. 4-nonilfenol en buffer B-R pH 5 / etanol 70:30. D. Curva de calibración.	45
Figura 12: Caracterización electroquímica por VPD de azinfos-metil 70 μ M en buffer B-R pH 6 sobre electrodos modificados con derivados de β -CD. A. CDex-021; B. CDex-013; C. CDex-053; D. CDex-012.	49
Figura 13. Estudio tiempo de acumulación de azinfos-metil sobre GCE modificado con CDex-053.	51
Figura 14: Caracterización electroquímica por VPD de carbarilo 70 μ M en buffer B-R pH 9 sobre electrodos modificados con derivados de β -CD. A. CDex-021; B. CDex-013; C. CDex-053; D. CDex-012.	52

Figura 15. Estudio tiempo de acumulación de carbarilo sobre GCE modificado con CDex-053.	53
Figura 16: Caracterización electroquímica por DPV de 4-nonilfenol 70 μ M en buffer B-R pH 5/Etanol 70:30 sobre electrodos modificados con derivados de β -CD. A. CDex-021; B. CDex-013; C. CDex-053; D. CDex-012.	55
Figura 17. Estudio tiempo de acumulación de 4-nonilfenol sobre GCE modificado con CDex-021.	57
Figura 18. A. Curvas DPV de azinfos-metil obtenidas para diferentes concentraciones de β -CD en buffer B-R pH 6. B. Efecto de la concentración de β -CD sobre la corriente de pico de azinfos-metil.	59
Figura 19. Relación lineal entre $1/[\beta\text{-CD}]$ versus $1/I - (I/I_0)$ de azinfos-metil 70 mM.	59
Figura 20. VPD de la mezcla de carbarilo + 4-nonilfenol 30 y 40 μ M, respectivamente, en buffer B-R pH 9. A. GCE sin modificar; B. GCE modificado con CDex-053; C. GCE modificado con CDex-021.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

CD: Ciclodextrina

β -CD: beta-Ciclodextrina

VC: Voltametría cíclica

VPD: Voltametría de pulso diferencial

K_a: Constante de asociación

XPS: Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X

GCE: Glassy Carbon Electrode (Electrodo de carbono vítreo)

E_p: Potencial de pico

I_p: Corriente de pico

B-R: Britton Robinson (buffer)

1. INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas (CDs) son un grupo de oligosacáridos cíclicos producidos por la degradación bacteriana del almidón [1], unidas mediante enlaces α (1-4) (Figura 1). Las tres CDs nativas (α -, β -, y γ -CD) tienen 6, 7 y 8 subunidades de glucosa, respectivamente (Figura 2A).

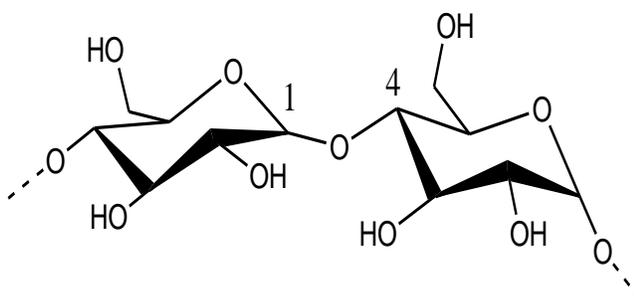


Figura 1. Representación del enlace α (1-4) de la ciclodextrina

Las ciclodextrinas poseen una estructura toroidal (Figura 2B), con una cavidad interior hidrofóbica compuesta por los oxígenos glucosídicos y los hidrógenos metilénicos, y una superficie hidrofílica debido a los hidroxilos en las posiciones 2, 3 y 6 [2].

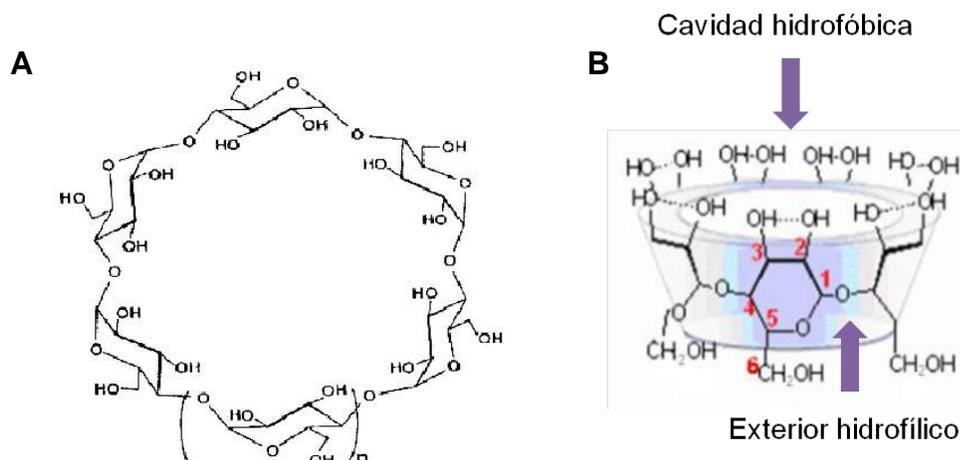


Figura 2. A. Estructura química de la ciclodextrina ($n= 6, 7$ u 8 , para α -CD, β -CD y γ -CD, respectivamente); **B.** Representación toroidal de la ciclodextrina donde se muestra el exterior hidrofílico y la cavidad hidrofóbica.

La característica más importante de las CDs es su capacidad para formar complejos de inclusión con moléculas hidrofóbicas de tamaño compatible con su cavidad [1]. La afinidad de unión entre la molécula de CD y el compuesto incluido, cuantitativamente descrito por la constante de asociación, K_a , está influenciada por las propiedades moleculares de la molécula huésped, así como de la CD utilizada [3].

La formación del complejo de inclusión es un proceso de equilibrio dinámico, donde no existe la formación de enlaces covalentes anfitrión-huésped. Con respecto a las fuerzas de enlace que rigen la interacción ciclodextrina-huésped, se han efectuado distintos estudios que consideran que las interacciones hidrofóbicas, dipolo-dipolo, fuerzas de Van der Waals y formación de puentes de hidrógeno [4-7], influyen en la formación de los complejos de inclusión.

Las CDs han ganado una significativa atención en la última década por la gran variedad de aplicaciones que poseen. Pueden ser utilizadas en la industria farmacéutica [8], agrícola, de alimentos, en formulaciones de cosméticos, complejos con moléculas hidrofóbicas, principalmente con pesticidas [9 - 11].

A nivel mundial, los pesticidas (clasificados en cuatro grandes grupos: herbicidas, fungicidas, insecticidas y bactericidas) se aplican para proteger los cultivos contra los insectos, malezas, hongos y otros parásitos y, por lo tanto, para maximizar el rendimiento agrícola. Sin estos compuestos químicos, no sería posible producir alimentos suficientes para satisfacer la demanda cada vez mayor de la población mundial.

Sin embargo, el uso excesivo de pesticidas puede resultar en la presencia de residuos en los productos agrícolas [12] y en el medio ambiente [13]. La persistencia de los plaguicidas en los alimentos y el medio ambiente es un riesgo para la salud humana y los ecosistemas. La presencia de residuos de pesticidas en el suelo es debido, en parte, a altas dosis y aplicaciones repetitivas para garantizar la eficacia, debido a que parte de ellos se puede perder por evaporación, hidrólisis o la inactivación por la humedad o por el contacto con el suelo, la degradación por la luz, etc.

Las estimaciones muestran que ~ 95 % de los plaguicidas aplicados llegan a un destino distinto de su sitio objetivo previsto, y en su lugar se acumulan en las aguas subterráneas, el suelo, las plantas, y los animales en el medio ambiente circundante [14].

El azinfos-metil (Figura 3A) es un plaguicida organofosforado no sistémico, muy utilizado para controlar una variedad de insectos en los cultivos alimentarios y no alimentarios, plantas ornamentales y árboles forestales. Este compuesto es uno de los más tóxicos insecticidas organofosforados, ya sea por inhalación, absorción dérmica, ingestión o contacto visual [15]. Al igual que todos los productos químicos organofosforados, azinfos-metil es un inhibidor de la colinesterasa, una enzima esencial para el adecuado funcionamiento del sistema nervioso.

El carbarilo (Figura 3B) fue el primer carbamato insecticida de éxito; es de amplio espectro y se utiliza para el control de más de 100 especies de insectos en los cultivos, en el césped, plantas ornamentales, árboles forestales e incluso en animales. El uso indiscriminado de carbarilo puede causar su bioacumulación en las fuentes de alimentos y agua, con la consiguiente bioconcentración a través de la cadena alimentaria. En los seres humanos, se ha observado que la exposición ocupacional aguda y crónica puede causar la inhibición de la colinesterasa y la reducción de la actividad de

la enzima en la sangre, dando lugar a efectos neurológicos, náuseas, vómitos, coma, insuficiencia respiratoria y muerte [16].

El 4-nonilfenol (Figura 3C) es un compuesto xenobiótico tóxico clasificado como un disruptor endocrino, capaz de interferir con el sistema hormonal de numerosos organismos. Se origina principalmente a partir de la degradación de los etoxilatos de nonilfenol, que son ampliamente utilizados como agentes tensioactivos industriales y en menor medida en pesticidas, resinas, etc. Recientemente, ha sido reconocido como un contaminante importante [17, 18], cuya bioacumulación en los órganos internos de los organismos que viven en el agua puede ser 10-1000 veces mayor que en el ambiente circundante [19]. En particular, debido a su potencial para perturbar el sistema endocrino, nonilfenol exhibe extrema toxicidad para los organismos incluso a bioacumulación moderada [20].

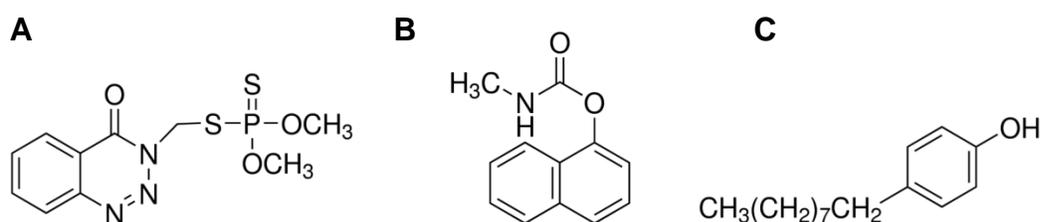


Figura 3. Estructuras químicas de pesticidas **A.** Azinfos-metil; **B.** Carbarilo; **C.** 4-nonilfenol.

Los límites máximos de residuos de pesticidas en muestras de alimentos, agua y vegetales están regulados por los organismos gubernamentales de la mayoría de los países. Por lo tanto, la determinación sensible y rápida de estos compuestos es importante para la protección del medio ambiente y de la salud humana. La mayoría de los métodos analíticos empleados para la determinación de estos analitos se han basado en técnicas cromatográficas utilizando diferentes sistemas de detección [21,22]. Estos métodos no permiten fácilmente un análisis continuo in situ y con frecuencia requieren varios pasos anteriores en la preparación de muestras, que incluyen una extracción y procedimiento de limpieza, con el fin de obtener un extracto final totalmente compatible con la determinación cromatográfica. Estas técnicas suelen generar desechos que contienen disolventes orgánicos, lo que hace el procedimiento más complicado y más caro. Métodos electroquímicos tienen la ventaja de bajo costo, alta sensibilidad, fácil manejo, la potencialidad para la miniaturización y automatización, construcción de dispositivos portátiles simples para fines de selección rápidos y con un control in situ [23].

Como los pesticidas están diseñados y elegidos para adherirse a los cultivos durante el riego y la lluvia, son altamente hidrofóbicos. Esta característica permite la formación de complejos de inclusión anfitrión-huésped con las CDs.

Con el fin de diseñar un sensor apropiado, el receptor macrocíclico necesita ser inmovilizado sobre una superficie adecuada, preferiblemente mediante unión covalente a fin de obtener una inmovilización sólida y duradera, que permita exponer la cavidad de la CD para la interacción con el analito. En nuestro laboratorio, se ha estado probando una ruta para inmovilizar derivados aminados de β -CD sobre carbono vítreo, basada en trabajos de aminas sobre carbono vítreo [24]. Sin embargo, la optimización de la ruta de inmovilización, el efecto de diferentes derivados aminados y la respuesta que estas superficies tienen frente a diferentes analitos, son algunos aspectos que están pendientes.

En este trabajo de memoria de título se estudió el comportamiento de electrodos de carbono vítreo modificados con derivados de β -ciclodextrina, que presentan uno o más grupos amino terminales. Los electrodos fueron preparados por una oxidación electroquímica simple y directa del grupo amino presente en el derivado de CD. La modificación se evaluó mediante voltametría cíclica (VC) haciendo uso del mediador electroactivo ferricianuro. La caracterización de los electrodos fue realizada mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS). Además se estudió la respuesta de los electrodos de carbono vítreo modificado con CD, frente al comportamiento electroquímico de algunos analitos de interés, como pesticidas, carbarilo y azinfos-metil, y otro utilizado en la formulación de pesticidas, tal como, 4-nonilfenol.

2. OBJETIVOS DE LA MEMORIA

2.1 OBJETIVO GENERAL

Modificar electrodos de carbono vítreo utilizando diferentes derivados aminados de β -CD, siguiendo una ruta optimizada y evaluar la respuesta de diferentes modificaciones frente a algunos analitos de interés.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar electrodos de carbono vítreo utilizando diferentes derivados aminados de β -CD y evaluar la modificación utilizando el mediador redox ferricianuro.
- Caracterizar la superficie modificada utilizando espectroscopía de fotoelectrones de rayos X.
- Evaluar el comportamiento electroquímico de los analitos azinfos-metil, carbarilo y 4-nonilfenol sobre electrodos de carbono vítreo sin modificación.
- Estudiar la respuesta de los electrodos modificados frente a los analitos en estudio.
- Estudiar las interacciones de los complejos de inclusión de cada analito con la β -CD, por medio de las constantes de asociación.
- Estudiar el comportamiento de los electrodos modificados en mezclas de analitos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y equipos

➤ Reactivos y solventes

- Hexacianoferrato (III) de potasio, Merck
- β -ciclodextrina, Merck
- 6-monodesoxi-6-monoamino- β -ciclodextrina (**CDex-053**), AraChem
- Heptakis-(2,3-di-O-metil-6-amino-6-deoxi)- β -ciclodextrina (**CDex-021**), AraChem
- Heptakis-(6-amino-6-deoxi)- β -ciclodextrina (**CDex-013**), AraChem
- Heptakis-(6-aminometil-6-deoxi)- β -ciclodextrina (**CDex-012**), AraChem
- Azinfos-metil PESTANAL®, SIGMA-ALDRICH
- Carbarilo PESTANAL®, SIGMA-ALDRICH
- 4-nonilfenol PESTANAL®, SIGMA-ALDRICH
- Cloruro de potasio, Merck
- Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado, Merck
- Ácido sulfúrico 95-97 % Merck
- Ácido bórico, Merck
- Ácido ortofosfórico 85 % Merck
- Ácido acético glacial 100 % Merck
- Hidróxido de sodio (pellets) p.a, Merck
- Ácido clorhídrico 36 % p.a, Merck

- Etanol absoluto 99,8 % p.a Merck
- Acetona p.a Merck
- Alúminas de 0,3 y 0,05 μm , BUEHLER
- Nitrógeno extra puro 99,9 % AGA Chile S.A.
- Agua pureza Milli-Q (18,2 M Ωcm)

➤ **Material de vidrio**

- Todo el material de vidrio utilizado fue de clase A

➤ **Equipos**

Equipos de uso general

- Balanza de precisión, Precisa 40 SM-200, sensibilidad 0,01 mg
- Balanza granataria PJ Precisa Junior 500C (sensibilidad 1 mg)
- Medidor de pH WTW modelo pMx3000
- Sistema purificador de agua Milli-Q Ultra-Pure Water System

Sistema electroquímico

- Analizador voltamétrico BAS CV-50W
- Sistema computacional BIOANALYTICAL SYSTEMS CV-50W versión 7.4 para adquisición y tratamiento de datos.

- Celda electroquímica:
 - Celda electroquímica (10 mL)
 - Electrodo de trabajo: Carbono vítreo
 - Electrodo de referencia: Ag/AgCl
 - Electrodo auxiliar: Alambre de platino

Sistema de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)

Los datos de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) se registraron con un analizador Phoibos 150, equipado con nueve channeltrons y con radiación no-monocromática de Mg K α , bajo una presión base en el espectrómetro superior a 5×10^{-10} torr. Los espectros fueron adquiridos utilizando un paso de energía constante de 20 eV, y las energías de enlace son de una precisión de $\pm 0,2$ eV.

3.2 Métodos

➤ Preparación de soluciones

- **Solución Buffer Britton-Robinson (buffer B-R)**

Para preparar el buffer 0,1 M se agregaron 3,09 g de ácido bórico a un matraz de 500 mL y se adicionó suficiente agua hasta disolverlo, luego bajo campana se agregó 3,37 mL de ácido ortofosfórico y 2,86 mL ácido acético glacial, finalmente se aforó con agua Milli-Q. El pH se ajustó adicionando pequeñas alícuotas de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, según corresponda.

- **Solución Buffer fosfato**

Se preparó una solución de buffer fosfato 0,1 M pH 7, en donde se agregaron 7,098 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado a un matraz de 500 mL, se aforó con agua Milli-Q y finalmente se ajustó el pH adicionando pequeñas alícuotas de ácido ortofosfórico.

- **Solución stock de pesticidas**

El stock de cada pesticida se preparó en una concentración de 10 mM en un eppendorf ámbar de 2 mL y se aforó con acetona para azinfos-metil y con etanol para carbarilo y 4-nonilfenol. Las soluciones stock se mantuvieron refrigeradas a 5 °C.

- **Solución de pesticidas en Buffer Britton-Robinson**

- **Azinfos-metil**

Se tomó una alícuota de solución stock de azinfos-metil, se agregó a un matraz de 10 mL y se aforó con buffer Britton-Robinson pH 6.

- **Carbarilo**

Se tomó una alícuota de la solución stock de carbarilo, se agregó a un matraz de 10 mL y se adicionó 6,3 mL de buffer Britton-Robinson pH 12, se agitó y se dejó por 10 min. Transcurrido este tiempo, se aforó con buffer Britton-Robinson pH 1,71 obteniendo un pH 9 en la solución.

- **4-nonilfenol**

Se tomó una alícuota de la solución stock de 4-nonilfenol, se agregó a un matraz de 10 mL y se adicionó un volumen de etanol tal que la solución tenga un 30 % de etanol, luego se aforó con buffer Britton-Robinson pH 5. La solución contiene buffer Britton-Robinson pH 5 / etanol 70:30.

- **Solución de β -ciclodextrina**

Se masaron cantidades crecientes de β -CD para obtener concentraciones de 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 12 mM, las cuales se agregaron a 10 mL de solución de trabajo de azinfos-metil en buffer Britton-Robinson pH 6.

- **Solución de los derivados aminados de β -ciclodextrina**

Se preparó una solución para cada uno de los derivados aminados de β -ciclodextrina (CDexB-012, CDexB-013, CDexB-021 CDexB-053) en una concentración de 3 mM en buffer fosfato 0,1 M pH 7 en eppendorf ámbar de 2 mL. Se almacenaron refrigerados a 5°C.

- **Solución de Cloruro de potasio**

Se preparó una solución 1 M, para esto se agregó 37,27 g de KCl a un matraz de 500 mL y se aforó con agua Milli-Q.

- **Solución de hexacianoferrato (III) de potasio**

Se preparó una solución de concentración 1 mM, agregando 0,016 g de hexacianoferrato (III) a un matraz de 50 mL y se aforó con KCl 1 M.

- **Solución de ácido sulfúrico**

Se preparó una solución 0,1 M, para esto se agregó 2,81 mL de H₂SO₄ a un matraz de 500 mL y se aforó con agua Milli-Q.

➤ **Estudio electroquímico**

• **Modificación de superficies de carbón vítreo**

Para modificar la superficie del electrodo de carbono vítreo (GCE) con derivados de β -CD se utilizaron 3 celdas electroquímicas perfectamente equipadas. La primera celda contiene una solución de ácido sulfúrico 0,1 M, la segunda celda contiene buffer fosfato 0,1 M y la tercera contiene el derivado de β -CD. Es importante burbujear con N_2 extra puro cada solución por 10 minutos aproximadamente. El protocolo para modificar superficies se muestra a continuación:

1. El electrodo de trabajo de carbono vítreo se limpió de la siguiente manera: se pule en un paño para pulido con alúmina 0,3 micras y posteriormente con alúmina 0,05 micras. Después de la limpieza, se enjuaga el electrodo con abundante agua Milli-Q.
2. El GCE se sumerge en la primera celda que contiene una solución de ácido sulfúrico 0,1 M, donde se realizan 2 VC partiendo de un potencial inicial de -800 mV hasta un potencial final de 1000 mV, con una velocidad de barrido de 100 mV/s y una sensibilidad de 10 μ A/V. Luego se limpia el electrodo (clean electrode) aplicando un potencial de 800 mV por 5 segundos, 2 veces.

3. El GCE se sumerge en una segunda celda que contiene buffer fosfato 0,1 M pH 7, se realiza un VC partiendo de un potencial inicial de 0 mV hasta un potencial final de 1000 mV, con una velocidad de barrido de 100 mV/s y una sensibilidad de 10 μ A/V. Posteriormente se realizan 2 VC partiendo de un potencial inicial de 200 mV hasta un potencial final de 1400 mV, una velocidad de barrido de 10 mV/s y una sensibilidad de 1 μ A/V.

4. El GCE se sumerge en una tercera celda que contiene un derivado aminado de β -CD CDexB-012 (7-amino), CDexB-013 (7-amino), CDexB-021 (7-amino) y CDexB-053 (monoamino) en una concentración 3 mM en buffer fosfato pH 7. Se realizan 2 VC partiendo de un potencial inicial de 200 mV hasta un potencial final de 1400 mV, una velocidad de barrido de 10 mV/s y una sensibilidad de 1 μ A/V. Durante la medición se agita suavemente la solución utilizando un agitador magnético.

5. Finalmente el GCE se sumerge en una cuarta celda que contiene una solución que permita evaluar el porcentaje de recubrimiento, como por ejemplo, ferricianuro o bien estudiar la interacción con un analito, como los pesticidas.

- **Evaluación de la modificación de la superficie de carbono vítreo**

La modificación se evaluó mediante voltametría cíclica haciendo uso del mediador electroactivo ferricianuro. Este resultado se comparó con el comportamiento del mediador sobre el electrodo sin modificar. Para esto se preparó una solución 1 mM de ferricianuro en buffer fosfato 0,1 M pH 7. La celda electroquímica está formada por un electrodo de trabajo de carbono vítreo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de alambre de platino. Antes de cada medición, la solución de trabajo se burbujeó con N₂ extra puro por 10 minutos. El electrodo de trabajo sin modificación se pulió con alúminas de 0,3 y 0,05 μm. Se realizó un barrido desde un potencial inicial de 600 mV hasta un potencial final de -100 mV con una velocidad de barrido de 100 mV/s.

- **Caracterización de los electrodos modificados**

La caracterización de los electrodos fue realizada mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) en el Instituto de "Rocasolano" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, España, a través de la colaboración que mantiene la Dra. Claudia Yáñez con el Dr. José Francisco Marco.

- **Caracterización electroquímica de los pesticidas**

Para evaluar la respuesta de los electrodos modificados frente a los analitos, primero es necesario realizar un estudio electroquímico de cada analito sobre el electrodo de carbono vítreo sin modificar. El estudio se llevó a cabo mediante voltametría cíclica (VC) y voltametría de pulso diferencial (VPD). Las condiciones de barrido de potencial para los pesticidas según cada técnica se muestran en la tabla I.

Pesticida	DPV	VC
Azinfos-metil	$E_i = -400; E_f = -1200 \text{ mV}$	$E_i = -400; E_f = -1200 \text{ mV}$
Carbarilo	$E_i = -300; E_f = 900 \text{ mV}$	$E_i = -400; E_f = 800 \text{ mV}$
4-nonilfenol	$E_i = 100; E_f = 1000 \text{ mV}$	$E_i = -400; E_f = 1000 \text{ mV}$

Tabla I. Condiciones de trabajo para azinfos-metil, carbarilo y 4-nonilfenol.

Para estos tres pesticidas se estudiaron los siguientes efectos:

a) Efecto de la velocidad de barrido

Se preparó una solución de trabajo a una concentración y pH determinado (dependiendo de cada pesticida), y por medio de voltametría cíclica se varió la velocidad de barrido entre 25 y 1000 mV/s.

b) Efecto del pH

Se preparó una solución de trabajo a una concentración determinada (dependiendo de cada pesticida), y por medio de voltametría de pulso diferencial se estudió el efecto del pH sobre el potencial de pico (E_p).

El pH se ajustó directamente en la celda electroquímica agregando pequeñas alícuotas de HCl o NaOH concentrados, según corresponda.

a) Efecto de la concentración

Se prepararon soluciones de diferente concentración entre 20 y 100 μM . El estudio se realizó mediante voltametría de pulso diferencial.

- **Estudio de la respuesta de los electrodos modificados frente a los analitos**

Se estudió el efecto de la modificación con los distintos derivados aminados de β -CD para todos los analitos. También se llevó a cabo un estudio con tiempo de acumulación a circuito abierto, ya que la acumulación del analito sobre la superficie del electrodo modificado puede aumentar la concentración de éste, amplificando la señal electroquímica.

- **Determinación de la constante de asociación**

Con el fin de relacionar las respuestas de los electrodos modificados con las interacciones que ocurren entre el pesticida y la β -CD, es necesario realizar un estudio del efecto de la concentración de la ciclodextrina sobre la corriente de pico del analito en solución y así poder determinar la constante de asociación.

Este estudio se realiza solo para azinfos-metil, ya que para carbarilo y 4-nonilfenol las constantes están informadas en la literatura.

Se preparó, a partir de la solución stock de azinfos-metil, 100 mL de una solución de trabajo de concentración 70 mM en buffer Britton-Robinson 0,1M a pH 6. Se tomaron alícuotas de 10 mL de esta solución y se pesaron cantidades crecientes de β -CD hasta obtener concentraciones de 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 12 mM. Se agitó cada solución por 15 minutos a temperatura ambiente, luego se dejó reposar por 20 minutos, se burbujeó por 10 minutos con N_2 extra puro y finalmente fueron medidas mediante VPD.

A partir de los valores de corriente en función de la concentración de CDs, es posible obtener las constantes de asociación del complejo de inclusión β -CD-azinfos-metil, mediante la siguiente relación:

$$\frac{1}{[CD]} = K_a \frac{(1-A)}{1 - \frac{I}{I_0}} - K_a \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

K_a = constante de asociación

I_0 = corriente de pico en ausencia de CD

I = corriente de pico en presencia de CD

A = factor de proporcionalidad

$[CD]$ = concentración molar de CDs

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de los electrodos de carbono vítreo modificados con diferentes derivados aminados de β -CD

La superficie de carbono vítreo fue modificada con cuatro derivados aminados de β -CD: CDexB-013, CDexB-021, CDexB-012 y CDexB-053. El protocolo de modificación de superficies del GCE con CDs descrito anteriormente fue optimizado previamente, en un trabajo de Unidad de Investigación Electiva.

En una primera etapa, el electrodo de carbono vítreo se sometió a un número de ciclos de potencial en medio ácido, con el fin de activar los grupos carboxílicos presentes en la superficie. Luego, la superficie se modificó mediante la formación de un enlace covalente entre un derivado aminado de β -CD y la superficie oxidada del electrodo de carbono vítreo, por electro-oxidación directa del grupo amino [24]. De esta manera, los derivados aminados de CDs estarían unidos a la superficie covalentemente.

En la figura 4 se ha representado esquemáticamente el proceso para una de las CDs que posee un solo grupo amino en su estructura, CDex-053. Las otras CDs (CDex-021, CDex-013 y CDex-012) poseen 7 grupos amino disponibles para unirse covalentemente a la estructura. La diferencia entre estas tres radica en la naturaleza de los grupos ubicados en la parte ancha de la estructura de la CD (Figura 5) y en el número de carbonos unidos al grupo

amino. Así, la CDex-021 posee grupos metoxilo en la parte ancha de la CD en lugar de grupos hidroxilo, y CDex-012 posee un grupo metileno más que las otras.

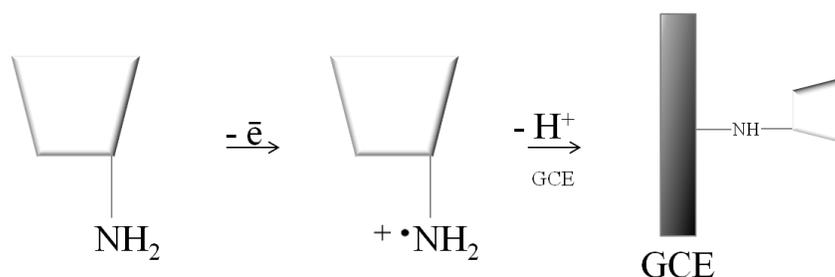


Figura 4. Ruta para la modificación de la superficie de los electrodos de carbono vítreo con derivados aminados de β -CD [24].

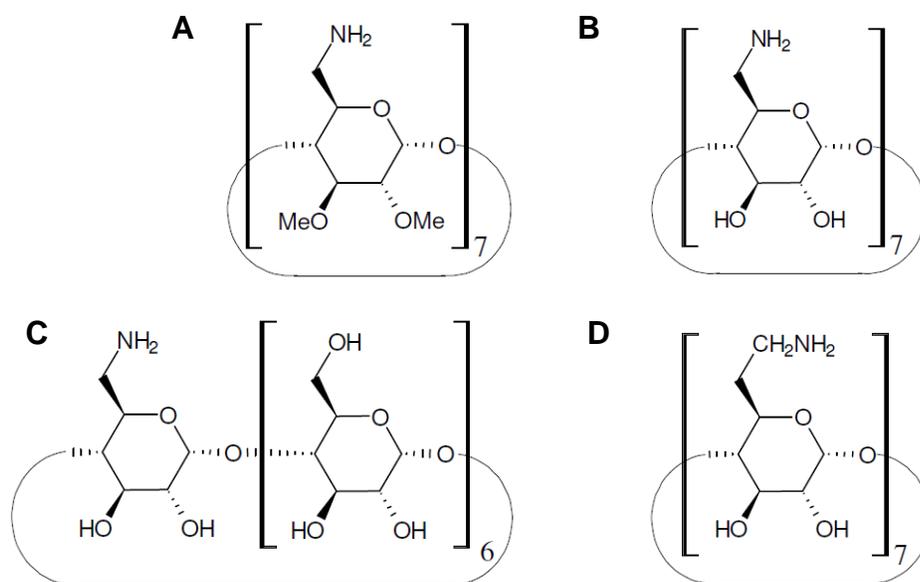


Figura 5. Estructuras de los derivados aminados de β -CD **A.** CDex-021; **B.** CDex-013; **C.** CDex-053; **D.** CDex-012.

Para evaluar la superficie modificada se utilizó la reacción del ferricianuro como mediador redox, puesto que no forma complejos de inclusión con CDs.

De esta manera, cuando la superficie está modificada con CD, la intensidad de corriente del par redox disminuye. En la figura 6 se muestran los voltamogramas cíclicos de ferricianuro sobre GCE sin modificar y sobre GCE modificado con las distintas CDs.

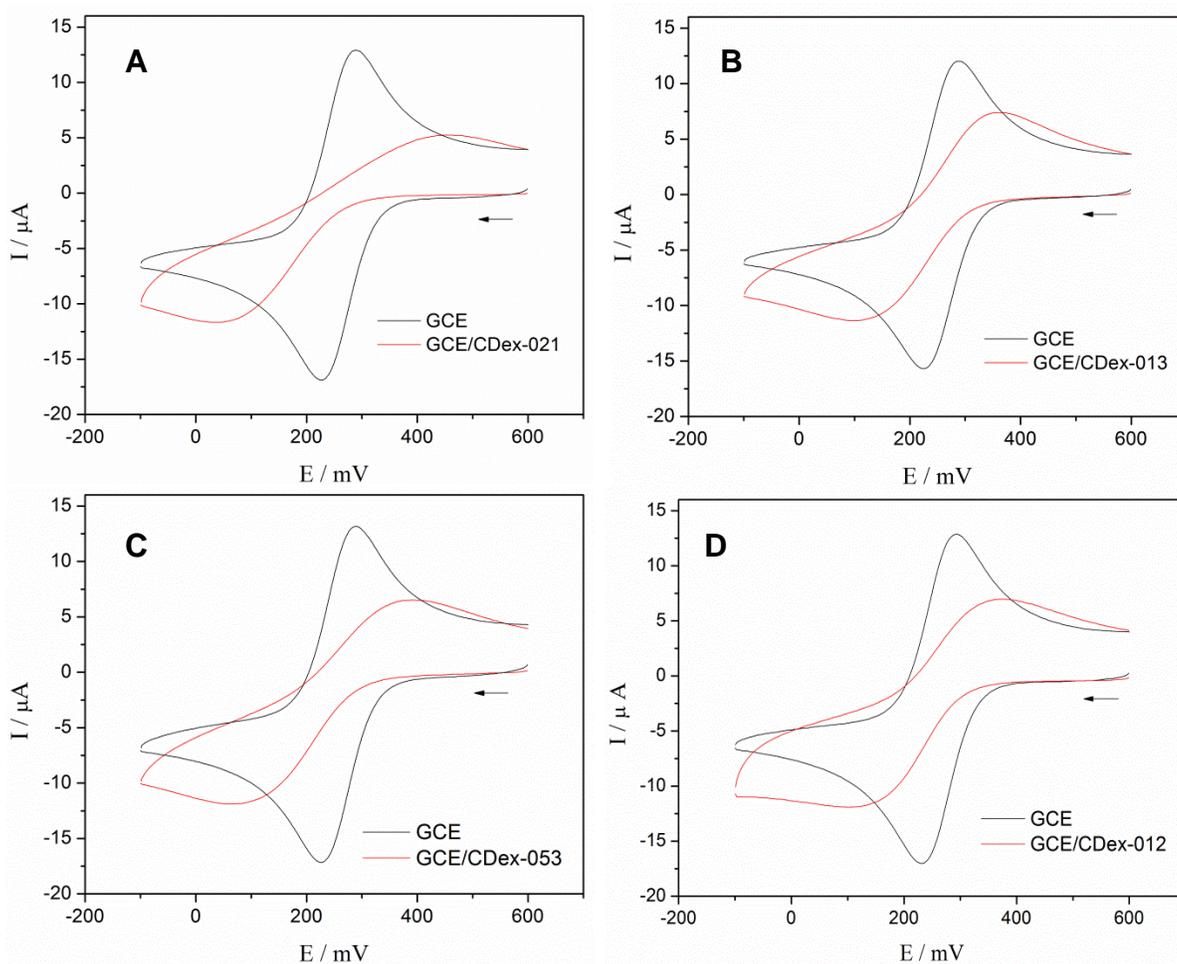


Figura 6. VC de ferricianuro 1 mM en KCl 1 M a 100 mV/s en el GCE (negro) y en el GCE modificado con β -CD (rojo). **A.** CDex-021; **B.** CDex-013; **C.** CDex-053; **D.** CDex-012.

Cuando el ferricianuro reacciona sobre el GCE se obtiene una señal del par redox muy bien resuelta con un pico de reducción a 233 mV y un pico de oxidación a 293 mV. La diferencia de potenciales de pico (ΔE_p) es 60 mV, característica de un proceso monoelectrónico reversible. Cuando la superficie está modificada, la señal del ferricianuro cambia, se observa una disminución de las corrientes de pico y un cambio en los potenciales de pico, el proceso deja de ser reversible. En la figura 6 se puede observar que en general, todas las CDs estudiadas tienen un comportamiento similar al ser evaluadas con el mediador ferricianuro.

Dado que el ferricianuro no forma complejos de inclusión con las CDs, y estos macrociclos están inmovilizados sobre la superficie del electrodo, la superficie tendrá expuestos menos sitios para que la reacción redox de ferricianuro tenga lugar, lo que conlleva a una disminución de la corriente y a un corrimiento en los potenciales de oxidación y reducción del mediador.

Esta primera observación estaría indicando que efectivamente a la superficie del electrodo ha sido modificada con CDs, ya que la señal de mediador cambia cuando están presentes las CDs.

4.2 Caracterización de los electrodos modificados con β -CD

La modificación de las superficies fue verificada mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS). En la figura 7 se observa el espectro XPS general para dos superficies de carbono vítreo modificadas con CDs, conteniendo 1 ó 7 grupos amino.

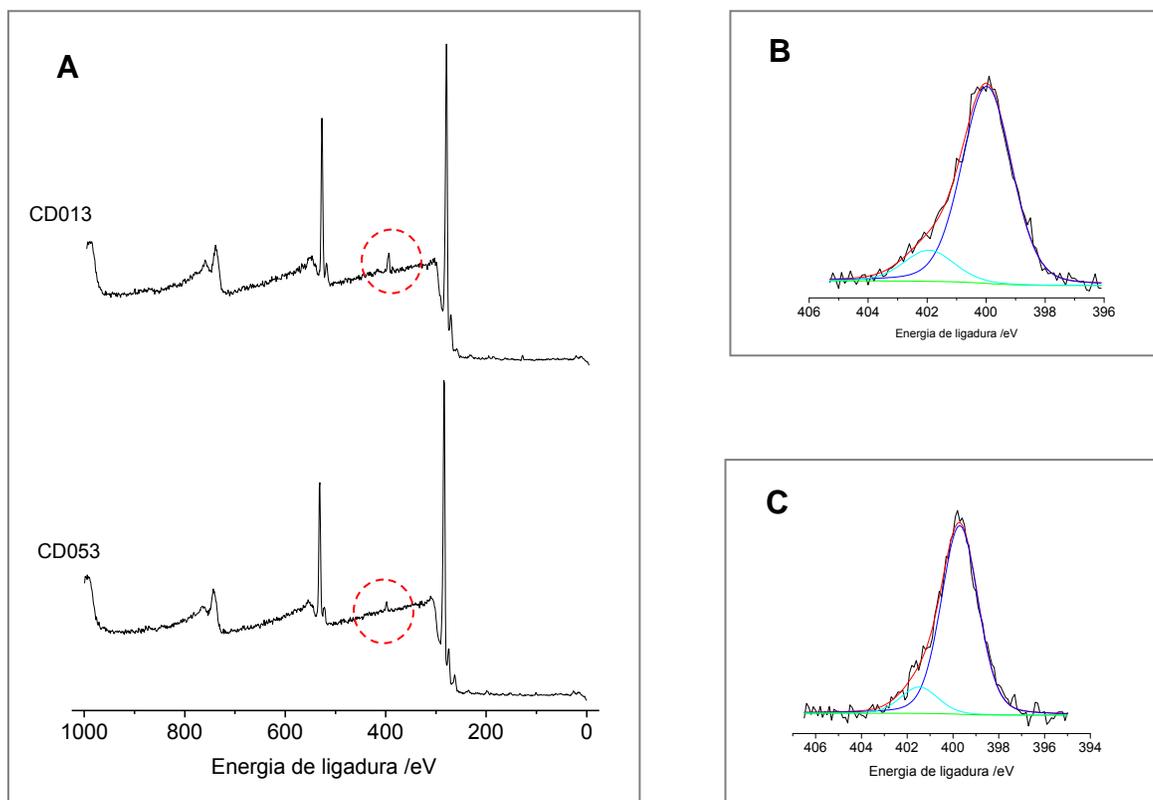


Figura 7. A. Espectro XPS de superficies de carbono vítreo modificadas con los derivados aminados de β -CD, monoamino (CDex053) y 7-amino (CDex013). **B.** Espectro N 1s de carbono vítreo modificado con CDex013. **C.** Espectro N 1s de carbono vítreo modificado con CDex053.

En la figura 7A se observan dos señales intensas centradas en 285 y 532 eV correspondientes a carbono y oxígeno, respectivamente. Una señal de baja intensidad centrada en 400 eV se observa en ambos espectros, que corresponde a nitrógeno. Un análisis de las señales indica que la contribución de carbono es 81 y 78 % para las muestras monoamino y 7-amino, respectivamente. Asimismo, la contribución de oxígeno 17,4 y 18,8 %, respectivamente. Es esperable que estas contribuciones de carbono y oxígeno sean grandes, considerando el número de átomos en cada estructura de CD. Además, la superficie es carbono y algo de oxígeno adicional se encuentra debido a CO₂ que está presente, como contaminante, a pesar de la condición de ultra alto vacío en que se realizan los experimentos.

Las figuras 7 B y C muestran el espectro de nitrógeno (N 1s) registrado para las superficies modificadas. Esta señal tiene dos contribuciones. La mayor apareciendo a 399,8 eV es característica de nitrógeno amida, lo que da cuenta de la unión de la ciclodextrina con los grupos carboxílicos de la superficie. La contribución a 401,5 eV de menor intensidad se asocia con amonio cuaternario, que podría ser producto del tratamiento electroquímico aplicado para modificar la superficie.

La modificación con el derivado 7-amino presentó un 3,2 % de nitrógeno, mientras que la superficie modificada con mono-amino mostró un 1,6 %. De esta manera, una cantidad mayor de nitrógeno se encontró en la muestra 7-amino. Dadas las intensidades de las señales y las limitaciones de la técnica, la diferencia de los porcentajes de nitrógeno observada se relaciona de manera adecuada con la diferencia de átomos de nitrógeno presentes en cada molécula. Estos resultados confirman la unión de las CDs con la superficie.

4.3 Caracterización electroquímica de los pesticidas

Se estudió el comportamiento electroquímico de los tres analitos sobre el electrodo de carbono vítreo sin modificar, con el objetivo de definir las condiciones adecuadas para realizar el posterior estudio con los electrodos modificados. Se utilizó voltametría cíclica (VC) y voltametría de pulso diferencial (VPD) y se realizaron experimentos variando la velocidad de barrido, el pH y la concentración. Los voltamogramas cíclicos de azinfos-metil, carbarilo y 4-nonilfenol, con sus respectivos blancos se muestran en la figura 8

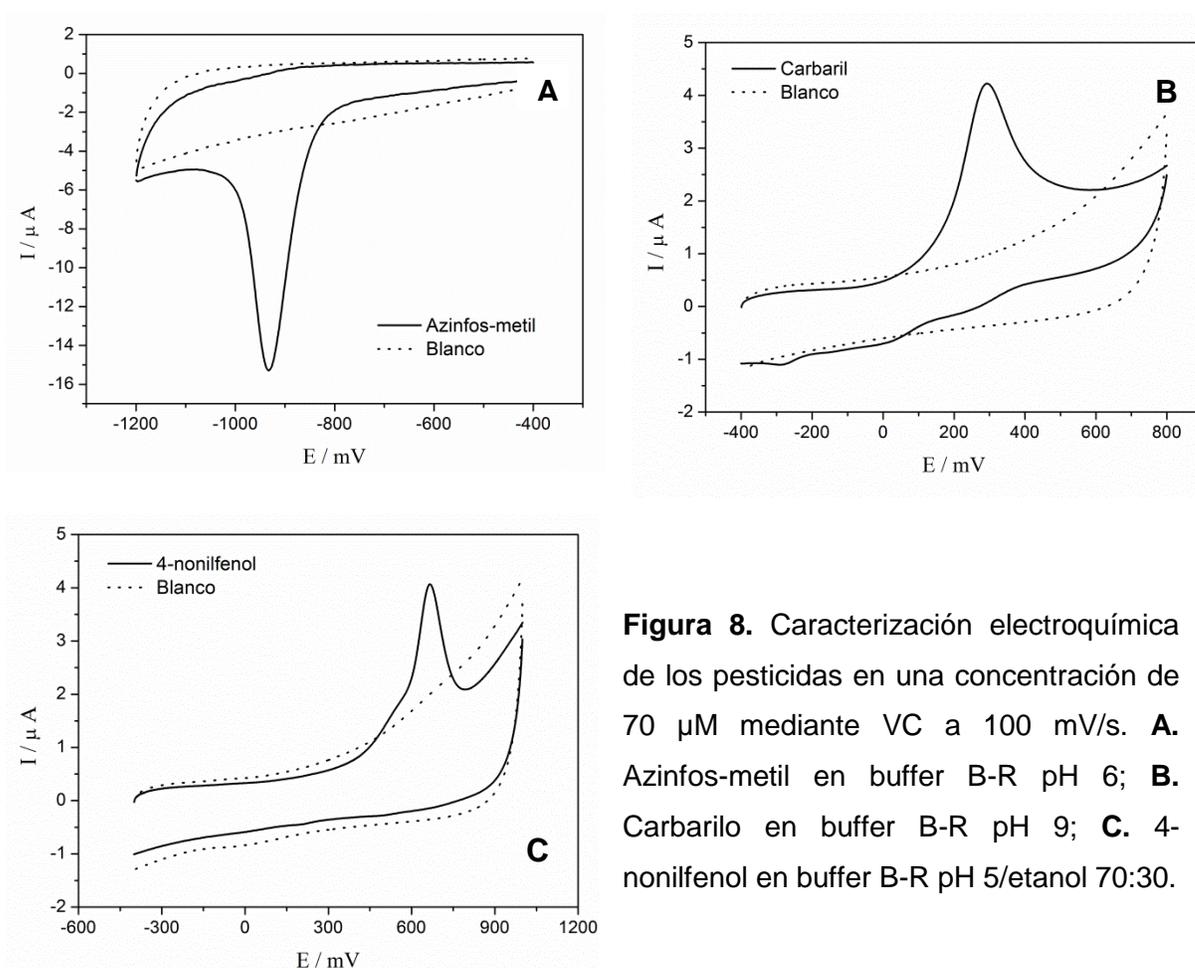


Figura 8. Caracterización electroquímica de los pesticidas en una concentración de 70 μM mediante VC a 100 mV/s . **A.** Azinfos-metil en buffer B-R pH 6; **B.** Carbarilo en buffer B-R pH 9; **C.** 4-nonilfenol en buffer B-R pH 5/etanol 70:30.

En la figura 8A se observa una única señal de reducción para el compuesto azinfos-metil sobre el GCE a un potencial cercano a los -930 mV. Para el compuesto carbarilo (figura 8B), se observa una única señal de oxidación sobre el GCE a un potencial cercano a los 300 mV. Lo mismo ocurre para el compuesto 4-nonilfenol (figura 8C), donde existe una única señal de oxidación sobre el GCE a un potencial cercano a los 600 mV. En todos los casos no se observa una señal en el barrido inverso, por lo que son procesos de transferencia electrónica irreversibles.

a) Estudio de velocidad

Mediante VC se evaluó el efecto de la velocidad de barrido sobre la señal de cada uno de los analitos. La velocidad de barrido se varió entre 25 y 1000 mV/s. Con los valores obtenidos de la corriente de pico a distintas velocidades es posible determinar si el proceso está controlado por difusión o por adsorción. En la figura 9 se observan los voltamogramas de los 3 analitos a distintas velocidades de barrido.

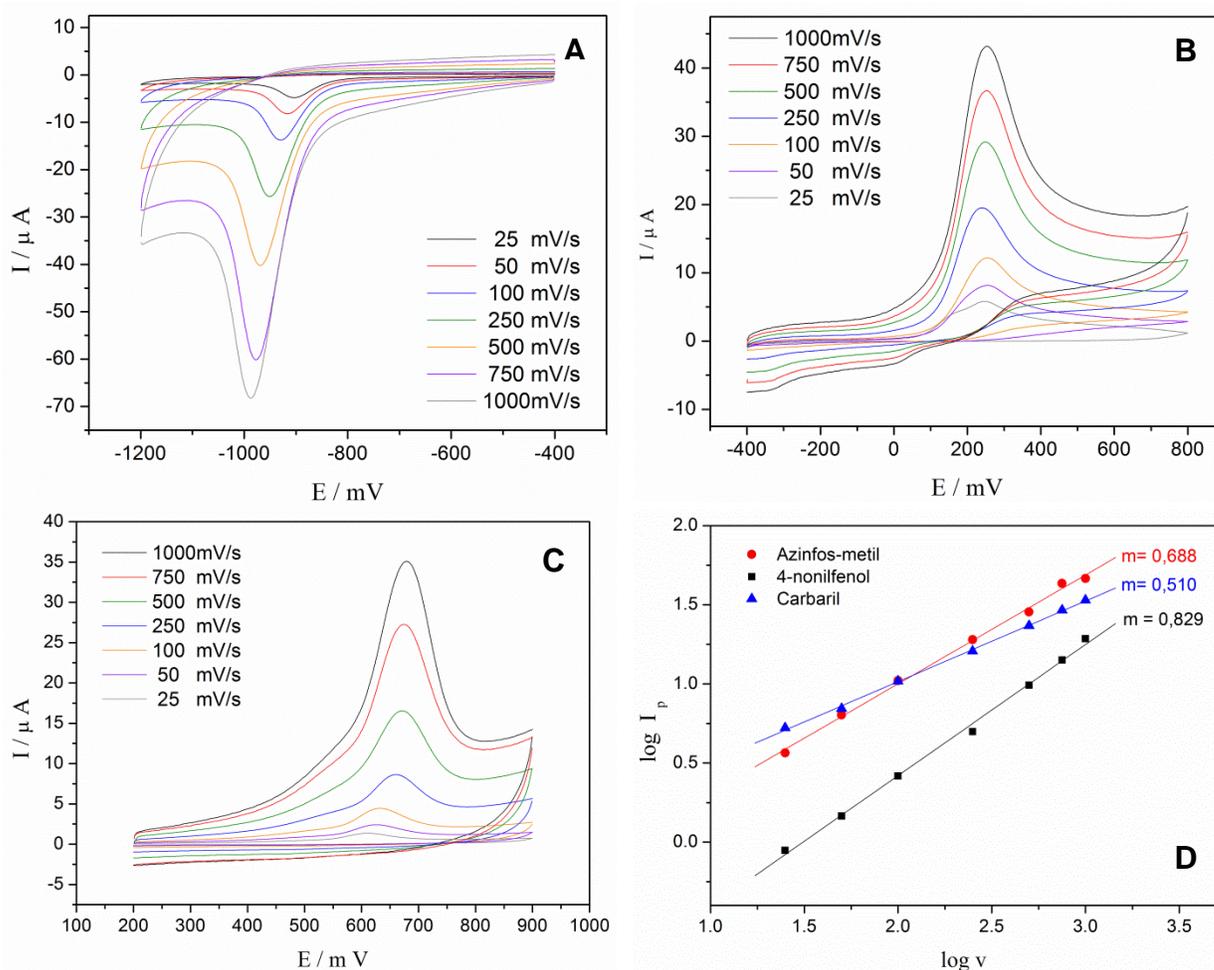


Figura 9. A. Azinfos-metil 100 μM en buffer B-R pH 6; **B.** Carbarilo 70 μM en buffer B-R pH 9; **C.** 4-nonilfenol 50 μM en buffer B-R pH 5/etanol 70:30. **D.** Relación lineal entre $\log I_p$ versus $\log v$ para los tres analitos.

Para todos los analitos, la corriente de oxidación o reducción, según sea el caso, aumenta con el aumento de la velocidad de barrido. En la figura 9D se muestra la relación logarítmica entre la corriente de pico y la velocidad de barrido para los 3 analitos estudiados. Para todos se obtuvo una relación lineal (azinfos: $\log I_p = -0,374 + 0,688 \log v$ ($R^2 = 0,998$); carbarilo: $\log I_p = -0,005 + 0,510 \log v$ ($R^2 = 0,999$); 4-nonilfenol: $\log I_p = -1,238 + 0,829 \log v$ ($R^2 = 0,998$)).

Cuando el comportamiento es irreversible, se tienen las siguientes ecuaciones que representan procesos controlados por difusión y adsorción, respectivamente.

$$I_p = 2,99 * 10^5 * n * (\alpha * n_a)^{1/2} * A * D^{1/2} * C^0 * v^{1/2} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$I_p = 2,99 * 10^5 * n * (\alpha * n_a)^{1/2} * A * D^{1/2} * C^0 * v \quad \text{Ecuación 3}$$

I_p = intensidad de pico, [A]

n = número de electrones transferidos finales

α = coeficiente de transferencia

n_a = número de electrones transferidos antes de la etapa determinante.

A = área del electrodo, [cm²]

D_0 = coeficiente de difusión, [cm²/s]

C = concentración, [mol/cm³]

v = velocidad de barrido, [V/s]

Al hacer una relación logarítmica y aplicando el diferencial a las ecuaciones con respecto a la velocidad de barrido, es posible encontrar el valor de la pendiente para el proceso en estudio. Así, si la pendiente es igual a 0,5 el proceso está controlado por difusión y si la pendiente es igual a 1,0 el proceso está controlado por adsorción.

Para este estudio, el proceso de oxidación de carbarilo está controlado por difusión ($m = 0,510$). Para el proceso de reducción de azinfos y oxidación de 4-nonilfenol se obtienen valores de pendiente intermedios ($m = 0,688$ y $m = 0,829$, respectivamente), por lo que se habla de procesos con control mixto: difusión y adsorción.

b) Estudio de pH

El efecto del pH de la solución en la reducción de azinfos y oxidación de carbarilo y 4-nonilfenol se investigó mediante VPD. El pH se ajustó directamente en la celda agregando pequeñas alícuotas de NaOH o HCl, según corresponda. En la figura 10 se observan los voltamogramas de pulso diferencial de los 3 analitos al variar el pH de la solución de trabajo.

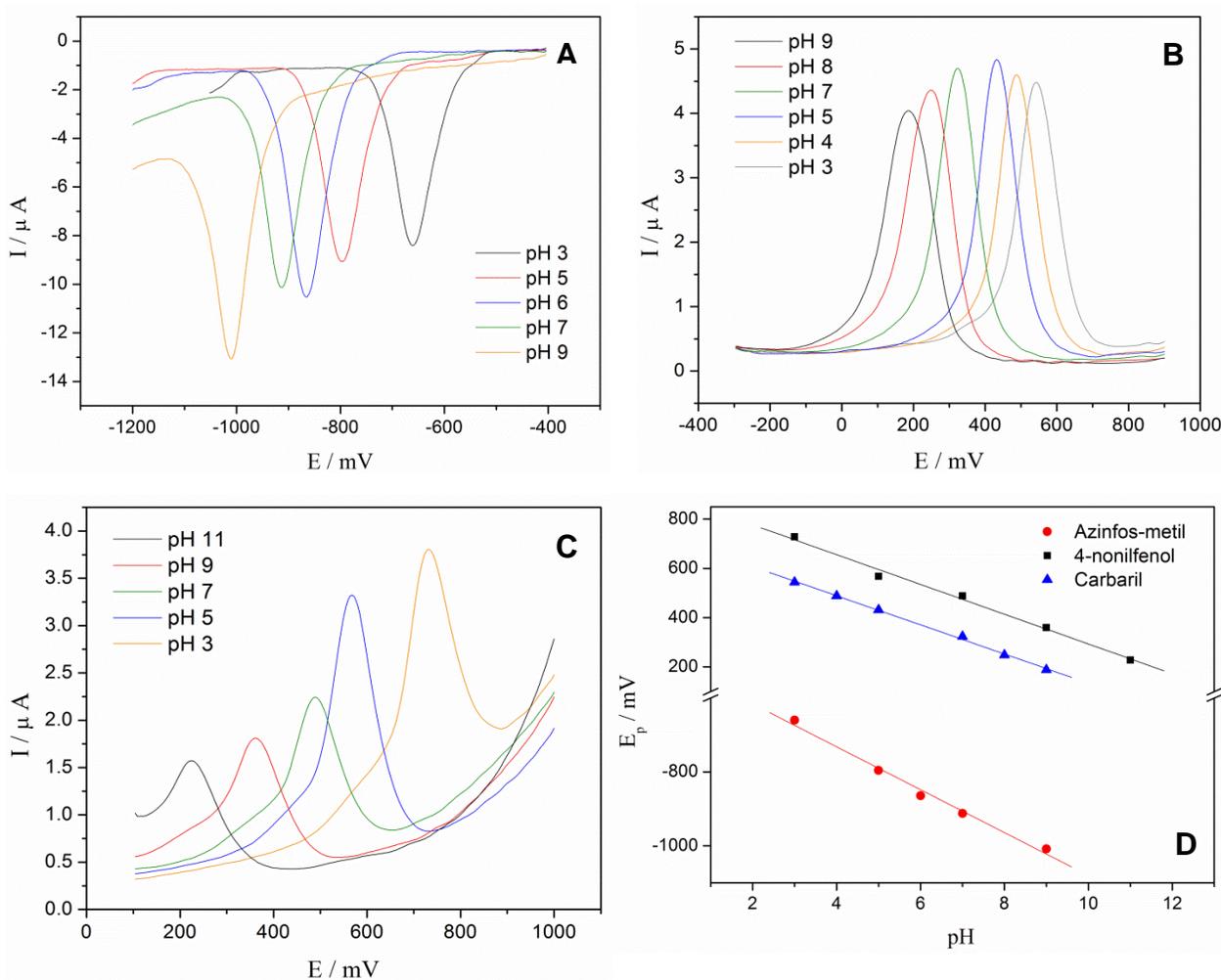


Figura 10. Efecto del pH sobre la respuesta VPD de **A.** Azinfos-metil 100 μM en buffer B-R. **B.** Carbarilo 70 μM en buffer B-R. **C.** 4-nonilfenol 50 μM en buffer B-R/etanol 70:30. **D.** Relación lineal entre el E_p versus el pH de la solución.

Para azinfos-metil (fig. 10A) se observa que a medida que aumenta el pH (en un rango de 3 a 9), la señal de reducción se desplaza hacia potenciales más negativos. En general, la intensidad de la señal se mantiene relativamente constante.

Para carbarilo (fig. 10B) se observa que la señal de oxidación se desplaza a valores menores de potencial, a medida que el pH de la solución aumenta (en un rango de 3 a 9). La intensidad de la señal varía poco con el pH.

Para 4-nonilfenol (fig. 10C) se observa que al aumentar el pH de la solución (en un rango de 3 a 11) la señal de oxidación se desplaza a potenciales menores (hacia potenciales negativos). En cuanto a la intensidad de la señal, se obtienen las señales más intensas a pHs 5 y 3, mientras que para los otros pHs (7, 9 y 11), las señales son de una intensidad más baja.

Por consiguiente, se puede deducir que carbarilo y 4-nonilfenol son más fáciles de oxidar a pH básico, y azinfos-metil se reduce más fácilmente a pH ácido.

En la figura 10D se muestra la relación entre E_p y pH para los 3 compuestos, donde se observa una respuesta lineal en todos los casos (azinfos: $E_p = -500 - 58,0 \text{ pH}$ ($R^2 = 0,995$); carbarilo: $E_p = 725,5 - 59,14 \text{ pH}$ ($R^2 = 0,999$); 4-nonilfenol: $E_p = 867,2 - 60,40 \text{ pH}$ ($R^2 = 0,996$)). Por lo tanto, todos los mecanismos, ya sea de reducción para azinfos y oxidación para carbarilo y 4-nonilfenol dependen del pH. Finalmente, los pH óptimos seleccionados para trabajar con estos analitos fueron 6, 9 y 5 para azinfos, carbarilo y 4-nonilfenol, respectivamente.

c) Efecto de la concentración

Mediante VPD se realizó un estudio de concentración de los tres analitos, por triplicado, con el fin de realizar una curva de calibración y determinar límite de detección y cuantificación sobre el electrodo sin modificar. En la figura 11 se muestran los voltamogramas de pulso diferencial obtenidos para los tres analitos al variar la concentración de la solución de trabajo.

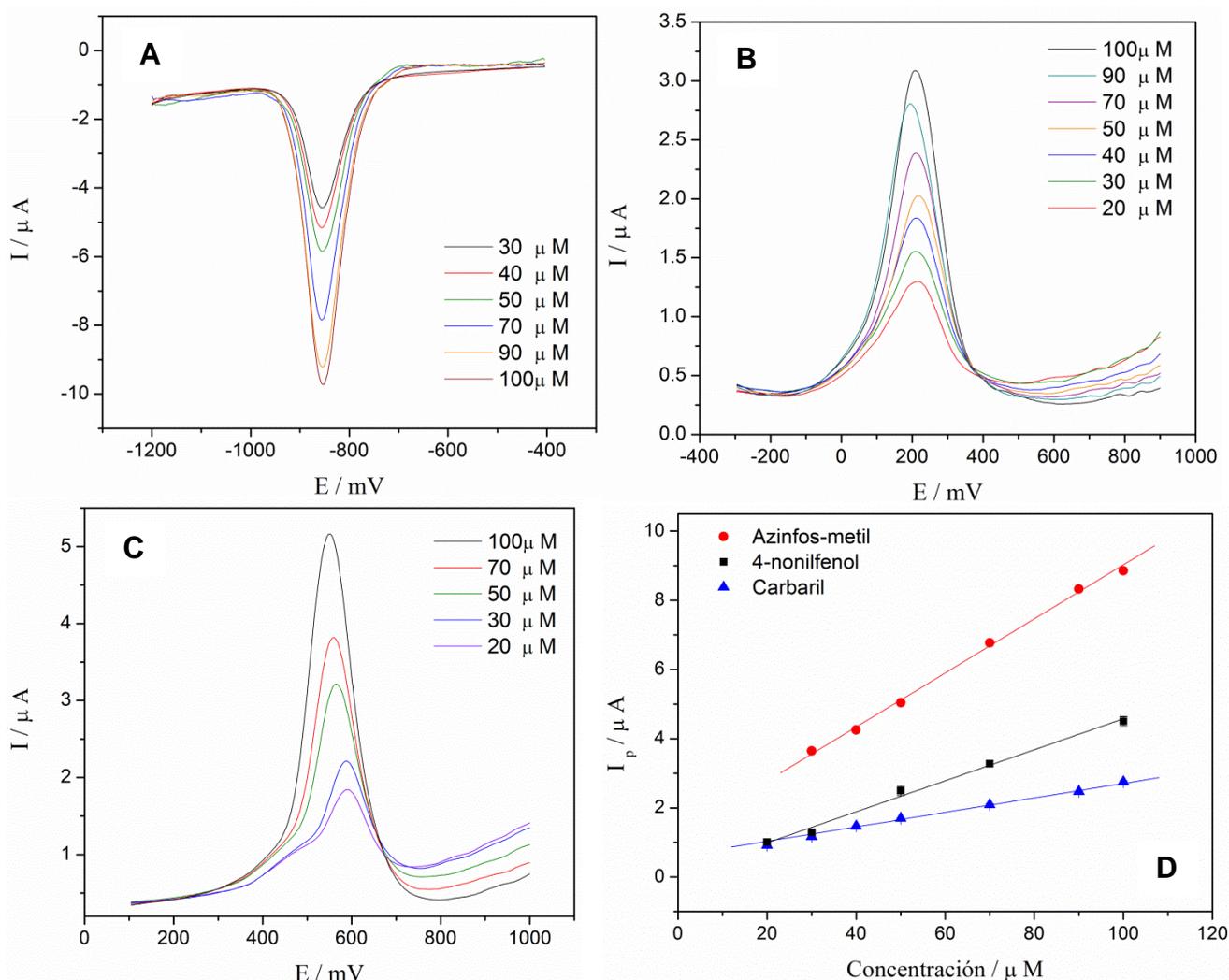


Figura 11. A. Azinfos-metil en buffer B-R pH 6; **B.** Carbarilo en buffer B-R pH 9; **C.** 4-nonilfenol en buffer B-R pH 5 / etanol 70:30. **D.** Curva de calibración.

En todos los casos, se puede observar el aumento de la corriente con el aumento de la concentración de analito en la zona de concentraciones de estudio.

En la figura 11D se muestra la variación de la corriente de pico con la concentración (curva de calibración) para los 3 analitos. Cada punto de la curva se realizó 3 veces en distintos días. En todos los casos existe una respuesta lineal en el intervalo estudiado (azinfos: $I_p = -1,258 - 0,077 C$ ($R^2 = 0,997$); carbarilo: $I_p = 0,533 + 0,022 C$ ($R^2 = 0,997$); 4-nonilfenol: $I_p = 0,095 + 0,045 C$ ($R^2 = 0,995$)).

Azinfos-metil no experimentó una variación del potencial de pico con la concentración (figura 11A), por lo que para realizar la curva de calibración, la corriente se midió en el máximo de la señal. Lo mismo se hizo para carbarilo, donde si bien existe una variación del potencial con la concentración (inferior a 10 mV), esta se considera dentro del error experimental. En el caso de 4-nonilfenol, el potencial de pico varía considerablemente con la concentración (alrededor de 30 mV), por lo que fue necesario medir la corriente a un potencial fijo de 560 mV para realizar la curva de calibración.

Los límites de detección IUPAC [25] de los analitos fueron 4,8; 7,0 y 8,9 μM para azinfos, carbarilo y 4-nonilfenol, respectivamente.

Los límites de cuantificación de los analitos fueron 16,2; 23,4 y 29,6 μM para azinfos, carbarilo y 4-nonilfenol, respectivamente.

Para los experimentos con los electrodos modificados se seleccionó una concentración de 70 μM para todos los analitos, ya que a esta concentración se tienen señales muy bien resueltas.

4.4 Respuesta de los electrodos modificados frente a los pesticidas

El comportamiento de los analitos sobre los electrodos modificados se realizó bajo las condiciones seleccionadas. La modificación de la superficie se realizó siguiendo el protocolo optimizado. Para realizar los estudios, cada electrodo se preparó de acuerdo al protocolo y solo se usó una vez. Los estudios se realizaron por medio de VPD, comparando las señales de los electrodos modificados y el electrodo sin modificar.

En las figuras 12, 14 y 16 se muestran los VPD de cada analito (azinfos-metil, carbarilo y 4-nonilfenol) sobre el GCE sin modificar y modificado con cada uno de los derivados de β -CD (CDexB-012, CDexB-013, CDexB-021 y CDexB-053). Además, para complementar la información de los VPD se adjunta una tabla donde se muestra el desplazamiento del potencial de pico (ΔE_p) y la variación de la intensidad de corriente de pico expresada en términos de porcentaje de disminución de la corriente de la señal del analito sobre el electrodo modificado, respecto a la señal sobre el electrodo sin modificar (% I_p).

Con el electrodo modificado que presentó la mejor respuesta, se realizó un estudio de tiempo de acumulación. Cabe destacar que cada medición fue independiente, y se realizó sobre un electrodo recién modificado y por triplicado, es decir, un electrodo recién preparado, se dejó en contacto con la solución que contiene el analito durante un tiempo determinado, se realizó el barrido de potencial y ese electrodo se limpió y se preparó nuevamente para una modificación.

En la figura 12 se muestran los VPD de azinfos-metil sobre el GCE sin modificar (línea negra) y modificado (línea roja) con cada uno de los derivados aminados de β -CD. Se puede observar que la señal de azinfos-metil sobre los electrodos modificados presenta una menor intensidad de corriente, comparado con el electrodo sin modificar. Además, la carga capacitiva es diferente, lo que se evidencia por el corrimiento de la línea base.

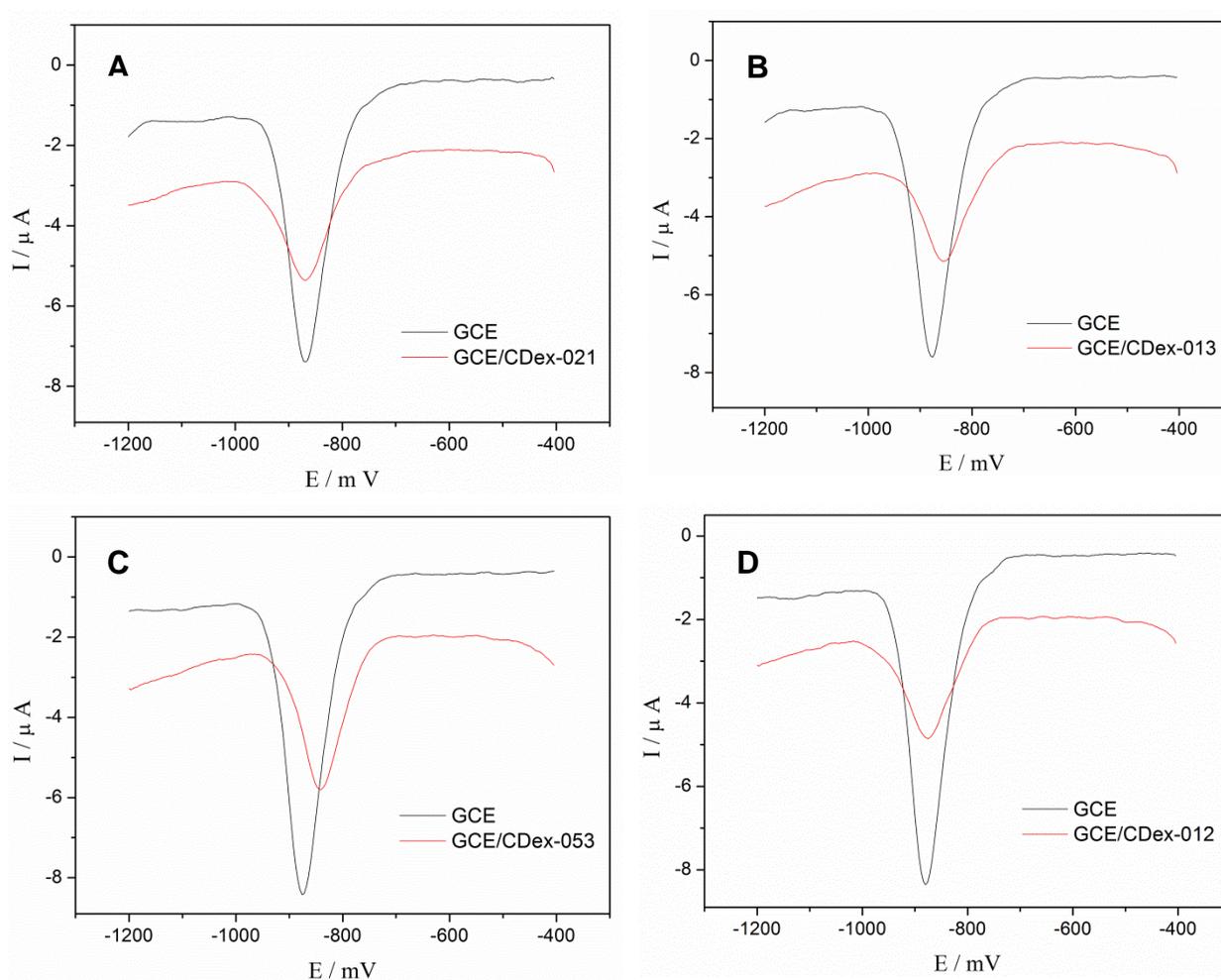


Figura 12: Caracterización electroquímica por VPD de azinfos-metil 70 μ M en buffer B-R pH 6 sobre electrodos modificados con derivados de β -CD. **A.** CDex-021; **B.** CDex-013; **C.** CDex-053; **D.** CDex-012.

En la tabla II se resumen los cambios de potencial de pico e intensidad de corriente para todos los electrodos modificados. En general, se puede observar que el % I_p es similar con todos los derivados de β -CD, no así el ΔE_p , el cual difiere entre las diferentes CDs. Esto se puede deber a que la ciclodextrina, al entregarle un carácter hidrofóbico a la superficie del electrodo, genera un ambiente más favorable para el analito, lo que conlleva a que éste requiera menos energía al reaccionar a través de la cavidad de la CD, lo cual se evidencia con un potencial ligeramente menor (~36 mV).

Derivado de β -CD	ΔE_p (mV)	% I_p
CDex-021	0	44
CDex-013	24	39
CDex-053	36	48
CDex-012	4	35

Tabla II. Desplazamiento de la señal de reducción de azinfos-metil (ΔE_p) y razón de corrientes (% I_p) sobre el electrodo modificado con respecto al electrodo no modificado.

Con la CD que se alcanzó un mayor % I_p y un mayor desplazamiento de potencial (ΔE_p) fue con la CDex-053, por lo cual se eligió para realizar el estudio de tiempo de acumulación.

En la figura 13 se muestra el estudio de tiempo de acumulación de azinfos-metil sobre el electrodo de carbono vítreo modificado con CDex-053.

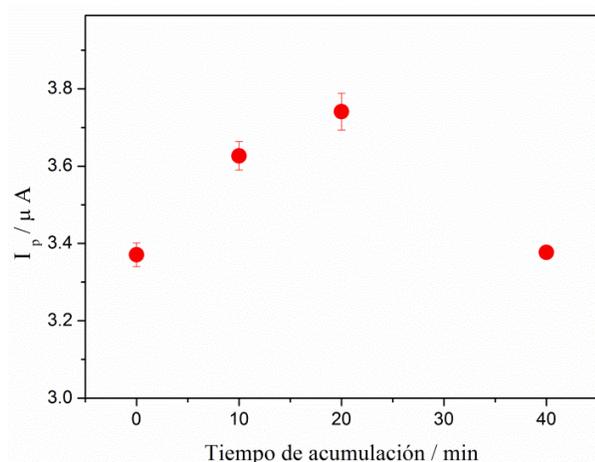


Figura 13. Estudio tiempo de acumulación de azinfos-metil sobre el GCE modificado con CDex-053.

Se puede observar que la corriente de pico aumenta levemente al aumentar el tiempo de acumulación, de 3,4 a 3,7 μA en 20 minutos. Luego la corriente disminuye a los 40 minutos. Aunque la variación de corriente es pequeña ($\sim 0,3 \mu A$), un tiempo de acumulación óptimo es de 20 minutos.

En la figura 14 se observa la respuesta de los electrodos modificados frente a la oxidación de carbarilo. Al igual que el caso anterior, las intensidades de corriente son menores con los electrodos modificados y se produce un cambio en la carga capacitiva de los electrodos.

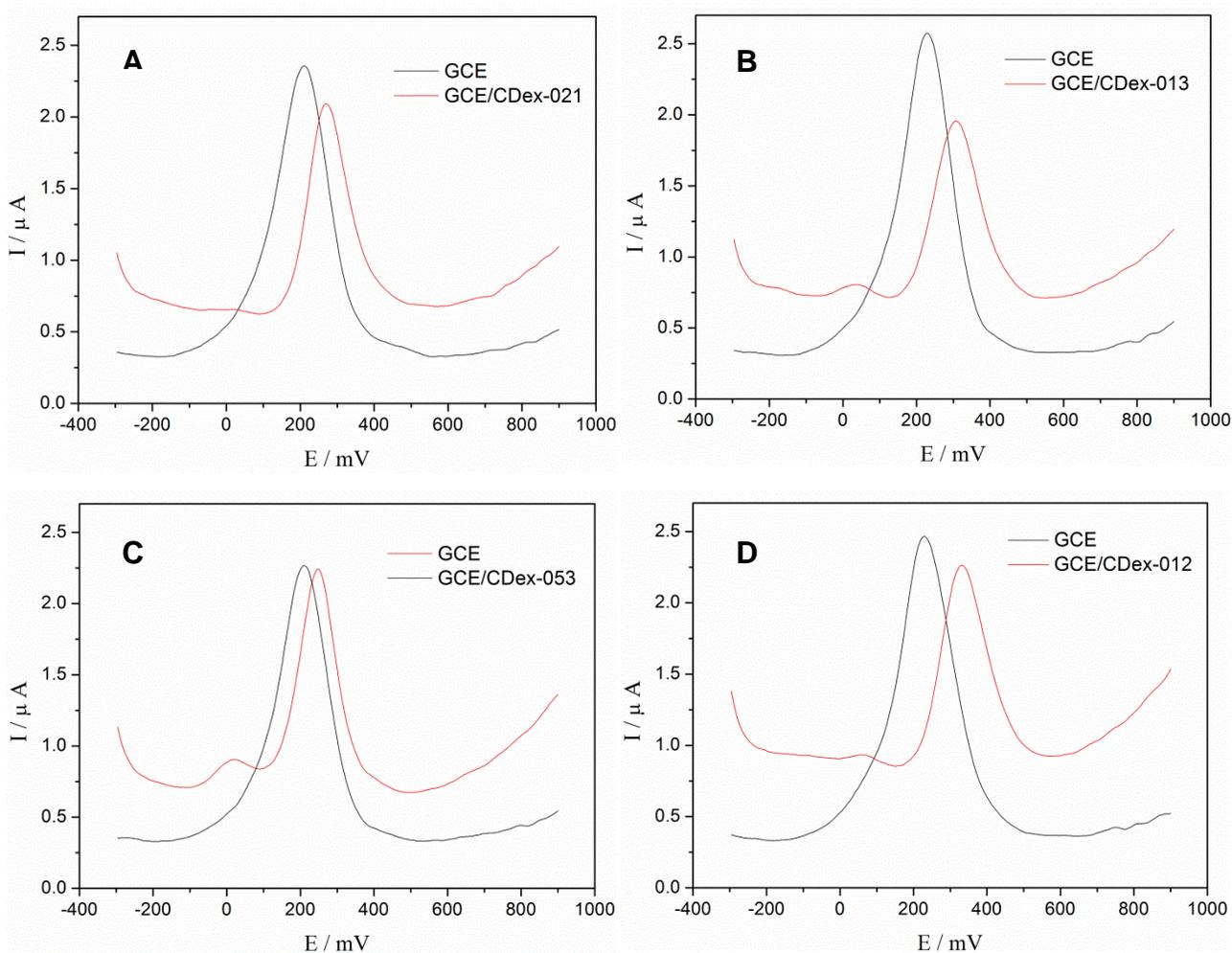


Figura 14: Caracterización electroquímica por VPD de carbarilo 70 μM en buffer B-R pH 9 sobre electrodos modificados con derivados de $\beta\text{-CD}$. **A.** CDex-021; **B.** CDex-013; **C.** CDex-053; **D.** CDex-012.

Cuando interacciona carbarilo con la CDex-053, se observa la aparición de una pequeña señal cercana a 0,0 mV. Esta señal también se observa con la CDex-013 y CDex-012 pero menos intensa. Esta señal podría ser un producto fuertemente adsorbido, lo que origina un prepico de adsorción.

En la tabla III se resumen los cambios en el potencial de pico e intensidad de corriente para todos los electrodos modificados.

Derivado de β -CD	ΔE_p (mV)	% I_p
CDex-021	64	72
CDex-013	80	55
CDex-053	40	75
CDex-012	104	65

Tabla III. Desplazamiento de la señal de oxidación de carbarilo (ΔE_p) y razón de corrientes (% I_p) sobre el electrodo modificado con respecto al electrodo no modificado.

Carbarilo posee una mayor interacción con la CDex-053, alcanzando un % I_p de 75 %. Con respecto a las otras CD, los valores de corriente son similares. Los cambios de potencial son mayores que los vistos con azinfos-metil. En la figura 15 se muestra el estudio de tiempo de acumulación de carbarilo con la CDex-053, ya que con esta se observaron mejores resultados.

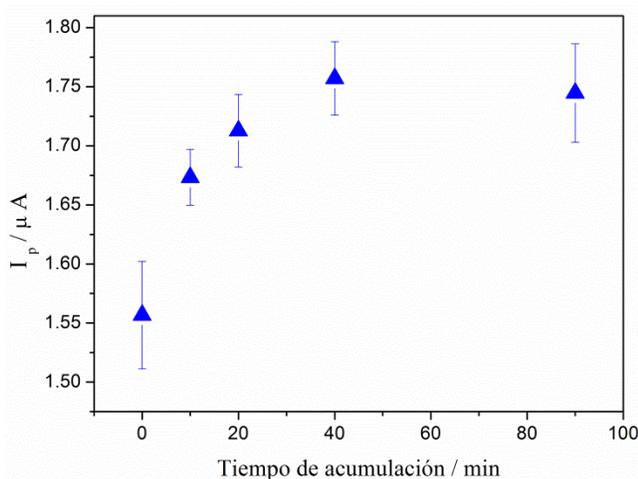


Figura 15. Estudio tiempo de acumulación de carbarilo sobre el GCE modificado con CDex-053.

Se puede observar que se alcanza un máximo de corriente a los 40 minutos, para luego disminuir ligeramente. De manera similar a lo observado previamente con azinfos-metil, el aumento en la intensidad de corriente no es muy importante, ya que el cambio es de 1,5 a 1,7 μA aproximadamente. De todas maneras, el tiempo de acumulación óptimo es de 40 minutos.

En la figura 16 se muestra la respuesta de los electrodos modificados frente a la oxidación de 4-nonilfenol. Se observa que con los electrodos modificados se obtienen corrientes menos intensas que con el electrodo sin modificar. A diferencia de los otros analitos, 4-nonilfenol muestra una diferencia muy grande en la interacción con las CDs.

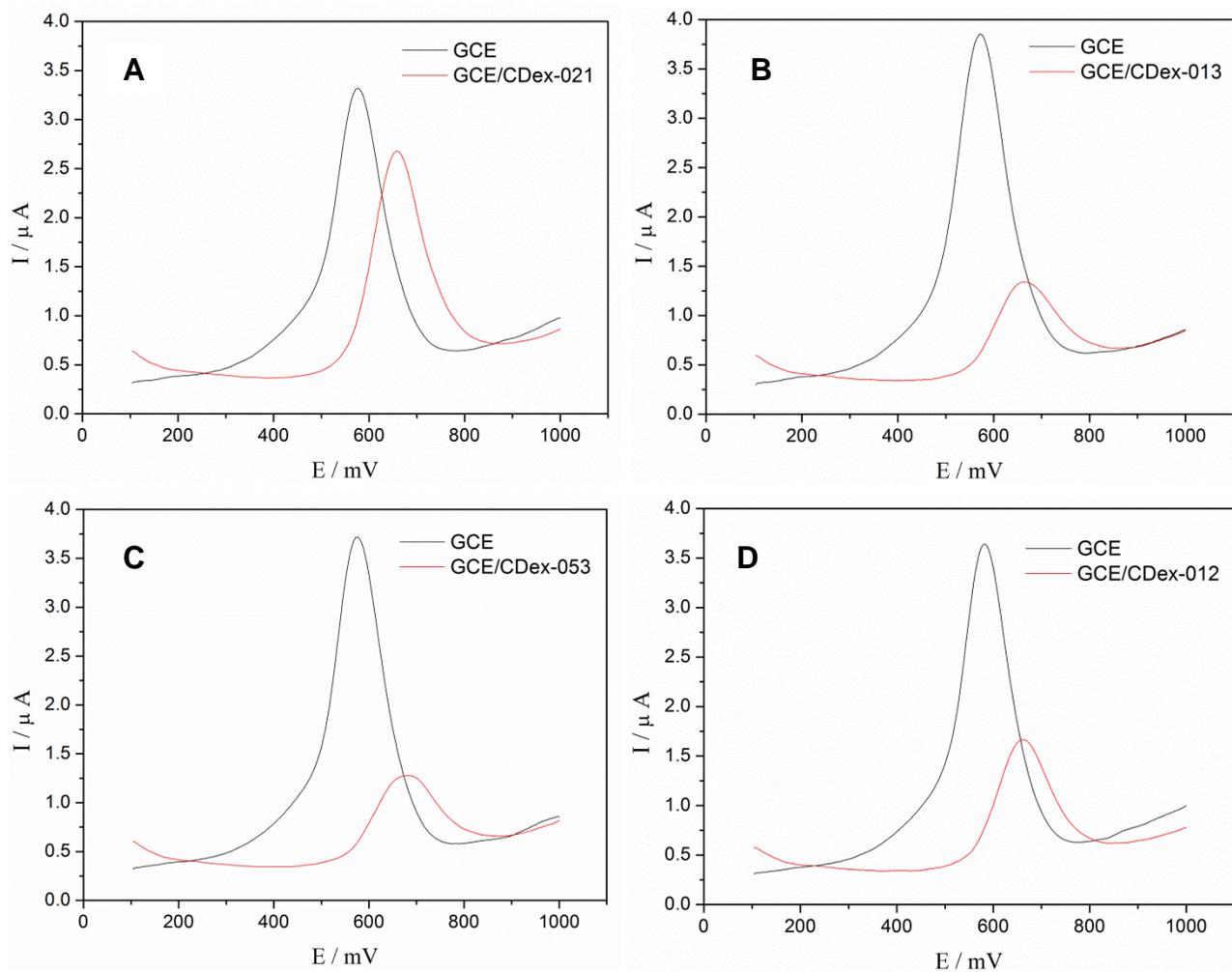


Figura 16: Caracterización electroquímica por VPD de 4-nonilfenol 70 μM en buffer B-R pH 5/Etanol 70:30 sobre electrodos modificados con derivados de $\beta\text{-CD}$. **A.** CDex-021; **B.** CDex-013; **C.** CDex-053; **D.** CDex-012.

En la tabla IV se resumen los cambios en el potencial de pico e intensidad de corriente para todos los electrodos modificados.

Derivado de β -CD	ΔE_p (mV)	% I_p
CDex-021	80	77
CDex-013	88	25
CDex-053	100	24
CDex-012	80	38

Tabla IV. Desplazamiento de la señal de oxidación de 4-nonilfenol (ΔE_p) y razón de corrientes (% I_p) sobre el electrodo modificado con respecto al electrodo no modificado.

Con la CDex-021 se alcanza un % I_p muy grande comparado con las otras CDs (77 % versus 30 % aprox.). Con respecto al desplazamiento del potencial, todas las CDs tienen un valor similar, el cual fluctúa entre 80 y 100 mV. En este caso, a diferencia de los otros dos analitos, no se observa un cambio en la línea base.

En la figura 17 se muestra el estudio de tiempo de acumulación para 4-nonilfenol con la CDex-021. Se puede observar que la corriente de pico aumenta considerablemente al transcurrir el tiempo de acumulación, de 2 a 6,7 μ A a los 40 minutos. Se decidió trabajar solo hasta 40 minutos, ya que se consideró que el incremento en la señal era suficiente para los estudios siguientes y tiempos más largos podrían ser poco prácticos.

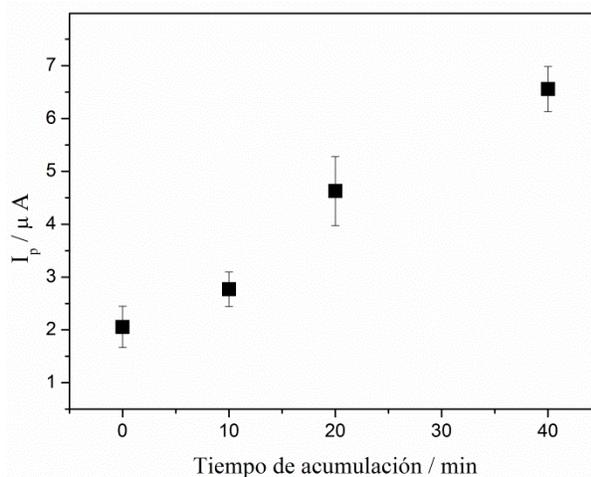


Figura 17. Estudio tiempo de acumulación de 4-nonilfenol sobre GCE modificado con CDex-021.

Este comportamiento con el tiempo de acumulación sugiere que la cinética de inclusión es lenta, y que es necesario un tiempo de 40 minutos (incluso superior a esto) para formar el complejo de inclusión entre 4-nonilfenol y la CD inmovilizada.

En general, todos los analitos presentaron señales de menor intensidad con los electrodos modificados. Azinfos-metil y carbarilo experimentaron un desplazamiento de la línea base, un comportamiento similar con todos los derivados de β -CD y un leve aumento de la corriente con el tiempo de acumulación. 4-nonilfenol experimentó una mayor interacción con una CD en particular, con la cual la corriente aumentó considerablemente con el tiempo de acumulación.

4.5 Determinación de la constante de asociación

Un parámetro esencial para determinar la afinidad ciclodextrina/huésped en la generación del complejo de inclusión es la constante de asociación (K_a). En esta memoria se determinó la K_a de azinfos-metil por métodos electroquímicos, ya que presenta numerosas ventajas respecto a otras técnicas, tales como UV-visible, fluorescencia, HPLC, entre otras. Para carbarilo y 4-nonilfenol las K_a están informadas en la literatura, por lo que no es necesaria su determinación.

La determinación de K_a se realizó en solución siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Por medio de VPD se evaluó el efecto en la intensidad de la señal de reducción de azinfos-metil para concentraciones crecientes de β -CD (2, 3, 4, 5, 6, 8 y 12 mM). El estudio se realizó por triplicado.

En la figura 18A se muestran los voltamogramas de pulso diferencial de azinfos-metil al variar la concentración de β -CD. Se puede observar la disminución de la corriente al aumentar la concentración de β -CD de 0 hasta 12 mM. En la figura 18B se aprecia claramente el efecto de la concentración de β -CD sobre la corriente de pico de azinfos-metil. De acuerdo a estudios previos [9], la disminución de la corriente de reducción es evidencia de la formación de un complejo de inclusión entre azinfos-metil y la β -CD, ya que el complejo de inclusión presenta un coeficiente de difusión menor comparado con la molécula libre.

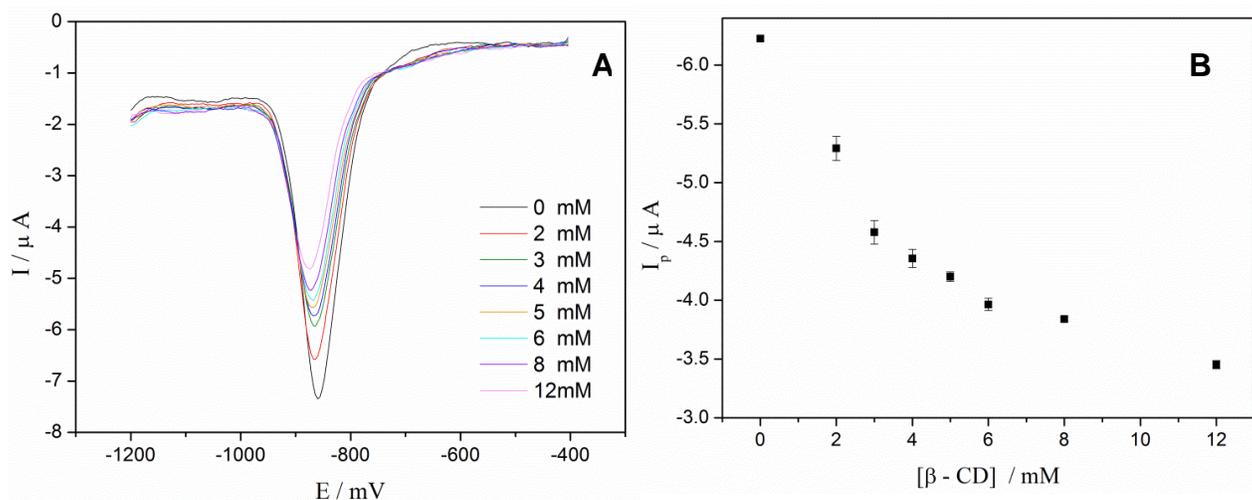


Figura 18. A. Curvas DPV de azinfos-metil obtenidas para diferentes concentraciones de β -CD en buffer B-R pH 6. **B.** Efecto de la concentración de β -CD sobre la corriente de pico de azinfos-metil.

Para obtener las constantes de asociación del complejo de inclusión azinfos-CDs se utilizó el descenso de la intensidad de la corriente de pico en función de la concentración de ciclodextrina, según lo descrito en la ecuación 1 mostrada anteriormente. En la figura 19 se muestra la relación lineal entre $1/[\beta\text{-CD}]$ versus $1/1-(I/I_0)$ para azinfos-metil.

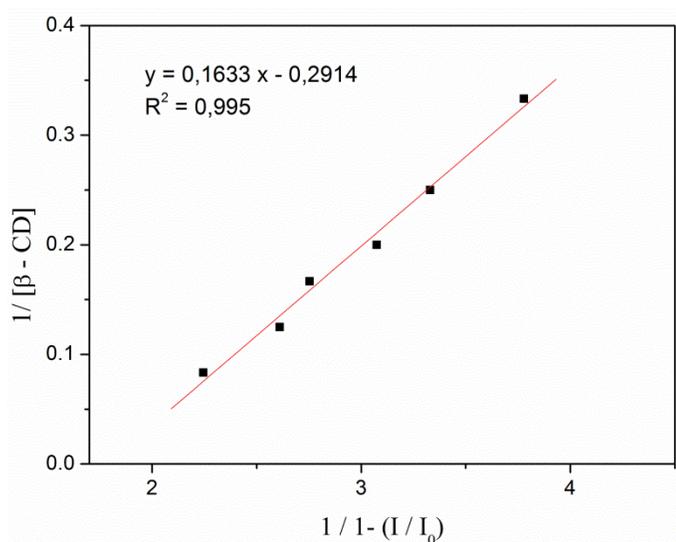


Figura 19. Relación lineal entre $1/[\beta\text{-CD}]$ versus $1/1-(I/I_0)$ de azinfos-metil 70 mM.

A partir de la ecuación de la recta de la figura 19, se determinó que el valor de la constante de asociación para el complejo de inclusión azinfos-metil- β -ciclodextrina es de $291 \pm 25 \text{ M}^{-1}$.

A continuación, en la Tabla V se muestran las constantes de asociación para los 3 analitos en estudio.

Pesticida	K_a / M^{-1}
Azinfos-metil	291 ± 25
Carbaril	350 ± 50 [26]
4-nonilfenol	360 [27]

Tabla V. Constantes de asociación para los complejos de inclusión pesticida- β -CD.

En la tabla V se puede observar que las constantes de asociación de los analitos con la β -CD son similares, alrededor de 300 M^{-1} . Estos valores de K_a son relativamente bajos, por lo que la interacción anfitrión-huésped no es muy grande. Algunos ejemplos de constante de asociación mayores son para el complejo de β -CD con 1,3-butanodiol con un valor de K_a de 12.022 M^{-1} [28] o el complejo de β -CD con doxepina con un valor de K_a de 13.182 M^{-1} [29].

En un medio acuoso, para que un pesticida no polar se incluya dentro de la cavidad de la CD, las moléculas de agua presentes dentro de la cavidad deben ser expulsadas. Es por esto que existen 2 factores claves para que ocurra la inclusión.

Primero, la molécula que se va a incluir debe ser lo suficientemente grande para expulsar la mayoría (si no todas) las moléculas de disolvente desde la cavidad tras la unión, y segundo, la molécula de pesticida no debe ser demasiado grande para incluirse en la cavidad por completo, ya que existe un impedimento estérico que también disminuirá la unión. Por lo tanto, las moléculas de plaguicidas de tamaño adecuado para incluirse dentro de la cavidad y expulsar todas las moléculas de disolvente exhibirán la mayor interacción [11].

Existen principalmente cuatro interacciones energéticamente favorables, que ayudan a desplazar el equilibrio para la formación del complejo de inclusión:

- El desplazamiento de las moléculas de agua polares de la cavidad de la ciclodextrina apolar.
- El aumento del número de enlaces de hidrógeno formados con el agua desplazada de la cavidad.
- Una reducción de las interacciones repulsivas entre el huésped hidrófobo y el ambiente acuoso.
- Un aumento de las interacciones hidrofóbicas cuando se inserta el huésped en la cavidad apolar de la ciclodextrina [9].

De acuerdo a las constantes de asociación mostradas en la Tabla V, los 3 analitos estarían formando complejos de inclusión, en los que todos los factores antes mencionados están presentes o participan de manera cooperativa, de tal forma que no hay un complejo de inclusión favorecido con respecto a los otros.

Sin embargo, los resultados electroquímicos aplicando distintos tiempos de acumulación, dan cuenta de una formación favorable del complejo de 4-nonilfenol con la CD (comparado con las respuestas de azinfos-metil y carbarilo), ya que la corriente de este aumentó considerablemente con tiempos largos de acumulación (~ 40 min).

4.6 Comportamiento de los electrodos modificados en mezclas de analitos

Para evaluar este comportamiento en función de la modificación y el tiempo de acumulación, se realizó un experimento utilizando una mezcla de carbarilo y 4-nonilfenol en solución.

Se preparó una solución de trabajo con los 2 analitos en buffer Britton-Robinson pH 9 a una concentración de 30 y 40 μM para carbarilo y 4-nonilfenol, respectivamente, la que fue evaluada utilizando dos de los electrodos modificados. Cada electrodo se mantuvo en la solución de trabajo con un tiempo de acumulación de 40 minutos, para finalmente registrar la señal por VPD.

En la figura 20 se observan los voltamogramas de pulso diferencial obtenidos para este experimento. La señal obtenida experimentalmente se muestra en línea roja. Mediante un programa computacional que ajusta las curvas experimentales a una suma de curvas gaussianas por mínimos cuadrados, se evaluaron las contribuciones correspondientes a cada analito, lo que se conoce como “desconvolución”. De esta manera, estas contribuciones se muestran en línea azul y negra para carbarilo y nonilfenol, respectivamente.

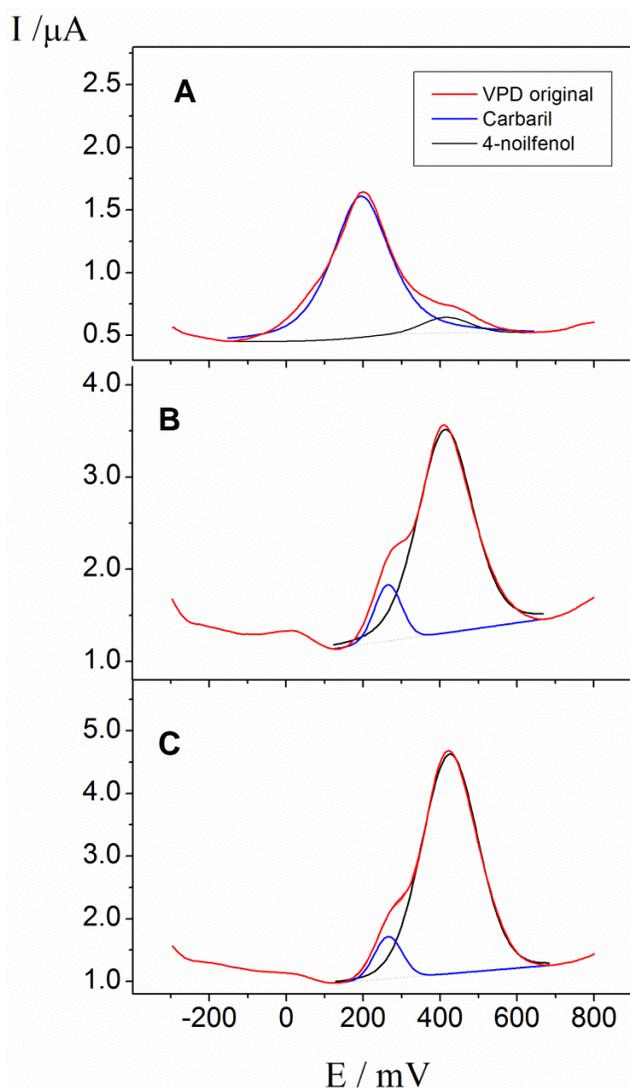


Figura 20. VPD de la mezcla de carbarilo + 4-nonilfenol 30 y 40 μM , respectivamente, en buffer B-R pH 9. **A.** GCE sin modificar; **B.** GCE modificado con CDex-053; **C.** GCE modificado con CDex-021.

En la figura 20 A, se muestra la señal de la mezcla de los 2 analitos, carbarilo y 4-nonilfenol sobre el electrodo sin modificar (línea roja). Se puede ver una señal ancha y mal resuelta, donde no se define claramente cada analito. El ajuste con el programa computacional permite, por un lado, determinar con más precisión el potencial al que aparecen las señales y por otro, cuantificar la carga correspondiente a ambas contribuciones de un modo más eficiente que la mera inspección gráfica.

Así, se puede observar una contribución principal (1,6 μA) centrada en 200 mV y otra de menor intensidad ($\sim 0,6 \mu\text{A}$) centrada en 416 mV. Estas señales corresponden a la oxidación de carbarilo y 4-nonilfenol respectivamente, de acuerdo con los resultados de electroquímica previamente mostrados.

Los resultados con electrodos modificados se muestran en la figura 20B y C. En ambas figuras se observan 2 señales, una de baja intensidad ($\sim 1,7 \mu\text{A}$) centrada en 266 mV y otra de mayor intensidad (entre 3,5 y 4,6 μA , figura 20B y 20C, respectivamente) centrada en ~ 426 mV. La señal que se observa a 266 mV corresponde a carbarilo, la cual aparece desplazada en 66 mV con respecto al GCE, lo que se correlaciona bien con los desplazamientos observados con los electrodos modificados (tabla III). La señal más intensa centrada en 426 mV corresponde a 4-nonilfenol, cuyo desplazamiento también había sido visto en los estudios previos (tabla IV).

Cuando el electrodo está sin modificación y se tiene la mezcla de estos 2 analitos, la señal de carbarilo es intensa y mayor que la de nonilfenol. Cabe destacar que la intensidad de la señal de cada analito sobre carbono vítreo es similar para concentraciones entre 30 y 40 μM , de acuerdo a lo observado previamente (figura 11D). Esto podría interpretarse en función de los potenciales de oxidación y la disponibilidad de la superficie para la reacción.

Carbarilo presenta un potencial de oxidación menor y, por lo tanto, reacciona a potenciales menores y podría estar ocupando un mayor número de sitios activos en la superficie del electrodo, en comparación con 4-nonilfenol. Es probable que el producto de la oxidación de carbarilo también esté en la superficie o en la interfase, disminuyendo los sitios disponibles para la reacción de nonilfenol, por lo que la señal de nonilfenol aparece mucho menos intensa (figura 20A).

Sin embargo, tal comportamiento cambia al tener superficies modificadas, como se observa en las figuras 20B y C, en donde 4-nonilfenol aumenta de forma considerable su corriente. Cuando existe una mezcla de analitos se da un tipo de competencia entre estos por incluirse en la CD, esta competencia favorece a 4-nonilfenol, ya que como se vio en estudios anteriores, este analito aumenta de forma considerable su corriente cuando el tiempo de acumulación es de 40 minutos (figura 17). Por el contrario, carbarilo mostró en el estudio de tiempo de acumulación (figura 15), que la corriente aumenta muy poco a los 40 minutos.

También se puede observar que con CDex-021 la separación de las señales de los analitos es un poco mejor que con CDex-053, ya que con la primera se presenta una separación de los máximos cercana a 168 mV frente a 152 mV que se obtienen con la segunda CD.

5. Conclusiones

- Los electrodos de carbono vítreo fueron modificados mediante la formación de un enlace covalente entre el derivado aminado de β -CD y la superficie oxidada del electrodo, por electro-oxidación directa del grupo amino, lo que fue verificado por electroquímica utilizando un mediador redox y por XPS.
- La caracterización de los analitos sobre el electrodo sin modificar permitió optimizar las condiciones de trabajo, tales como la velocidad de barrido, el pH y la concentración, para el estudio posterior con electrodos modificados.
- Los valores de constantes de asociación para los complejos de inclusión entre los analitos y el derivado de β -CD son similares, alrededor de 300 M^{-1} , lo que da cuenta de una interacción relativamente débil.
- El comportamiento de los electrodos modificados frente a los analitos fue diverso y pareciera no tener relación con el valor de la constante de asociación. Sin embargo, los resultados de tiempo de acumulación dan cuenta de una formación favorable del complejo de 4-nonilfenol con la CD, en comparación con azinfos-metil y carbarilo.

6. Referencias

- [1] SZEJTLI, J. 1998. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 98(5): 1743–1753.
- [2] SZEJTLI, J. 1982. *Cyclodextrins and their inclusion complexes*. Akademiai Kiado.
- [3] TANERI, F., GÜNERI, T., KATA, M. 2002. Improvement in the physicochemical properties of ketoconazole through complexation with cyclodextrin derivatives. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 44(1-4): 257-260.
- [4] MÜLLER, B. W., ALBERS, E. 1992. Complexation of dihydropyridine derivatives with cyclodextrins and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 79(1): 273-288.
- [5] SUZUKI, M., KAJTAR, M., SZEJTLI, J., VIKMAN, M., FENYVESI, E., SZENTE, L. 1991. Induced circular-dichroism spectra of complexes of cyclomalto-oligosaccharides and azobenzene derivatives *Carbohydrate Research*, 214:25.
- [6] PARK, J. H., JANG, M. D., SHIN, M. J. 1992. Solvatochromic hydrogen bond donor acidity of cyclodextrins and reversed-phase liquid chromatographic retention of small molecules on a β -cyclodextrin-bonded silica stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 595(1): 45-52.
- [7] INOUE, Y., LIU, Y., TONG, L. H., SHEN, B. J., JIN, D. S. 1993. Calorimetric titration of inclusion complexation with modified. beta.-cyclodextrins. Enthalpy-entropy compensation in host-guest complexation: from ionophore to cyclodextrin and cyclophane. *Journal of the American Chemical Society*, 115(23): 10637-10644.
- [8] UEKAMA, K. 2002. Recent aspects of pharmaceutical application of cyclodextrins. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 44(1-4): 3-7.

- [9] DEL VALLE, E. M. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*, 39(9): 1033-1046.
- [10] LANTZ, A.W., RODRIGUEZ, M., WETTERER, S., ARMSTRONG, D.W. 2006. Estimation of association constants between oral malodor components and various native and derivatized cyclodextrins. *Analytica Chimica Acta* 557, 184–190.
- [11] MORILLO, E., SANCHEX-TRUJILLO, M.A., MOYANO, J.R., VILLAVARDE, J., GOMEZ-PANTOJA, M.E., PEREZ-MARTINEZ, J.I. 2012. Enhanced solubilization of six PAHs by three synthetic cyclodextrins for remediation applications: molecular modeling of the inclusion complexes. *PLoS ONE* 7, e44137.
- [12] ZAMBONIN, C. G., QUINTO, M., DE VIETRO, N., PALMISANO, F. 2004. Solid-phase microextraction–gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chemistry*, 86(2): 269-274.
- [13] SOPEÑA, F., MAQUEDA, C., MORILLO, E. 2009. Controlled release formulations of herbicides based on micro-encapsulation. *Science and Agricultural Research*, 36(1): 27-42.
- [14] PIMENTEL, D., 2005. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability*, 7: 229–252.
- [15] GALLO, M. A., LAWRYK, N. J. 1991. Organic phosphorus pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*. Hayes, W. J., Jr. and Laws, E. R., Jr., Eds. Academic Press, New York, NY.5-3.
- [16] KHALAF, K. D., MORALES-RUBIO, A., DE LA GUARDIA, M. 1993. Simple and rapid flow-injection spectrophotometric determination of carbaryl after liquid-liquid extraction. *Analytica Chimica Acta*, 280(2): 231-238.

- [17] ASIMAKOPOULOS, A. G., THOMAIDIS, N. S., KOUPPARIS, M. A. 2012. Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. *Toxicology letters*, 210(2): 141-154.
- [18] VINCENT, M. D., SNEDDON, J. 2009. Nonylphenol: An overview and its determination in oysters and wastewaters and preliminary degradation results from laboratory experiments. *Microchemical Journal*, 92(1): 112-118.
- [19] US Environmental Protection Agency, RIN 2070-ZA09, Washington, USA, 2010.
- [20] LOPEZ-ESPINOSA, M.J., FREIRE, C., ARREBOLA, J.P., NAVEA, N., TAOUFIKI, J. 2009. Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere*, 76(6): 847-852.
- [21] JIME, J. J., BERNAL, J. L., DEL NOZAL, M. J., RIVERA, J. M. 1997. Determination of pesticide residues in waters from small loughs by solid-phase extraction and combined use of gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection and high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 778(1): 289-300.
- [22] SARAJI, M., ESTEKI, N. 2008. Analysis of carbamate pesticides in water samples using single-drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3): 1091-1100.
- [23] MORAES, F. C., MASCARO, L. H., MACHADO, S. A., BRETT, C. M. 2009. Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode. *Talanta*, 79(5): 1406-1411.
- [24] DEINHAMMER, R. S., Ho, M., ANDEREGG, J. W., PORTER, M. D. 1994. Electrochemical oxidation of amine-containing compounds: a route to the surface modification of glassy carbon electrodes. *Langmuir*, 10(4): 1306-1313.

- [25] MILLER, J.N., MILLER, J.C. 2002. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Cuarta Edición. Madrid, Prentice Hall. Pág 124-140.
- [26] PACIONI, N. L., VEGLIA, A. V. 2003. Determination of carbaryl and carbofuran in fruits and tap water by β -cyclodextrin enhanced fluorimetric method. *Analytica Chimica Acta*, 488(2): 193-202.
- [27] YÁÑEZ, C., CAÑETE, P., MORILLO, E. 2013. Determinación Electroquímica de la inclusión de nonilfenol en ciclodextrinas. En: Jornadas Chilenas de Química XXX: 12-15 noviembre del 2013. Pucón, Chile.
- [28] TAKAGI, S., FUJISAWA, M., KIMURA, T. 1991. Enthalpy and entropy changes on molecular inclusion of 1,3-butanediol into α and β -cyclodextrin cavities in aqueous solutions. *Thermochimica Acta*, 183: 289-297.
- [29] VALSAMI, G., KOUPPARIS, M.A., MACHERAS, P.E. 1992 Complexation Studies of Cyclodextrins with Tricyclic Antidepressants Using Ion-Selective Electrodes. *Pharmaceutical Research*, 9(1):94-100.