

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE NICARBAZINA SOBRE
ELECTRODOS NANOESTRUCTURADOS DE NANOTUBOS DE
CARBONO DE PARED MÚLTIPLE Y SU DETERMINACIÓN
ANALÍTICA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Química por:**

CARLOS DANIEL LEMA RANGEL

Director de Tesis: Dr. Arturo Squella

Co-director de Tesis: Dr. Alejandro Álvarez

Santiago-CHILE

Julio 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

CARLOS DANIEL LEMA RANGEL

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química

Director de Tesis:

Dr. Arturo Squella

Co-director de Tesis:

Dr. Alejandro Álvarez

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Tatiana Garrido

Dr. Galo Ramírez

Dr. Fernando Godoy

**Dedico este trabajo con amor a
mi Familia quienes han creído
en mí siempre.**

“Locura es hacer lo mismo una y otra vez esperando
obtener diferentes resultados”

Albert Einstein

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a mi Dios YHWH, quien ha sido mi guía y mi fuerza en todo momento, por sus bendiciones en todos los sentidos de mi vida, y por darme la sabiduría y la fortaleza para llevar a cabo este trabajo

A mis padres amados por ser las personas más importantes en mi vida, quienes me criaron con mucho amor y me inculcaron valores que me llevaron a ser la persona que soy hoy en día, a pesar de la distancia, los llevo siempre en mi mente y corazón. Gracias a mi Papá Carlos Rolando por sus consejos y sabias palabras que me ayudaron a tomar mejores decisiones. A mi Mamita Carmen por estar al pendiente de mí en todo momento, por su amor incondicional y por darme ánimos para culminar esta etapa de mi vida.

A mi hermanita Carolina por creer en mí, gracias por tus consejos y apoyo incondicional, que, a pesar de la distancia, siempre se ha preocupado por mí.

A mi Tía Celina y Mercedes, por sus palabras de ánimos y preocupación. A mi Tía Petra que, a pesar de ya no estar presente, sé que habrías estado muy orgullosa de mi.

A mi estimado amigo Wolfgang, gracias por la ayuda, apoyo y recomendaciones en mi llegada a Chile.

Un especial agradecimiento a mis Directores de tesis, profesores y amigos, Dr. Arturo Squella y Dr. Alejandro Álvarez, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su equipo de investigación, gracias por todo el apoyo brindado, también por su tiempo, paciencia, consejos y recomendaciones para culminar con éxito este trabajo.

A mis profesores formadores de catedra, por impartirme el conocimiento y proporcionarme herramientas de mucha utilidad para llevar a cabo esta investigación. Profesores: Edwar Fuentes, Tatiana Garrido, Verónica Arancibia, Claudia Yáñez, Pablo Richter, Inés Ahumada, Betsabet Sepúlveda y Loreto Ascar.

Un agradecimiento a todos los profesores de mi comisión evaluadora: Dra. Tatiana Garrido, Dr. Fernando Godoy y Dr. Galo Ramírez por su tiempo, buena disposición y consejos para completar el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Gerald Zapata y Dr. José Parada, excelentes profesores y compañeros en el laboratorio de Química General, gracias por sus recomendaciones.

Un agradecimiento al Dr. Daniel Arismendi por su buena disposición y ayuda en su laboratorio para completar el proceso de preparación de muestra.

A mis compañeros del centro de investigación para los procesos redox (CIPRex), y del laboratorio de análisis de fármacos, gracias por su orientación y por compartir sus conocimientos, que fueron fundamentales para el desarrollo de los experimentos.

A la Universidad de Chile, y en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por haberme abierto sus puertas, y tener el privilegio de ser estudiante en esta casa de estudios.

Financiamiento

Esta investigación fue realizada gracias al financiamiento del Proyecto de Investigación Fondecyt 1210899 (Multiwalled carbon nanotube Buckypapers as nanostructured electrodic platforms coupled to enzymatic systems for electroanalysis, biosensors, biofuel cells and capacitors applications).

Publicaciones

Lema, C., Moscoso, R., Yáñez, C., Squella, J.A. (2024). Exploring novel electroanalytical approach using MWCNT nanostructures to quantify nimodipine. *Talanta*, 269, 125494.

Lema, C., Álvarez-Lueje, A., Moscoso, R., Squella, J.A. (2024). Electrochemical Nicarbazin Analysis: Rapid Determination on bucky paper disks constructed from MWCNT. *Journal of the Electrochemical Society*.

Presentaciones en Congresos/Jornadas

Título	Congreso/Jornada	Lugar/Fecha
Presentación oral - <i>“Desarrollo de un Sensor Electroquímico Basado en Nanoestructuras de MWCNT para la Determinación de Nicarbazina”</i>	XXXIV Jornadas Chilenas de Química 2024	Puerto Varas, Chile/ 09 al 12 de enero 2024
Presentación de poster - <i>“Desarrollo de un Sensor Electroquímico Basado en Nanoestructuras de MWCNT para la Determinación de Nicarbazina”</i>	Primeras Jornadas de Investigación, Postgrado y Educación Continua de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas - Universidad de Chile	Santiago-Chile/19 y 20 de octubre 2023
Presentación de poster - <i>“Nicarbazin determination in glassy carbon electrode</i>	25 th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (XXV-Extech)	Arona, Tenerife, Islas Canarias, España/ 18 al 21 de julio 2023

<i>modified with multiwall carbon nanotube bucky paper</i>		
Presentación de poster - <i>“Nanostructured Platform of Bucky paper Based on MWCNT and Nitroaromatics”</i>	33rd Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE)	Santiago-Chile/ 27 al 30 de noviembre 2022
Presentación de poster - <i>“Estudio Electroquímico de Nicarbazina sobre electrodos nanoestructurados de MWCNT”</i>	VIII Simposio Chileno de Electroquímica (SIELEC 2022)	Termas el Corazón, San Esteban -Chile/ 23 al 25 de noviembre 2022
Presentación de poster - <i>“Nanostructured Platform of Bucky paper Based on MWCNT and Nitroaromatics”</i>	24 th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (XXIV-Extech) & XV Encuentro de Química Analítica y Ambiental (XV-EQAA)	Iquique-Chile/ 18 al 21 de octubre 2022

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
2.1 HIPÓTESIS.....	15
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	15
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. METODOLOGÍA.....	17
3.1 Reactivos.....	17
3.2 Materiales.....	17
3.3 Equipos.....	19
3.4 Preparación de soluciones.....	19
3.4.1 Soluciones electrolíticas.....	19
3.4.1.1 Buffer Britton-Robinson (BRB) 0,1 M.....	19
3.4.1.2 Solución de KCl 0,1 M.....	20
3.4.2 Soluciones stock y de trabajo.....	20
3.4.3 Solución de NCZ (0,12 mg mL ⁻¹).....	20
3.4.4 Solución de ferricianuro de potasio K ₃ [Fe(CN) ₆].....	20
3.4.5 Solución ACN: agua (25:75 v/v).....	20
3.4.6 Solución de PS.....	21
3.4.7 Dispersión de MWCNT (3 mg mL ⁻¹).....	21
3.4.8 Dispersión de MWCNT/PS (0,2 mg mL ⁻¹).....	21
3.5 Procedimientos y métodos.....	21
3.5.1 Purgado de la solución electrolítica.....	21
3.5.2 Pulido de electrodos de GC.....	21
3.5.3 Fabricación de películas de BP.....	22
3.5.4 Modificación de GCE y SPE con películas de BP.....	22

3.5.5	Sistema de medición electroanalítico con GCE	23
3.5.6	Estudios de caracterización para la plataforma BP-MWCNT/PS.....	24
3.5.6.1	Caracterización por SEM	24
3.5.6.2	Caracterización por espectroscopía Raman.....	24
3.5.6.3	Ángulo de contacto con diferentes líquidos	24
3.5.6.4	Determinación del área de superficie electroactiva en GCE	25
3.5.7	Funcionalización de la plataforma BP-MWCNT/PS con la DNC en GCE	25
3.5.8	Estudios generales por CV	25
3.5.9	Influencia del pH en la reducción del grupo nitro	26
3.5.10	Estudio de electrólisis	26
3.5.11	Efecto de la velocidad de barrido en la reducción del grupo nitro	26
3.5.12	Estudios electroquímicos para las especies superficiales electrogeneradas.....	26
3.5.13	Estabilidad de la solución analítica	27
3.5.14	Tiempo de acumulación.....	28
3.5.15	Condiciones para el sistema BIAS.....	28
3.5.16	Condiciones para el sistema cromatográfico.....	29
3.5.17	Validación de métodos analíticos.....	30
3.5.17.1	Cifras de mérito para el método electroanalítico por DPV con BP- MWCNT/PS-GCE.....	30
3.5.17.1.1	Precisión.....	30
3.5.17.1.2	Linealidad	32
3.5.17.1.3	Sensibilidad, LOD y LOQ.....	33
3.5.17.2	Cifras de mérito para el método electroanalítico por AD i-t con BP- MWCNT/PS-SPE	33
3.5.17.2.1	Precisión.....	33
3.5.17.2.2	Linealidad, rango, sensibilidad, LOD y LOQ.....	34
3.5.17.3	Cifras de mérito para el método HPLC-DAD.....	34
3.5.17.3.1	Adecuación del sistema	34
3.5.17.3.2	Linealidad	35
3.5.17.3.3	Sensibilidad, LOD y LOQ.....	35
3.5.18	Estudios de recuperación	35
3.5.19	Aplicación del método electroanalítico en muestras de músculo de pollo	36

3.5.19.1	Recolección.....	36
3.5.19.2	Incubación.....	36
3.5.19.3	Extracción.....	36
3.5.19.4	Preconcentración.....	37
3.5.19.5	Cuantificación.....	37
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1	Preparación de electrodos con películas de tipo BP	38
4.1.1	Preparación de dispersiones de MWCNT	38
4.1.2	Modificación de electrodos comerciales con BP-MWCNT/PS.....	40
4.2	Estudios de caracterización para la plataforma BP-MWCNT/PS.....	41
4.2.1	Caracterización por SEM.....	41
4.2.2	Caracterización por espectroscopía Raman	44
4.2.3	Ángulo de contacto con diferentes líquidos.....	46
4.2.4	Determinación del área de superficie electroactiva en GCE	48
4.3	Funcionalización de la plataforma BP-MWCNT/PS con la DNC en GCE	52
4.4	Comportamiento electroquímico de la DNC	54
4.4.1	Estudios generales por CV	54
4.4.2	Estudios electroquímicos para la reducción del grupo nitro	57
4.4.2.1	Influencia del pH	57
4.4.2.2	Estudio de electrólisis	61
4.4.2.3	Efecto de la velocidad de barrido	63
4.2.3	Estudios electroquímicos para las especies superficiales electrogeneradas.....	65
4.2.3.1	Comportamiento voltamétrico	65
4.2.3.2	Influencia del pH	67
4.2.3.3	Efecto de la velocidad de barrido	69
4.2.3.4	Mecanismo redox.....	72
4.5	Desarrollo del método electroanalítico	75
4.5.1	Estabilidad de la solución analítica	75
4.5.2	Tiempo de acumulación.....	76
4.5.3	Optimización de las condiciones en el sistema BIAS	77
4.5.4	Cifras de mérito para el método electroanalítico por DPV con BP-MWCNT/PS-GCE	80

4.5.4.1	Precisión	80
4.5.4.2	Linealidad	83
4.5.4.3	Sensibilidad, rango, LOD y LOQ	85
4.5.5	Cifras de mérito para el método electroanalítico por AD i-t con BP-MWCNT/PS-SPE.....	87
4.5.5.1	Precisión	87
4.5.5.2	Linealidad, rango, sensibilidad, LOD y LOQ.....	88
4.6	Validación de un método HPLC-DAD	91
4.6.1	Adecuación del sistema HPLC	92
4.6.2	Linealidad	94
4.6.3	Sensibilidad, rango, LOD y LOQ.....	94
4.7	Estudios de recuperación con NCZ	96
4.8	Aplicación del método electroanalítico desarrollado por DPV	100
5.	CONCLUSIONES	104
6.	REFERENCIAS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. (A) electrodo de pasta de carbono⁸ y (B) electrodo de carbono vítreo⁹. 2

Figura 2. Representación esquemática del proceso de fabricación de SPEs¹¹. 3

Figura 3. Nanotubos de carbono y grafeno como estructuras (A) de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y (B) de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT)²⁸. 5

Figura 4. Dispersión de MWCNT. (A) Baja estabilidad de la dispersión de nanotubos, (B) Dispersión estable de los nanotubos²⁹. 6

Figura 5. Método de drop casting para modificar electrodos con dispersiones de CNT^{35,36}. 6

Figura 6. Esquema del proceso de fabricación de BP basado en nanoestructuras de MWCNT³⁰. 7

Figura 7. Estructura química de la nicarbazina. 8

Figura 8. Respuesta instrumental por AD i-t en el sistema BIAS⁷¹. 12

Figura 9. Proceso de fabricación de BP basado en nanoestructuras de MWCNT. 22

Figura 10. Proceso de modificación de electrodos con BP-MWCNT/PS. (A) Modificación de GCE y (B) Modificación de SPE. 23

Figura 11. (A) Celda electroquímica BIAS con micropipeta electrónica programable. (B) Celda acoplada a SPE para ejecutar la detección amperométrica i-t. 29

Figura 12. Dispersión de MWCNT 0,2 mg mL⁻¹ en 1,3-dioxolano y poliestireno de bajo peso molecular. (A) Previo al proceso de agitación. (B) Dispersión estable para preparar BP-MWCNT/PS. 39

Figura 13. Superficie de un GCE modificado con la plataforma BP-MWCNT/PS. (A) Modificación apropiada (B) Fallo en la modificación y (C) Superficie poco homogénea. 41

Figura 14. Imágenes SEM para la plataforma nanoestructurada BP-MWCNT/PS. Superficie de un BP sin DNC (A) y con DNC (B). Borde de un mini disco de BP (C). La magnificación se muestra en cada imagen. 44

Figura 15. Espectro Raman de un (A) BP-MWCNT/PS, (B) BP-MWCNT/PS-DNC y (C) Dispersión de MWCNT sin PS. En cada espectro se indican las bandas características y la relación de intensidades I_D/I_G. 46

Figura 16. Ángulo de contacto para la plataforma BP-MWCNT/PS con diferentes líquidos. (A) Agua Milli-Q, (B) BRB (pH 7) y (C) ACN: agua (25:75 v/v). 48

Figura 17. (A) Voltamograma cíclico de K₃[Fe(CN)₆] (1 mM) en KCl (0,1 M) a diferentes velocidades de barrido usando un GCE. (B) Corriente de pico anódica y catódica frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. En la leyenda se indica el experimento llevado a cabo. 50

Figura 18. Diferencia de potencial de pico anódico y catódico (ΔE_p) para el $K_3[Fe(CN)_6]$ a diferentes velocidades de barrido con un GCE y la plataforma BP-MWCNT/PS en BRB (0,1 M).....	52
Figura 19. Funcionalización no covalente de la plataforma BP-MWCNT/PS con la DNC en GCE. (A) Adsorción directa de la DNC y (B) Adsorción indirecta de la DNC desde el medio de reacción.	53
Figura 20. CVs de la DNC 0,2 mM en BRB 0,1 M/ pH 7 a 0,1 V s ⁻¹ con GCE (A) sin modificar y (B) modificado con la plataforma BP-MWCNT/PS. En la leyenda se indica la dirección tomada para generar cada voltamograma.	56
Figura 21. Estudio de pH por CV a 0,1 V s ⁻¹ en BRB (0,1 M) para la reducción del grupo nitro de la DNC (0,2 mM). (A) CVs a diferentes pH, (B) Corriente de pico en función del pH y (C) Potencial de pico en función del pH.....	60
Figura 22. Electrólisis de la DNC para la reducción de los grupos nitro mediante cronoamperometría a -0,75 V. Mediciones realizadas en BP-MWCNT/PS a pH 5.	62
Figura 23. Efecto de la velocidad de barrido en la reducción de la DNC (0,2 mM) a un derivado de hidroxilamina. (A) CVs registrados a diferentes velocidades de barrido: 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35 y 0,40 V s ⁻¹ en BRB (pH 5). (B) Logaritmo de la corriente de pico catódico vs. Logaritmo de la velocidad de barrido. (C) Potencial de pico catódico vs. Logaritmo de la velocidad de barrido.	64
Figura 24. CVs de la DNC 0,2 mM en BRB (0,1 M) y 0,1 V s ⁻¹ a (A) pH 10 y (B) pH 2.66	
Figura 25. CVs para la DNC (0,2 M) registrados en dos etapas en BRB (0,1 M) a 0,1 V s ⁻¹ . (A) pH 10, (B) pH 8, (C) pH 6, (D) pH 4, (E) pH 2, (F) Potencial de pico anódico y catódico en función del pH para las especies superficiales electrogeneradas.	68
Figura 26. (A) Curvas log I _p vs. log v para el pico anódico y catódico de cada señal a pH 5. (B) Razón de corriente de pico anódico y catódico en función de la velocidad de barrido. (C) Diferencia de potencial de pico anódico y catódico en función del logaritmo de la velocidad de barrido. Las señales electroquímicas se muestran dentro de cada gráfico.....	71
Figura 27. Mecanismo de reacción propuesto para el comportamiento electroquímico de la DNC.....	72
Figura 28. CVs registrados a (A) pH 7 y 0,1 V s ⁻¹ para la formación de azo y azoxi derivados y su avance posterior a 1 hora, (B) pH 7 y 0,1 V s ⁻¹ sin generación del derivado nitroso, (C) con función macros a pH 5 y 0,15 V s ⁻¹	74
Figura 29. Estabilidad de un estándar de DNC para 5 días consecutivos mediante espectroscopía UV-Vis y DPV. (A) espectro de absorción, (B) promedio de la altura de pico para cada día de análisis, (C) voltamogramas de pulso diferencial registrados con el primer electrodo y (D) promedio de la corriente de pico para cada día de análisis. ...	76
Figura 30. Efecto del tiempo de acumulación sobre la respuesta de corriente de la DNC por DPV en BBR (0,1 M) a pH 5.....	77

Figura 31. Estudio de repetibilidad a pH 5 usando una solución estándar de DNC (0,2 mM). (A) Voltamogramas de pulso diferencial para un GCE modificado con BP-MWCNT/PS, (B) Escaneo de limpieza por CV y (C) corriente de pico para la reducción de la DNC.	81
Figura 33. Estudio de linealidad para el método electroanalítico por DPV con BP-MWCNT/PS-GCE. (A) Funcionalización por adsorción directa con un estándar de DNC en un rango de 0,75 a 90,67 mg L ⁻¹ y (B) Funcionalización por adsorción indirecta con un estándar de DNC en un rango de 2,03 a 18,13 mg L ⁻¹	84
Figura 34. Curvas de calibrado para el método electroanalítico por DPV con BP-MWCNT/PS-GCE. Funcionalización por (A) adsorción directa y (B) adsorción indirecta.	86
Figura 35. Amperograma para el estudio de repetibilidad con el sistema de medición BIAS, considerando 8 inyecciones sucesivas de una solución estándar de DNC al 0,03 mM.	88
Figura 36. Estudio de linealidad para el método electroanalítico por AD i-t con BP-MWCNT/PS-SPE.	89
Figura 37. Cromatograma líquido de un estándar de DNC a una concentración de 0,2 mM.	92
Figura 38. Estudio de linealidad para el método HPLC usando un estándar de DNC en un rango de 0,12 a 59,36 mg L ⁻¹	94
Figura 39. Curva de calibrado externa para el método HPLC usando un estándar de DNC en un rango de 0,12 a 9,02 mg L ⁻¹	95
Figura 40: CV para una solución de NCZ (0,12 mg L ⁻¹) a 0,1 V s ⁻¹ y pH 5 en BRB (0,1 M).	96
Figura 41. Curvas de adición de estándar para la determinación de NCZ mediante el (A) método electroanalítico por DPV (B) y por el método de HPLC-DAD. La concentración de la muestra fue extrapolada en el eje x negativo.	97
Figura 42. Cromatograma líquido para una muestra de DNC en tejido muscular de pollo enriquecido a una concentración de 3000 µg/kg y su correspondiente blanco. .	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. LMR de DNC en diferentes tejidos de pollo ($\mu\text{g}/\text{kg}$).....	9
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la DNC.....	10
Tabla 3. Pasos específicos para llevar a cabo la secuencia de medición en el comando <i>macro</i>	27
Tabla 4. Condiciones de operación para el sistema cromatográfico.....	30
Tabla 5. Condiciones optimizadas para la obtención de dispersiones de MWCNT.....	39
Tabla 6. Superficie de área electroactiva (EAS) obtenida de la ecuación de Randles-Sevcik para un GCE y la plataforma BP-MWCNT/PS.....	51
Tabla 7. Potencial y corriente de pico para las señales generadas por la DNC usando CV en GCE.....	57
Tabla 8. Curvas de potencial vs. pH para los picos de oxidación y reducción de cada señal.....	69
Tabla 9. Regresión de las curvas $\text{Log } I_p$ vs. $\text{Log } \nu$ para el pico anódico y catódico de cada señal. Señales electroquímicas: IIa, IIb, IIIa, IIIb, IVa, IVb, Va y Vb.....	71
Tabla 10. Análisis comparativo de diferentes diluyentes en la precisión de las medidas amperométricas.....	78
Tabla 11. Condiciones optimizadas para el sistema de medición BIAS con AD i-t.....	79
Tabla 12. Prueba t de student para la repetibilidad y reproducibilidad de la plataforma BP-MWCNT/PS asumiendo varianzas desiguales.....	83
Tabla 13. Análisis de regresión para estudio de linealidad mediante la funcionalización con la DNC por adsorción directa e indirecta.....	85
Tabla 14. Mediciones realizadas a una solución estándar de DNC para el cálculo del LOD.....	86
Tabla 15. Parámetros analíticos para el método por DPV con BP-MWCNT/PS-GCE..	87
Tabla 16. Análisis de precisión para la AD i-t en el sistema de medición BIAS.....	88
Tabla 17. Parámetros analíticos para el método por AD i-t con BP-MWCNT/PS-SPE.	90
Tabla 18. Comparación de las cifras de mérito de diferentes métodos electroanalíticos publicados para la determinación de NCZ.....	91
Tabla 19. Parámetros de desempeño del sistema HPLC obtenidos para un estándar de DNC a una concentración de 0,2 mM.....	93
Tabla 20. Parámetros analíticos para el método HPLC-DAD.....	95
Tabla 21. Porcentaje de recuperación para NCZ en forma farmacéutica utilizando el método electroanalítico por DPV y su comparación con un método de referencia HPLC-DAD.....	99

Tabla 22. Comparación del método electroanalítico por DPV con el método de referencia HPLC-DAD en el estudio de recuperación. 100

Tabla 24. Cuantificación de DNC desde una matriz certificada de músculo de pollo enriquecida a 3000, 5000 y 7000 µg/kg. 102

Tabla 25. Comparación del método electroanalítico por DPV con el método de referencia HPLC-DAD en la cuantificación de DNC en tejido muscular de pollo. 103

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AD i-t	Detección amperométrica i-t
BIAS	Sistema de análisis de inyección por lotes
BP	Buckypaper
BRB	Buffer Britton-Robinson
CNT	Nanotubos de carbono
CV	Voltametría cíclica
CVs	Voltamogramas
DAD	Detector de arreglo de diodos
DNC	4,4'-dinitrocarbanilida
DPV	Voltametría de pulso diferencial
EAS	Área de superficie electroactiva
GCE	Electrodo de carbono vítreo
HDP	2-hidroxi-4,6-dimetil-pirimidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
LMR	Límite máximo de residuos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MWCNT	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NCZ	Nicarbazina
PS	Poliestireno
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SPE	Electrodo serigrafiado

RESUMEN

En la actualidad, la nicarbazina (NCZ) tiene un amplio uso como coccidiostático en la población de aves de corral, para controlar principalmente el desarrollo de parásitos en pollos de engorde, sin embargo los estudios recientes han logrado demostrar que el componente activo de la NCZ (4,4'-dinitrocarbanilida o DNC) se acumula en diferentes tejidos del ave a concentraciones considerables, convirtiéndose en el único residuo marcador de preocupación que debe ser monitoreado, para garantizar la seguridad alimentaria y el bienestar de los consumidores. En respuesta a esta problemática se han desarrollado estrategias analíticas que permiten el análisis de este residuo, siendo la LC/MS/MS la técnica más aceptada para la determinación y confirmación de residuos de NCZ en diferentes tejidos de pollo. En esta tesis se propone una estrategia electroanalítica reproducible, sencilla y ecológica, utilizando un sensor basado en la tecnología Buckypaper (BP). El BP se presenta como una película versátil, debido a su capacidad para modificar la superficie de un electrodo comercial (GCE o SPE), y dar como resultado un sensor electroquímico más sensible. El proceso de elaboración de películas de BP es bastante sencillo, económico y rápido; donde se prepara una dispersión de MWCNT con una pequeña cantidad de poliestireno en 1,3-dioxolano, la cual posteriormente es sometida a un proceso de filtración al vacío. Las películas de BP producidas fueron caracterizadas mediante SEM y espectroscopía Raman, entre otras técnicas, las cuales mostraron una elevada área de superficie activa, buena eficiencia en la transferencia de electrones y alta capacidad de adsorción frente a la DNC, lo que permitió realizar su rápida detección electroquímica. Se estudió el comportamiento electroquímico de la DNC mediante CV, donde se logró identificar la generación de diferentes especies superficiales a través de procesos de oxidación y reducción, las cuales mostraron un mecanismo controlado por protones en medio acuoso. Dentro de las especies superficiales electrogeneradas se incluyen a los pares redox cuasi-reversibles: $\text{ArNO}/\text{ArNHOH}$ y $\text{ArN}_2\text{OAr}/\text{ArN}_2\text{Ar}$. Se ha demostrado que los grupos nitro de la DNC pueden ser electroreducidos a un derivado de hidroxilamina, generando un solo pico de reducción en medio acuoso que involucra la transferencia de 8 electrones y 8 protones. La respuesta de corriente producida por la reducción de la DNC a un derivado de hidroxilamina, se mostró como la señal analítica de mayor intensidad, cuyo valor

aumentó en dos órdenes de magnitud utilizando la plataforma BP-MWCNT/PS. Asimismo, su intensidad se mostró estable y mejoró a pH 5, por lo que fue considerada esta condición para validar el método electroanalítico. Como técnica electroanalítica se utilizó la DPV acoplada al sensor electroquímico BP-MWCNT/PS-GCE. El método demostró buena linealidad y precisión, con un LOD de $0,78 \text{ mg L}^{-1}$ y una sensibilidad de $3,07 \mu\text{A mg}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$. Por otra parte, se utilizó la AD i-t para validar un método utilizando un sistema de medición BIAS, acoplado al sensor electroquímico BP-MWCNT/PS-SPE. En este caso se obtuvo un LOD de $0,52 \text{ mg L}^{-1}$ y una sensibilidad de $3,42 \mu\text{A mg}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$, además el método demostró ser lineal en un rango comprendido entre $1,51$ y $7,56 \text{ mg L}^{-1}$. A pesar de que la AD i-t representó una técnica más sensible en comparación con la DPV, al ser utilizada con el sistema de medición BIAS resultó ser menos reproducible y más laboriosa para llevar a cabo un análisis. La recuperación del método electroanalítico por DPV fue evaluada utilizando NCZ en forma farmacéutica, donde se obtuvieron recuperaciones promedio de $104,0 \pm 6,0 \%$ con una RSD de $5,8 \%$ para el estudio intradía, y $100,2 \pm 7,9 \%$ con una RSD de $7,9 \%$ para el estudio interdía. El método electroanalítico desarrollado por DPV fue aplicado exitosamente en la determinación y confirmación de residuos de NCZ en tejido muscular de pollo, donde se logró cuantificar hasta una cantidad de $743 \pm 50 \mu\text{g/kg}$ con una RSD de $6,7 \%$. Los resultados obtenidos a partir del método electroanalítico por DPV fueron comparados con un método de referencia HPLC-DAD, donde no se encontraron diferencias significativas.

ABSTRACT

Currently, NCZ is widely used as a coccidiostatic agent in poultry populations, primarily to control parasite development in broiler chickens. However, recent studies have shown that the active component of NCZ (4,4'-dinitrocarbanilide or DNC) accumulates in various chicken tissues at considerable concentrations, becoming the sole marker residue of concern that must be monitored to ensure food safety and consumer welfare. In response to this issue, analytical strategies have been developed to analyze this residue, where LC/MS/MS is the most accepted technique for the determination and confirmation of NCZ residues in different chicken tissues. This thesis proposes a reproducible, simple, and environmentally friendly electroanalytical strategy using a sensor based on BP technology. BP serves as a versatile film due to its ability to modify the surface of a commercial electrode (GCE or SPE), resulting in a more sensitive electrochemical sensor. The process of elaboration BP films is straightforward, cost-effective, and fast, involving the preparation of an MWCNT dispersion with a small amount of PS in 1,3-dioxolane, which is then subjected to a vacuum filtration process. The produced BP films were characterized using SEM, Raman spectroscopy, among other techniques, showing a large active surface area, good electron transfer efficiency, and high adsorption capacity towards DNC, enabling its rapid electrochemical detection. The electrochemical behavior of DNC was studied using CV, where the generation of different surface species through oxidation and reduction processes was identified, showing a proton-controlled mechanism in aqueous medium. Among the electrogenerated surface species are the quasi-reversible redox pairs: $\text{ArNO}/\text{ArNHOH}$ and $\text{ArN}_2\text{OAr}/\text{ArN}_2\text{Ar}$. It has been demonstrated that the nitro groups of DNC can be electroreduced to a hydroxylamine derivative, generating a single reduction peak in aqueous medium which involves the transfer of 8 electrons and 8 protons. The current response produced by the reduction of DNC to a hydroxylamine derivative was shown to be the most intense analytical signal, whose value increased by two orders of magnitude using the BP-MWCNT/PS platform. Likewise, its intensity was stable and improved at pH 5, thus it was deemed under this condition to validate the electroanalytical method. The electroanalytical technique of DPV coupled with the BP-MWCNT/PS-GCE electrochemical sensor was employed. The method showed good linearity and precision, with a LOD of $0,78 \text{ mg L}^{-1}$ and a sensitivity

of $3,07 \mu\text{A mg}^{-1} \text{L cm}^{-2}$. Additionally, AD i-t was used to validate a method using a BIAS measurement system, coupled with the BP-MWCNT/PS-SPE electrochemical sensor. In this case, a LOD of $0,52 \text{ mg L}^{-1}$ and a sensitivity of $3,42 \mu\text{A mg}^{-1} \text{L cm}^{-2}$ were obtained, in addition, the method proved to be linear in the range of $1,51$ to $7,56 \text{ mg L}^{-1}$. Although AD i-t represented a more sensitive technique compared to DPV, when used with the BIAS measurement system, it proved to be less reproducible and more laborious for conducting an analysis. The recovery of the electroanalytical method by DPV was evaluated using NCZ in pharmaceutical form, where average recoveries of $104,0 \pm 6,0 \%$ with an RSD of $5,8 \%$ for the intraday study, and $100,2 \pm 7,9 \%$ with an RSD of $7,9 \%$ for the interday study were obtained. The electroanalytical method developed by DPV was successfully applied in the determination and confirmation of NCZ residues in chicken muscle tissue, where quantification was achieved up to an amount of $743 \pm 50 \text{ mg L}^{-1}$ with an RSD of $6,7 \%$. The results obtained from the DPV electroanalytical method were compared with an HPLC-DAD reference method, where no significant differences were found.

1. INTRODUCCIÓN

La química electroanalítica es un subcampo de la electroquímica, centrado en el desarrollo de nuevas técnicas, métodos y electrodos modificados para investigaciones analíticas cuantitativas¹. En las últimas décadas, el desarrollo de las técnicas electroanalíticas ha despertado un creciente interés en diferentes áreas de la química, debido a su versatilidad en numerosas aplicaciones, como la monitorización ambiental, el control de calidad industrial, el análisis biomédico y aplicaciones en el sector energético², lo cual ha hecho que se conviertan en una alternativa cada vez más prometedora en el análisis químico. Las técnicas electroanalíticas se basan en la medida de corriente, potencial o carga generadas durante reacciones químicas en un sistema electroanalítico², y son consideradas una herramienta poderosa que puede ofrecer bajos límites de detección (LOD), alta sensibilidad, selectividad, exactitud, reproducibilidad, amplio rango dinámico lineal, y tiempos de análisis cortos con instrumentación de costo relativamente bajo^{3,4}. Esto último representa una ventaja interesante si se compara con las técnicas analíticas convencionales, las cuales requieren de instalación de equipamiento voluminoso, y suelen tener elevados costos de mantenimiento y funcionamiento. Una de las ventajas más notables de las técnicas electroanalíticas, es la capacidad de miniaturizar sus sistemas de medición electroquímicos⁴. Esto posibilita el uso de menores cantidades de muestra (5-20 μL)⁵ y solventes, haciéndolas más amigables con el medio ambiente, además la portabilidad de los instrumentos electroanalíticos permite realizar análisis *in situ*, lo que es beneficioso para la detección de especies electroactivas en tiempo real⁴.

Un elemento clave dentro de un sistema de detección electroanalítico es el electrodo de trabajo (WE), el cual es el sitio donde ocurren las reacciones redox, que conllevan a la generación de una corriente electroquímica denominada corriente farádica. Los electrodos de trabajo comúnmente usados incluyen a los electrodos de pasta de carbono (CPE) y a los de carbono vítreo (GCE), los cuales por lo general emplean un tubo de teflón como material aislante (figura 1). Ambos presentan buena estabilidad química y electroquímica, excelente conductividad, versatilidad, amplias ventanas de potencial^{6,7} y corrientes de fondo relativamente bajas³, y a diferencia de

otros electrodos comerciales, estos pueden ser reutilizados, convirtiéndolos en herramientas muy útiles para aplicaciones electroanalíticas.

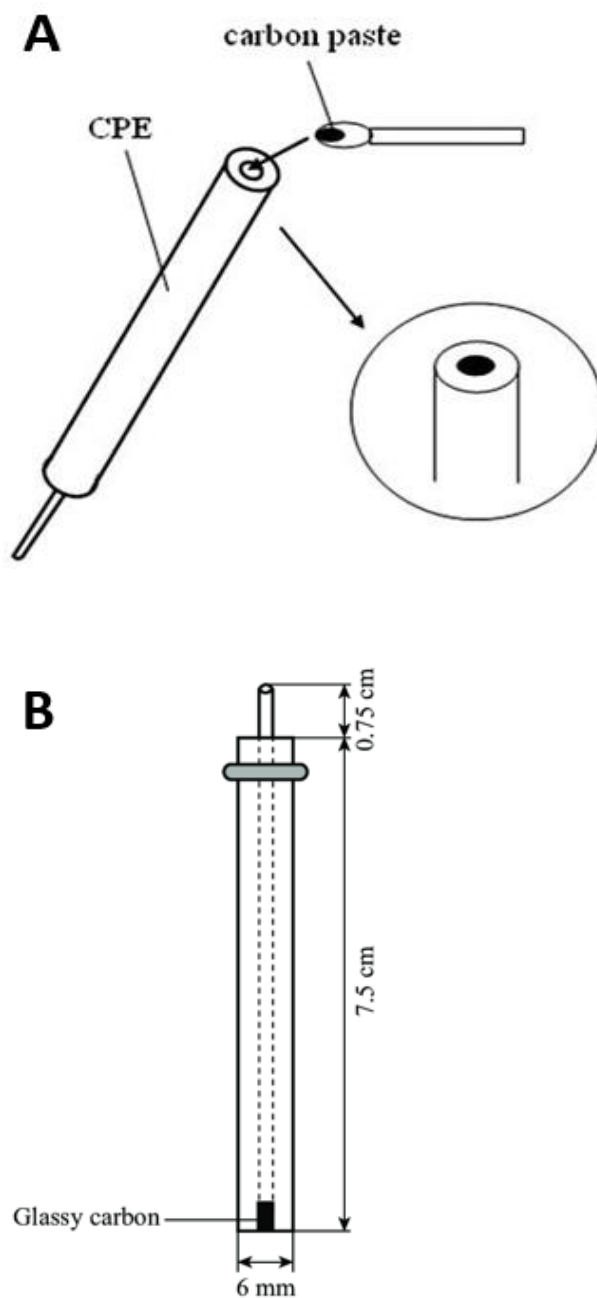


Figura 1. (A) *electrodo de pasta de carbono*⁸ y (B) *electrodo de carbono vítreo*⁹.

Uno de los logros en la miniaturización del equipamiento electroanalítico ha sido el desarrollo de los electrodos serigrafiados, mejor conocidos como “Screen–printed electrodes” (SPEs), los cuales se fabrican utilizando impresoras industriales, que depositan una combinación de capas de tintas conductoras (carbono, grafito, plata y oro) sobre sustratos cerámicos o plásticos^{10,11} (figura 2). La ventaja de este tipo de electrodos radica en su versatilidad en términos de diseño, además son ampliamente utilizados en aplicaciones portátiles y dispositivos desechables debido a su bajo costo.

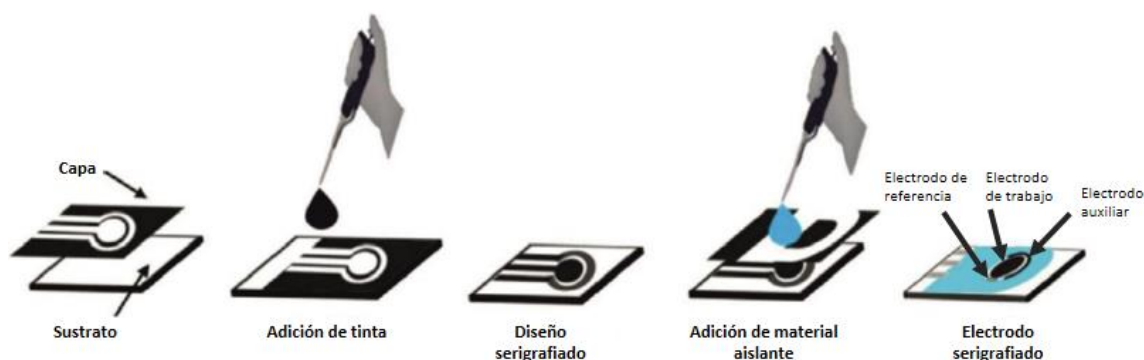


Figura 2. Representación esquemática del proceso de fabricación de SPEs¹¹.

El análisis electroquímico con SPEs se puede llevar a cabo en una celda común de metacrilato o de vidrio¹², pero también se puede realizar sin el uso de una celda electroquímica, en este caso el analito es acumulado sobre la superficie del WE y posteriormente es agregada una gota de solución electrolítica que permite cubrir los tres electrodos, para finalmente registrar la medición electroanalítica¹³. Las formas de medición antes mencionadas se han recomendado para ejecutar principalmente técnicas electroanalíticas por voltamperometría^{12,13}, sin embargo, la detección amperométrica con SPEs es más utilizada, debido a una mayor selectividad en la técnica, la cual ha tenido mejores resultados al acoplarse a un sistema de medición BIAS (sistema de análisis de inyección por lotes). El BIAS fue desarrollado por Wang y Taha en 1991¹⁴, el cual ha experimentado cambios en el diseño de la celda electroquímica a lo largo de los años. La celda BIAS está llena con solución electrolítica, y contiene los respectivos electrodos para llevar a cabo la medición electroanalítica. Su funcionamiento se basa en la

inyección de un pequeño volumen de muestra a través de la punta de una micropipeta, directamente sobre la superficie del WE¹⁵.

Entre los avances más significativos con respecto a los WE se destaca el mejoramiento de su superficie, lo que ha permitido aumentar la selectividad de las técnicas electroanalíticas utilizadas, y ha dado como resultado el desarrollo de los denominados sensores electroquímicos. Los sensores electroquímicos son una clase de sensores químicos en los que se utiliza un electrodo como elemento transductor en presencia de un analito¹⁶. Estos sensores se basan en la conversión de una señal química desde la concentración de un componente de muestra específico¹⁷, en una señal eléctrica medible (potencial, resistencia y corriente eléctrica)¹⁶, para obtener datos analíticos cuantitativos o semicuantitativos precisos¹⁷. Los sensores electroquímicos son dispositivos emergentes que representan herramientas analíticas confiables, simples, económicas, portátiles, selectivas y fáciles de usar, y que pueden ser utilizados fuera de los laboratorios por personal no especializado¹¹. El rendimiento analítico de los sensores electroquímicos está fundamentalmente ligado al material del que está hecho el WE¹⁸⁻²⁰, y se puede mejorar modificando su superficie utilizando recubrimientos, materiales depositados y/o adheridos a la superficie del WE^{21,22}.

En la actualidad resulta un desafío interesante la búsqueda de nuevos materiales para la construcción de sensores robustos, que puedan superar las limitaciones de los sensores existentes y sean más eficientes. En este sentido los materiales a nanoescala han despertado un creciente interés para el desarrollo de sensores electroquímicos, donde aparecen los nanotubos de carbono (CNT) como la alternativa más prometedora. Los CNT, descubiertos por lijima en 1991²³, exhiben excelentes propiedades mecánicas, térmicas, ópticas y conductivas; están formados por láminas de grafeno que les confieren buena estabilidad química, gran área de superficie y alta resistencia mecánica, considerando un peso ultraligero²⁴. Además, los CNT poseen actividad catalítica, alta flexibilidad, inercia química y bajos LOD^{25,26}. Todas estas características y propiedades únicas hacen que los CNT tengan un estatus preminente en nanomateriales, permitiendo su uso en el desarrollo de nuevos sensores electroquímicos que sean útiles en aplicaciones analíticas.

Por lo general se pueden considerar dos tipos de CNT, los de pared simple (SWCNT) (figura. 3A) y pared múltiple MWCNT (figura. 3B), estos últimos están conformados por varios tubos concéntricos con un eje en común, los cuales se encuentran inmersos uno dentro de otro²⁷. Conviene enfatizar que los SWCNT son de baja disponibilidad y alto costo en comparación con los MWCNT, por lo que estos últimos son más frecuentemente usados en aplicaciones electroquímicas.

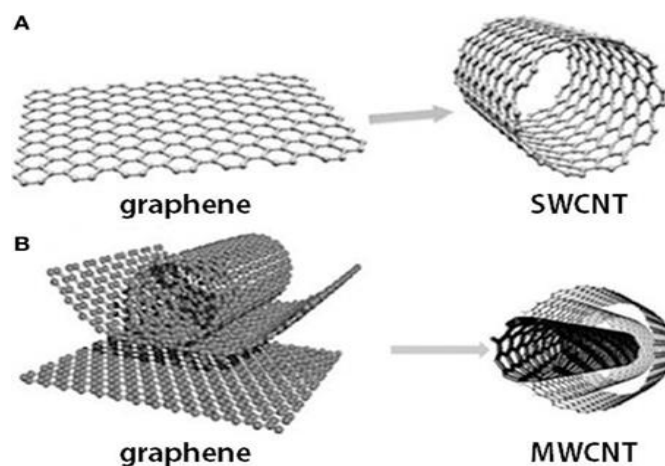


Figura 3. Nanotubos de carbono y grafeno como estructuras (A) de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y (B) de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT)²⁸.

En esta Tesis se busca aprovechar las propiedades únicas de los CNT para formar una plataforma nanoestructurada de MWCNT, que permita modificar la superficie de los electrodos convencionales (GCE y SPE), para el desarrollo de una metodología electroanalítica que sea reproducible, económica, sencilla y amigable con el medio ambiente. La modificación de la superficie de un electrodo a partir de CNT implica la elaboración de dispersiones de nanotubos, las cuales a su vez necesitan de un solvente que permita la generación de una dispersión estable (figura 4). En la literatura se describen diferentes surfactantes y solventes usados para generar dispersiones de SWCNT y MWCNT, tales como dodecilsulfato de sodio²⁹, Triton X-100³⁰, 1,2-diclorobenceno, cloroformo, 1-metilnaftaleno o dimetilformamida³¹, sin embargo dichos solventes pueden resultar ser tóxicos o difíciles de evaporar. En este sentido se ha propuesto utilizar el 1,3-dioxolano³², debido a su baja toxicidad y por tener la capacidad

de dispersar suficientemente las partículas de CNT, dando como resultado dispersiones estables.



Figura 4. *Dispersión de MWCNT. (A) Baja estabilidad de la dispersión de nanotubos, (B) Dispersión estable de los nanotubos²⁹.*

Comúnmente se ha utilizado el método de *drop casting*^{33,34} para modificar la superficie de un electrodo, mediante la deposición de una gota de líquido que contiene una suspensión de partículas de CNT (figura 5), sin embargo uno de los inconvenientes que presenta dicho método es la ocurrencia del efecto “anillo de café”, el cual altera la distribución de las nanopartículas, creando una superficie modificada poco homogénea, y por ende generando medidas electroquímicas poco reproducibles para fines analíticos.

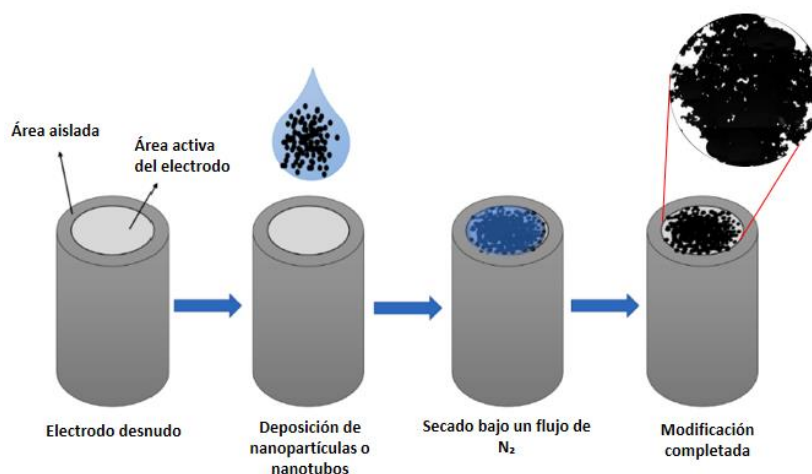


Figura 5. *Método de drop casting para modificar electrodos con dispersiones de CNT^{35,36}.*

Como respuesta a este inconveniente se ha propuesto la modificación de la superficie del electrodo mediante una plataforma de MWCNT, conocida como *Buckypaper* (BP) (figura 6), la cual dará como resultado final la obtención de un sensor electroquímico útil para la metodología a desarrollar en este trabajo. El BP es un material altamente poroso, mecánicamente estable y eléctricamente conductor, con varias ventajas sobre otras películas de CNT^{37,38}. Algunas de sus aplicaciones se encuentran en supercondensadores, actuadores electromecánicos, músculos artificiales, sustratos transparentes y conductores. Además, su uso en celdas de combustible^{39,40} y dispositivos sensores⁴¹ acaba de comenzar. El proceso de elaboración de BP resulta ser bastante sencillo, económico y rápido, donde la lámina de CNT es producida mediante filtración al vacío de suspensiones de SWCNT o MWCNT, las cuales son preparadas por sonicación en presencia de un solvente o tensoactivo³⁰.

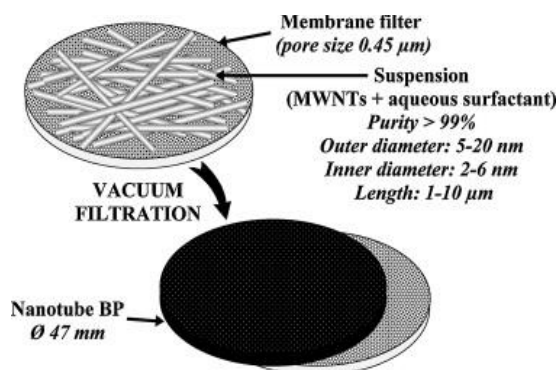


Figura 6. Esquema del proceso de fabricación de BP basado en nanoestructuras de MWCNT³⁰.

Una de las principales ventajas que ofrecen los CNT es su capacidad de funcionalización con otras moléculas, como tensoactivos⁴², polímeros²⁹, enzimas⁴³, moléculas redox^{44,45}, entre otras. El proceso de funcionalización implica la modificación de la superficie MWCNT mediante métodos covalentes y no covalentes. El método covalente se basa en la unión de diferentes grupos funcionales químicos en las paredes laterales de los CNT, donde se puede perturbar la estructura de los CNT debido al cambio de hibridación de los átomos de carbono de sp^2 a sp^3 , produciendo una pérdida de los electrones π , y finalmente alterando sus propiedades conductoras⁴⁶. Por otra

parte, el método no covalente se basa en la adsorción de fracciones químicas en la superficie de los nanotubos, a través de la interacción de apilamiento π - π u otras fuerzas intermoleculares (Van der Waals, puente de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas), manteniendo las propiedades deseables de los nanotubos⁴⁶, lo cual resulta ventajoso para aplicaciones electroanalíticas, debido a que se permite la adsorción del analito de interés, conservando la red electrónica de los CNT. Este fenómeno aumenta la sensibilidad de los electrodos modificados con la plataforma MWCNT, mejorando la capacidad de detección electroquímica¹³. En los últimos años se ha buscado activamente nuevas moléculas que sean compatibles con la superficie de los CNT⁴⁷, sin embargo es importante tener en cuenta que esta superficie es de naturaleza hidrofóbica, por lo que la elección de moléculas insolubles en agua resulta beneficiosa para fomentar los procesos de fisisorción en la plataforma MWCNT. Es por ello que este trabajo busca ser aplicado a un compuesto nitroaromático (NC), debido a que son compuestos que se caracterizan por presentar escasa solubilidad en agua⁴⁸, lo que puede conllevar a su fácil incorporación en la red tridimensional de los CNT para su posterior análisis. En este contexto, el analito a estudiar es la 4,4'-dinitrocarbanilida, la cual es el componente activo principal de la nicarbazina (NCZ) (figura 7).

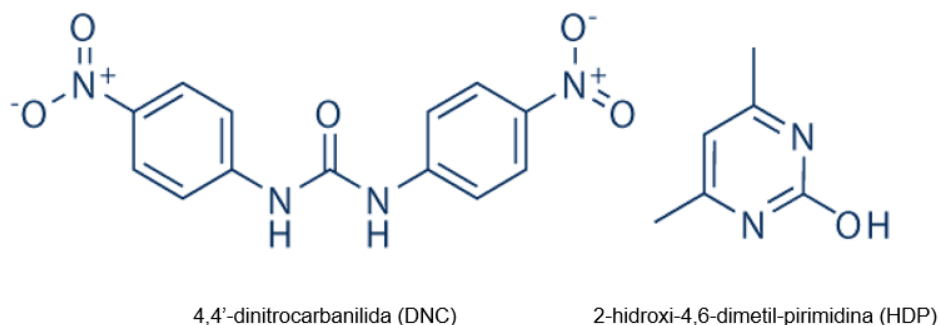


Figura 7. Estructura química de la nicarbazina.

La NCZ pertenece al grupo de las carbanilidas, el cual es un complejo bimolecular sintético altamente insoluble en agua⁴⁹, preparado en relación molar 1:1 de 4,4'-dinitrocarbanilida (DNC) y 2-hidroxi-4,6-dimetil-pirimidina (HDP), encontrándose entre

los anticoccidiales más utilizados en la producción avícola⁵⁰ para el control de protozoarios coccidios⁵¹, que afectan principalmente a las aves de corral en condiciones cálidas y húmedas⁵². La función del HDP en la NCZ es permitir la absorción de la DNC⁴⁹, sin embargo el HDP es excretado más rápidamente en pollos, mientras que la DNC se acumula en diferentes tejidos⁵³, por lo que el análisis de NCZ se suele realizar en función de restos de DNC. De esto último se desprende que la DNC, es el único residuo marcador de preocupación que queda de la NCZ en la carne de pollo⁵⁴, además existe una creciente preocupación en Europa por los posibles residuos de NCZ en los huevos. Desde hace muchos años la unión europea no permite que esta sustancia se incorpore a pollos de engorde, durante más de 28 días antes de realizar el sacrificio del animal⁵⁵. La NCZ no es genotóxica, sin embargo, la toxicidad primaria resultante del uso oral de NCZ sobre ratas puede manifestarse en lesiones renales⁵³. Con base en datos toxicológicos⁵⁶, las agencias sanitarias de todo el mundo han establecido límites máximos de residuos (LMR) para la DNC en diferentes tejidos de pollo, con el fin de garantizar la seguridad de los alimentos y proteger la salud de los consumidores. Los LMR para tejidos comestibles de pollo establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) con la Organización Mundial de la Salud (OMS), y seguido por las agencias reguladoras de Brasil, Estados Unidos y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. LMR de DNC en diferentes tejidos de pollo ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Tejido	DNC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Codex (FAO/WHO)	Brasil	USA	Unión Europea
Músculo	200	200	4000	4000
Hígado	200	-	4000	15000
Riñón	200	-	4000	6000
Piel/grasa	200	-	4000	4000

Fuente: EFSA⁵⁷ (2010), FAO/WHO⁵⁸ (2015), GPO⁵⁹ (2012) y MAPA⁶⁰ (2015)

Algunas de las propiedades fisicoquímicas de la DNC se muestran en la tabla 2. La molécula de la DNC tiene actividad electroactiva debido a la presencia de dos grupos nitro en su estructura química, los cuales pueden ser reducidos a un derivado de

hidroxilamina (ArNHOH) por técnicas voltamétricas o amperométricas, como se ha descrito en otros NC⁶¹. La reducción de los grupos nitro es la señal analítica que se espera utilizar en este trabajo para desarrollar un método electroanalítico por voltametría de pulso diferencial (DPV) y por amperometría i-t.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la DNC.

Uso	Coccidiostático
Masa molecular	302,24
CAS	587-90-6
Sinónimos	1,3-bis(4-nitrofenil)urea
Apariencia	Sólido amarillo
Solubilidad en agua	0,02 mg/L ⁴⁹
Punto de fusión	> 300°C
Densidad	1,3627
Índice de refracción	1,6120
Log P _{ow}	3,76
pK _a	12,44 ± 0,70

Los datos fueron obtenidos de ChemIDplus por NIH⁶²

Dentro del campo del electroanálisis, los métodos voltamétricos y amperométricos son las técnicas más utilizadas para la detección de una variedad de analitos que se encuentran en diferentes sectores industriales^{63,64}. En los métodos voltamétricos se mide la corriente producida por la especie electroactiva en respuesta a un potencial aplicado al WE. El potencial se aplica durante el análisis, ya sea de forma continua o en variaciones paso a paso. El potencial aplicado al electrodo sirve como fuerza impulsora de la reacción electroquímica, que permite que las especies químicas se oxiden o reduzcan³. Los procedimientos voltamétricos se han utilizado ampliamente para dilucidar las propiedades redox de muchos fármacos⁶⁵, debido a que muchos de los componentes activos de las formulaciones se pueden oxidar o reducir fácilmente, permitiendo establecer su comportamiento electroquímico. La voltametría cíclica (CV) se ha vuelto particularmente importante, debido a que entrega datos que se pueden utilizar con fines mecanísticos. En este caso será utilizada para caracterizar la plataforma nanoestructurada de MWCNT, y para estudiar el comportamiento electroquímico del componente activo de la NCZ. La CV es la técnica más utilizada para adquirir información cualitativa⁵, sobre diferentes procesos electroquímicos que tienen lugar al aplicar un

escaneo de potencial. Los picos de corriente medidos a partir de un voltamograma cíclico proporcionan información valiosa sobre los procesos de oxidación y reducción de una especie electroactiva. Además proporcionan información sobre el tipo de proceso objeto de estudio: (i) reversible, (ii) irreversible o (iii) cuasi-reversible. Otra información relevante obtenida está relacionada con la naturaleza del proceso, en términos de características de adsorción o difusión¹¹. El pico de corriente puede ser descrito mediante la ecuación de Randles- Sevcik⁶⁶:

$$I_p = \pm(2,69 \times 10^5) EAS \times D^{1/2} \times n^{3/2} \times v^{1/2} \times C \quad (1)$$

donde I_p es la corriente máxima (anódica o catódica) medida en amperios, EAS es el área de superficie electroactiva (cm^2), D es el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), n corresponde al número de electrones transferidos, v es la velocidad de barrido (V s^{-1}) y C es la concentración en el seno de la disolución (mol cm^{-3}).

Otra técnica de gran aplicación incluida dentro de los métodos voltamétricos es la voltametría de pulso diferencial (DPV), la cual se caracteriza por alcanzar mejores LOD que la CV, permitiendo medir niveles de trazas en especies orgánicas e inorgánicas⁵. Es por ello que esta técnica resulta más adecuada para fines cuantitativos, y en este trabajo será empleada para el desarrollo de un método electroanalítico que permita llevar a cabo la determinación de NCZ con BP-MWCNT/PS-GCE.

Dentro de los métodos amperométricos, la detección amperométrica (AD) es muy popular hoy en día como una técnica utilizada en electroforesis capilar, cromatografía líquida y análisis por inyección en flujo (FIA)⁶⁷, donde se han obtenido resultados exitosos. La AD se lleva a cabo aplicando un potencial constante al electrodo de trabajo, y la corriente resultante se mide en función del tiempo. La aplicación de un potencial permite llevar a cabo las reacciones redox, donde la corriente de salida es proporcional a la concentración del analito⁶⁸. La expresión matemática que relaciona la cantidad de analito oxidado o reducido en la superficie del WE con la corriente resultante se puede establecer según la ley de Faraday⁶⁹:

$$I_t = \frac{dQ}{dt} = nF \frac{dN}{dt} \quad (2)$$

donde i_t es la corriente producida en la superficie del WE a un tiempo t , Q es la carga en la superficie del WE, t es el tiempo, n es el número de electrones transferidos por mol de analito, F es la constante de Faraday (96500 C mol^{-1}) y N es el número de moles de analito oxidado o reducido.

De acuerdo a la literatura⁷⁰, se ha informado el uso de la AD $i-t$ con el sistema BIAS acoplado a SPE, donde la superficie de estos últimos fue modificada con MWCNT. De acuerdo a los autores, el sistema BIAS-SPE resultó ser una herramienta portable, que permite realizar análisis rápidos y alcanzar bajos LOD. En esta tesis la AD $i-t$ será utilizada con el sistema BIAS-SPE, donde la superficie del SPE será modificada con películas de BP, para desarrollar un método electroanalítico que sea útil en la determinación de NCZ. La AD $i-t$ en el sistema BIAS-SPE tiene un comportamiento característico, como se puede observar en la figura 8. Antes de realizar la inyección de la muestra la corriente se mantiene estable, luego la inyección es realizada sobre la superficie del WE, generando una respuesta transitoria en forma de pico, seguido de una rápida caída de la señal al nivel inicial⁷¹.

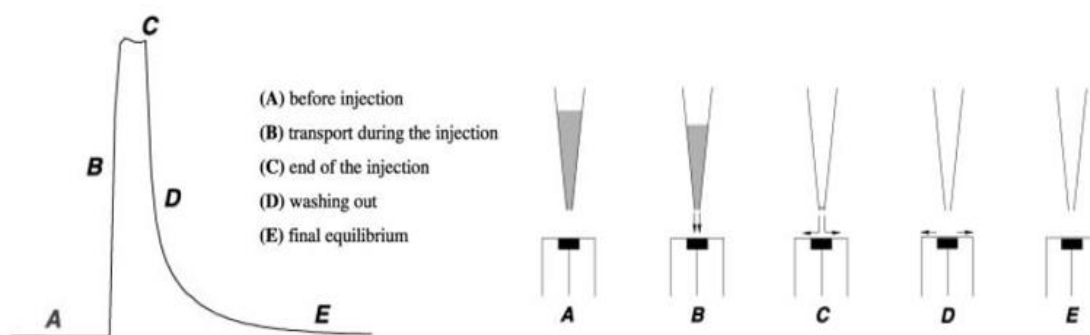


Figura 8. Respuesta instrumental por AD $i-t$ en el sistema BIAS⁷¹.

Con base en la literatura consultada, se puede resaltar que los estudios electroanalíticos sobre NCZ son escasos. Hasta el momento se han reportado dos estudios de polarografía pulso diferencial (DPP)^{72,73} para la determinación cuantitativa de residuos de NCZ en tejido de pollo; por otro lado, Knupp *et al*⁷⁴ determinaron los

residuos de NCZ en tejido muscular de aves y huevos por DPP. Los trabajos antes mencionados fueron publicados hace 4 décadas, donde se utilizaban polarógrafos con electrodos de mercurio para la determinación de analitos. Sin embargo, debido a la alta toxicidad del mercurio, esta práctica ha sido gradualmente reemplazada por el uso de modernos potenciostatos. Estos equipos permiten llevar a cabo las mediciones electroquímicas a un potencial controlado, utilizando diferentes plataformas de electrodos que no utilizan mercurio debido a su alta toxicidad, lo cual hace que las técnicas electroanalíticas empleadas sean cada vez más amigables con el medio ambiente. Además, se debe considerar las desventajas que tiene la técnica polarográfica, como es la sensibilidad a impurezas o a interferencias de la matriz de la muestra, y la aplicación de un potencial continuamente cambiante, que se ve manifestado de manera negativa en los LOD. Una forma más sensible, reproducible y rápida en comparación con los estudios antes mencionados se ha reportado en el estudio de Ellison y Tait⁷⁵, donde se cuantificó la NCZ en tejido de pollo por voltametría de onda cuadrada (SWV), sin embargo, el electrodo de trabajo utilizado sigue considerando el sistema clásico de gota de mercurio. Un estudio más reciente⁷⁶ reporta el desarrollo de un sensor electroquímico a partir de la modificación de un SPE de carbono con cubos de azul de Prusia, el cual permite la detección de NCZ en carne de pollo y huevos. En lo que corresponde a las técnicas analíticas convencionales, se ha empleado preferentemente la técnica de cromatografía líquida para el análisis de NCZ con diferentes sistemas de detección: electroquímica^{74,77}, UV/VIS⁷⁸ y espectrometría de masas en tándem⁷⁹. También se ha informado la detección de NCZ a través de un biosensor de resonancia de plasmón superficial⁸⁰, y mediante técnicas de inmunoensayos utilizando anticuerpos policlonales⁸¹ y monoclonales⁸².

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se espera que las técnicas electroanalíticas a emplear en este trabajo, sean herramientas efectivas para desarrollar una metodología útil en el análisis de NCZ, a través de un sensor electroquímico basado en nanoestructuras de MWCNT. Este último constituye un material crucial, debido a que otorgará bajos LOD, con una mayor sensibilidad y selectividad del método hacia la NCZ. Se prevé que la metodología electroanalítica a desarrollar en esta tesis sea sencilla de aplicar, económica, efectiva y rápida en el análisis de NCZ, y que a su vez pueda ser

aplicada en la determinación de residuos de NCZ en tejido muscular de pollo. Los resultados generados por el método electroanalítico a desarrollar serán comparados con un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección de arreglo de diodos (DAD), para verificar la confiabilidad de los mismos.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

El desarrollo de películas de MWCNT a partir de la tecnología BP, permitirá la modificación de GCE y SPE, generando un sensor electroquímico estable, sensible y reproducible, que logre una interacción efectiva y selectiva con la DNC, basado en la naturaleza altamente hidrofóbica de esta última. Esto debería resultar en una mejora significativa en la adsorción de la DNC por parte de la plataforma BP-MWCNT/PS cuando se utiliza un medio de reacción acuoso, permitiendo llevar a cabo la detección de la DNC de manera eficiente, para desarrollar una metodología electroanalítica voltamétrica y/o amperométrica que sea útil en el análisis de NCZ.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sensor electroquímico sensible con nanoestructuras de MWCNT, a partir de la modificación de GCE y SPE, para llevar a cabo la detección electroquímica y cuantificación de la DNC en NCZ mediante técnicas voltamétricas y/o amperométricas.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Fabricar películas de tipo BP a partir de dispersiones de MWCNT en 1,3-dioxolano.
2. Modificar los GCE y SPE mediante la plataforma nanoestructurada de MWCNT tipo BP.
3. Caracterizar la plataforma nanoestructurada de MWCNT mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopía RAMAN.
4. Estudiar el comportamiento electroquímico de la DNC sobre GCE modificados con nanoestructuras de MWCNT por la tecnología tipo BP, mediante voltametría cíclica.
5. Desarrollar un método electroanalítico por DPV con BP-MWCNT/PS-GCE y mediante amperometría i-t con BP-MWCNT/PS-SPE.

6. Aplicar el método electroanalítico desarrollado para la determinación de residuos de NCZ en tejido muscular de pollo.
7. Comparar los resultados obtenidos con un método cromatográfico de alta eficiencia con detección de arreglo de diodos.

3. METODOLOGÍA

3.1 Reactivos

- 1,3-Bis(4-nitrofenil) urea o DNC (97%) de Sigma-Aldrich (materia prima)
- 1,3-Dioxolano p.a. de Sigma-Aldrich
- Acetato de etilo p.a. de Merck
- Acetonitrilo grado HPLC de Merck
- Ácido acético glacial (100%) de Merck
- Ácido bórico p.a. de Merck
- Ácido clorhídrico (37 %) de Merck
- Ácido orto-fosfórico (85%) de PanReac AppliChem ITW Reagent
- Agua desionizada grado Milli-Q
- Alúmina (0,3 μm y 0,05 μm) de Leco
- Cloruro de potasio p.a. de Merck
- Etanol p.a. de Merck
- Ferricianuro de potasio p.a. de Merck
- Hidróxido de sodio p.a. de Merck
- Músculo de pollo certificado “Chicken Raw-Reference Material LGC7206, UKAS[®] reference materials”
- Nanotubos de carbono de multipared (> 95 % en C) de DropSens
- Nicarbazina (25%) de Veterquímica (forma farmacéutica). Excipientes: glucosa
- Nitrógeno extra puro (99,99%) de Linde Gas Chile S.A
- Poliestireno ($M_w \sim 35$) de Aldrich

3.2 Materiales

- Abrazadera de matraz
- Almohadillas para pulir electrodos
- Barras magnéticas
- Botellas de vidrio de 25, 500 y 1000 mL con tapa rosca
- Placas de Petri
- Celda BIAS de Metrohm hecha en Acrilonitrilo Butadieno Estireno (ABS)

- Celda de cuarzo para espectrofotómetro (10 mm)
- Celda electroquímica de vidrio (10 mL) con tapa de acrílico
- Columna C₁₈ Symmetry en fase reversa (5 µm, 3,9 mm x 150 mm)
- Conector de cable i-µStat para SPE de Metrohm DropSens
- Electrodo auxiliar (Platino)
- Electrodo de referencia (Ag/AgCl)
- Electrodo de trabajo (GC): 3 mm de diámetro
- Electrodo serigrafiado 110D de Metrohm DropSens (electrodo auxiliar: carbón, electrodo de referencia: Ag, electrodo de trabajo: carbón)
- Embudo de vidrio
- Espátula
- Filtros de jeringa Chromafil® de Nylon (0,22 y 0,45 µm)
- Filtros de membrana Whatman de Nylon (0,20 µm, 47 mm de diámetro)
- Filtro de succión al vacío de vidrio
- Jeringa Hamilton® 81000 para HPLC (20 µL)
- Matraces aforados (10, 25, 100 y 1000 mL)
- Micrómetro exterior Makawa (0–25 mm, 0,01 mm)
- Micropipeta electrónica programable P1000M (10–250 µL)
- Micropipeta mecánica (0,5–10, 10–100, 100–250 y 100–1000 µL)
- Microtubos de polipropileno (2 mL)
- Navecilla para pesar
- Papel Parafilm
- Pinzas de plástico
- Pipetas Pasteur de plástico (3 y 5 mL)
- Pissetas (250 mL)
- Portaobjetos
- Puntas para micropipetas
- Soporte universal
- Tubos para centrifuga de polipropileno (15 mL)
- Tubos Eppendorf (0,5, 1,5 y 5 mL)
- Tubos de vidrio para dispersiones (20 mL)
- Vasos de precipitado (10 y 50 mL)

3.3 Equipos

- Agitador magnético HI 190M/ Hanna Instruments
- Agitador vortex
- Balanza analítica precisa ES 225SM-DR
- Baño termostático con agitación
- Bomba de vacío N820.3FT.18/ Knf Neuberger
- Cromatógrafo líquido Jasco LC-Net II/ADC con detector de arreglo de diodos (DAD)
- Espectrómetro RAMAN, Delta Nu Advantage p/n A532
- Espectrofotómetro UV/VIS, Agilent 8453
- Estufa Blinder Ecocell
- Goniómetro estándar de Ramé-Hart Instrument Co., modelo 200
- Máquina cortadora Silhouette Portrait
- pHmetro WTW modelo pMx 3000 y OAKTON pH 700
- Potenciostatos CHInstrument 760c/760e
- Procesadora de alimentos Moulinex
- Microscopio electrónico de barrido Inspect-F50
- Sistema de evaporación con nitrógeno TurboVap® LV, Biotage
- Sistema purificador de agua Milli-Q Merk
- Sonicador Branson Branson 2510 y VWR/Symphony

3.4 Preparación de soluciones

3.4.1 Soluciones electrolíticas

3.4.1.1 Buffer Britton-Robinson (BRB) 0,1 M

Para preparar 1 litro de buffer se pesaron 6,19 g de ácido bórico, llevándose a un matraz donde se agregó aproximadamente 1/4 de su capacidad con agua Milli-Q, posteriormente se adicionó 5,7 mL de ácido acético glacial (100%) y 7,9 mL de ácido ortofosfórico (85%). La mezcla resultante se sonicó durante 10 minutos. Finalmente, se añadió agua Milli-Q al matraz hasta enrasar a su capacidad. El buffer resultante tuvo aproximadamente un pH de 2. El pH del buffer se ajustó

agregando pellets de NaOH al mismo con agitación, hasta alcanzar el pH deseado.

3.4.1.2 Solución de KCl 0,1 M

Se preparó 100 mL de una solución concentrada de KCl 3 M, disolviendo 22,36 g de dicha sal en agua Milli-Q. A partir de la solución concentrada de KCl se preparó una solución diluida de KCl 0,1 M.

3.4.2 Soluciones stock y de trabajo

Como punto de partida se preparó una solución stock a partir de 1,56 mg de un estándar de referencia de materia prima (DNC 97%) en 25 mL de acetonitrilo (ACN). La solución se sonicó durante 5 minutos y luego se agitó vigorosamente en un vortex durante 1 minuto. La solución resultante tuvo una concentración de 0,20 mM. A partir de la solución stock se prepararon las respectivas soluciones de trabajo en tubos de Eppendorf, haciendo diluciones en ACN y agitando durante 1 minuto en vortex. Todas las soluciones fueron almacenadas a refrigeración en material ámbar para mantener su estabilidad.

3.4.3 Solución de NCZ (0,12 mg mL⁻¹)

Se disolvieron 3 mg de NCZ en 25 mL de ACN. La solución resultante se sonicó durante 5 minutos y luego se agitó vigorosamente en un vortex durante 1 minuto. Finalmente, la solución fue filtrada con membranas de Nylon (0,22 µm).

3.4.4 Solución de ferricianuro de potasio K₃[Fe(CN)₆]

Se prepararon soluciones de ferricianuro de potasio 1 mM, disolviendo 3,29 mg de dicha sal en 10 mL de BRB (0,1 M) o KCl (0,1 M).

3.4.5 Solución ACN: agua (25:75 v/v)

Se preparó una solución a partir de la mezcla de 250 µL de ACN con 750 µL de agua Milli-Q, y se agitó en vortex durante 30 segundos.

3.4.6 Solución de PS

Se disolvió un pellet de PS ($M = 35$), con masa aproximada de 42 mg en 1 mL de 1,3-dioxolano, y se agitó vigorosamente con un vortex hasta su completa disolución.

3.4.7 Dispersión de MWCNT (3 mg mL^{-1})

Se pesó una cantidad equivalente a 3 mg de MWCNT previamente triturados, los cuales fueron disueltos en 1 mL de 1,3-dioxolano. La dispersión resultante se agitó en un baño ultrasónico durante 5 minutos. Se utilizaron 5 sesiones de sonicado con agitación mecánica en vortex entre cada periodo de sonicación.

3.4.8 Dispersión de MWCNT/PS ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$)

Las condiciones fueron optimizadas y se describen con detalle en la sección de resultados y discusión, sin embargo el proceso de elaboración de dispersiones de MWCNT/PS se puede resumir de la siguiente forma: se disolvieron en conjunto 4 mg de MWCNT y 3 mg de PS ($M = 35$) en 20 mL de 1,3-dioxolano. La mezcla resultante se agitó en un baño ultrasónico, donde se utilizó 8 sesiones de sonicado de 5 minutos, y agitación en vortex entre cada periodo de sonicación.

3.5 Procedimientos y métodos

3.5.1 Purgado de la solución electrolítica

Antes de realizar cualquier medición electroquímica, la solución electrolítica a emplear fue purgada con una corriente de nitrógeno para remover el oxígeno disuelto. Como tiempo de purgado se consideró 1 minuto por cada mililitro de solución electrolítica.

3.5.2 Pulido de electrodos de GC

Se utilizaron dos almohadillas de pulido, cada una fijada a una placa de vidrio. Sobre una de las almohadillas se depositó una pequeña cantidad de polvo de alúmina con un tamaño de partícula de $0,3 \mu\text{m}$, mientras que en la otra se colocó una cantidad similar de polvo de alúmina con un tamaño de partícula de $0,05 \mu\text{m}$. El polvo de alúmina colocado sobre las almohadillas fue humedecido con agua

Milli-Q formando una pasta. Antes de realizar el pulido el electrodo fue lavado con etanol y agua Milli-Q. El pulido se llevó a cabo efectuando movimientos circulares sobre la pasta formada, comenzando primero con la alúmina de 0,3 μm . Después de realizar el proceso de pulido, la superficie del electrodo fue lavada con abundante agua Milli-Q y se dejó secar al aire.

3.5.3 Fabricación de películas de BP

Las películas de BP se obtuvieron a través de filtración al vacío de la dispersión de MWCNT/PS sobre filtros de membrana de Nylon/0,20 μm (figura 9). Las películas de BP obtenidas fueron cortadas en diámetros de 6 y 4 mm para la modificación de GCE y SPE, respectivamente.

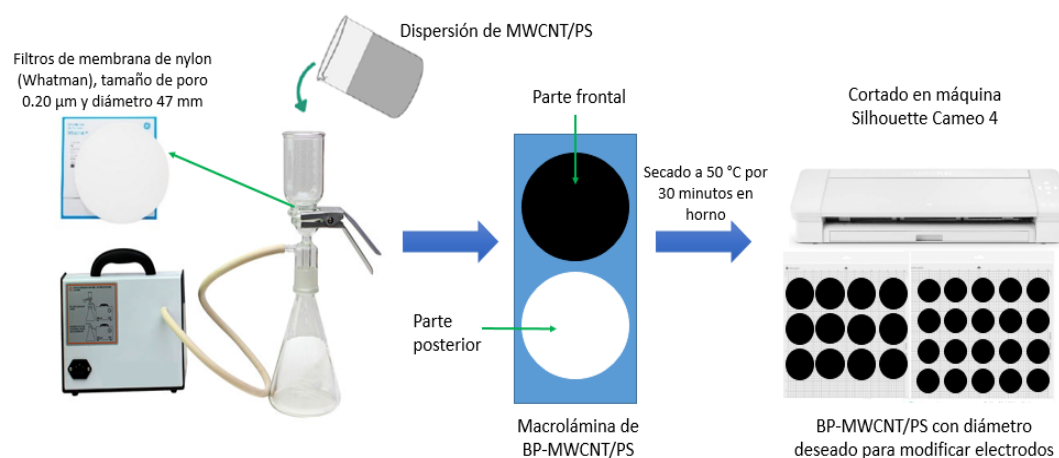


Figura 9. Proceso de fabricación de BP basado en nanoestructuras de MWCNT.

3.5.4 Modificación de GCE y SPE con películas de BP

La modificación de GCE y SPE se logró mediante el método de Stamp⁸³, como se muestra en la figura 10. En líneas generales, se depositó una gota de 1,3-dioxolano sobre un disco de BP, el cual inmediatamente se incorporó a la superficie del electrodo a modificar, ejerciendo una presión controlada alrededor de 20 segundos. El disco de BP adherido a la superficie del electrodo se dejó reposar por 2 minutos, posteriormente la membrana de Nylon fue removida con la ayuda de unas gotas de agua Milli-Q.

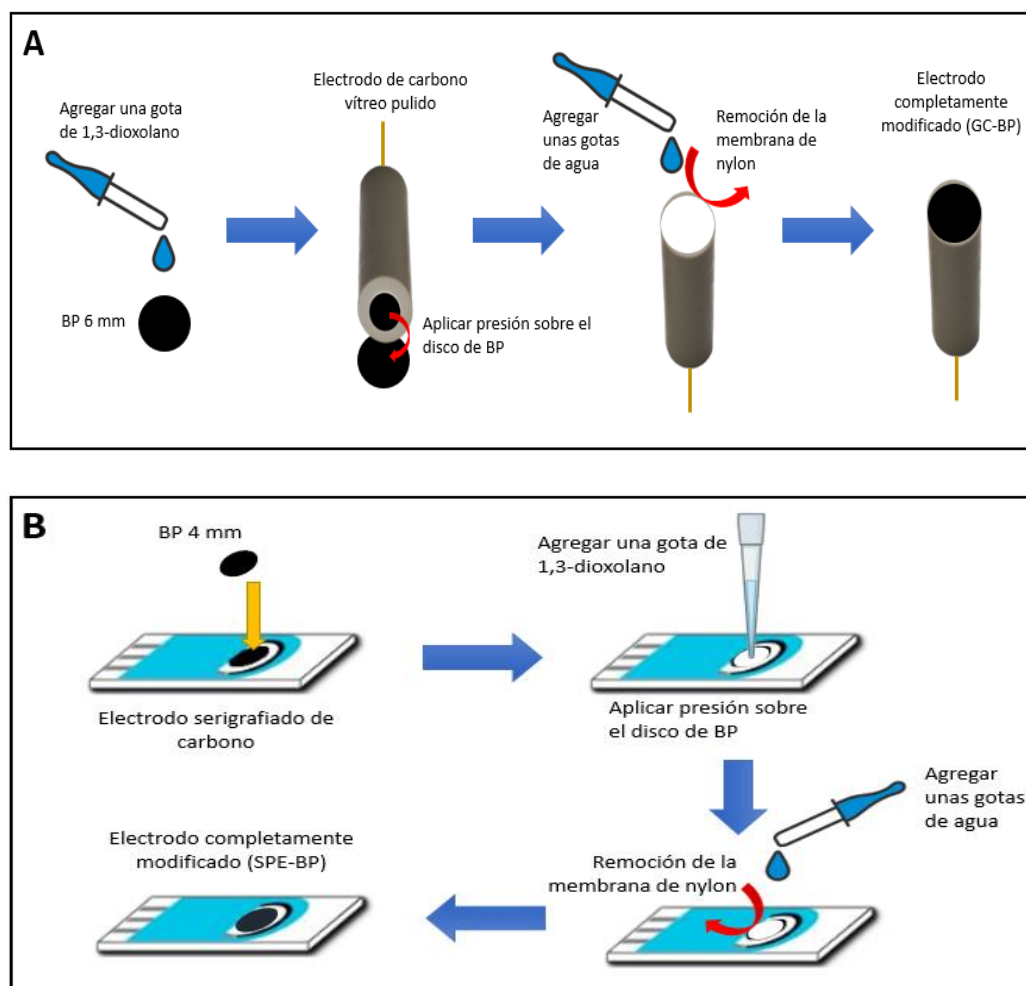


Figura 10. Proceso de modificación de electrodos con BP-MWCNT/PS. (A) Modificación de GCE y (B) Modificación de SPE.

3.5.5 Sistema de medición electroanalítico con GCE

Todas las mediciones con GCE se realizaron en una celda electroquímica de vidrio, usando 10 mL de BRB (0,1 M), además se utilizó un RE de Ag/AgCl (KCl 1 M) y un CE de platino.

3.5.6 Estudios de caracterización para la plataforma BP-MWCNT/PS

3.5.6.1 Caracterización por SEM

Para el análisis se prepararon dos discos de BP-MWCNT/PS de 10 mm de diámetro, el primero sin nitrocompuesto y el segundo se modificó con una cantidad total de 166 μL de una solución de DNC (0,2 mM). Cada disco fue fijado sobre el soporte para muestra (PIN SEM), mediante la metodología utilizada para modificar la superficie de un electrodo. Para el registro de imágenes, el equipo SEM utilizó alto vacío y un voltaje de 20 kV.

3.5.6.2 Caracterización por espectroscopía Raman

Para llevar a cabo el análisis se prepararon tres muestras. La primera muestra consistió en un BP de 6 mm de diámetro, y la segunda muestra fue un BP modificado con 100 μL de una solución de DNC (0,2 mM); ambas muestras fueron fijadas sobre un portaobjeto mediante la metodología descrita para modificar la superficie de un electrodo. La tercera muestra consistió en la deposición de una alícuota de 10 μL de una dispersión de MWCNT (3 mg mL⁻¹) sin PS sobre un portaobjeto, donde se dejó evaporar completamente el solvente antes de realizar su correspondiente análisis. Los parámetros consistieron en el uso de luz polarizada (532 nm) con un tiempo de integración de 30 segundos y una secuencia de retardo de 1 segundo. Para disminuir el ruido de la línea base se tomó el promedio de 5 espectros en cada medida realizada.

3.5.6.3 Ángulo de contacto con diferentes líquidos

La hidrofobicidad de la plataforma BP-MWCNT/PS fue evaluada utilizando los siguientes líquidos: agua Milli-Q, BRB a pH 7 y una mezcla de ACN: agua en proporción 25:75 v/v. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente (25 °C) y utilizaron 4 μL de cada líquido sobre diferentes BP de 6 mm de diámetro. El valor del ángulo de contacto fue tomado como el promedio del ángulo formado por la gota en ambos lados.

3.5.6.4 Determinación del área de superficie electroactiva en GCE

El EAS se determinó por el método de Randles-Sevcik mediante la técnica de CV, con velocidades de barrido comprendidas entre 0,05 y 0,40 V s⁻¹, y usando una solución de K₃[Fe(CN)₆] 1 mM; además las medidas fueron realizadas por triplicado en cada experimento. La corriente máxima anódica y catódica fue tomada como respuesta electroquímica. Se hicieron un total de tres experimentos: en el primer experimento se determinó el área activa de un GCE en KCl (0,1 M), considerando un coeficiente de difusión anódico y catódico de 6,50×10⁻⁶ y 7,63×10⁻⁶ cm² s⁻¹ (Zoski, 2006⁸⁴), respectivamente, para el ion [Fe(CN)₆]³⁻ en dicho medio. En el segundo experimento se determinó el coeficiente de difusión anódico y catódico para el ion [Fe(CN)₆]³⁻ medido en BRB (0,1 M), a partir del EAS del GCE determinada en el primer experimento. En el tercer experimento se determinó el EAS de un GCE modificado con un disco BP-MWCNT/PS de 6 mm de diámetro. En este último caso las mediciones se hicieron en BRB (0,1 M), y se consideró los coeficientes de difusión calculados en el segundo experimento.

3.5.7 Funcionalización de la plataforma BP-MWCNT/PS con la DNC en GCE

La funcionalización se llevó a cabo por métodos no covalentes, específicamente por procesos de adsorción del analito en la superficie del electrodo modificado, siguiendo dos metodologías: adsorción directa e indirecta. La primera metodología se llevó a cabo agregando el analito sobre la superficie del electrodo modificado (BP-MWCNT/PS-GCE). En la segunda metodología la adsorción del analito se llevó a cabo desde el medio de reacción (10 mL de BRB), con agitación magnética. Las condiciones fueron optimizadas y se describen con detalle en la sesión de resultados y discusiones.

3.5.8 Estudios generales por CV

Las mediciones se realizaron en BRB (pH 7) empleando un GCE sin modificación, y posteriormente modificado con la plataforma BP-MWCNT/PS. Para generar los voltamogramas se tomó un tiempo de equilibrio de 2 segundos, los cuales fueron normalizados por el EAS de cada electrodo, expresándose en

forma de densidad de corriente. Los barridos se realizaron a una velocidad de $0,10 \text{ V s}^{-1}$. Los electrodos fueron funcionalizados por adsorción directa con una solución de DNC $0,2 \text{ mM}$. Este último paso se efectuó para todos los estudios llevados a cabo en el comportamiento electroquímico de la DNC.

3.5.9 Influencia del pH en la reducción del grupo nitro

El estudio fue realizado con GCE previamente modificados con la plataforma BP-MWCNT/PS. Las medidas electroquímicas se generaron por CV a una velocidad de barrido de $0,10 \text{ V s}^{-1}$, y se tomaron por triplicado con un electrodo diferente en cada valor de pH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). El pH del BRB se ajustó con pellets de NaOH o HCl (37%).

3.5.10 Estudio de electrólisis

Los electrodos GC-BP-MWCNT/PS previamente funcionalizados con la DNC se sometieron a un estudio de electrólisis por cronoamperometría, aplicando un potencial de $-0,75 \text{ V}$ durante 60 segundos (potencial bajo: $-0,85 \text{ V}$; potencial alto: $-0,45 \text{ V}$). Las mediciones se realizaron por triplicado para el blanco y el analito adsorbido, usando un electrodo diferente en cada medida y BRB ($0,1 \text{ M}$) a pH 5.

3.5.11 Efecto de la velocidad de barrido en la reducción del grupo nitro

El estudio se llevó a cabo mediante CV a pH 5, registrando la corriente máxima y el potencial de reducción para el pico catódico tomando las siguientes velocidades: $0,05$, $0,10$, $0,15$, $0,20$, $0,25$, $0,30$, $0,35$ y $0,40 \text{ V s}^{-1}$, donde las medidas fueron tomadas por triplicado en cada valor de velocidad.

3.5.12 Estudios electroquímicos para las especies superficiales electrogeneradas

Los estudios se llevaron a cabo por CV con la plataforma BP-MWCNT/PS en GCE. En un primer estudio los CVs se generaron con 10 ciclos de barrido a una velocidad de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ y un pH de 10 y 2. En un segundo estudio se evaluó el efecto del pH sobre las especies superficiales electrogeneradas, donde los CVs se registraron en dos etapas en un rango de pH de 2 a 10, y con una velocidad de $0,1 \text{ V s}^{-1}$. La primera etapa consistió en la reducción de la DNC y la formación

del par redox: derivado nitroso/derivado de hidroxilamina, mientras que la segunda etapa consistió en la formación de los azo y azoxi derivados. Lo anteriormente descrito se realizó con la intención de observar todas las señales en los CVs generados, para realizar el registro de las medidas electroquímicas. En el tercer estudio se evaluó el efecto de la velocidad de barrido sobre las especies superficiales electrogeneradas, donde se utilizaron las mismas condiciones empleadas en el estudio de velocidad para la reducción del grupo nitro. Adicionalmente se utilizó el comando *macro* disponible en el software de análisis electroquímico, con la finalidad de automatizar la secuencia de medición a pH 5 y a $0,15 \text{ V s}^{-1}$. En este caso para llevar a cabo la secuencia de medición, se establecieron los siguientes pasos que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Pasos específicos para llevar a cabo la secuencia de medición en el comando *macro*.

Primera etapa	Segunda etapa
Tech: CV	Tech: CV
Ei: 0	Ei: -0,10
Eh: 0,15	Eh: 0,70
El: -0,70	El: -0,10
Ef: 0	Ef: 0,05
v: 0,15	v: 0,15
cl: 2	cl: 2
qt: 2	qt: 0,50
sens: 1e-3	sens: 1e-4

3.5.13 Estabilidad de la solución analítica

Se estudió la estabilidad de la DNC en solución mediante espectroscopía UV-Vis y DPV. Esto se logró a través de la preparación de una solución madre (0,15 mM) en un matraz volumétrico transparente, utilizando un estándar de DNC disuelto en ACN. La solución madre estuvo expuesta a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración (4 °C). Los estudios fueron realizados por triplicado durante cinco días consecutivos. Para el estudio por espectroscopía UV-Vis, se monitoreó el espectro de absorción molecular a 400 nm/min en un rango de longitudes de onda entre 300 a 450 nm, y se registró la altura del pico. Para el

estudio por DPV, los voltamogramas se generaron a pH 5 en BRB (0,1 M) para la reducción de la DNC, donde se tomó la altura del pico de corriente como señal analítica. Cada voltamograma se registró tomando un potencial inicial de $-0,35$ V y un potencial final de $-0,70$ V, además se consideraron los siguientes parámetros: amplitud del pulso 0,05 V, ancho del pulso de 0,20 s, periodo de pulsación 0,50 segundos y tiempo de equilibrio de 2 s. Las condiciones y parámetros descritos anteriormente fueron utilizados en todos los estudios realizados por DPV. En este caso, se utilizaron electrodos diferentes para cada día de estudio, modificados con la plataforma BP-MWCNT/PS.

3.5.14 Tiempo de acumulación

El estudio de tiempo de acumulación se evaluó por DPV, considerando un rango de 1 a 8 minutos. Se empleó una solución estándar de DNC (0,1 mM) y GCE modificados con la plataforma BP-MWCNT/PS. La superficie del electrodo modificado fue funcionalizada por adsorción indirecta con la DNC, la cual se agregó al medio de reacción (10 mL de BRB) utilizando alícuotas de 100 μ L de la solución preparada, donde se mantuvo una agitación magnética a 500 rpm durante el periodo de acumulación. Posteriormente se detuvo la agitación y se procedió a registrar el correspondiente voltamograma. En cada tiempo de estudio las medidas se tomaron por triplicado con electrodos diferentes.

3.5.15 Condiciones para el sistema BIAS

Las mediciones se llevaron a cabo por AD i-t en una celda BIAS acoplada a una micropipeta electrónica programable y un SPE (figura 11), este último fue previamente modificado con la plataforma BP-MWCNT/PS. Antes de realizar la modificación, la superficie del SPE fue lavada con agua Milli-Q con la intención de eliminar los posibles contaminantes o impurezas que puedan interferir en las mediciones. Con el mismo fin, la solución madre fue filtrada utilizando membranas de nylon de 0,22 μ m. El volumen de solución electrolítica utilizado en la celda BIAS se ajustó a 20 mL. La solución electrolítica y el diluyente utilizado para preparar las muestras se purgaron con una corriente de N_2 para eliminar el

O₂ disuelto. Las condiciones experimentales fueron optimizadas y se describen con detalle en la sección de resultados y discusión.

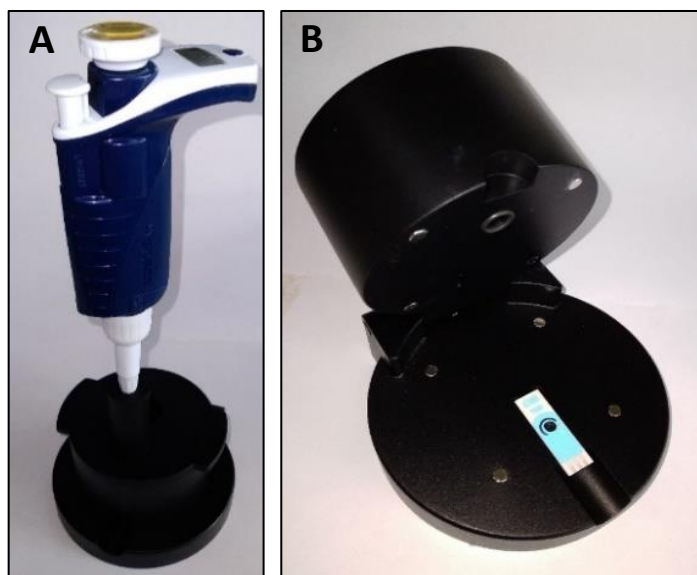


Figura 11. (A) Celda electroquímica BIAS con micropipeta electrónica programable. (B) Celda acoplada a SPE para ejecutar la detección amperométrica *i-t*.

3.5.16 Condiciones para el sistema cromatográfico

Se utilizaron condiciones de operación similares a las reportadas en la literatura para el análisis de NCZ en alimentos destinados a pollos de engorde^{78,85,86}. En este caso se hizo un reajuste en la composición de la fase móvil, y se disminuyó la longitud y diámetro de la columna cromatográfica utilizada, con el objetivo de minimizar los tiempos de análisis de la DNC. Además, se eliminó la proporción de agua utilizada en el diluyente de la muestra, debido a la escasa solubilidad de la DNC en medio acuoso. En la tabla 4 se resumen las condiciones de operación utilizadas. Todas las muestras a analizar fueron filtradas usando membranas de Nylon de 0,45 μm , y se tomó el área del pico cromatográfico como respuesta analítica para la DNC. La fase móvil se filtró al vacío con membranas de Nylon de 0,20 μm .

Tabla 4. Condiciones de operación para el sistema cromatográfico.

Fase Móvil		Bomba	
Parámetro	Condición	Parámetro	Condición
Eluyente A	Acetonitrilo 60%	Elución	Isocrática
Eluyente B	Agua 40%	Flujo	1 mL/min
		Presión máxima	35 MPa
Inyector		Columna	
Parámetro	Condición	Parámetro	Condición
Tipo	Manual de válvula	Tipo	C ₁₈ Symmetry en fase reversa
Loop de muestra	20 µL	Longitud	150 mm
		Diámetro interno	3,9 mm
Diluyente de la muestra	Acetonitrilo	Tamaño de partícula	5 µm
		Temperatura horno	25 °C
Detector			
Parámetro		Condición	
Tipo		Absorbancia UV/DAD	
Longitud de onda		340 nm	
Temperatura		25 °C	

3.5.17 Validación de métodos analíticos

Para validar cada método, se siguió un protocolo que incluyó la evaluación de la precisión (repetibilidad y reproducibilidad), la linealidad y rango, así como la determinación de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).

3.5.17.1 Cifras de mérito para el método electroanalítico por DPV con BP-MWCNT/PS-GCE

3.5.17.1.1 Precisión

La repetibilidad se estudió para un mismo electrodo previamente modificado con la plataforma BP-MWCNT/PS, donde se registraron ocho mediciones con un escaneo de limpieza entre cada una de ellas. La reproducibilidad se estudió para ocho electrodos modificados con la plataforma BP-MWCNT/PS. En este caso, para la modificación de los electrodos se emplearon dos BP por cada macrolamina producida (se fabricaron 4 macrolaminas en diferentes días). La superficie de cada electrodo modificado se funcionalizó por adsorción directa con una solución estándar de DNC (0,2 mM). Las mediciones fueron realizadas en una misma celda y mismo día para el estudio de repetibilidad, mientras que para

el estudio de reproducibilidad se hicieron en diferentes celdas y días. La repetibilidad y reproducibilidad se expresó en términos de desviación estándar relativa (RSD) porcentual, la cual se calcula utilizando la siguiente relación:

$$RSD = \frac{\sigma_x}{\bar{X}} \times 100 \quad (3)$$

donde σ_x es la desviación estándar y \bar{X} es la media en relación a la variable x. La desviación estándar se determinó utilizando la siguiente relación:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n}} \quad (4)$$

Se hizo un análisis comparativo entre la repetibilidad y reproducibilidad mediante una prueba t de student. El estadístico t para dos poblaciones con varianzas desiguales se calculó de la siguiente forma:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}} \quad (5)$$

Los grados de libertad (g.l) fueron determinados utilizando la siguiente formula:

$$g.l. = \frac{\left(\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{\sigma_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{\sigma_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}} \quad (6)$$

A partir del estadístico t y de los g.l., se determinó el valor de probabilidad de dos colas, y se estableció la afirmación de la hipótesis nula (Ho) mediante el siguiente criterio, considerando un nivel de confianza del 95%:

$$\text{Valor de probabilidad de dos colas} > 0,05 \quad (7)$$

3.5.17.1.2 Linealidad

La linealidad se estudió funcionalizando la superficie del electrodo modificado con la DNC por adsorción directa. En este caso se utilizó un set de soluciones estándar con las siguientes concentraciones: 0,75, 15,11, 30,22, 45,34, 60,45, 75,56, 90,67 mg L⁻¹. Las medidas se hicieron por triplicado utilizando un electrodo modificado en cada nivel de concentración. Adicionalmente se estudió la linealidad del método a través de la funcionalización por adsorción indirecta. En este caso, se agregaron en la misma celda electroquímica alícuotas sucesivas de 100 µL (solución estándar de DNC) con las siguientes concentraciones: 2,03, 3,02, 6,04, 9,07, 12,09, 15,11 y 18,13 mg L⁻¹. Este proceso se hizo por triplicado con diferentes electrodos, donde se tomó un tiempo de acumulación de 4 minutos después de la adición de cada alícuota. El rango lineal se consideró como el intervalo de concentraciones en el que el método mantuvo una linealidad con la respuesta analítica. La linealidad se expresó en términos del coeficiente de determinación (R²), el cual se calculó mediante la siguiente relación:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2} \quad (8)$$

La linealidad obtenida para cada modelo de regresión lineal se comprobó a través de la comparación del valor de t para el coeficiente de correlación (r), con el valor de t crítico de dos colas (n-2 grados de libertad y un 95% de nivel de confianza). El valor del estadístico t se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-R^2}} \quad (9)$$

donde n representan al número de niveles de concentración utilizados en el modelo de regresión lineal. El valor de r se determinó a través de la siguiente ecuación:

$$r = \frac{n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \sum_{i=1}^n X_i \sum_{i=1}^n Y_i}{\sqrt{\left(n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2 \right) \left(n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 \right)}} \quad (10)$$

3.5.17.1.3 Sensibilidad, LOD y LOQ

Para la metodología por adsorción directa, se construyó una curva de calibración utilizando un set de soluciones estándar con las siguientes concentraciones: 2,01, 3,50, 4,53, 7,56, 9,04 y 15,11 mg L⁻¹. En el caso de la metodología por adsorción indirecta se utilizaron las siguientes concentraciones: 5,00, 6,00, 7,00, 8,00, 9,00 y 10,00 mg L⁻¹. Análogamente al estudio de linealidad, las medidas se tomaron por triplicado. La ecuación de la recta de la curva de calibración se expresó de la siguiente forma:

$$y = mx + b \quad (11)$$

donde m es la pendiente y b es el intercepto con el eje y . La sensibilidad se definió como la pendiente de la curva de calibración, la cual se puede expresar de la siguiente forma:

$$m = \frac{n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \sum_{i=1}^n X_i \sum_{i=1}^n Y_i}{n \sum_{i=1}^n X_i^2 - (\sum_{i=1}^n X_i)^2} \quad (12)$$

El LOQ se consideró igual al límite inferior del rango de trabajo, y el LOD se definió de la siguiente forma:

$$\text{LOD} = t_{((n-1);0,99)} \times \text{SD} \quad (13)$$

El valor de t crítico (1 cola) se determinó considerando $n-1$ grados de libertad y un 99% de nivel de confianza. SD corresponde a la desviación estándar de las concentraciones predichas en un punto de la parte baja del rango lineal.

3.5.17.2 Cifras de mérito para el método electroanalítico por AD i-t con BP-MWCNT/PS-SPE

3.5.17.2.1 Precisión

La repetibilidad se estudió con un mismo electrodo, donde el registro de las medidas se hizo mediante inyecciones de 25 μL de una solución estándar de

DNC (0,03 mM) cada 100 segundos. La reproducibilidad se estudió con ocho electrodos, donde las medidas se registraron en diferentes días. Análogamente al método por DPV, la repetibilidad y reproducibilidad se expresó en términos de la RSD.

3.5.17.2.2 Linealidad, rango, sensibilidad, LOD y LOQ

La linealidad se ensayó utilizando un set de soluciones estándar con las siguientes concentraciones: 0,76, 1,51, 3,02, 4,53, 6,05, 7,56, 9,07 y 9,70 mg L⁻¹. Las soluciones fueron inyectadas individualmente con un intervalo de 200 segundos entre cada una; además se tomaron las medidas por triplicado con electrodos diferentes. La curva de calibrado se generó en el intervalo donde se mantuvo la mejor linealidad. Siguiendo la misma lógica que en el método por DPV, la linealidad se expresó en términos del R², y el LOQ se consideró igual al límite inferior del rango de trabajo; en el caso del LOD se determinó mediante la siguiente expresión:

$$LOD = \frac{3 \times SD_{blanco}}{Sensibilidad} \quad (14)$$

3.5.17.3 Cifras de mérito para el método HPLC-DAD

3.5.17.3.1 Adecuación del sistema

Para la prueba de adecuación del sistema HPLC se utilizó una solución estándar de DNC a una concentración de 0,2 mM, donde se determinaron los parámetros típicos de desempeño: tiempo de retención (*t_r*), área de pico, altura de pico, número de platos teóricos (NTP) y factor de simetría (*A_s*), como se establece en la literatura⁸⁷. La adecuación del sistema se llevó a cabo durante 5 días consecutivos, considerando un total de 5 inyecciones repetidas por cada día de análisis. La precisión del método se determinó en relación al área del pico cromatográfico.

3.5.17.3.2 Linealidad

La linealidad del método se evaluó utilizando un set de soluciones estándar de DNC con las siguientes concentraciones: 0,12, 3,78, 7,56, 15,11, 30,22 y 59,36 mg L⁻¹. Cada nivel de concentración se inyectó por triplicado. La linealidad del método se expresó en términos del R².

3.5.17.3.3 Sensibilidad, LOD y LOQ

Se construyó una curva de calibración utilizando un set de soluciones estándar con las siguientes concentraciones: 0,12, 0,24, 0,47, 0,95, 1,89, 3,78 y 9,02 mg L⁻¹. Análogamente al estudio de linealidad, las medidas se tomaron por triplicado. El LOQ se consideró igual al límite inferior del rango de trabajo, y el LOD se estableció según la siguiente definición sugerida en la literatura⁸⁸:

$$LOD = \frac{LOQ}{3,3} \quad (15)$$

3.5.18 Estudios de recuperación

La exactitud del método fue determinada por medio de la recuperación, utilizando NCZ en forma farmacéutica. Los estudios se llevaron a cabo por el método electroanalítico de DPV y el método HPLC de forma intradía (n = 3) e interdía (n = 9). La recuperación fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\% Re = \frac{\text{Concentración encontrada}}{\text{Concentración porción tomada}} \times 100 \quad (16)$$

Un total de 9 muestras fueron preparadas de la siguiente forma: se tomó una alícuota de 2 mL de una solución de NCZ (0,12 mg mL⁻¹) y se aforó a 4 mL con ACN. La concentración de las muestras fue determinada por el método de adición de estándar, donde cada una fue fortificada con cantidades crecientes (200, 400 y 600 µL) de una solución estándar de DNC (54,30 mg L⁻¹). La concentración de la porción tomada se determinó en base a la cantidad de NCZ declarada en el producto terminado. Adicionalmente se calculó la precisión del método en términos de la RSD. Las medidas se registraron por triplicado para cada muestra

analizada. Los resultados de recuperación fueron confirmados mediante la comparación del valor de t_{rec} para la recuperación promedio con el valor de t crítico de dos colas ($n-1$ grados de libertad y 95% de nivel de confianza). El valor de t_{rec} se determinó a través de la siguiente ecuación:

$$t_{rec} = \frac{|100 - \text{Recuperación promedio}| \sqrt{n}}{RSD} \quad (17)$$

donde n representa el número de niveles fortificados en la curva de adición de estándar.

3.5.19 Aplicación del método electroanalítico en muestras de músculo de pollo

3.5.19.1 Recolección

La muestra consistió en un músculo de pollo certificado (material de referencia). La carne fue triturada en un procesador de alimentos hasta formar una pasta. Se eliminó el contenido de humedad con la ayuda de una estufa y posteriormente con una corriente de nitrógeno. Se prepararon 10 muestras (cada una de 5 gramos), las cuales se colocaron en tubos de centrifuga de 15 mL y se almacenaron a refrigeración.

3.5.19.2 Incubación

Las muestras se distribuyeron de la siguiente forma: un blanco y tres muestras enriquecidas a cada nivel de concentración (3000, 5000 y 7000 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Esto se logró agregando 5 mL de una solución estándar de DNC (3, 5 y 7 mg L^{-1}) a cada una de las muestras. Todas las muestras se llevaron a un baño termostático a 37 °C y con agitación a 140 rpm durante 12 horas.

3.5.19.3 Extracción

Luego de la incubación, las muestras fueron estabilizadas a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se separó el sólido mediante filtración. El sólido se colocó en un tubo de centrifuga de 15 mL y se procedió a agregar 4 mL de acetato de etilo a cada muestra. Las muestras se agitaron en

vortex durante 2 minutos y luego se centrifugaron a 3500 rpm por 10 minutos. El sólido se separó por filtración, transfiriendo el extracto a un nuevo tubo de centrifuga. En total se realizaron tres etapas de extracción.

3.5.19.4 Preconcentración

Los tres extractos recolectados de cada muestra se evaporaron a 40 °C en un sistema de evaporación con nitrógeno de flujo controlado (5 psi). El residuo se reconstituyó con 500 µL de ACN, donde se agitó en vortex durante 2 minutos. La solución resultante se filtró (membrana de Nylon 0,22 µm) y fue recolectada en un tubo de Eppendorf.

3.5.19.5 Cuantificación

En la preparación de las muestras para el análisis cuantitativo se tomó 100 µL de analito preconcentrado y se diluyó a 250 µL con ACN. Debido a la complejidad de la matriz, la cuantificación se llevó a cabo por el método de adición de estándar, donde las muestras fueron fortificadas con cantidades crecientes (12,5, 25,0 y 37,5 µL) de una solución estándar de DNC (60,45 mg L⁻¹).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Preparación de electrodos con películas de tipo BP

4.1.1 Preparación de dispersiones de MWCNT

El desarrollo exitoso de películas de BP conllevó la elaboración de dispersiones de nanotubos que se comporten de manera estable. Esto depende principalmente del tipo de solvente empleado, la cantidad de nanotubos a utilizar y el tipo de agitación para dispersar las partículas de CNT. En este estudio el 1,3-dioxolano fue filtrado con membranas de Nylon de 0,45 μm , para eliminar alguna posible impureza que pueda interferir al momento de producir las películas de BP. Asimismo, los nanotubos fueron previamente triturados con la ayuda de un mortero de ágata, para romper los agregados que puedan afectar negativamente la homogeneidad de la dispersión, además para aumentar la superficie disponible de los mismos. La trituración de los nanotubos fue una etapa crucial al momento de preparar la dispersión, debido a que la película de BP producida presentó agregados de nanotubos sobre su superficie, cuando la trituración no fue realizada eficientemente. Para la fabricación de películas de BP, se optó por utilizar una concentración de MWCNT de 0,2 mg mL^{-1} en la dispersión, debido a que se ha comprobado experimentalmente que las concentraciones por encima de este umbral generan películas de BP con baja homogeneidad, dando resultados poco reproducibles.

Un elemento considerado en el proceso de elaboración de dispersiones de CNT son los polímeros, los cuales actúan como una barrera que evita que los nanotubos se aglomeren, debido a fuerzas de repulsión entrópica, favoreciendo de esta forma la estabilidad de la dispersión formada^{89,90}. En este caso se ha propuesto utilizar una cantidad equivalente a 3 mg de poliestireno (PS) de bajo peso molecular ($M = 35$), para estabilizar la dispersión de MWCNT y mejorar las propiedades mecánicas de los BP producidos. La cantidad y tipo de PS se optimizó en el estudio de Moscoso *et al*⁸³, donde se observó la dependencia de la corriente capacitiva y farádica del 3,5-dinitrobenzoato de 4-(piren-1-il) butilo en presencia de PS de alto y bajo peso molecular, siendo este último un polímero que genera mejores señales de corriente. En la tabla 5 se muestra un resumen de las condiciones experimentales consideradas para la preparación de dispersiones de MWCNT.

Tabla 5. Condiciones optimizadas para la obtención de dispersiones de MWCNT.

Parámetro	Condición
Cantidad de CNT	4 mg de MWCNT previamente triturados en un mortero de ágata
Solvente	20 mL de 1,3-dioxolano previamente filtrado
Agitación	8 sesiones de sonicado en baño ultrasónico (5 min c/u) y agitación en vortex entre cada sesión de sonicado
Polímero	3 mg de PS de bajo peso molecular ($M_w = 35$)

Con las condiciones descritas en la tabla 4 se logró obtener una dispersión exitosa (figura 12), la cual es estable y resulta adecuada para producir películas homogéneas de BP, que permitirán generar resultados reproducibles. Cabe destacar que el proceso de elaboración de dispersiones de MWCNT no incluyó la utilización de ningún tipo de tensoactivo; a pesar de que estos ejercen un efecto positivo en la estabilidad de la dispersión, resultan difíciles de evaporar al momento de producir las películas de BP.

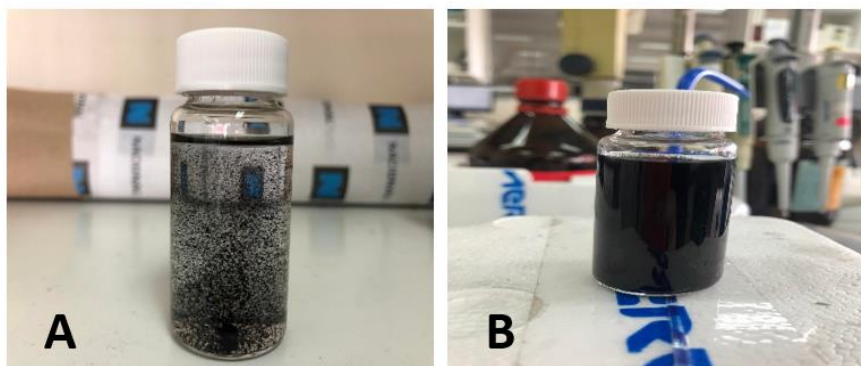


Figura 12. Dispersión de MWCNT $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ en 1,3-dioxolano y poliestireno de bajo peso molecular. (A) Previo al proceso de agitación. (B) Dispersión estable para preparar BP-MWCNT/PS.

La dispersión de MWCNT obtenida se sometió a un proceso de filtración al vacío usando membranas de Nylon ($0,20 \mu\text{m}$, 47 mm de diámetro), como se describió en la sección metodológica. El proceso de filtración al vacío se realizó con una velocidad de filtrado controlada para obtener una macrolámina de BP-MWCNT/PS lo más homogénea posible. La macrolámina de BP-MWCNT/PS obtenida fue cortada en pequeños discos

de diámetro deseado, que finalmente se emplearon en la modificación de electrodos comerciales. El proceso de corte se realizó de manera meticulosa, para evitar deformaciones o daños estructurales en el mini disco de BP-MWCNT/PS producido. Se midió el espesor de las películas de BP-MWCNT/PS con la ayuda de un micrómetro, dando un valor de $154 \pm 1 \mu\text{m}$. Para resumir, se puede destacar que el éxito en el proceso de fabricación de películas de tipo BP dependerá del desarrollo metodológico adecuado que se haya realizado, desde la elaboración de la dispersión hasta la obtención de mini discos de BP-MWCNT/PS.

4.1.2 Modificación de electrodos comerciales con BP-MWCNT/PS

La obtención de películas homogéneas de BP-MWCNT/PS, permitieron llevar a cabo la modificación de la superficie de un GCE o SPE para generar un sensor electroquímico, el cual se espera que sea sensible y reproducible para la detección de la DNC. La modificación de la superficie de cada electrodo fue llevada a cabo por el método de Stamp, descrito en la sección de metodología. La rápida evaporación del 1,3-dioxolano permitió obtener electrodos modificados de manera práctica durante la aplicación del método de Stamp, como se logra observar en la figura 13. A, donde la superficie del electrodo ha sido modificada correctamente, la cual resulta adecuada para llevar a cabo las mediciones electroquímicas, sin embargo existe la posibilidad de crear una superficie con imperfecciones, como se logra apreciar en la figura 13. B. Esto es atribuible a una incorrecta ejecución del método de Stamp, que crea una superficie defectuosa, la cual no produce ninguna señal analítica para el nitrocompuesto en estudio. Otro problema que se puede presentar luego de la modificación de la superficie del electrodo, es la obtención de una superficie poco homogénea, como se muestra en la figura 13. C. Esto es debido a una falta de agitación en la dispersión de MWCNT previamente preparada, que impide que las nanopartículas no sean dispersadas completamente, y como consecuencia de esto se generan medidas electroquímicas poco reproducibles. Un electrodo correctamente modificado da como resultado la obtención de un sensor electroquímico basado en nanoestructuras de MWCNT, el cual tiene como propósito principal la detección de la DNC, para ser utilizado en aplicaciones analíticas.

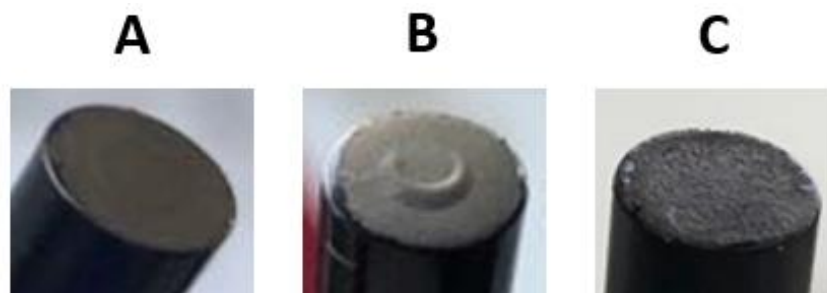


Figura 13. Superficie de un GCE modificado con la plataforma BP-MWCNT/PS. (A) Modificación apropiada (B) Fallo en la modificación y (C) Superficie poco homogénea.

4.2 Estudios de caracterización para la plataforma BP-MWCNT/PS

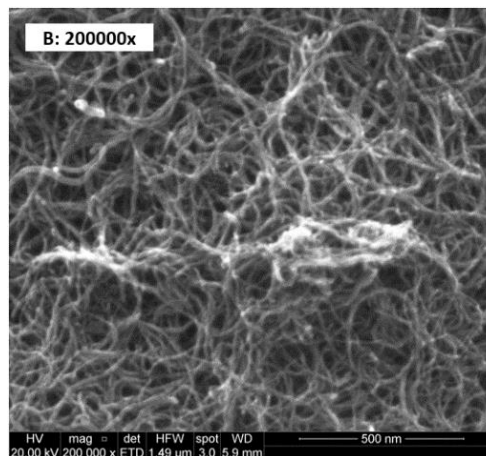
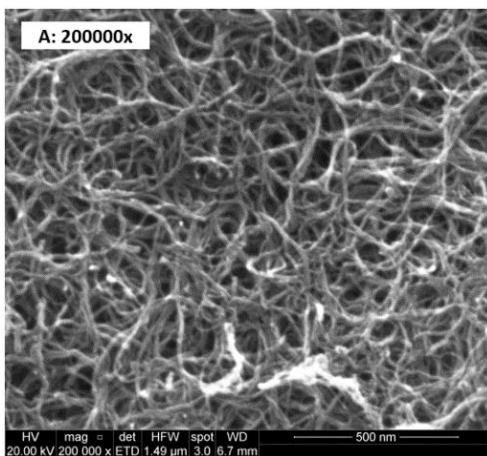
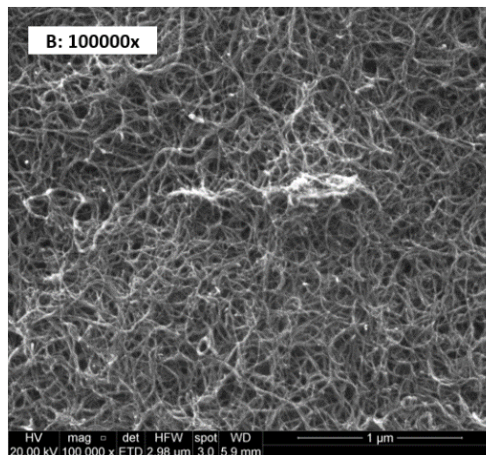
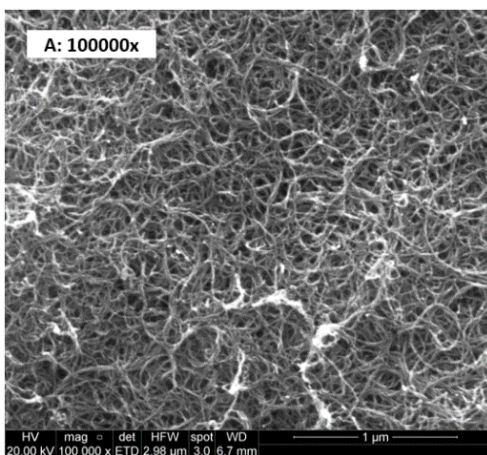
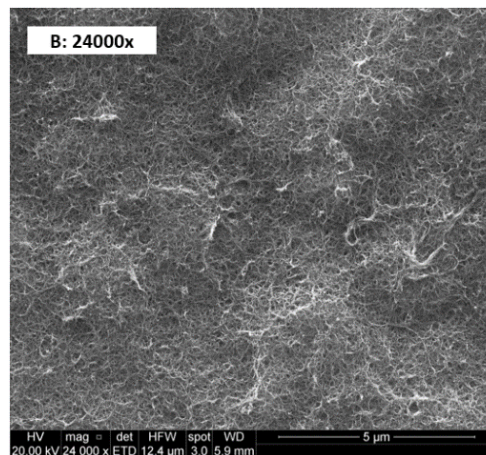
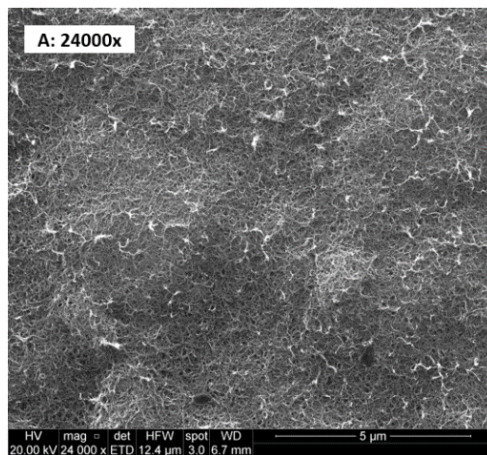
4.2.1 Caracterización por SEM

El estudio por SEM permitió realizar un análisis de alta resolución a nivel nanométrico de las películas BP-MWCNT/PS producidas, con la finalidad de evaluar su morfología y la presencia de posibles defectos que permitan definir su calidad. La figura 14. A con magnificación de 24.000x muestra la superficie de un BP-MWCNT/PS, donde se puede observar que es relativamente homogénea, lo que confirma que el proceso de elaboración de dispersiones de MWCNT por la metodología propuesta, resulta adecuado para fabricar películas de BP. Por otra parte, se pone de manifiesto que la fabricación de películas de MWCNT, resulta una alternativa más prometedora para modificar la superficie de un electrodo, en comparación con la clásica técnica de *drop casting*, donde los nanotubos se aglomeran al azar a lo largo de la superficie del electrodo modificado³⁶.

Los CNT se muestran como estructuras bien definidas y enredadas de manera aleatoria, que forman una extensa red tridimensional como se describe en la literatura. Dentro de la estructura porosa de los CNT, se observan espacios vacíos, denominados “intersticios”, los cuales permiten atrapar a la DNC mediante interacciones intermoleculares, generando un efecto denominado fisisorción³². Este fenómeno es de vital importancia porque permite realizar la detección de la DNC mediante técnicas electroanalíticas. La incorporación de la DNC a la superficie de un BP-MWCNT/PS se confirma en la figura 14. B con magnificación de 100.000x, donde se observa que los intersticios de la red de CNT se encuentran más ocupados, si se compara con la estructura de un BP-MWCNT/PS sin DNC. Además, los contornos de los CNT exhiben

una apariencia poco definida o difuminada, atribuible a las interacciones con la DNC, y esto es más evidente a una magnificación de 200.000x (figura 14. C). Es importante resaltar que una dispersión perfecta de CNT no es deseable en la preparación de películas de BP, si se tiene pensado utilizar este material para fabricar un sensor electroquímico destinado a la detección de la DNC, debido a que la formación de los intersticios, que es crucial para el rendimiento del sensor, se ve favorecida por la aglomeración de los CNT en diversas regiones de la red tridimensional de los nanotubos.

Las imágenes SEM con diferentes magnificaciones muestran un material amorfo que se distribuye de manera aleatoria sobre la superficie de los nanotubos, el cual puede atribuirse al PS agregado a la dispersión de MWCNT previamente preparada. Un solo CNT tiene muchas similitudes con una cadena de polímero individual, sin embargo el polímero puede incrustarse en la superficie de los nanotubos, creando una superficie irregular por efecto de nucleación⁹¹. En el trabajo de Hill *et al*⁹² se realizó un tratamiento térmico a los MWCNT para eliminar polímeros de la superficie de los nanotubos, donde el análisis mediante SEM mostró imágenes donde no aparecen cúmulos o materiales amorfos incrustados sobre la superficie de los nanotubos. El uso de polímeros en grandes cantidades o de elevado peso molecular⁸³ puede resultar en una disminución de la conducción eléctrica en la plataforma BP-MWCNT/PS, sin embargo este trabajo utiliza una pequeña cantidad de PS de bajo peso molecular, cuyo objetivo es estabilizar la dispersión formada y proporcionar maleabilidad a las películas de BP fabricadas. Finalmente, en la figura 14. C se puede observar que el disco BP-MWCNT/PS presenta un borde de forma regular, lo cual indica una buena precisión del corte realizado mediante la máquina Silhouette cameo 4.



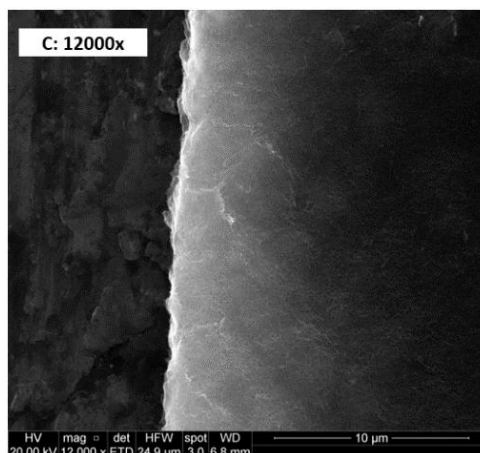


Figura 14. Imágenes SEM para la plataforma nanoestructurada BP-MWCNT/PS. Superficie de un BP sin DNC (A) y con DNC (B). Borde de un mini disco de BP (C). La magnificación se muestra en cada imagen.

4.2.2 Caracterización por espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman resulta una herramienta útil en este estudio, debido a que permite ofrecer información sobre la estructura geométrica, electrónica y vibracional de los CNT, y de esta forma conocer la calidad del nanomaterial producido, para el desarrollo de un sensor electroquímico basado en MWCNT. En este caso se utilizaron MWCNT (diámetro: 10 nm), los cuales mostraron bandas características como se puede observar en la figura 15. Entre 1470 y 1650 cm^{-1} aparece una banda intensa correspondiente a la vibración fundamental de elongación tangencial denominada banda G, que corresponde al modo de estiramiento de enlace C-C en la red hexagonal de cada lámina de grafeno⁹³. Se puede observar que la banda G presenta una ligera asimetría con desdoblamiento G+ y G-, debido al efecto de tensión que está relacionado con la curvatura y/o acoplamiento de electrones y fonones en un CNT⁹³.

Además del modo fundamental G, se pueden observar bandas correspondientes a un modo de segundo orden, conocidas como bandas D y G', las cuales son consecuencia de un mecanismo de doble resonancia que acopla electrones y fonones⁹⁴, y su frecuencia depende de la energía de excitación del láser y del diámetro del nanotubo⁹⁵. En la zona entre 1270 y 1420 cm^{-1} se puede apreciar la banda D, la cual indica el grado de desorden en los alótropos de carbono con hibridación sp^2 , por lo que

su intensidad está relacionada con la presencia de vacantes y tamaño finito de la red tridimensional de los CNT⁹², asimismo con los defectos estructurales en las paredes de los nanotubos, por lo que cuanto mayor sea su intensidad, más defectos tendrán los CNT⁹⁶. En 2690 cm^{-1} se logra apreciar la banda G', atribuible a un sobretono de la banda G, la cual se muestra deformada y con baja intensidad, y está relacionada a un modo vibratorio, caracterizado por la respiración de seis carbonos pertenecientes a un hexágono en la red de una lámina de grafeno⁹⁷. Se entiende por modo de respiración a las oscilaciones de baja amplitud perpendiculares al plano que tiene cada lámina individual de grafeno⁹⁸.

En la figura 15 se incluye la relación de intensidad entre las bandas D y G (I_D/I_G) para cada muestra. La relación de intensidades entre las bandas D y G es un parámetro que puede ser utilizado para tener información sobre el número de defectos en las paredes de los nanotubos (razón de cristalinidad), y su funcionalización con otros materiales⁹³. La relación entre las bandas D y G para un BP sin nitrocompuesto fue 1,12, lo que indica que el material basado en MWCNT posee una cristalinidad aceptable, tomando en cuenta que no se ha realizado ningún tipo de tratamiento térmico u otro proceso, que modifique la microestructura del material. Con una razón de cristalinidad de 1,12 se ha podido modificar satisfactoriamente la superficie de un electrodo para obtener un sensor electroquímico útil. Una razón de cristalinidad más baja podría inducir al aumento en la fragilidad del BP-MWCNT/PS, y como resultado de esto se vería afectado el proceso de modificación de la superficie del electrodo. En el caso de un BP con la DNC, se logra apreciar un aumento en la relación I_D/I_G , debido a que se encuentra funcionalizado con dicho analito de manera no covalente, confirmando de esta forma el fenómeno de fisisorción reportado en el estudio SEM. Finalmente, se logra observar que la relación I_D/I_G es mayor para una dispersión de MWCNT sin PS, en comparación con el valor obtenido para un BP sin nitrocompuesto, lo que explica que el PS aumenta el grado de cristalinidad en la plataforma BP-MWCNT/PS.

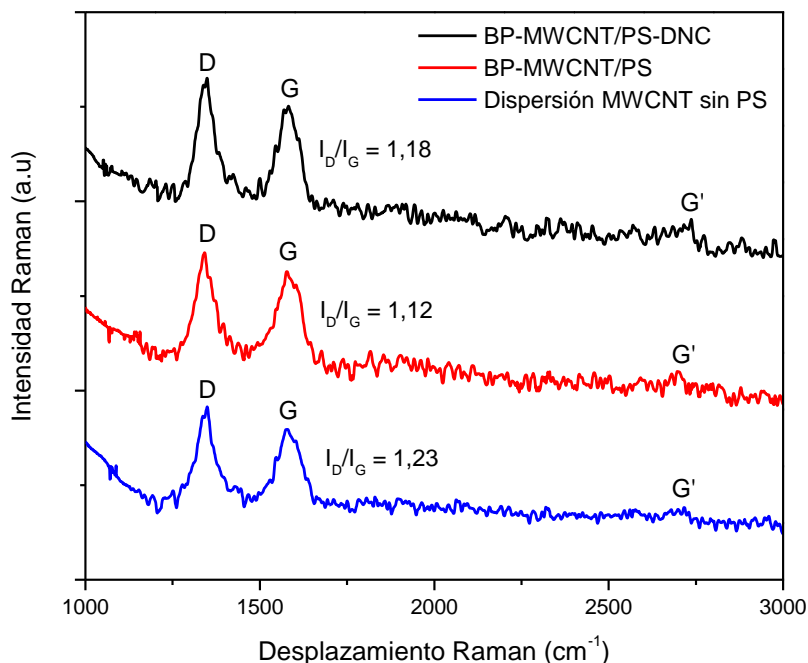


Figura 15. Espectro Raman de un (A) BP-MWCNT/PS, (B) BP-MWCNT/PS-DNC y (C) Dispersión de MWCNT sin PS. En cada espectro se indican las bandas características y la relación de intensidades I_D/I_G .

4.2.3 Ángulo de contacto con diferentes líquidos

Este estudio representó una herramienta importante para comprender y evaluar la hidrofobicidad de la plataforma BP-MWCNT/PS, así como su interacción con el analito en estudio y el medio de reacción. Esto último permitió optimizar las condiciones experimentales para llevar a cabo las mediciones electroquímicas en medio acuoso. La figura 16 muestra el ángulo de contacto generado por la plataforma BP-MWCNT/PS para cada líquido utilizado, donde se logra observar un ángulo de $131,5^\circ$ con agua Milli-Q. Este valor indica un comportamiento superhidrofóbico, tal como se esperaba, debido al enlace sp^2 de los átomos de carbono presentes en cada lamina de grafeno, y es comparable con el valor obtenido en el trabajo de Lee *et al*.⁶⁹. Esta característica sugiere una buena afinidad con la DNC y a su vez resulta apropiada para el proceso de modificación de la superficie de un electrodo, debido a que permite la fácil remoción de

la membrana de Nylon utilizada en la preparación de los BP. Sin embargo cuando se utilizan materiales basados en CNT para la superficie de un electrodo, se pueden presentar inconvenientes al realizar las mediciones electroquímicas en un medio de reacción acuoso, donde la alta resistencia iónica entre la superficie del electrodo y el medio de reacción dificulta el acceso de los iones electrolíticos al material del electrodo, independientemente de su porosidad^{100,101}. Debido a la naturaleza acuosa del BRB, es conveniente que la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS esté mojada antes de realizar las mediciones electroquímicas.

Se pudo registrar el ángulo de contacto con BRB a pH 7, debido a que este pH será utilizado como condición inicial para realizar las mediciones electroquímicas con la plataforma BP-MWCNT/PS. Se obtuvo un valor de $85,5^\circ$, lo que implica que la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS frente al BRB exhibe una hidrofobicidad moderada¹⁰² ($\Theta = 80-120^\circ$). El descenso del ángulo de contacto (figura 16. B) con respecto al primer caso, se puede explicar debido a las interacciones débiles de tipo Van der Waals y apilamiento π - π que se pueden producir entre sustancias iónicas con los CNT^{103,104}. En este caso las sales del electrolito de soporte usado (BRB) producen interacciones más fuertes con los CNT, si es comparado con el efecto producido utilizando solo agua. A pesar de que el BRB disminuye el ángulo de contacto, no permite que la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS sea mojada completamente. Es por ello que se decidió reemplazar el BRB por una mezcla de ACN: agua antes de llevar a cabo una medición electroquímica, cuya proporción fue optimizada a 25:75 v/v. Esta mezcla cumple la función de humectar la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS, pero a su vez evita en la mayor medida posible la desorción de la DNC adsorbida en la red tridimensional de los CNT. Esto último constituye una ventaja que permitirá optimizar el proceso de funcionalización de la plataforma BP-MWCNT/PS con la DNC.

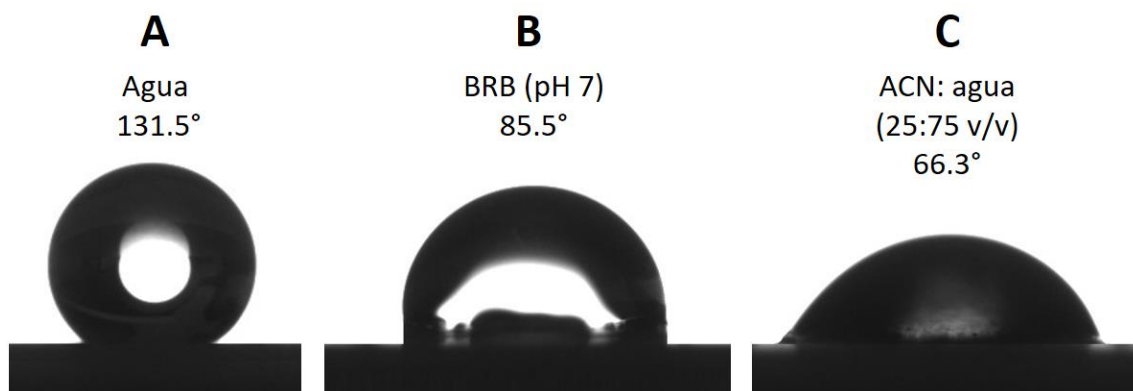


Figura 16. *Ángulo de contacto para la plataforma BP-MWCNT/PS con diferentes líquidos. (A) Agua Milli-Q, (B) BRB (pH 7) y (C) ACN: agua (25:75 v/v).*

4.2.4 Determinación del área de superficie electroactiva en GCE

Los experimentos electroquímicos en este trabajo inician con la determinación de la EAS de la plataforma BP-MWCNT/PS, con el propósito de conocer su superficie con actividad electroquímica. El área activa o electroactiva es un concepto fundamental, que está relacionado con la cantidad de sitios activos disponibles en la superficie de un electrodo¹⁰⁵ donde ocurre la transferencia de electrones. La EAS es una porción del área microscópica de la superficie de un electrodo¹⁰⁵, donde esta última considera las imperfecciones o defectos superficiales del material⁶⁶. El área microscópica es siempre mayor en comparación con el área geométrica de un electrodo⁶⁶. Para el cálculo de la EAS se consideró la ecuación de Randles- Sevcik, previamente descrita en la sección introductoria, el cual es un método clásico que continúa utilizándose en la literatura^{106,107}, y es aplicado a nanomateriales porosos que presentan estructuras 3D. Se utilizó un sistema reversible ideal de ferricianuro de potasio $K_3[Fe(CN)_6]$, el cual experimentó la siguiente reacción en la superficie del electrodo:



En la figura 17. A se muestra un voltamograma cíclico del $K_3[Fe(CN)_6]$ en KCl (0,1 M) a diferentes velocidades de barrido, utilizando un GCE. Se evidencia el aumento en la corriente de pico conforme se aumenta la velocidad de barrido. Este comportamiento mostró una tendencia lineal en un gráfico de corriente de pico en función de la raíz

cuadrada de la velocidad de barrido (figura 17. B), describiendo de esta manera un proceso controlado por difusión. A partir de la pendiente del gráfico I_p vs $v^{1/2}$ para el pico anódico y catódico, se pudo determinar la EAS de un GCE, donde se obtuvo un valor promedio de $0,083 \pm 0,012 \text{ cm}^2$. Con la EAS de un GCE se determinó el coeficiente de difusión anódico y catódico del $K_3[Fe(CN)_6]$ en BRB (0,1 M), debido a que las mediciones electroquímicas para la DNC se realizarán en ese medio. En este sentido se utilizó un GCE, y se procedió de manera análoga al caso anterior, donde se obtuvo un coeficiente de difusión anódico y catódico igual a $(1,14 \pm 0,10) \times 10^{-5}$ y $(1,23 \pm 0,02) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Se observa que hubo un incremento en el coeficiente de difusión utilizando BRB (0,1 M) a pH 5, lo que explica que bajo estas condiciones se ejerce menor resistencia al transporte de masa en comparación con el KCl (0,1 M). Este comportamiento está estrechamente ligado al aumento en la corriente de pico que produce el BRB, como se puede observar en la figura 17. B. Esto sugiere que el BRB a pH 5 exhibe una mayor conductividad en relación con el KCl (0,1 M), lo que pone de manifiesto su ventaja para ser utilizado en este trabajo. A partir de los coeficientes de difusión previamente calculados, se pudo obtener una estimación más exacta de la EAS de la plataforma BP-MWCNT/PS. Cabe señalar que todos los experimentos realizados generaron relaciones lineales de la corriente de pico anódica y catódica frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (figura 17. B). La EAS obtenida fue normalizada por área geométrica para su respectiva comparación, a través de la siguiente forma: $\rho = \text{EAS}/A_g$, siendo ρ el factor de rugosidad. El área geométrica (A_g) se puede determinar a partir de la siguiente relación: $A_g = \pi \times r^2$, donde r es el radio del círculo con actividad electroquímica. En la tabla 6 se resumen los resultados obtenidos para cada experimento realizado.

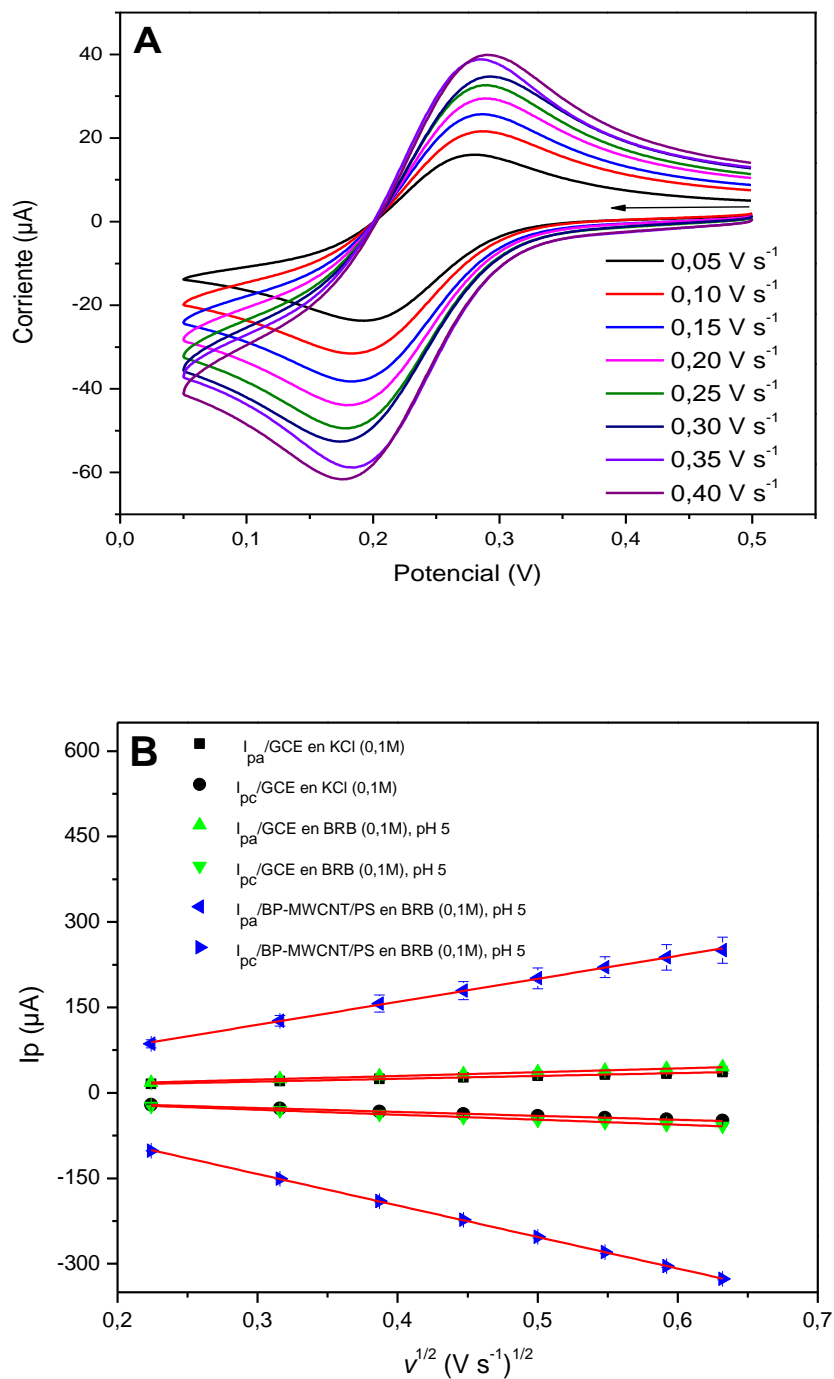


Figura 17. (A) Voltamograma cíclico de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1 mM) en KCl (0,1 M) a diferentes velocidades de barrido usando un GCE. (B) Corriente de pico anódica y catódica frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. En la leyenda se indica el experimento llevado a cabo.

Tabla 6. Superficie de área electroactiva (EAS) obtenida de la ecuación de Randles-Sevcik para un GCE y la plataforma BP-MWCNT/PS.

Superficie	Área geométrica (cm ²)	I _p vs v ^{1/2} (pendiente)	EAS (cm ²)		ρ
			Anódica	Catódica	
GCE	0,071	Anódica 4,970×10 ⁻⁵	Anódica 0,072 ± 0,003	Catódica 0,093 ± 0,004	1,169
		Catódica -6,887×10 ⁻⁵	Promedio 0,083 ± 0,012		
BP-MWCNT/PS	0,283	Anódica 4,043×10 ⁻⁴	Anódica 0,445 ± 0,056	Catódica 0,586 ± 0,006	1,820
		Catódica -5,528×10 ⁻⁴	Promedio 0,515 ± 0,087		

Para la plataforma BP-MWCNT/PS se obtuvo un valor de EAS igual a $0,515 \pm 0,087$ cm². Este valor es superior al reportado en el trabajo de Wan *et al*¹⁰⁸, donde modificaron la superficie de un GCE con una dispersión de MWCNT, a través del método de *drop casting*. De esto se puede inferir que el desarrollo de películas de MWCNT a partir de la tecnología BP, resulta en una alternativa más eficiente, para obtener una superficie con mayor área electroactiva. A diferencia de un GCE sin modificar, se puede apreciar que la plataforma BP-MWCNT/PS presentó una mayor EAS como era de esperarse, debido a la estructura laminar del grafeno presente en los CNT¹⁰⁷ y la alta porosidad que estos últimos presentan en su superficie, la cual fue evidenciada en los estudios de caracterización por SEM. La plataforma BP-MWCNT/PS demostró un aumento del 56 % en la EAS normalizada con respecto a un GCE. Este incremento es muy relevante para aplicaciones en electroanálisis, debido a que conduce un aumento en la señal analítica, y de esta forma se pueden obtener mejores cifras significativas para el desarrollo de un método electroanalítico.

En la figura 18 se presenta la diferencia de potencial de pico anódico y catódico (ΔE_p) para el K₃[Fe(CN)₆] a diferentes velocidades de barrido, usando un GCE y la plataforma BP-MWCNT/PS. En ambos casos se puede observar que el valor de ΔE_p aumenta a medida que se incrementa la velocidad de barrido, manteniéndose por debajo de los 120 mV, lo que demuestra que el proceso redox en estudio se comporta de manera cuasi-reversible. El aumento de ΔE_p con la plataforma BP-MWCNT/PS es más pronunciado en comparación con el GCE, revelando de esta forma que el transporte de masa hacia la superficie del electrodo está controlado por difusión y adsorción, mientras

que en el CGE está controlado únicamente por difusión. De esto se deduce que la alta porosidad en la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS contribuye a la adsorción de especies desde el medio de reacción, aumentando la sensibilidad del electrodo. Por lo tanto, se puede afirmar que el proceso de transferencia de electrones es más rápido en el nanomaterial propuesto para desarrollar un sensor electroquímico, permitiendo mejorar la eficiencia en la transferencia electrónica¹⁰⁹.

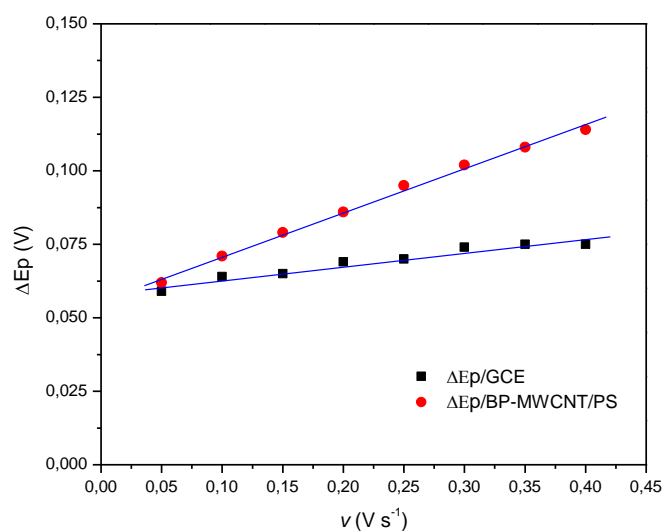


Figura 18. Diferencia de potencial de pico anódico y catódico (ΔE_p) para el $K_3[Fe(CN)_6]$ a diferentes velocidades de barrido con un GCE y la plataforma BP-MWCNT/PS en BRB (0,1 M).

4.3 Funcionalización de la plataforma BP-MWCNT/PS con la DNC en GCE

Los estudios de caracterización de la plataforma BP-MWCNT/PS han demostrado que la DNC es capaz de adsorberse dentro de la red tridimensional de los CNT, donde específicamente queda atrapada en los intersticios de los mismos, lo que permite realizar su detección mediante el sensor electroquímico desarrollado. El mecanismo que explica la adsorción de la DNC dentro de la red tridimensional de los CNT es la funcionalización no covalente, y es producido principalmente por interacciones de apilamiento π - π ¹⁰⁵. Comúnmente la funcionalización no covalente de MWCNT con nitrocompuestos es lograda a través de procesos de derivatización^{44,110}, sin embargo dichos procedimientos pueden resultar laboriosos para el desarrollo de una metodología

analítica, por lo que se ha propuesto modificar la plataforma BP-MWCNT/PS a través de procesos de adsorción directa e indirecta con la DNC (figura 19).

La adsorción directa es un proceso más rápido y permite que la DNC se una directamente a la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS, sin la interacción con otro medio. Este proceso se logró siguiendo la metodología descrita en la figura 19. A, la cual consiste en la adición de una alícuota de 5 μL de muestra sobre la plataforma BP-MWCNT/PS, dejando evaporar completamente el solvente; el resultado es la obtención de una plataforma funcionalizada con la DNC (BP-MWCNT/PS-DNC). No se emplearon

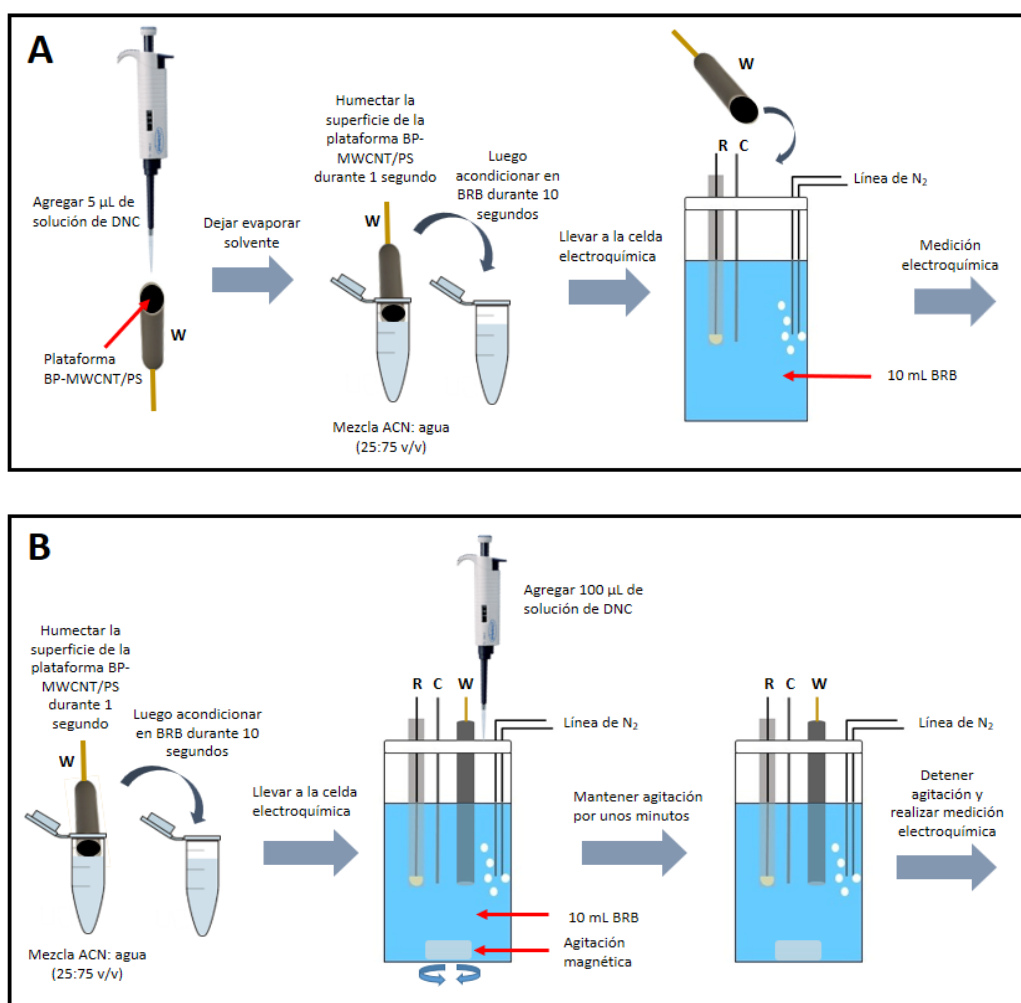


Figura 19. Funcionalización no covalente de la plataforma BP-MWCNT/PS con la DNC en GCE. (A) Adsorción directa de la DNC y (B) Adsorción indirecta de la DNC desde el medio de reacción.

volúmenes de alícuotas superiores a 5 μL , debido a que la muestra se derrama de la superficie del electrodo de trabajo, por lo que en ese caso tendría que realizarse la adición del analito de manera fraccionada, lo cual implicaría una metodología más laboriosa. Antes de introducir el sensor electroquímico a la celda de medición, es necesario humectar la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS con una mezcla ACN: agua (25:75 v/v) durante 1 segundo, para evitar la desorción de la DNC; luego se acondiciona en BRB durante 10 segundos.

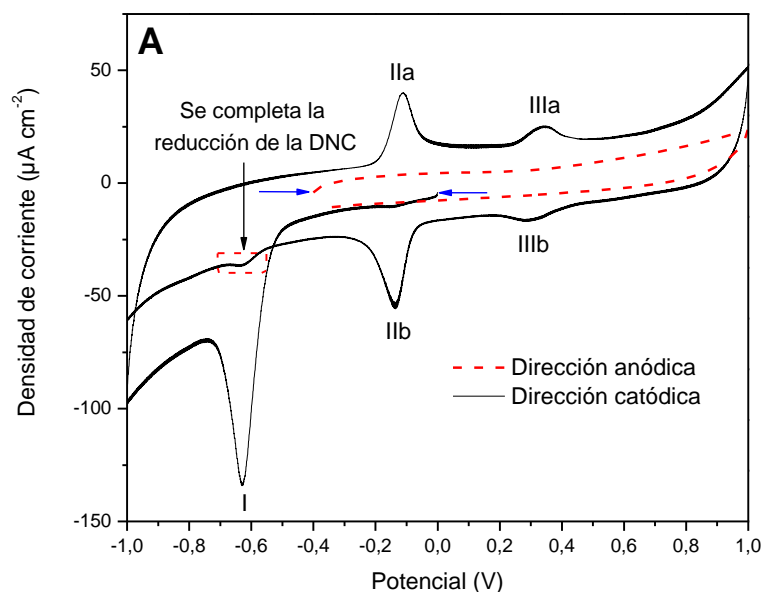
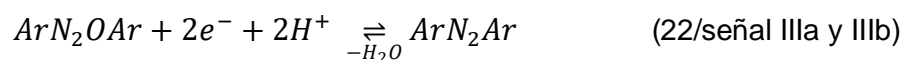
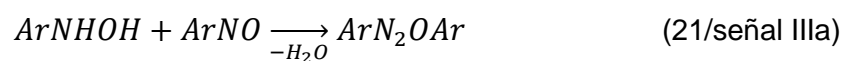
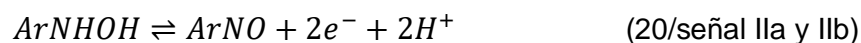
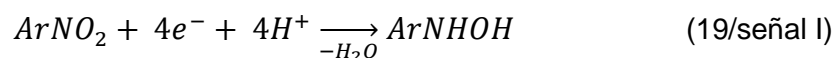
La adsorción indirecta se lleva a cabo por procesos de convección desde el medio de reacción hacia la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS. Este proceso se realizó siguiendo la metodología descrita en la figura 19. B, donde se agregaron alícuotas de 100 μL de muestra al medio de reacción. En este caso fue necesario el uso de una agitación magnética para promover el transporte de masa del analito a la superficie del electrodo. Considerando que la DNC es un compuesto altamente insoluble en medio acuoso, el volumen de alícuota propuesto fue cuidadosamente equilibrado, de modo que evite en la mayor medida posible la saturación de la superficie del electrodo, pero a su vez que promueva el aumento en la sensibilidad de la detección electroquímica. Además, cabe destacar que se recomienda el uso de soluciones considerablemente diluidas, para lograr una dispersión más efectiva del analito en el medio de reacción. Esto último permitirá un mejor control de la adsorción de la DNC en la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS, y como consecuencia se obtendrán medidas más reproducibles.

4.4 Comportamiento electroquímico de la DNC

4.4.1 Estudios generales por CV

El comportamiento electroquímico de la DNC comienza con un estudio mediante la técnica de CV, para investigar las especies superficiales que se generan por mecanismos de oxidación y/o reducción. En este contexto, se realizó un barrido de potencial en sentido catódico, iniciando en 0 V (figura 20). Mediante el análisis de los voltamogramas obtenidos se observa la reducción del grupo nitro a un derivado de hidroxilamina (ArNHOH), tal como se describe en la literatura para otras especies nitroaromáticas¹¹¹, mostrando un único pico de reducción irreversible (señal I). Luego, mediante un barrido de potencial anódico se pudo generar un derivado nitroso, el cual

posteriormente se reduce a un derivado de hidroxilamina formando un par redox cuasi reversible ($\text{ArNO}/\text{ArNHOH}$), correspondiente a las señales Ila y IIb, con una transferencia de 2 electrones y 2 protones¹¹¹. A potenciales más positivos se pudo apreciar una señal, la cual puede ser atribuible a una reacción entre el derivado nitroso y el derivado de hidroxilamina¹¹², generando un azoxi derivado/ ArN_2OAr (señal IIIa), el cual posteriormente se reduce en un azo derivado/ ArN_2Ar (señal IIIb), formando un par redox ($\text{ArN}_2\text{OAr}/\text{ArN}_2\text{Ar}$). Adicionalmente, se realizó un barrido de potencial en sentido anódico, iniciando en $-0,4\text{ V}$. En este caso no hubo generación de ninguna especie superficial, lo cual pone de manifiesto que los pares redox formados ($\text{ArNO}/\text{ArNHOH}$ y $\text{ArN}_2\text{OAr}/\text{ArN}_2\text{Ar}$) son dependientes de la reducción del grupo nitro. Las señales descritas anteriormente se pueden explicar a través de las siguientes reacciones:



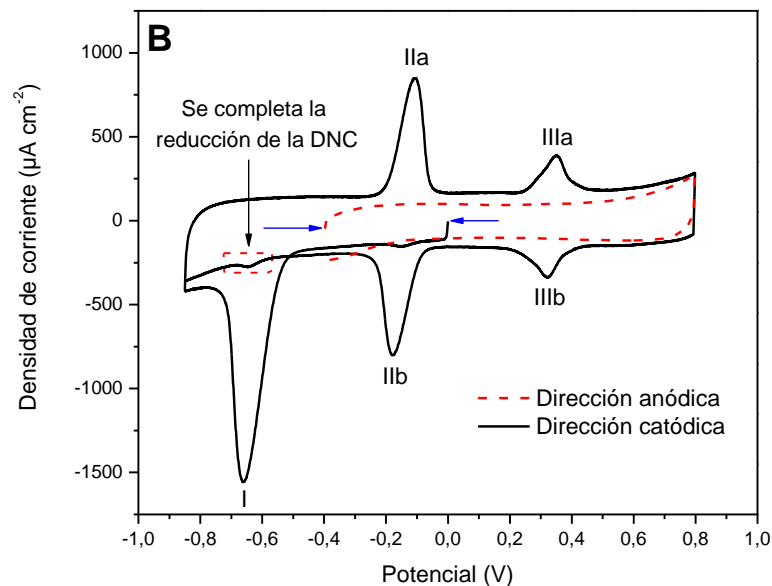


Figura 20. CVs de la DNC 0,2 mM en BRB 0,1 M/ pH 7 a 0,1 V s⁻¹ con GCE (A) sin modificar y (B) modificado con la plataforma BP-MWCNT/PS. En la leyenda se indica la dirección tomada para generar cada voltamograma.

En los voltamogramas obtenidos se puede observar que no se reduce toda la cantidad de la DNC previamente adsorbida en la plataforma BP-MWCNT/PS, durante el primer barrido de potencial catódico. Para fines analíticos esto podría estar sugiriendo la realización de un escaneo de limpieza, con la intención de renovar la superficie del electrodo, si se piensa reutilizarlo en sucesivas mediciones electroquímicas. En la tabla 7 se resumen las corrientes de pico para cada señal generada, donde se logra evidenciar que la reducción del grupo nitro es la señal con mayor intensidad, cuyo valor se incrementa en dos órdenes de magnitud usando la plataforma BP-MWCNT/PS. Esto último confirma el estudio de caracterización realizado por SEM, donde el gran número de intersticios dentro de la superficie porosa de los nanotubos permite atrapar una mayor cantidad de DNC, si es comparado con un electrodo sin modificar¹¹³, por lo que la respuesta en corriente se incrementa. Dado que la reducción del grupo nitro es la señal con mayor intensidad, se utilizará como respuesta para el desarrollo del método electroanalítico, lo cual permitirá alcanzar LOD más bajos, para que dicho método pueda

ser aplicable en el análisis de residuos de NCZ en músculo de pollo. Algo que resulta interesante son los valores de corriente de pico obtenidos con la plataforma BP-MWCNT/PS para el par redox ArNO/ArNHOH, cuya suma es aproximadamente igual a la corriente de pico generada por la reducción del grupo nitro, lo cual confirma su dependencia con respecto a este último. En lo que corresponde al par redox ArN₂OAr/ArN₂Ar se procederá a estudiar más adelante su comportamiento electroquímico, con el fin de conocer su dependencia con el par redox ArNO/ArNHOH.

Tabla 7. Potencial y corriente de pico para las señales generadas por la DNC usando CV en GCE.

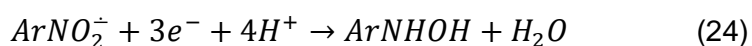
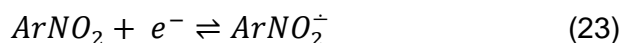
		GCE	Con BP-MWCNT/PS
Señal I	Potencial (V)	-0,629	-0,661
	Corriente de pico ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	$9,278 \times 10^1$	$1,342 \times 10^3$
Señal IIa	Potencial (V)	-0,112	-0,106
	Corriente de pico ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	$3,072 \times 10^1$	$7,013 \times 10^2$
Señal IIb	Potencial (V)	-0,138	-0,179
	Corriente de pico ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	$3,588 \times 10^1$	$6,300 \times 10^2$
Señal IIIa	Potencial (V)	0,343	0,351
	Corriente de pico ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	$7,066 \times 10^0$	$2,204 \times 10^2$
Señal IIIb	Potencial (V)	0,295	0,321
	Corriente de pico ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	$5,345 \times 10^0$	$1,892 \times 10^2$

4.4.2 Estudios electroquímicos para la reducción del grupo nitro

4.4.2.1 Influencia del pH

Una variable importante a considerar en el comportamiento electroquímico de la DNC, así como en el desarrollo del método electroanalítico es la influencia del pH sobre las medidas electroquímicas. En este sentido, se generaron diferentes voltamogramas por CV (figura 21. A), donde se logra evidenciar que la reducción del grupo nitro de la DNC muestra solo una señal en todo el rango de pH estudiado (2–12). En la figura 21. B se resume el efecto del pH en la corriente del pico de reducción. En este caso se observa que la respuesta de corriente varía en función del pH, lo que pone en evidencia que su intensidad depende de la naturaleza del medio de reacción. En este contexto, las mejores respuestas en corriente se obtuvieron a los siguientes valores de pH: 2, 5, 11 y 12. Es importante mencionar que la reducción del grupo nitro implica la electrogeneración del anión radical nitro (23), el cual actúa como una base de Bronsted-

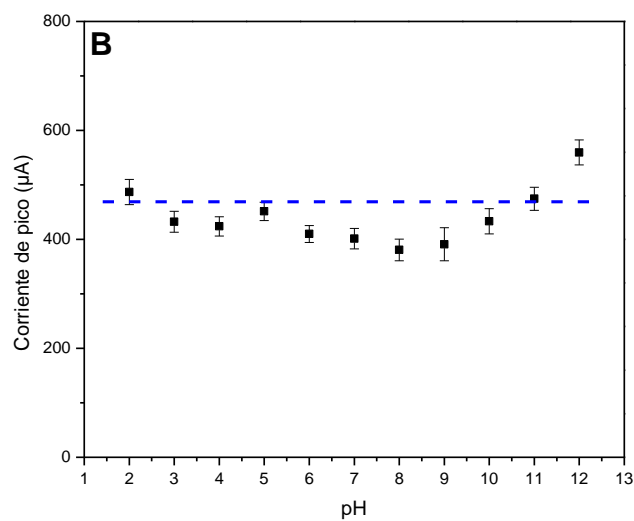
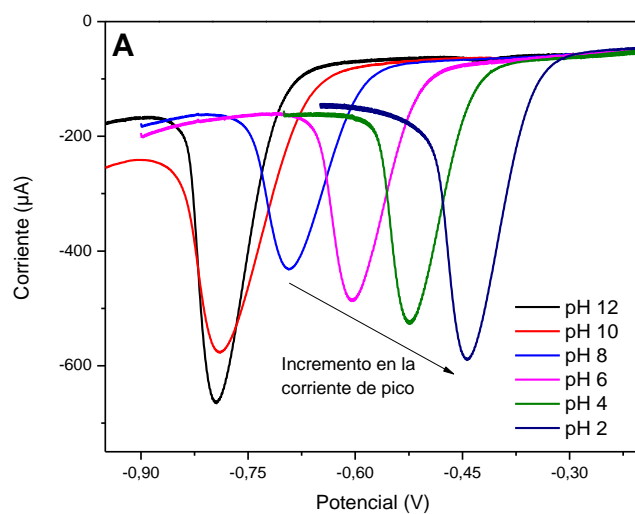
Lowry¹¹¹, que se puede protonar fácilmente en medios ácidos. En este caso la alta acidez del medio favorece la protonación del anión radical nitro en la superficie del electrodo, el cual genera un aumento en la señal analítica al momento de descargarse para formar el derivado de hidroxilamina (24); esto último puede explicar el aumento en la respuesta de corriente a valores de pH inferiores a 7.



De acuerdo a lo antes mencionado, se puede deducir que un medio de reacción acuoso a valores de pH bajos favorece la protonación no solamente del anión radical nitro, sino también de otras especies superficiales generadas a lo largo del proceso redox, como es el caso de los grupos hidroxilamina, nitroso y amina¹¹⁴. Por el contrario, se espera que la estabilidad del anión radical nitro aumente en medios aproticos¹¹⁵, debido a la ausencia de protones, afectando la respuesta de corriente para la reducción del grupo nitro. Por lo tanto, resulta adecuado para fines analíticos el uso del BRB como medio de reacción con pH ácido; en este caso se ha considerado un valor de 5 para el desarrollo del método electroanalítico. A pesar de que un valor de pH 2 produce una mayor respuesta en corriente en comparación con un valor de pH 5, no se ha considerado debido a que el BRB es efectivo dentro de un rango de 2,6 a 12,0¹¹⁶, por otro lado, no se ha considerado los valores de pH de 11 y 12 debido a que el BRB no mantiene su capacidad de amortiguación tan eficazmente en la región alcalina (pH 9–12)¹¹⁶, además como se mencionó anteriormente, el anión radical nitro es controlado por un mecanismo dependiente de protones, para permitir la generación del correspondiente derivado de hidroxilamina. La elección de un pH 5 permite que el método electroanalítico a desarrollar pueda ser aplicable en la determinación de residuos de NCZ en muestras de músculo de pollo, las cuales de acuerdo a Qiao *et al*¹¹⁷ presentan un valor de pH promedio de 5,96.

Por último, se ha representado el potencial del pico de reducción en función del pH (figura 21. C). En este caso se observa que los potenciales de reducción se mueven hacia valores negativos a medida que aumenta el pH, lo que demuestra que la reducción

del grupo nitro involucró la transferencia de protones. Este fenómeno se describe a través de la variación lineal del potencial de reducción en un rango de pH entre 2 a 10, de acuerdo a la siguiente regresión: $E_1 = -0,278 - 0,054\text{pH}$ con $R^2 = 0,996$. En el rango de pH comprendido entre 10 y 12, el potencial de reducción se mantiene prácticamente constante, lo que indica una relativa independencia del pH, y se puede describir mediante la siguiente regresión: $E_2 = -0,770 - 0,002\text{pH}$ con $R^2 = 0,965$. Este comportamiento es consistente con el valor del pK_a de la DNC reportado en la literatura



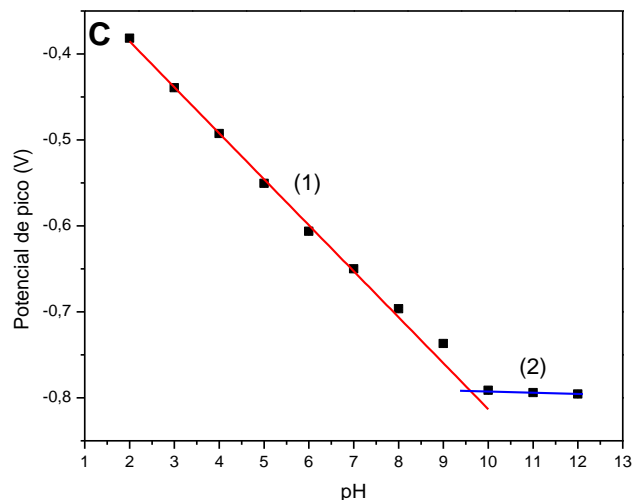


Figura 21. Estudio de pH por CV a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ en BRB ($0,1 \text{ M}$) para la reducción del grupo nitro de la DNC ($0,2 \text{ mM}$). (A) CVs a diferentes pH, (B) Corriente de pico en función del pH y (C) Potencial de pico en función del pH.

($12,44 \pm 0,70$, dato teórico obtenido en ChemIDplus por NIH⁶²). Por lo tanto, dicho valor indica que la DNC se comporta como un ácido débil, y en un rango de pH de 10 a 12 se encuentra principalmente de forma disociada. La regresión obtenida para la variación lineal del potencial de reducción en función del pH (2–10), puede ser relacionada con la ecuación de Nernst¹¹⁸, la cual se describe a continuación:

$$E_{pc} = E^0 - \left[\frac{2,303mRT}{nF} \right] pH \quad (25)$$

A partir la pendiente calculada ($-0,054$) y considerando los siguientes valores dentro de la ecuación ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$, $F = 96500 \text{ C mol}^{-1}$) se puede calcular la relación (m/n), que representa la proporción de protones y electrones que se transfieren dentro de la reducción del grupo nitro; en este caso el valor calculado corresponde a $0,905$. Este valor es cercano a 1, lo que manifiesta que interviene la misma proporción de protones y electrones para la reducción de un grupo nitro, tal como se describe en la reacción 19. En definitiva, el estudio de pH ha resultado una herramienta fundamental para optimizar la condición más adecuada para el desarrollo

del método electroanalítico, permitiendo obtener una alta respuesta de corriente por parte de la señal electroquímica seleccionada, y un potencial de reducción moderado para evitar la pasivación de la superficie del electrodo.

4.2.2.2 Estudio de electrólisis

En los estudios generales por CV se estableció una transferencia de 4 electrones y 4 protones para la reducción de un grupo nitro, según la reacción 19. Sin embargo, dado que la estructura química de la molécula de la DNC exhibe 2 grupos nitro, era de esperarse dos picos de reducción al momento se realizar un barrido de potencial catódico mediante CV. En el estudio de Daftsios & Schall¹¹⁹, se ha mencionado que el medio de reacción empleado tiene una marcada influencia sobre los potenciales de reducción en el análisis de nitroderivados, así como en la generación de uno o dos picos de reducción para compuestos mononitro y dinitroderivados. En el mencionado estudio se obtuvo un polarograma para la NCZ en una mezcla de DMF con bromuro de tetraetilamonio (TEAB), donde se obtuvieron dos picos de reducción muy cercanos a potenciales de $-0,825$ y $-0,967$ V. Esto podría estar indicando que al cambiar el medio de reacción, existe la posibilidad de producir un solapamiento de los dos picos de reducción, para generar únicamente una señal. Para verificar esta suposición, se procedió a realizar un estudio de electrólisis por cronoamperometría, el cual se presenta en la figura 22. El área debajo de la curva (corriente vs. tiempo) en este gráfico representa la carga transferida en un proceso redox, la cual se puede expresar mediante la ley de Faraday descrita previamente, y se ajusta a las siguientes ecuaciones.

$$Q = \int_{t_1}^{t_2} i dt \quad (26)$$

$$Q = n N F \quad (27)$$

Mediante el software OriginPro 8.5 se pudo determinar el área para la DNC y el blanco, cuyos resultados se resumen dentro de la figura 22. La diferencia de carga entre el analito y el blanco ($\Delta Q = Q_{\text{DNC}} - Q_{\text{Blanco}}$), representa la carga total transferida en el proceso, donde a partir de la ecuación 27 se puede determinar el número de electrones

transferidos (n). El promedio de electrones transferidos presentó un valor de 8,37, lo que en términos absolutos representa 8 electrones involucrados en la reducción de los grupos nitro. De esta forma se confirma la reducción de ambos grupos nitro presentes en la molécula de la DNC, para generar únicamente un pico de reducción, tal como se había previsto. Por lo tanto, a partir de este estudio se puede deducir que la DNC exhibe un pico de reducción en un medio de reacción prático, como lo es el BRB, lo cual está en concordancia con el estudio de Michielli y Downing⁷², donde se argumentó que la DNC genera dos señales en DMSO, pero a medida que se protona el medio de reacción, la dos señales se fusionan y generan solamente un pico de reducción. Este fenómeno resalta la influencia significativa del uso del BRB, para potenciar la respuesta de corriente en la señal analítica generada por la reducción de la DNC, ofreciendo perspectivas valiosas para alcanzar LOD más bajos, en el desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación de NCZ. Finalmente, a partir del número de electrones determinados, se puede estimar el número de protones involucrados en la reacción mediante la razón (m/n) previamente calculada. En este caso se obtuvo un valor para el número de protones igual a 7,57, cuyo valor expresado en términos absolutos equivale a 8 protones.

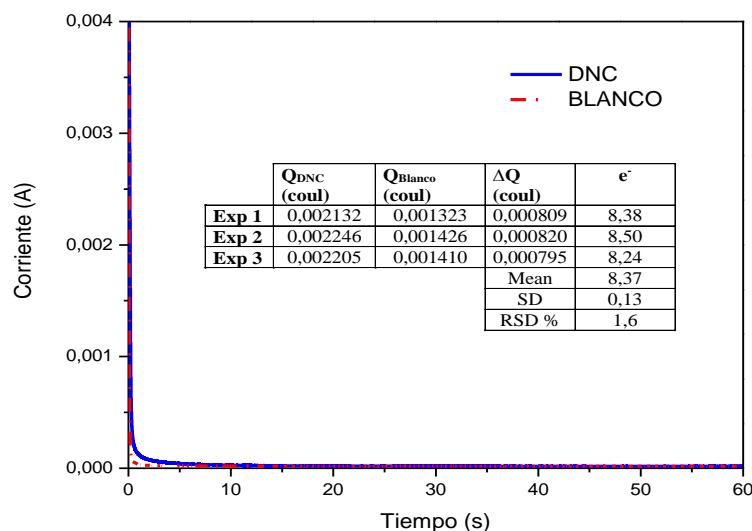
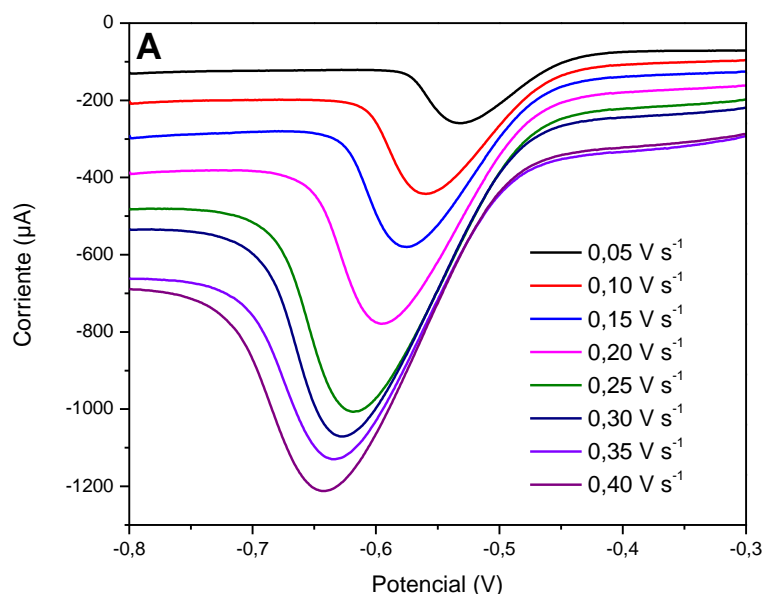


Figura 22. *Electrólisis de la DNC para la reducción de los grupos nitro mediante cronoamperometría a $-0,75$ V. Mediciones realizadas en BP-MWCNT/PS a pH 5.*

4.2.2.3 Efecto de la velocidad de barrido

Para investigar el transporte de masa involucrado en la reducción de los grupos nitro, se estudió el comportamiento de la corriente máxima catódica frente a diferentes velocidades de barrido (entre $0,05$ a $0,40 \text{ V s}^{-1}$) a pH 5, donde los CVs registrados se muestran en la figura 23. A. La grafica logarítmica de estos parámetros obtuvo una dependencia lineal con una pendiente de $0,65$ (figura 23. B), que revela que la reducción de 8 electrones para la DNC a un derivado de hidroxilamina corresponde a un régimen de transporte de masa mixto (difusión + adsorción) en BRB. Esto debido a que la pendiente obtenida es superior a $0,5$ (valor para la difusión pura semi-infinita), pero mucho menor a 1 (valor para un mecanismo controlado por adsorción)¹²⁰. La figura 23. C muestra la dependencia del potencial de pico catódico con el logaritmo de la velocidad de barrido, donde se evidencia su variación en forma lineal. A medida que se aumenta la velocidad de barrido, la difusión en la capa delgada se ve favorecida, y como resultado de esto el potencial de pico se desplaza hacia valores más negativos. Este fenómeno sugiere que la reducción de la DNC a un derivado de hidroxilamina corresponde a un proceso irreversible, como se ha descrito para otros compuestos nitroaromáticos en medio acuoso¹²¹.



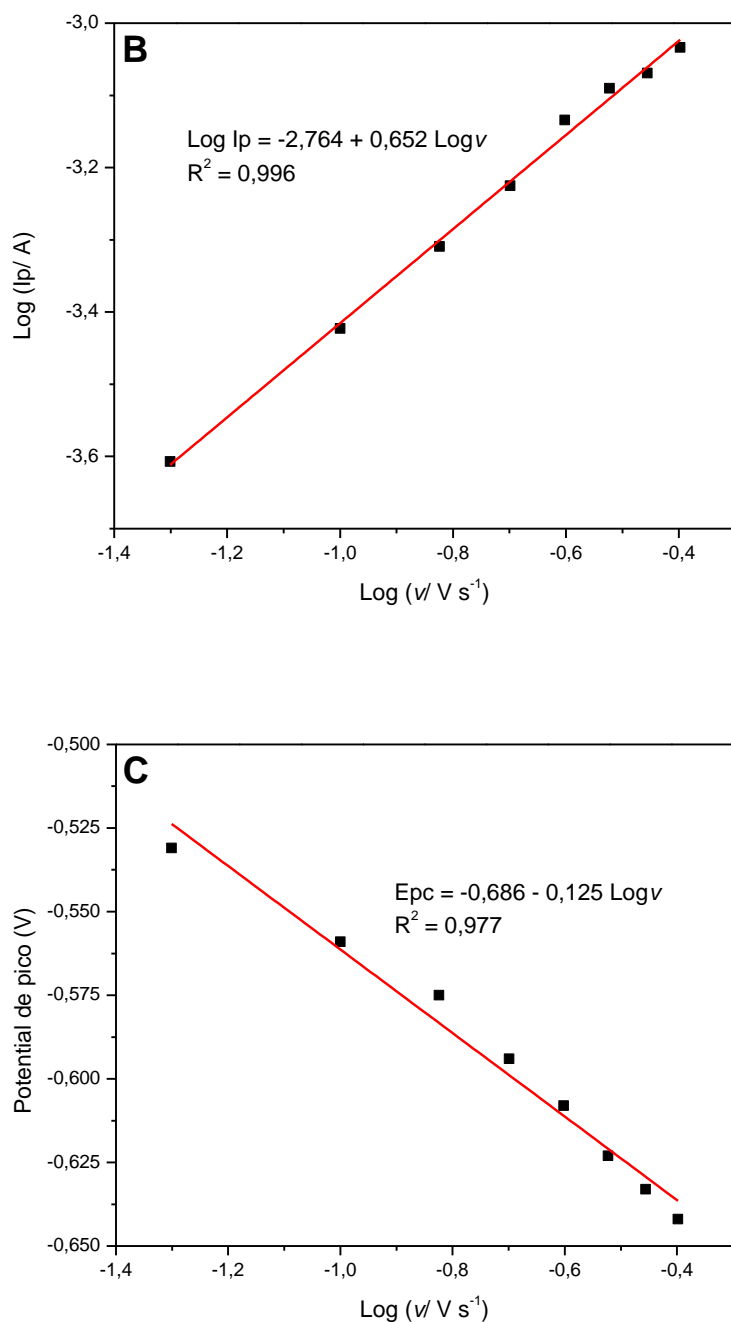


Figura 23. Efecto de la velocidad de barrido en la reducción de la DNC (0,2 mM) a un derivado de hidroxilamina. (A) CVs registrados a diferentes velocidades de barrido: 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35 y 0,40 $V s^{-1}$ en BRB (pH 5). (B) Logaritmo de la corriente de pico catódico vs. Logaritmo de la velocidad de barrido. (C) Potencial de pico catódico vs. Logaritmo de la velocidad de barrido.

4.2.3 Estudios electroquímicos para las especies superficiales electrogeneradas

4.2.3.1 Comportamiento voltamétrico

Los experimentos realizados por CV a pH 7 (figura 20), revelaron que no toda la cantidad de DNC adsorbida en la plataforma BP-MWCNT/PS fue electroquímicamente reducida en el primer ciclo de barrido. En este contexto, se decidió realizar un nuevo experimento por CV considerando 10 ciclos de barrido a pH 2 y 10 (figura 24), con la finalidad de monitorear el avance de la reducción de la DNC y la generación de las especies superficiales. Como se puede observar, a pH 10 la DNC no se reduce completamente en el primer ciclo, no obstante, en la segunda vuelta se completa su reducción (figura 24. A). Este comportamiento no se produce a pH 2 (figura 24. B), donde la intensidad de corriente registrada por la reducción de los grupos nitro es mayor en comparación con el valor registrado a pH 10. Esto último confirma que un medio de reacción ácido favorece la reducción del grupo nitro para formar el derivado de hidroxilamina, debido a la rápida protonación del anión radical nitro¹²² descrito en la reacción 24. Siguiendo con la generación del par redox ArNO/ArNHOH, a pH 10 se ha observado la disminución de la corriente de pico con un incremento en el número de ciclos. Esto confirma la ocurrencia de la reacción entre el ArNO con el ArNHOH, para formar el correspondiente azoxi derivado. A pH 2 no se observaron las señales para el par redox ArNO/ArNHOH, lo cual podría estar sugiriendo la ocurrencia de una segunda reacción por parte del derivado nitroso, que conlleva a la rápida disminución de su concentración en la superficie del electrodo. Por otro lado, a pH 10 se ha identificado la generación de dos picos de oxidación y reducción (IIIa, IVa, IIIb y IVb) a partir del segundo ciclo, cuyas intensidades aumentan con el incremento del número de ciclos, lo cual es atribuible a la formación de dos azoxi derivados y dos azo derivados ($\text{ArN}_2\text{OAr}/\text{ArN}_2\text{Ar}$), que representan a los dos grupos nitro presentes en la molécula de la DNC. Los picos antes mencionados aparecen desde el primer ciclo de barrido a pH 2, y disminuyen su intensidad conforme se aumenta el número de ciclos, lo cual podría sugerir la ocurrencia de una segunda reacción en medio ácido que permite generar un derivado de amina¹²³, el cual correspondería al par redox Va/Vb.

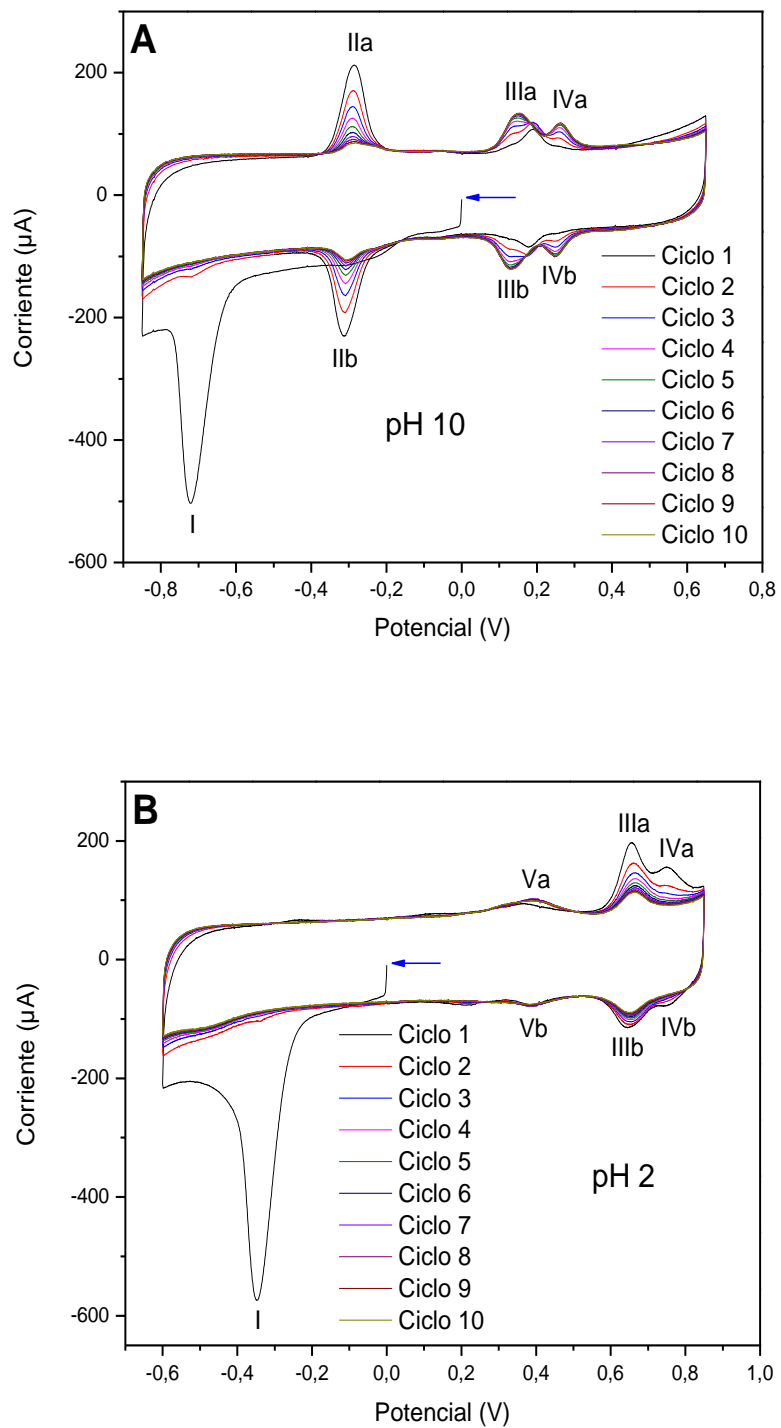
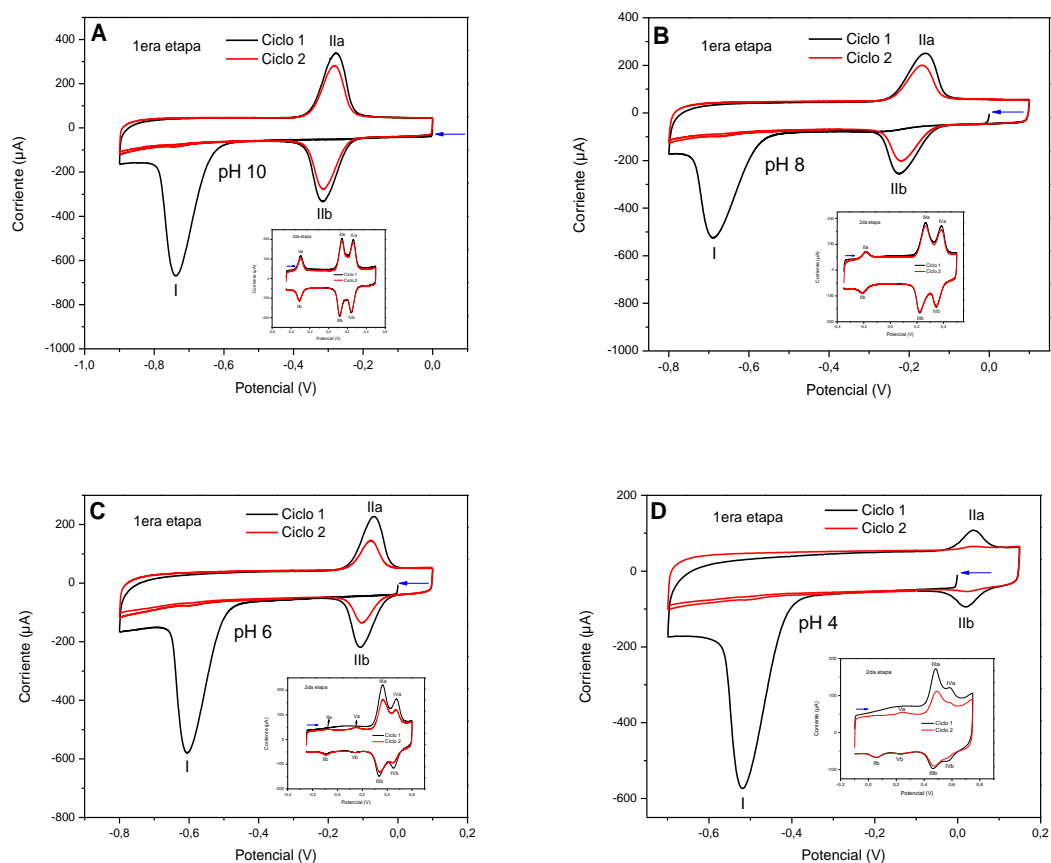


Figura 24. CVs de la DNC 0,2 mM en BRB (0,1 M) y 0,1 V s⁻¹ a (A) pH 10 y (B) pH 2.

4.2.3.2 Influencia del pH

A fin de estudiar el comportamiento electroquímico de los pares redox: ArNO/ArNHOH y ArN₂OAr/ArN₂Ar, se registraron diferentes CVs a distintos pH en dos etapas, para poder registrar las mediciones de todas las especies superficiales electrogeneradas (figura 25). En la figura 25. A, B se puede identificar claramente los pares redox antes mencionados, demostrando de esta forma su estabilidad en medio básico, sin embargo conforme se disminuye el pH, la señal IVa empieza a decaer más rápido en comparación con la señal IIIa, y como consecuencia de esto se generan las señales Va y Vb a partir del segundo ciclo a pH 6 (figura 25. C). Esto podría suponer la conversión de una parte del azoxi derivado (IVa) a un azo derivado (IVb). Este último, debido a la presencia de protones en el medio de reacción, reduce los grupos hidroxilamina presentes en su estructura a grupos amina, los cuales se observan a potenciales más negativos¹²⁴. De modo que el par redox Va/Vb se muestra solamente



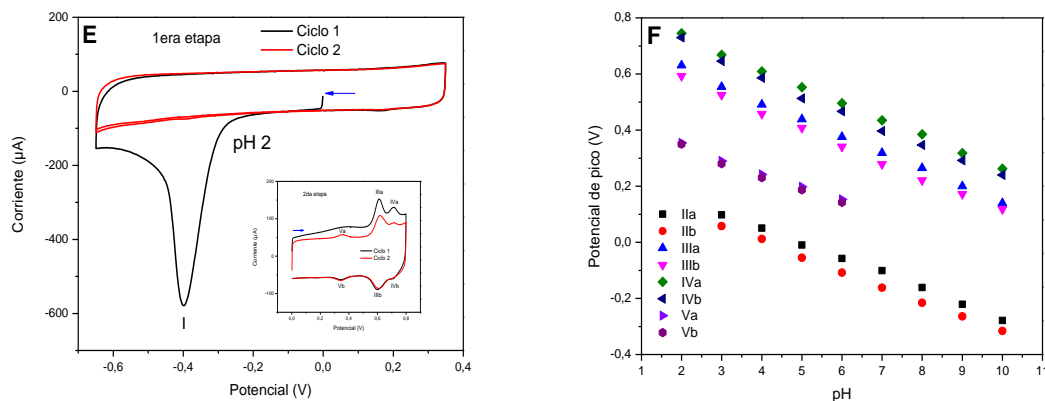


Figura 25. CVs para la DNC (0,2 M) registrados en dos etapas en BRB (0,1 M) a $0,1 \text{ V s}^{-1}$. (A) pH 10, (B) pH 8, (C) pH 6, (D) pH 4, (E) pH 2, (F) Potencial de pico anódico y catódico en función del pH para las especies superficiales electrogeneradas.

en un rango de pH entre 2 y 6. Por otra parte, se puede apreciar que el par redox IIa/IIb tiene una rápida tasa de consumo cuando el pH disminuye a 4 (figura 25. D), y a pH 2 (figura 25. E) no se logra identificar ninguna señal para este par redox. Como se mencionó anteriormente, esto se podría atribuir a una reacción que experimenta el derivado nitroso en medio ácido, que produce su rápida disminución en la superficie del electrodo. Este comportamiento ya se ha informado para la 4-nitro-N-(2-nitrofenil) benzamida¹²⁴, donde posterior a la formación del derivado nitroso se genera una especie radicalaria, y se evidencia a través de un pico irreversible, sin embargo más adelante se explicará con más detalle este comportamiento dentro del mecanismo de reacción de la DNC.

Adicionalmente los potenciales de pico anódico y catódico para cada par redox fueron graficados en función del pH, los cuales disminuyen linealmente con el aumento de pH (figura 25. F). Esto último ratifica que todas las especies superficiales generadas electroquímicamente, son dependientes de un mecanismo que está controlado por protones. Para el caso del par redox IIa/IIb la linealidad en el pico de oxidación y reducción se mantuvo dentro del intervalo de pH de 3 a 10, mientras que el par redox Va/Vb mantiene una linealidad en un rango comprendido entre 2 y 6. El resto de señales mantuvieron la linealidad del pico de oxidación y reducción en un rango de pH comprendido entre 2 y 10. En la tabla 8 se resumen las regresiones de las curvas de

potencial vs. pH para todas las señales, donde se puede observar la similitud en los valores de las pendientes obtenidas, lo cual indicaría que las reacciones ocurridas para la generación de las especies superficiales, involucran la misma proporción de protones y electrones.

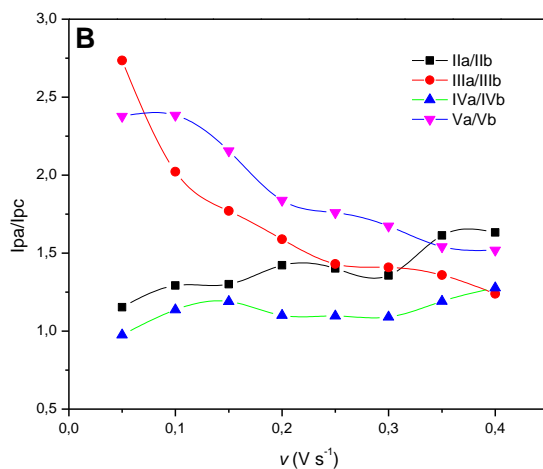
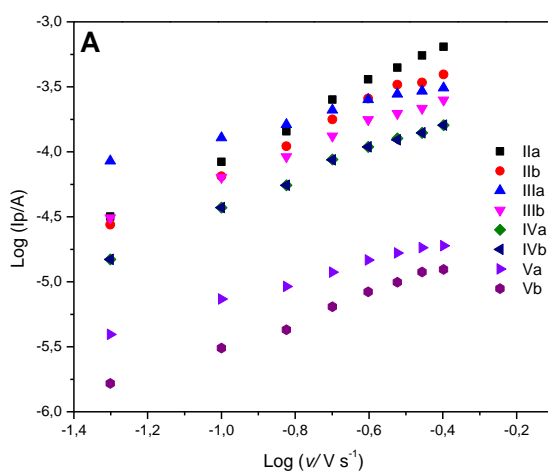
Tabla 8. Curvas de potencial vs. pH para los picos de oxidación y reducción de cada señal.

Señal	Potencial de pico vs. pH	R ²	Rango de pH
Ila	$E_p = 0,262 - 0,054\text{pH}$	0,998	3-10
Ilb	$E_p = 0,220 - 0,054\text{pH}$	0,999	3-10
IIla	$E_p = 0,739 - 0,060\text{pH}$	0,999	2-10
IIlb	$E_p = 0,702 - 0,059\text{pH}$	0,998	2-10
IVa	$E_p = 0,852 - 0,059\text{pH}$	0,999	2-10
IVb	$E_p = 0,830 - 0,060\text{pH}$	0,995	2-10
Va	$E_p = 0,445 - 0,049\text{pH}$	0,992	2-6
Vb	$E_p = 0,441 - 0,051\text{pH}$	0,986	2-6

4.2.3.3 Efecto de la velocidad de barrido

De acuerdo a los estudios realizados anteriormente, se puede argumentar que la acidez del medio de reacción constituye un factor fundamental en el proceso de generación de las especies superficiales, lo que puede aumentar su reactividad y por ende provocar una disminución en su tiempo de vida. Es por ello que se procedió a estudiar el efecto de la velocidad de barrido sobre las especies superficiales electrogeneradas a pH 5, debido a que bajo esta condición las señales (Ila, Ilb, IIIa, IIIb, IVa, IVb, Va y Vb) se mantienen estables. Se graficó el logaritmo de las corrientes de pico anódico y catódico en función del logaritmo de la velocidad de barrido (figura 26. A), utilizando un rango comprendido entre 0,05 a 0,40 V s⁻¹. Se observó un aumento en la corriente de pico con el incremento de la velocidad de barrido, además todas las curvas (log I_p vs. log v) mostraron una tendencia lineal en el rango de velocidad estudiado, cuyas regresiones se resumen en la tabla 9. Todas las curvas a excepción de la IIIa y Va, exhibieron una pendiente mayor a 1, lo que demuestra que el transporte de masa desde la superficie del electrodo hacia la disolución BRB está controlado por un proceso de adsorción. En la figura 26. B se muestra la razón de corriente de pico anódico y catódico (I_{pa}/I_{pc}) en función de la velocidad de barrido para los pares redox: Ila/Ilb, IIIa/IIIb, IVa/IVb y Va/Vb, donde se observa un leve aumento de dicha razón cuando se

incrementa la velocidad de barrido para los pares redox IIa/IIb y IVa/IVb. Para los pares redox IIIa/IIIb y Va/Vb, se evidencia una disminución progresiva en la razón I_{pa}/I_{pc} con el aumento de la velocidad de barrido. Esto último puede atribuirse a que el azoxi derivado de la señal IIIa y el derivado de amina de la señal Va, presentaron un régimen de transporte de masa mixto, que promueve la desorción de estas especies en la superficie del electrodo conforme se aumenta la velocidad de barrido. En la figura 26. C se muestra la variación del potencial de pico anódico y catódico (ΔE_p) de cada par redox en función del logaritmo de la velocidad de barrido, donde se observa un aumento en el valor de ΔE_p de forma exponencial cuando se incrementa la velocidad de barrido. Se logra evidenciar que a medida que se forman los pares redox estudiados, las reacciones



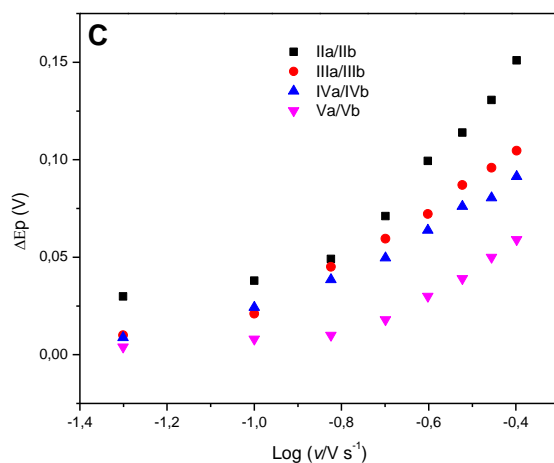


Figura 26. (A) Curvas $\log I_p$ vs. $\log v$ para el pico anódico y catódico de cada señal a pH 5. (B) Razón de corriente de pico anódico y catódico en función de la velocidad de barrido. (C) Diferencia de potencial de pico anódico y catódico en función del logaritmo de la velocidad de barrido. Las señales electroquímicas se muestran dentro de cada gráfico.

tienden más a la reversibilidad, y esto es especialmente evidente en el par redox Va/Vb, lo que sugiere una transferencia electrónica más rápida para este último. Sin embargo, la posición del pico de potencial cambia para todos los pares redox con la velocidad de barrido, y la relación I_{pa}/I_{pc} es diferente de uno, lo cual sugiere un sistema cuasi-reversible, tal como se ha descrito en la literatura^{2,5,61}.

Tabla 9. Regresión de las curvas $\text{Log } I_p$ vs. $\text{Log } v$ para el pico anódico y catódico de cada señal. Señales electroquímicas: Ila, IIb, IIIa, IIIb, IVa, IVb, Va y Vb.

Señal	Log I_p vs. Log v pH 5, rango v : 0,05–0,40 V s^{-1}	R^2
Ila	$\text{Log } I_p = -2,584 + 1,481 \text{Log } v$	0,997
IIb	$\text{Log } I_p = -2,834 + 1,332 \text{Log } v$	0,992
IIIa	$\text{Log } I_p = -3,231 + 0,651 \text{Log } v$	0,992
IIIb	$\text{Log } I_p = -3,181 + 1,016 \text{Log } v$	0,995
IVa	$\text{Log } I_p = -3,302 + 1,149 \text{Log } v$	0,991
IVb	$\text{Log } I_p = -3,307 + 1,145 \text{Log } v$	0,992
Va	$\text{Log } I_p = -4,389 + 0,769 \text{Log } v$	0,993
Vb	$\text{Log } I_p = -4,484 + 1,014 \text{Log } v$	0,993

4.2.3.4 Mecanismo redox

Con base en los estudios realizados para el comportamiento electroquímico de la DNC, se propone el mecanismo que se muestra en la figura 27, con la intención de explicar la transición que experimenta la DNC para formar las diferentes especies superficiales que han sido previamente descritas. Como se mencionó anteriormente, la DNC sufre únicamente un proceso de reducción, y como resultado de esto se forman los pares redox: IIa/IIb, IIIa/IIIb, IVa/IVb y Va/Vb, que son observados a medida que se avanza con el barrido de potencial en una CV a diferentes pH. En los CVs mostrados en la figura 25 se observó que la intensidad de la señal IVb disminuye progresivamente a medida que se reduce el pH, lo cual se puede explicar a través de la reacción IX, donde los grupos hidroxilamina del azo derivado IVb se reducen a grupos amina, con una transferencia de 4 electrones y 4 protones dando como resultado la formación de un

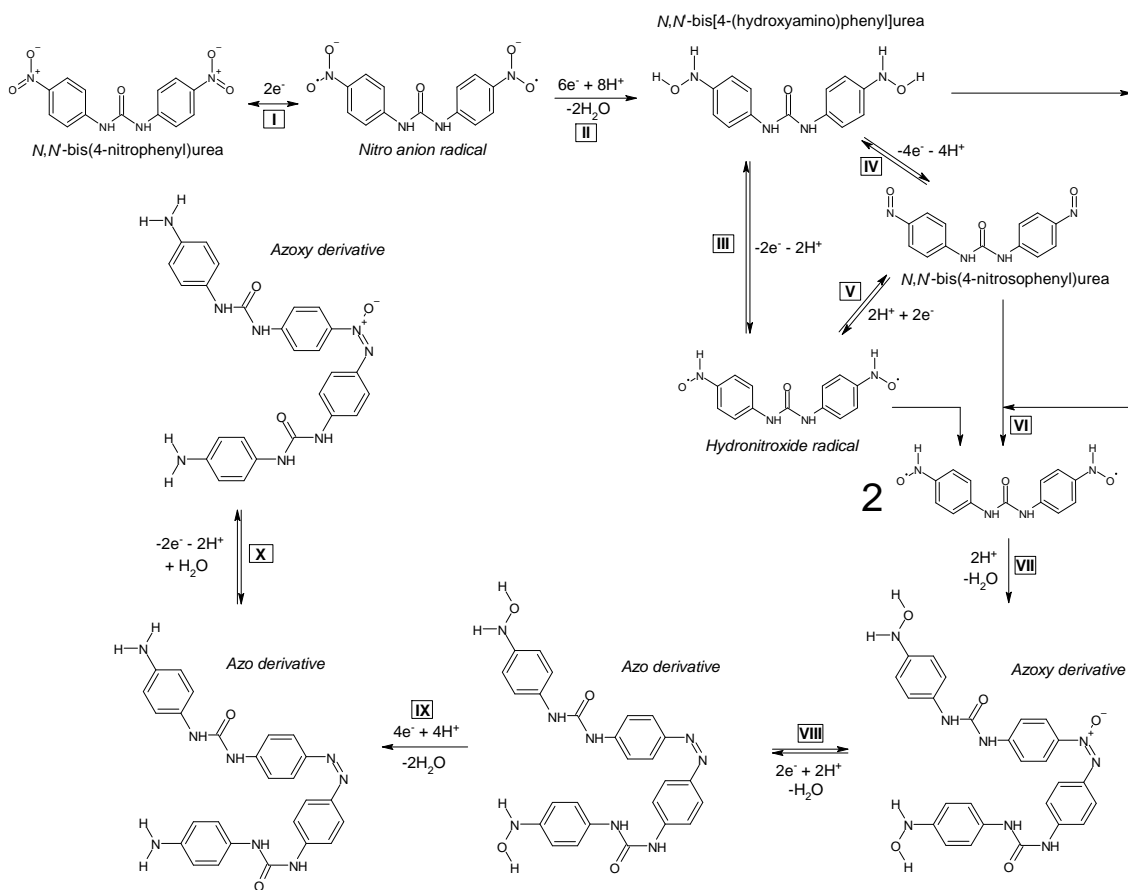
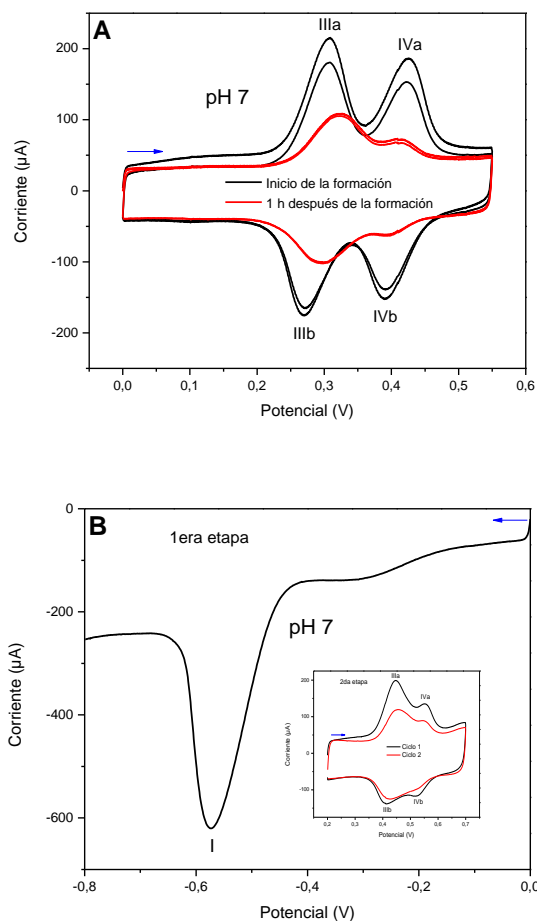


Figura 27. Mecanismo de reacción propuesto para el comportamiento electroquímico de la DNC.

nuevo azo derivado correspondiente a la señal Vb. Este azo derivado formado puede oxidarse (reacción X) a un azoxi derivado (Va), formando un par redox (Va/Vb), el cual como se mencionó anteriormente aparece solo en medio ácido. Vale la pena señalar que el resto de especies superficiales electrogeneradas también experimentaron una disminución en la intensidad de las señales registradas a medida que se aumenta la acidez del medio de reacción, sin embargo, para este caso, este fenómeno puede explicarse a través de la protonación de dichas especies, que da como resultado un aumento de la solubilidad en el medio de reacción¹²⁵, promoviendo de esta forma su desorción desde la superficie del electrodo hacia la solución. Este comportamiento incluso se observa a pH 7 (figura 28. A), donde la intensidad de la señal decae en un 60 % para el par redox IIIa/IIIb y en un 89 % para el par redox IVa/IVb, después de 1 hora de haber generado en la superficie del electrodo los azo y azoxi derivados. Es importante



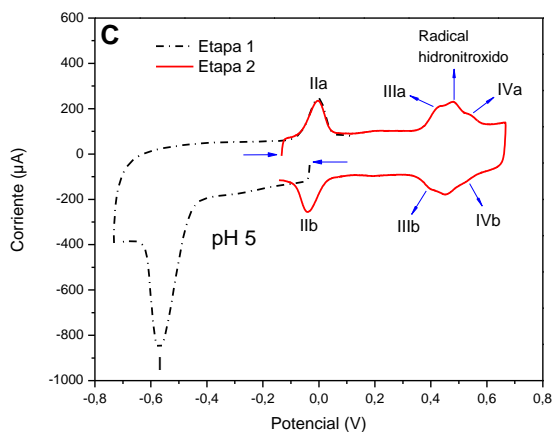


Figura 28. CVs registrados a (A) pH 7 y $0,1 \text{ V s}^{-1}$ para la formación de azo y azoxi derivados y su avance posterior a 1 hora, (B) pH 7 y $0,1 \text{ V s}^{-1}$ sin generación del derivado nitroso, (C) con función macros a pH 5 y $0,15 \text{ V s}^{-1}$.

destacar que la intensidad de la señal correspondiente al derivado nitroso IIa, disminuye de una manera más acentuada en medio ácido si se compara con el resto de señales, lo que se podría atribuir a la conversión de dicho derivado a un radical hidronitroxido, como se puede observar en la reacción V. El radical hidronitroxido sufre un proceso de dimerización^{126,127}, liberando una molécula de agua, que da como resultado final la formación de un azoxi derivado. La generación del radical hidronitroxido ha sido reportada en la literatura¹²⁸, y puede ocurrir a través de las siguientes vías: 1. mediante la reacción de acoplamiento entre el derivado de hidroxilamina y el derivado nitroso, 2. mediante la protonación del derivado nitroso y 3. mediante la desprotonación del derivado de hidroxilamina. Esta última vía fue demostrada llevando a cabo la reducción del grupo nitro, sin generar el derivado nitroso (figura 28. B), donde se registró satisfactoriamente en la segunda etapa la generación del correspondiente azoxi derivado. Por último, el radical hidronitroxido se pudo observar mediante una CV a pH 5 y $0,15 \text{ V s}^{-1}$ (figura 28. C), utilizando la función macros disponible en el software de medición, la cual permitió el registro de los voltamogramas en cada etapa de manera automática. En este caso, el radical hidronitroxido exhibe una sola señal, la cual se divide en dos señales (IIIa y IVa) a medida que avanza la reacción de dimerización, tal como se había observado de forma más clara en el primer ciclo de barrido de la figura 24. A, lo que demuestra una mayor estabilidad de dicho radical en medio básico.

4.5 Desarrollo del método electroanalítico

4.5.1 Estabilidad de la solución analítica

La estabilidad de una solución de DNC fue evaluada durante 5 días consecutivos mediante espectroscopía UV-Vis y DPV, con el fin de verificar su posible degradación en el tiempo, y su efecto sobre la respuesta electroquímica de la plataforma BP-MWCNT/PS. Para el análisis por espectroscopía UV-Vis, se hizo un escaneo por día a tres soluciones de DNC, donde se registraron los correspondientes espectros de absorción con su altura de pico (figura 29. A, B). Las soluciones de DNC se prepararon a diario, mediante la dilución de la solución madre en ACN (1:80). La DNC exhibió su mayor absorción en una longitud de onda promedio de 340 nm, donde se observó un decaimiento en la altura de pico en 1,3 % a partir del segundo día y en 4,7 % a partir del quinto día. Esta diferencia porcentual en los resultados después de 24 h revela la estabilidad limitada que posee la DNC en ACN. Lo antes mencionado concuerda con el trabajo de Krabel *et al*⁷⁸, donde se reportó que las soluciones madres de DNC preparadas en ACN permanecen estables durante 24 h, cuando se almacenan con luz tenue en condiciones ambientales o de refrigeración. Además, en el estudio reportado por de Jong *et al*⁸⁵, se informó que la estabilidad de la DNC en otros solventes diferentes a la DMF es limitada. Por otro lado, se registraron los voltamogramas de pulso diferencial junto a su señal analítica, utilizando el sensor BP-MWCNT/PS-GCE y la solución madre de la DNC (figura 29. C, D). Luego de 5 días, la respuesta de corriente disminuyó al 95,5 %, lo cual es atribuible a la estabilidad limitada de la DNC en ACN, y al posible efecto de degradación por acción de la luz. En base a lo antes expuesto, se decidió almacenar todas las soluciones en material ámbar, y su uso no se extendió por más de 24 h.

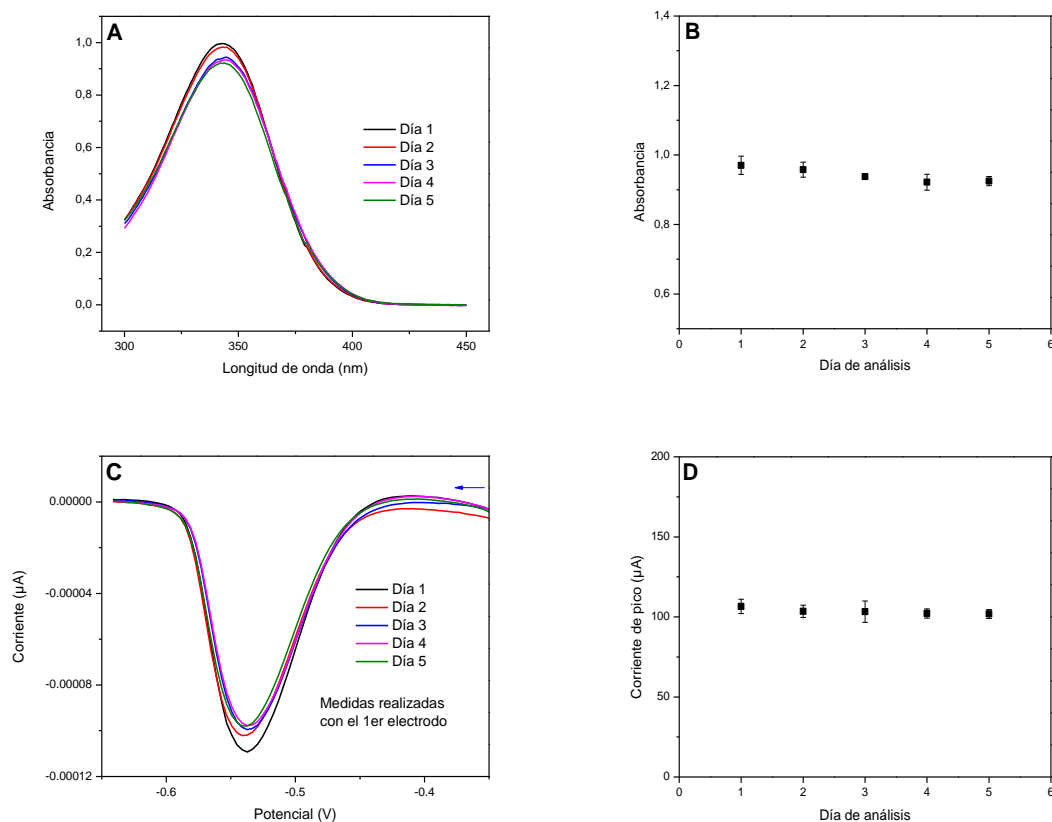


Figura 29. Estabilidad de un estándar de DNC para 5 días consecutivos mediante espectroscopía UV-Vis y DPV. (A) espectro de absorción, (B) promedio de la altura de pico para cada día de análisis, (C) voltamogramas de pulso diferencial registrados con el primer electrodo y (D) promedio de la corriente de pico para cada día de análisis.

4.5.2 Tiempo de acumulación

Para estudiar el efecto del transporte de masa sobre la respuesta de corriente, se realizó un estudio de tiempo de acumulación (figura 30), donde se utilizó una solución estándar de DNC al 0,1 mM, para garantizar una mejor solubilidad en el BRB al momento de ser agregada, debido a la solubilidad limitada que presenta la misma en medio acuoso. De acuerdo a la figura 30, se observa una acumulación rápida después del primer minuto, lo cual se puede atribuir a la macroporosidad e hidrofobicidad que presenta la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS, que permite una buena afinidad por la DNC. A medida que se incrementa el tiempo de acumulación se observa que la

respuesta de corriente continúa aumentando, pero de manera ligera, indicando de esta forma que los intersticios de la red de los nanotubos se encuentran cada vez más ocupados, debido al creciente número de moléculas de DNC que previamente se han adsorbido. Con base a lo anteriormente descrito, se puede argumentar que este estudio representa una herramienta fundamental para las mediciones electroquímicas que se realizan por adsorción indirecta con la DNC, tal como se ha descrito en la figura 19. B. Por lo que una mayor acumulación puede mejorar la cantidad de DNC absorbida, y como resultado de esto se obtiene una mejor sensibilidad de determinación por parte del método electroanalítico, y una disminución en el LOD. De modo que se ha considerado un tiempo de acumulación de 4 minutos para realizar la validación del método electroanalítico, el cual representa un valor apropiado para que dicho método no sea laborioso, y permita realizar el análisis de NCZ de manera rápida.

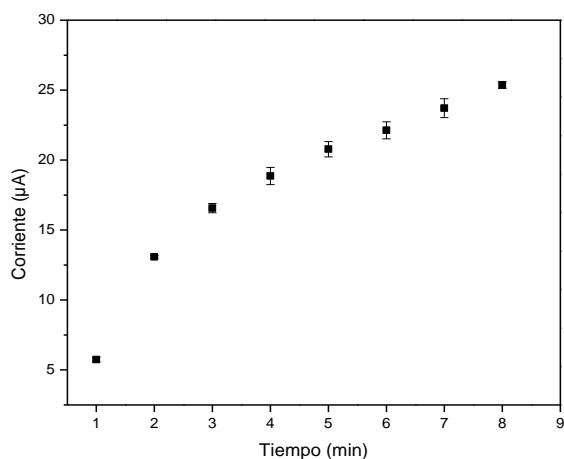


Figura 30. Efecto del tiempo de acumulación sobre la respuesta de corriente de la DNC por DPV en BBR (0,1 M) a pH 5.

4.5.3 Optimización de las condiciones en el sistema BIAS

Se llevó a cabo una etapa de optimización del sistema de medición BIAS para AD i-t, con el propósito de establecer las condiciones adecuadas que permitan validar un método electroanalítico. Inicialmente el análisis amperométrico se realizó aplicando un potencial de $-0,65\text{ V}$, donde se hicieron tres inyecciones sucesivas de $40\ \mu\text{L}$ de

muestra de DNC cada 50 segundos, y se registraron las medidas por triplicado. Se preparó una solución madre de DNC (0,2 mM en ACN), y como solución electrolítica se utilizó un BRB (0,1 M) a pH 5. La muestra a analizar se preparó a partir de la solución madre, tomando una alícuota adecuada para llevar la concentración a 0,05 mM, donde se utilizó como diluyente ACN, y luego se probó con etanol. Los resultados obtenidos a partir de las condiciones empleadas se muestran en la tabla 10, donde se logra evidenciar una baja precisión en las medidas realizadas. El etanol como diluyente de la muestra resultó en la precisión más baja, con un menor valor en la respuesta de corriente, atribuible a la solubilidad limitada que presenta la DNC en este solvente. Este fenómeno se puede ajustar al modelo de difusión lineal semi-infinita¹²⁹, donde en este caso existe una menor disponibilidad de moléculas de DNC en solución para interactuar con la superficie del electrodo, produciendo una disminución en la respuesta de corriente y en la precisión de las medidas, ya que las condiciones de difusión podrían variar de una medición a otra. Para mejorar la precisión de las medidas realizadas, se decidió utilizar diferentes solventes mezclados con BRB (0,1 M) a pH 5 en proporción 25:75 v/v, como se indica en la tabla 10. En este caso el volumen de cada inyección se ajustó a 30 μ L, donde la muestra se preparó a una concentración de 0,015 mM para garantizar la solubilidad de la DNC en el diluyente empleado. Los resultados revelan que la mezcla ACN: BRB en proporción 25:75 v/v permite obtener medidas con una precisión aceptable (RSD < 10%), como se sugiere en la literatura para realizar un análisis electroquímico¹³⁰.

Tabla 10. Análisis comparativo de diferentes diluyentes en la precisión de las medidas amperométricas.

Diluyente de la muestra	ACN	Etanol	Et: BRB 25:75 v/v	ACN: BRB 25:75 v/v	DMF: BRB 25:75 v/v
Concentración de la muestra	0,050 mM			0,015 mM	
Corriente promedio, μ A	282 \pm 98	203 \pm 54	24 \pm 3	103 \pm 9	79 \pm 8
RSD, %	10,3	26,8	11,1	8,3	10,4

Con base a esta novedad, se realizaron pruebas de linealidad utilizando un set de soluciones estándar de DNC con las siguientes concentraciones: 0,0025, 0,005,

0,010, 0,020, 0,030, 0,040 y 0,048 mM. Desafortunadamente no se obtuvo una relación lineal de la respuesta de corriente frente a las concentraciones analizadas. Posteriormente se decidió ajustar el potencial de trabajo a $-0,50$ V y el volumen de inyección a $25 \mu\text{L}$, sin embargo, no se logró una linealidad satisfactoria. Estos problemas presentados se atribuyeron a la escasa solubilidad que presenta la DNC en la solución electrolítica empleada hasta el momento (BRB). En respuesta a este problema, se optó por utilizar como solución electrolítica el diluyente empleado para preparar las muestras (ACN: BRB), cuya proporción se ajustó a 30:70 v/v para mejorar la solubilidad de la DNC. Este paso supone un desafío, debido a que la adición de un solvente a la solución electrolítica provoca una disminución en la conductividad de la misma, sin embargo, facilita la difusión de la DNC hacia la superficie del electrodo, debido al aumento en la solubilidad que produce una mayor concentración del analito en solución. Este comportamiento se explica a través de la primera ley de Fick¹²⁹, donde se sabe que la velocidad de difusión es proporcional a la concentración de las especies en solución. Es importante mencionar que la solución madre se preparó en ACN: BRB (30:70 v/v) en lugar de ACN puro, disolviendo aproximadamente 1 mg de un estándar de DNC en un volumen de 100 mL. Con los ajustes realizados se logró obtener una linealidad moderada en la respuesta de corriente, sin embargo, al ajustar la proporción de la mezcla ACN: BRB a 40:60 v/v, se observó una mejora en la linealidad. En la tabla 11 se muestra un resumen de las condiciones experimentales optimizadas para el sistema de medición BIAS.

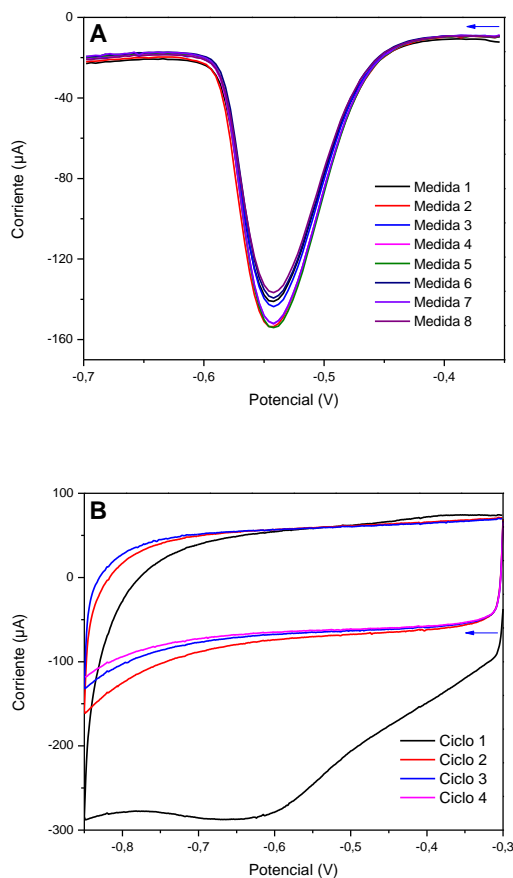
Tabla 11. Condiciones optimizadas para el sistema de medición BIAS con AD i-t.

Parámetro	Condición
Potencial aplicado	$-0,500$ V
Tiempo de equilibrio	1 s
Solución electrolítica/ diluyente de la muestra	ACN: BRB (40:60 v/v)
Volumen de solución electrolítica	20 mL
Volumen de inyección	$25 \mu\text{L}$
Concentración de la solución madre	0,032 mM

4.5.4 Cifras de mérito para el método electroanalítico por DPV con BP-MWCNT/PS-GCE

4.5.4.1 Precisión

Para el desarrollo de una metodología electroanalítica se utilizó la técnica de voltametría de pulso diferencial (DPV), debido a su alta sensibilidad para llevar a cabo estudios de cuantificación. El protocolo de validación se inició evaluando la repetibilidad en la plataforma BP-MWCNT/PS, con la intención de conocer su nivel de precisión al realizar una serie de medidas consecutivas utilizando un mismo electrodo modificado. En este sentido, se registró un total de 8 mediciones con el electrodo modificado como se observa en la figura 31. A. Entre cada medida fue necesario realizar un escaneo de limpieza para renovar la superficie del electrodo (figura 31. B). Para garantizar la remoción completa de la DNC, la superficie del electrodo se sumergió durante 10 segundos en ACN después de realizar el escaneo de limpieza.



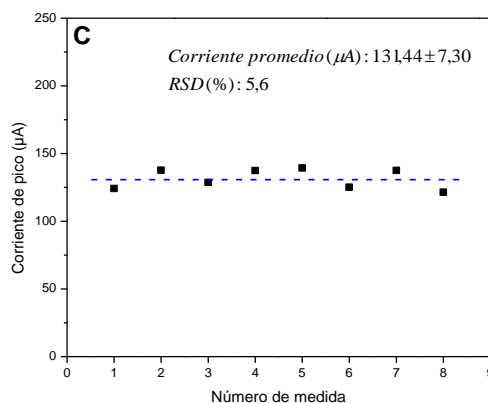


Figura 31. Estudio de repetibilidad a pH 5 usando una solución estándar de DNC (0,2 mM). (A) Voltamogramas de pulso diferencial para un GCE modificado con BP-MWCNT/PS, (B) Escaneo de limpieza por CV y (C) corriente de pico para la reducción de la DNC.

En la figura 32 se muestra un esquema del procedimiento adoptado para efectuar medidas sucesivas con un mismo electrodo. Los valores de altura de la corriente de pico fueron graficados frente a cada medición realizada (figura 31. C), donde se obtuvo una corriente promedio de $131,44 \pm 7,30 \mu\text{A}$ con una RSD igual a 5,6 %. En este caso se observó un cierto grado de variabilidad en los valores obtenidos, que se manifiestan como fluctuaciones en la corriente registrada a medida que avanza el experimento. En el contexto del electroanálisis, se ha informado que la repetibilidad y reproducibilidad de la señal analítica se ve afectada debido a los procesos de adsorción y formación de productos intermedios en la superficie del electrodo¹³¹. Sin embargo, una forma más clara de explicar la pérdida en la repetibilidad obtenida es a través de la reorganización que experimentan los CNT cuando se aplica un potencial¹³². Esto conlleva a la alineación de los mismos, formando en algunos casos caminos conductores que facilitan la transferencia de carga¹³², pero que nuevamente pueden regresar a sus ubicaciones primarias¹³³. No obstante, la repetibilidad obtenida en términos de RSD se considera aceptable para realizar un análisis electroquímico¹³⁰.

En lo que corresponde a la reproducibilidad, se utilizaron 8 electrodos modificados con la plataforma BP-MWCNT/PS. Se realizó una medición por cada electrodo modificado. El registro de la señal analítica se hizo bajo las mismas condiciones experimentales del estudio de repetibilidad, donde finalmente se obtuvo una

corriente promedio de $125,74 \pm 5,72 \mu\text{A}$ con una RSD igual a 4,6 %, lo que revela que este método tiene una buena reproducibilidad para realizar un análisis electroquímico. La buena reproducibilidad de la plataforma BP-MWCNT/PS ya ha sido reportada en la literatura con otras especies nitroaromáticas⁸³, y está asociada al grado de homogeneidad de las películas de BP producidas por la metodología empleada en esta tesis, lo que permite el desarrollo de un sensor electroquímico para la detección y cuantificación de NCZ.

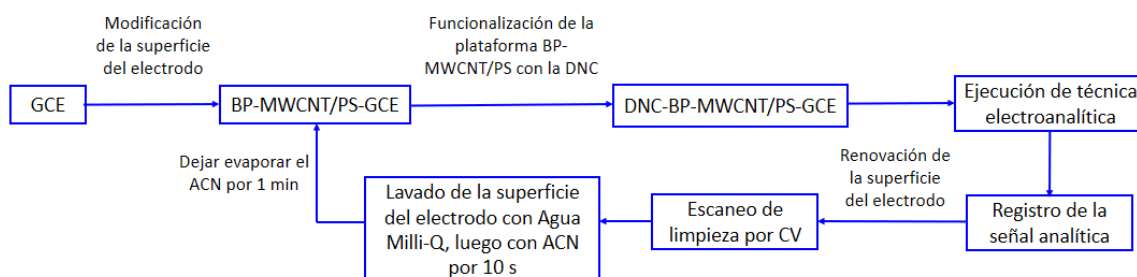


Figura 32. Procedimiento utilizado para llevar a cabo sucesivas mediciones con un GCE.

Para analizar la precisión del sensor BP-MWCNT/PS-GCE se realizó una prueba t de student comparando el estudio de repetibilidad y reproducibilidad, cuyos resultados se resumen en la tabla 12. Para esta prueba se puede observar que el valor en la probabilidad de error para dos colas es igual a 0,11 (nivel de confianza del 95 %), lo cual, de acuerdo a los criterios convencionales¹³⁴, demuestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos por el estudio de repetibilidad y reproducibilidad. De esto último se puede destacar que el sensor propuesto en esta tesis permite obtener mediciones precisas para llevar a cabo la calibración de un método electroanalítico, y a su vez demuestra que el proceso de renovación en la superficie de la plataforma BP-MWCNT/PS resulta adecuado, para realizar un número importante de análisis de forma rápida a partir de un mismo electrodo.

Tabla 12. Prueba t de student para la repetibilidad y reproducibilidad de la plataforma BP-MWCNT/PS asumiendo varianzas desiguales.

	<i>Repetibilidad</i>	<i>Reproducibilidad</i>
	<i>N = 8</i>	<i>N = 8</i>
Media (μA)	131,44	125,74
Varianza (μA^2)	53,34	32,75
RSD (%)	5,6	4,6
Grados de libertad	13	
Estadístico t	1,74	
P(T<=t) dos colas	0,11	
Valor crítico de t (dos colas)	2,16	

4.5.4.2 Linealidad

La linealidad se evaluó con la intención de conocer el intervalo donde se producen respuestas de corriente lineales en relación con la concentración analizada. Se realizaron dos modelos de regresión lineal para cada forma de funcionalización, los cuales se resumen en la tabla 13. El primer modelo de regresión consistió en un estudio de amplio rango lineal, donde los electrodos fueron funcionalizados por adsorción directa con una solución estándar de DNC, en siete niveles de concentración que oscilan entre 0,75 y 90,67 mg L⁻¹. El análisis de regresión reveló una buena linealidad, indicando que la corriente máxima para el pico de reducción varía linealmente en el intervalo de concentraciones estudiado (figura 33. A). El intercepto obtenido para la regresión lineal es menor al 2 % de la respuesta de corriente producida a bajas concentraciones, de modo que se cumple con el criterio de aceptación establecido para estudios de linealidad, en el protocolo de validación de métodos analíticos¹³⁵. En otras palabras, se puede argumentar que no existe una diferencia significativa entre el punto cero y el valor del intercepto, como se observa en la tabla 13. Adicionalmente se calculó el valor de t_r para el coeficiente de correlación (r), el cual arrojó un resultado de 64,52. Al comparar este resultado con el valor de t crítico, se cumple que el t_r es mayor que el t crítico (64,52 > 2,57), lo que indica que la correlación lineal obtenida es significativa.

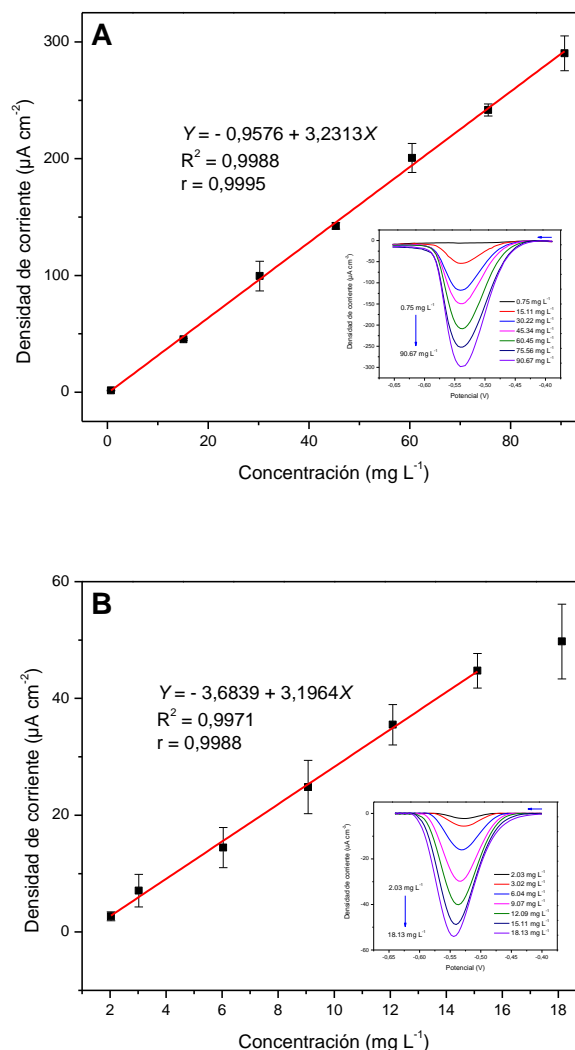


Figura 33. Estudio de linealidad para el método electroanalítico por DPV con BP-MWCNT/PS-GCE. (A) Funcionalización por adsorción directa con un estándar de DNC en un rango de 0,75 a 90,67 mg L^{-1} y (B) Funcionalización por adsorción indirecta con un estándar de DNC en un rango de 2,03 a 18,13 mg L^{-1} .

El segundo modelo de regresión lineal se llevó a cabo funcionalizando la superficie del electrodo por adsorción indirecta, con un set de soluciones estándar de DNC cuyas concentraciones oscilan entre 2,03 y 18,13 mg L^{-1} . En este enfoque, la DNC se disuelve en el medio de reacción en lugar de quedar directamente adsorbida en la superficie del electrodo. Después de 4 minutos de tiempo de acumulación para cada

alícuota agregada, se registraron las medidas voltamétricas, donde se observó que la respuesta de corriente aumentó linealmente hasta la sexta adición de solución estándar de DNC (figura 33. B), sin embargo la linealidad se empezó a perder después de la sexta alícuota agregada. Esto se puede atribuir a que la adición de alícuotas de mayor concentración al medio de reacción, requiere de un mayor tiempo de acumulación, para lograr adsorber una cantidad suficiente de analito, que permita producir un aumento en la respuesta de corriente y así mantener la linealidad. Es importante mencionar que el transporte de masa conlleva a la disminución en la precisión de este modelo, y se manifiesta en desviaciones a bajas concentraciones, que producen un intersección significativamente diferente de cero, como se observa en la tabla 13. Finalmente, para este caso se obtuvo un valor de t_r superior al valor de t crítico (de 37,09 > 2,78), sugiriendo una buena correlación lineal en un rango de 2,03 a 15,11 mg L⁻¹.

Tabla 13. Análisis de regresión para estudio de linealidad mediante la funcionalización con la DNC por adsorción directa e indirecta.

Funcionalización	Parámetro	Valor	Valor t	Prob dos colas > t	R ²	r	Rango lineal (mg L ⁻¹)
Adsorción Directa	Intercepto	-0,9576	-0,3797	0,7198	0,9988	0,9995	0,75–90,67
	Pendiente	3,2313	69,8151	1,1418E-8			
Adsorción Indirecta	Intercepto	-3,6839	-5,1673	0,0067	0,9971	0,9988	2,03–15,11
	Pendiente	3,1964	41,1923	2,0758E-6			

* Para el cálculo del valor de t y la probabilidad de dos colas se consideró un nivel de confianza del 95 %.

4.5.4.3 Sensibilidad, rango, LOD y LOQ

Sobre la base de la linealidad evaluada, se construyó una curva de calibración externa para la metodología por adsorción directa, en una región de baja concentración (2,01 a 15,11 mg L⁻¹) de DNC. La curva de calibrado obtenida se muestra en la figura 34. A, la cual se ajustó a la siguiente ecuación: $Y = -2,0885 + 3,0685X$ con $R^2 = 0,9992$. El valor obtenido para el coeficiente de determinación cumple con los criterios de aceptación ($R^2 \geq 0,999$ ¹³⁶), lo que revela una buena linealidad para el rango de trabajo seleccionado. Por otro lado, se construyó una curva de calibración para la metodología por adsorción indirecta, donde se consideró la región intermedia del rango lineal evaluado previamente. El ajuste lineal se muestra en la figura 34. B, y obedeció a la

siguiente ecuación: $Y = -19,323 + 4,9051X$ con $R^2 = 0,9980$. Se puede observar que la sensibilidad de este modelo aumentó en el rango de concentraciones seleccionado (5,00 a 10,00 mg L⁻¹). Este comportamiento demuestra que la plataforma BP-MWCNT/PS se comporta como una superficie adsorbente, que tiene la capacidad de capturar una mayor cantidad de DNC, a medida que la concentración de esta última aumenta en el medio de reacción, lo que resulta en una ampliación de la señal detectada.

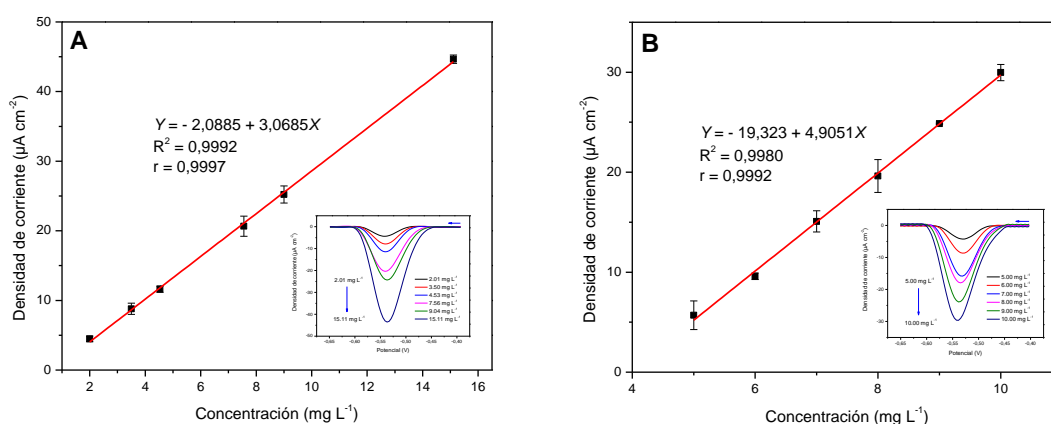


Figura 34. Curvas de calibrado para el método electroanalítico por DPV con BP-MWCNT/PS-GCE. Funcionalización por (A) adsorción directa y (B) adsorción indirecta.

Tabla 14. Mediciones realizadas a una solución estándar de DNC para el cálculo del LOD.

Muestra	Funcionalización			
	Adsorción directa*		Adsorción indirecta**	
	Densidad de corriente (μA cm ⁻²)	Concentración predicha (mg L ⁻¹)	Densidad de corriente (μA cm ⁻²)	Concentración predicha (mg L ⁻¹)
1	0,9996	1,0064	8,0524	5,5809
2	1,7606	1,2544	8,0874	5,5880
3	0,9773	0,9991	9,4913	5,8743
4	2,4194	1,4691	6,4311	5,2504
5	3,1398	1,7039	5,0427	4,6962
6	1,7322	1,2452	3,7126	4,5121
7	1,6804	1,2283	2,8097	4,9673
	Promedio	1,2723	Promedio	5,2099
	SD	0,2494	SD	0,5055

* Las muestras tienen una concentración de 1 mg L⁻¹

** Las muestras tienen una concentración de 4 mg L⁻¹

Finalmente se determinó el LOD para cada metodología, a través de la ecuación 13 descrita en la sección experimental, donde se analizaron 7 soluciones estándar de DNC a una concentración perteneciente a la zona baja del intervalo lineal previamente estimado. La concentración predicha para cada solución se muestra en la tabla 14. Las concentraciones predichas se calcularon por medio de la curva de calibrado. En la tabla 15 se resumen los parámetros analíticos determinados para cada metodología.

Tabla 15. Parámetros analíticos para el método por DPV con BP-MWCNT/PS-GCE.

Parámetro	Funcionalización	
	Adsorción directa	Adsorción indirecta
	Valor	Valor
Potencial de medida (V)	-0,540	-0,540
LOD (mg L ⁻¹)	0,784	1,589
LOQ (mg L ⁻¹)	2,011	5,000
Rango de trabajo (mg L ⁻¹)	2,01–15,11	5,00–10,00
Sensibilidad (μA mg ⁻¹ L cm ⁻²)	3,069	4,905
R ²	0,999	0,998

4.5.5 Cifras de mérito para el método electroanalítico por AD i-t con BP-MWCNT/PS-SPE

4.5.5.1 Precisión

Con base en las condiciones optimizadas, se realizó un estudio de precisión basado en la repetibilidad, donde se registraron 8 medidas consecutivas con un SPE previamente modificado con la plataforma BP-MWCNT/PS. En el experimento amperométrico se observó una forma de pico característica, asociada con procesos controlados por difusión (figura 35). Se obtuvo una corriente promedio de $9,49 \pm 0,35 \mu\text{A}$ con una RSD igual a 3,7 %. Se logra evidenciar una disminución en la respuesta de corriente, debido a la pérdida de conductividad provocada por la modificación en la composición de la solución electrolítica. Sin embargo, este cambio mejoró la solubilidad de la DNC en el medio, permitiendo alcanzar condiciones de difusión más favorables para mejorar la precisión de las medidas. Este nivel de precisión alcanzado es mejor al obtenido por la técnica electroanalítica de DPV, de lo que se puede argumentar que la aplicación de un potencial fijo en la AD i-t genera menos cambios en el ordenamiento de

los nanotubos de la plataforma BP-MWCNT/PS, y por lo tanto se produce una menor variabilidad en las medidas registradas. La precisión del método se complementó con un estudio de reproducibilidad, el cual se llevó a cabo utilizando 8 electrodos SPE modificados con la plataforma BP-MWCNT/PS. Los resultados para el análisis de precisión por AD i-t basado en las condiciones optimizadas se resumen en la tabla 16.

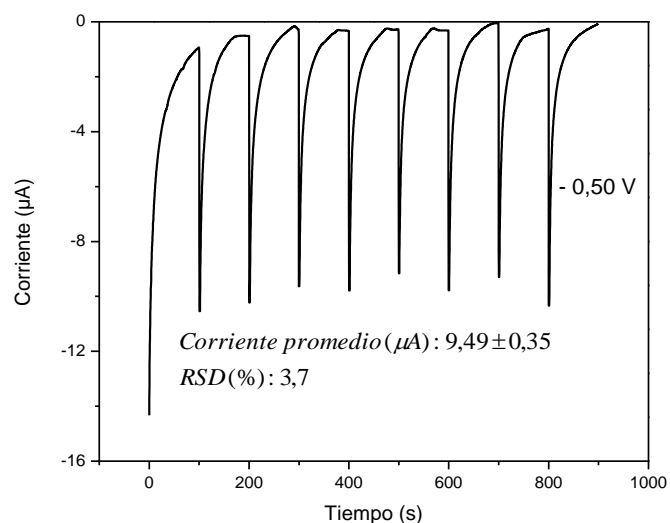


Figura 35. Amperograma para el estudio de repetibilidad con el sistema de medición BIAS, considerando 8 inyecciones sucesivas de una solución estándar de DNC al 0,03 mM.

Tabla 16. Análisis de precisión para la AD i-t en el sistema de medición BIAS.

	<i>Repetibilidad</i> N = 8	<i>Reproducibilidad</i> N = 8
Media (µA)	9,49	9,28
SD (µA)	0,35	0,46
Varianza (µA ²)	0,12	0,21
RSD (%)	3,7	4,9

4.5.5.2 Linealidad, rango, sensibilidad, LOD y LOQ

La linealidad se estudió bajo las condiciones optimizadas, realizando inyecciones sucesivas de un estándar de DNC con un mismo electrodo BP-MWCNT/PS-SPE en un rango de concentración de 0,76 a 9,70 mg L⁻¹. No se utilizaron concentraciones

superiores a $9,70 \text{ mg L}^{-1}$, debido a la solubilidad limitada de la DNC en la solución electrolítica. El mejor modelo de regresión lineal se encontró en un rango comprendido entre $1,51$ a $7,56 \text{ mg L}^{-1}$ (figura 36), el cual se ajustó a la siguiente ecuación: $Y = 19,117 + 3,4150X$ con $R^2 = 0,9948$. En este caso la linealidad del modelo fue verificada con una prueba t para el coeficiente de correlación. Se obtuvo un valor de 23,97 para el estadístico t, el cual es superior al valor de t crítico (3,18), de lo que se deduce que la linealidad para este modelo es aceptable.

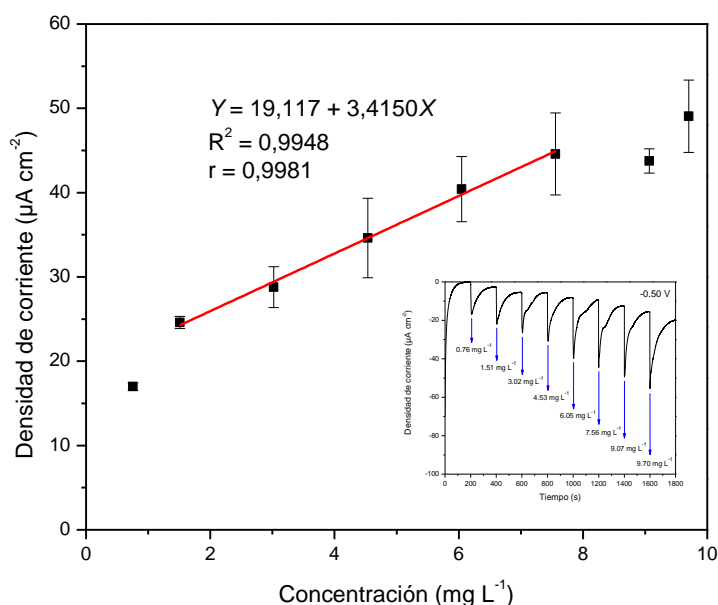


Figura 36. Estudio de linealidad para el método electroanalítico por AD *i-t* con BP-MWCNT/PS-SPE.

El modelo de regresión lineal se consideró como la curva de calibración del método, debido a que no se obtuvo un rango lineal más amplio bajo las condiciones optimizadas. Si bien la conductividad de la solución electrolítica se vio comprometida por la adición de ACN a la misma, se logró obtener una sensibilidad ligeramente superior en comparación con el método de DPV por adsorción directa. Esto se atribuye a que la AD *i-t* genera una menor contribución de la corriente de fondo, si se compara con las técnicas electroanalíticas que implican un barrido de potencial⁵. Con el nivel de sensibilidad obtenido se alcanzó un LOD de $0,516 \text{ mg L}^{-1}$, el cual fue estimado a partir de la ecuación

14 descrita en la sección experimental. En la tabla 17 se resumen los parámetros analíticos obtenidos para la AD i-t con BP-MWCNT/PS-SPE.

Tabla 17. Parámetros analíticos para el método por AD i-t con BP-MWCNT/PS-SPE.

Parámetro	Valor
Potencial de medida (V)	-0,500
LOD (mg L ⁻¹)	0,516
LOQ (mg L ⁻¹)	1,511
Rango de trabajo (mg L ⁻¹)	1,511-7,556
Sensibilidad (μA mg ⁻¹ L cm ⁻²)	3,415
R ²	0,995

Es importante mencionar que a pesar que la AD i-t es una técnica que permite alcanzar LOD más bajos en comparación con las técnicas que usan un barrido de potencial, resulta un desafío utilizarla con el sistema de medición BIAS para detectar a la DNC, debido a los problemas de solubilidad que presenta esta última en la solución electrolítica. Como se mencionó en la etapa de optimización, la solubilidad de la DNC en la solución electrolítica se mejoró agregando ACN a esta última, sin embargo, la celda BIAS utilizada presentó una compatibilidad limitada con este solvente. Esto se evidenció a través del desgaste progresivo que experimentó la celda BIAS al emplear la mezcla de BRB: ACN (60:40 v/v) como solución electrolítica. De esto se puede argumentar que la celda BIAS construida con plástico ABS tiene una capacidad limitada para analizar compuestos orgánicos poco solubles en medio acuoso. Una desventaja importante que tiene la AD i-t es la sensibilidad a interferentes, como el oxígeno en la solución electrolítica, impurezas de la muestra o subproductos de la reacción electroquímica, que conllevan a la pasivación o inactivación de la superficie del electrodo^{137,138}. En la literatura se ha informado que la detección catódica de especies reducibles se ve obstaculizada por la presencia de trazas de oxígeno en la solución electroanalítica⁵. Desafortunadamente la DNC no puede ser electro-oxidada para evitar las interferencias que podría ocasionar el oxígeno, por lo que la reducción de la misma fue necesaria para generar la señal analítica empleada en el desarrollo de este método amperométrico. Todos estos inconvenientes antes mencionados podrían explicar la linealidad limitada que se obtuvo en un corto rango de concentraciones, y la falta de precisión en el

calibrado del método. Finalmente, en base a los resultados obtenidos para la validación de cada método electroanalítico, se consideró a la DPV con funcionalización por adsorción directa, como el método más recomendable para llevar a cabo el análisis de NCZ en forma farmacéutica y en tejido muscular de pollo, debido a su buena precisión que permite entregar resultados confiables, además de su rapidez y sencillez para llevar a cabo un análisis. Asimismo, en este tipo de metodología el oxígeno no interfiere, por lo que el purgado de la solución electrolítica es innecesario. Esto reduce considerablemente el tiempo del análisis y elimina la necesidad de equipos de purificación de gas inerte. En la tabla 18 se muestran las cifras de mérito de los métodos electroanalíticos desarrollados por otros autores para la determinación de NCZ.

Tabla 18. Comparación de las cifras de mérito de diferentes métodos electroanalíticos publicados para la determinación de NCZ.

Elemento de detección	Técnica	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Rango lineal (mg L ⁻¹)	Sensibilidad (μA mg ⁻¹ L cm ⁻²)	Ref
GCE modificado con BP-MWCNT/PS	DA	0,78	2,01	2,01–15,11	3,07	Este trabajo
	DPV IA	1,59	5,00	5,00–10,00	4,91	
SPE modificado con BP-MWCNT/PS	AD i-t	0,52	1,51	1,51–7,56	3,42	Este trabajo
SPE modificado con cubos de azul de Prusia	AD i-t	0,02	-	0,04–462,43	9,42	[76]
Detector electroquímico/HPLC	AD i-t	0,10–0,20	-	-	-	[77]
DME	OSWV	1,00	-	0–10	0,02 (μA mg ⁻¹ L)	[75]
DME, detector electroquímico/HPLC	DPP y AD i-t	0,05; 0,001	-	-	-	[74]
DME	DPP	0,02	0,10	-	-	[73]
DME	DPP	0,20–0,30	2,00	-	-	[72]

* DME: electrodo de gota de mercurio, DA: adsorción directa, IA: adsorción indirecta, OSWV: voltametría de onda cuadrada de Osteryoung, DPP: polarografía de pulso diferencial

4.6 Validación de un método HPLC-DAD

En esta tesis se propone utilizar un método HPLC-DAD, que sirva como referencia para comparar los resultados obtenidos por el método electroanalítico

desarrollado, debido a su alta sensibilidad y reproducibilidad para determinar anticoccidiales en diferentes matrices⁵⁴. Las condiciones de operación para el sistema cromatográfico se indican en la sección experimental.

4.6.1 Adecuación del sistema HPLC

Las pruebas de adecuación se realizaron con la intención de evaluar y verificar el rendimiento y la idoneidad del sistema cromatográfico. Los parámetros de desempeño se determinaron para el pico cromatográfico de un estándar de DNC (figura 37), donde en la tabla 19 se resumen los resultados obtenidos.

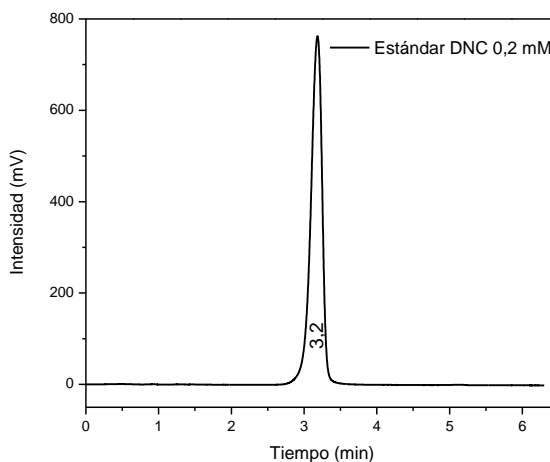


Figura 37. Cromatograma líquido de un estándar de DNC a una concentración de 0,2 mM.

El tiempo de retención (t_r) presentó variaciones en los días de estudio como era de esperarse, lo cual se puede atribuir a los posibles errores introducidos al preparar la fase móvil, así como los asociados por el material volumétrico utilizado. Otro factor que podría tener un impacto en la variación de los t_r son los errores asociados al proceso de integración del pico cromatográfico, y a la variabilidad instrumental que pueda presentar el equipo HPLC en sus componentes. Para minimizar la variación en los t_r se mantuvo de forma controlada las condiciones del método cromatográfico, y antes de realizar los respectivos análisis se hicieron lavados en la columna con agua Milli-Q y ACN, con la intención de remover los posibles contaminantes o impurezas que puedan alterar los resultados. Además, se ha establecido una ventana de tiempo de retención (RTW) para

compensar los cambios menores en los tr absolutos, la cual se define como el promedio de los tr \pm 3 desviaciones estándar de los tr para las medidas realizadas¹³⁹. A partir de esta relación se obtuvo una RTW desde 2,95 a 3,57 min, que permitirá identificar y cuantificar a la DNC de manera precisa y confiable. En todos los días de estudio el valor de RSD obtenido para los tr se mantuvo por debajo del 1 %, cumpliendo de esta forma con los criterios de aceptación establecidos en la literatura¹³⁵.

Tabla 19. Parámetros de desempeño del sistema HPLC obtenidos para un estándar de DNC a una concentración de 0,2 mM.

Día n = 5 c/día	Tiempo de retención (min)		Área de pico (AU)		Altura de pico (mV)		NTP	As
	Promedio	RSD, %	Promedio	RSD, %	Promedio	RSD, %		
1	3,29 \pm 0,01	0,21	8,27 \pm 0,06	0,74	701 \pm 5	0,65	2066 \pm 39	0,77 \pm 0,01
2	3,27 \pm 0,01	0,30	8,19 \pm 0,10	1,26	695 \pm 6	0,80	2017 \pm 38	0,78 \pm 0,01
3	3,36 \pm 0,01	0,26	8,49 \pm 0,09	1,01	716 \pm 3	0,44	2039 \pm 48	0,77 \pm 0,01
4	3,29 \pm 0,01	0,21	8,19 \pm 0,13	1,54	706 \pm 4	0,57	2063 \pm 60	0,79 \pm 0,01
5	3,08 \pm 0,02	0,56	8,53 \pm 0,14	1,65	777 \pm 7	0,95	2078 \pm 75	0,79 \pm 0,01
Total	3,26 \pm 0,10		8,34 \pm 0,16		719 \pm 33			

La repetibilidad y reproducibilidad del método se determinaron para el área del pico cromatográfico y se expresó en términos de RSD. Se obtuvieron valores de 0,7 % y 1,9 % respectivamente, lo cual está de acuerdo con los criterios de aceptación sugeridos en la literatura^{135,140}, indicando que el sistema HPLC seleccionado es adecuado para su uso. La adecuación del sistema HPLC se confirmó con los resultados obtenidos para la altura del pico cromatográfico, el NTP y el As. En este caso se observa que el RSD para la altura del pico cromatográfico se mantiene por debajo del 1 %, el NTP es superior a 2000 y el As es menor a 2, lo que está en concordancia con los criterios de aceptación para la validación de métodos analíticos¹³⁵.

4.6.2 Linealidad

La linealidad del método se comprobó a partir de una solución estándar de DNC, en seis niveles de concentración que oscilan entre 0,12 y 59,36 mg L⁻¹. El análisis de regresión lineal para el área de pico frente a la concentración demostró una buena linealidad, que obedece a la siguiente ecuación: $Y = 5,9998 + 131,25X$ con $R^2 = 0,9997$. En la figura 38 se muestra la regresión lineal obtenida para este estudio, donde se puede observar un bajo valor en la intersección con el eje Y, que solo difiere un poco de cero. Además el valor obtenido para el coeficiente de determinación cumple con los criterios de aceptación ($R^2 \geq 0,999$ ¹³⁶), y la RSD para los factores de respuesta de cada nivel de concentración es menor al 5 %¹⁴¹. Adicionalmente se calculó el valor de t para el coeficiente de correlación. En este contexto se cumple que el t_r es mayor que el t crítico (108,45 > 2,78), lo que demuestra que el método en estudio tiene un alto grado de linealidad.

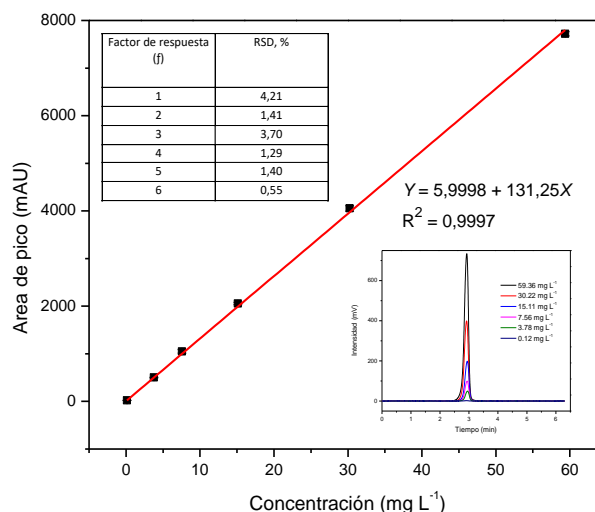


Figura 38. Estudio de linealidad para el método HPLC usando un estándar de DNC en un rango de 0,12 a 59,36 mg L⁻¹.

4.6.3 Sensibilidad, rango, LOD y LOQ

Sobre la base de la linealidad evaluada, se ha construido una curva de calibración externa para el método HPLC, en una región de baja concentración de DNC (0,12 a 9,02

mg L⁻¹). En la figura 39 se muestra el modelo de regresión lineal obtenido para la curva de calibración, el cual se ajusta a la siguiente ecuación: $Y = 6,9819 + 130,13X$ con $R^2 = 0,9996$. La precisión para cada nivel de concentración se encuentra por debajo del 3 % en términos de RSD, lo cual cumple con los criterios de aceptación establecidos en la literatura¹³⁵, para garantizar que las mediciones realizadas sean confiables dentro del rango de trabajo especificado. Sin embargo, la precisión del método se ve afectada cuando se utilizan concentraciones por debajo de 0,1 mg L⁻¹, manifestándose en valores de RSD superiores al 5 %. Por esta razón, se ha establecido el primer nivel de concentración del rango de trabajo como el LOQ. El LOD fue estimado mediante la ecuación 15 descrita en la sección experimental. En la tabla 20 se resumen los parámetros analíticos del método HPLC.

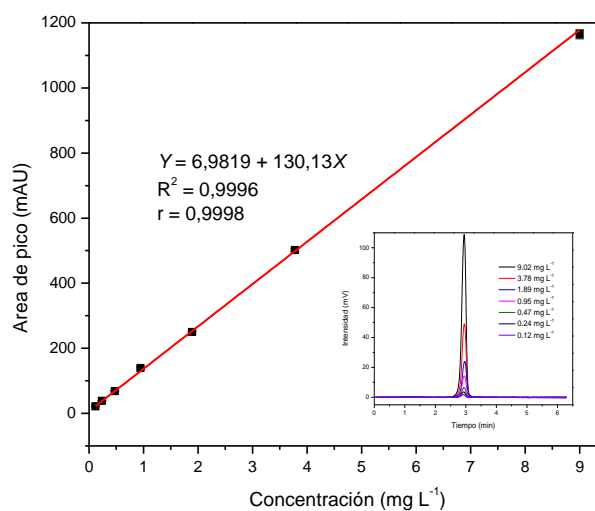


Figura 39. Curva de calibrado externa para el método HPLC usando un estándar de DNC en un rango de 0,12 a 9,02 mg L⁻¹.

Tabla 20. Parámetros analíticos para el método HPLC-DAD.

Parámetro	Valor
LOD (mg L ⁻¹)	0,036
LOQ (mg L ⁻¹)	0,118
Rango de trabajo (mg L ⁻¹)	0,118 – 9,021
Sensibilidad (mAU mg ⁻¹ L)	130,13
R ²	0,9996

4.7 Estudios de recuperación con NCZ

La exactitud del método electroanalítico seleccionado se evaluó mediante el porcentaje de recuperación, utilizando NCZ en forma farmacéutica. Este producto utilizado contiene un 25 % de NCZ (mezcla equimolar de DNC y HDP) y glucosa como excipiente. Se tenía la hipótesis de que los grupos imina presentes en la molécula de la HDP experimentarían reducción al llevar a cabo un barrido de potencial catódico, y que esto representaría una interferencia con la señal de reducción de la DNC. Para verificar esta suposición se registró una CV de una solución de NCZ de concentración $0,12 \text{ mg L}^{-1}$, a pH 5 (BRB $0,1 \text{ M}$) y $0,1 \text{ V s}^{-1}$ (figura 40). El voltamograma obtenido exhibió las mismas señales producidas por el estándar puro de DNC, lo que revela que el sensor BP-MWCNT/PS-GCE usado con el método electroanalítico es selectivo a la detección de la DNC en su forma farmacéutica. Por otro lado, no se observó una señal de oxidación por parte de los grupos hidroxilos de la glucosa, sin embargo, la muestra fue filtrada para evitar los posibles efectos de pasivación que pueda producir el excipiente.

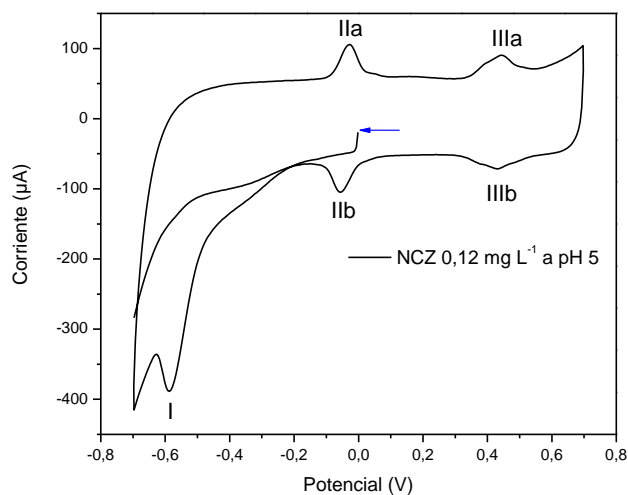


Figura 40: CV para una solución de NCZ ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$) a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ y pH 5 en BRB ($0,1 \text{ M}$).

Para llevar a cabo el estudio de recuperación, se analizaron un total de 9 muestras de NCZ distribuidas en tres días. Las muestras fueron fortificadas con un estándar de DNC a tres niveles de concentración como se indicó en la sección

experimental, con la intención de llevar a cabo su cuantificación por el método de adición de estándar. Las muestras se analizaron por el método HPLC-DAD para comparar los resultados del método electroanalítico. En la figura 41 se muestra una curva de adición de estándar para cada método empleado. Es importante mencionar que durante la corrida cromatográfica no se observó ningún tipo de interferencia por parte de alguno de los componentes de la NCZ en la RTW establecida para la DNC, lo que revela la especificidad de este método bajo las condiciones experimentales establecidas.

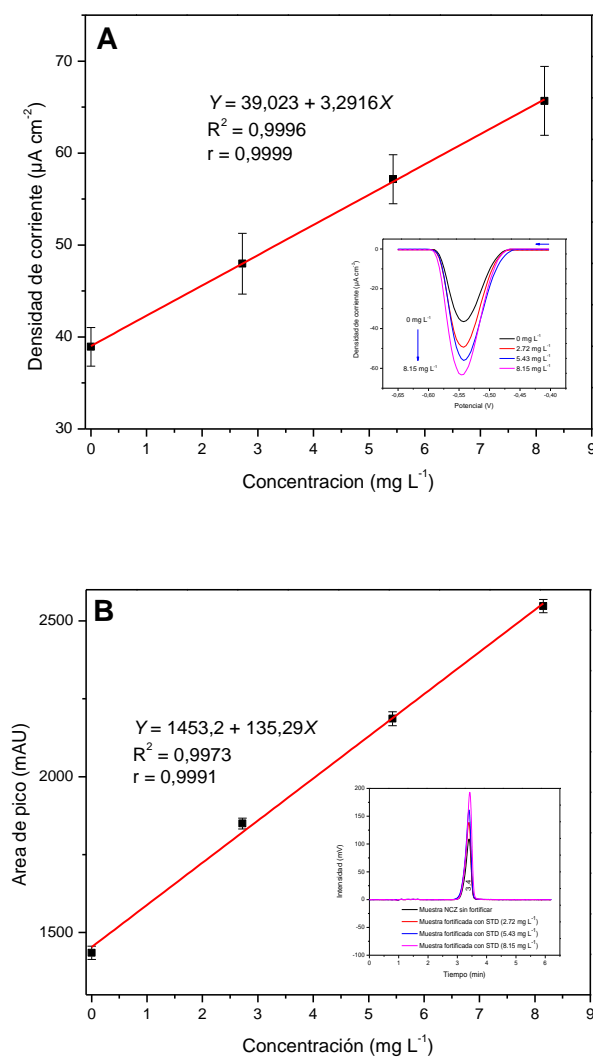


Figura 41. Curvas de adición de estándar para la determinación de NCZ mediante el (A) método electroanalítico por DPV (B) y por el método de HPLC-DAD. La concentración de la muestra fue extrapolada en el eje x negativo.

La recuperación fue calculada en relación a la concentración de la porción tomada de NCZ, la cual está basada en la cantidad declarada en el producto terminado. Los resultados obtenidos por ambos métodos se muestran en la tabla 21. El método electroanalítico por DPV presentó buenas recuperaciones que oscilaron entre 99,8 a 110,8 % para el estudio intradía, y entre 88,9 a 113,0 % para el estudio interdía. En el caso del método HPLC-DAD se obtuvieron recuperaciones que oscilaron entre 97,7 a 101,7 % para el estudio intradía, y entre 96,2 a 106,0 % para el estudio interdía. Los resultados de recuperación promedio estuvieron acorde con los criterios de aceptación establecidos en el manual de procedimientos del codex alimentarius¹⁴⁰ (80 - 110%). La exactitud de cada método fue confirmada aplicando una prueba t de Student para el estudio intradía e interdía, a través de la ecuación 17 descrita en la sección de metodología. Los valores de t_{rec} obtenidos con el método electroanalítico por DPV fueron de 1,20 y 0,05, respectivamente, mientras que para el método HPLC-DAD se encontraron valores de 0,08 y 0,14, respectivamente. Todos estos valores son inferiores al $t_{crítico}$ (4,30), demostrando que no existe diferencia significativa entre la recuperación promedio y el valor esperado, por lo que la exactitud alcanzada por cada método es aceptable. El análisis de precisión se realizó a partir de los valores obtenidos de RSD, los cuales se encuentran dentro de los criterios de aceptación establecidos en la literatura^{142,143}, lo que demuestra que ambos métodos tienen un buen desempeño para determinar NCZ en su forma farmacéutica con un nivel de precisión aceptable. Finalmente, los resultados obtenidos con el método electroanalítico por DPV se compararon con el método de referencia HPLC-DAD a través de una prueba t de Student, la cual se resume en la tabla 22. En esta prueba se puede evidenciar que tanto para el estudio intradía como interdía no existe una diferencia estadísticamente significativa, de lo que se puede inferir que los resultados entregados por el método electroanalítico desarrollado con DPV son consistentes y comparables con el método de referencia seleccionado, garantizando de esta forma su fiabilidad.

Tabla 21. Porcentaje de recuperación para NCZ en forma farmacéutica utilizando el método electroanalítico por DPV y su comparación con un método de referencia HPLC-DAD.

		Método electroanalítico por DPV			Método HPLC-DAD		
Día de corrida	Replica	Recuperación, %	Recuperación promedio, %	RSD, %	Recuperación, %	Recuperación promedio, %	RSD, %
Intradía (n = 3)	Muestra 1	110,8			100,4		
	Muestra 2	101,3	104,0 ± 6,0	5,8	97,7	99,9 ± 2,0	2,0
	Muestra 3	99,8			101,7		
Interdía (n = 9)	Muestra 1	110,8			100,4		
	Muestra 2	101,3			97,7		
	Muestra 3	99,8			101,7		
	Muestra 4	98,3			106,0		
	Muestra 5	113,0	100,2 ± 7,9	7,9	96,2	100,3 ± 3,4	3,4
	Muestra 6	91,1			104,7		
	Muestra 7	88,9			96,3		
	Muestra 8	98,6			100,0		
	Muestra 9	100,1			99,6		

Tabla 22. Comparación del método electroanalítico por DPV con el método de referencia HPLC-DAD en el estudio de recuperación.

	<i>Intradía</i>	<i>Interdía</i>
Estadístico t	1,12	0,02
Grados de libertad	2	11
P(T<=t) dos colas	0,38	0,99
Valor crítico de t (dos colas)	4,30	2,20

* Se consideró un 95 % de nivel de confianza y varianzas desiguales.

4.8 Aplicación del método electroanalítico desarrollado por DPV

El método se aplicó en la detección y cuantificación de la DNC en tejido muscular de pollo. Esto debido a que la DNC es el único residuo marcador que queda de la NCZ después de su administración⁵⁴. En este sentido se utilizó una matriz de músculo de pollo certificada, con el objetivo de garantizar su trazabilidad. Basado en el LOQ del método, se decidió enriquecer la matriz en estudio con un estándar de DNC a las siguientes concentraciones: 3000, 5000 y 7000 µg/kg. Se prepararon tres muestras para cada nivel enriquecido y un blanco, las cuales fueron incubadas y posteriormente se sometieron a un proceso de extracción con solvente, como se indica en la sección experimental. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de adición de estándar, para compensar las interferencias causadas por la matriz de la muestra original. En la figura 42 se observa un cromatograma para el análisis del blanco junto a una muestra enriquecida a 3000 µg/kg. El blanco no registró ninguna señal para la DNC en la RTW establecida en el método HPLC-DAD. En la tabla 23 se resumen los datos de regresión obtenidos para las curvas de calibración a diferentes niveles de enriquecimiento. Para evaluar el efecto matriz se realizó un análisis comparativo entre la pendiente de la curva de calibración externa del método, y la curva de calibración obtenida para cada nivel enriquecido. Cuando el músculo de pollo fue enriquecido a una concentración de 3000 µg/kg, se evidenció una disminución hasta un 46,5 % en la pendiente de la curva de calibración usando el método electroanalítico por DPV, lo cual sugiere un efecto matriz significativo causado por los componentes endógenos del músculo de pollo, que producen una supresión en la señal electroquímica detectada. Esta situación conlleva a no utilizar la estrategia de renovación de la superficie del electrodo; en su lugar se decidió

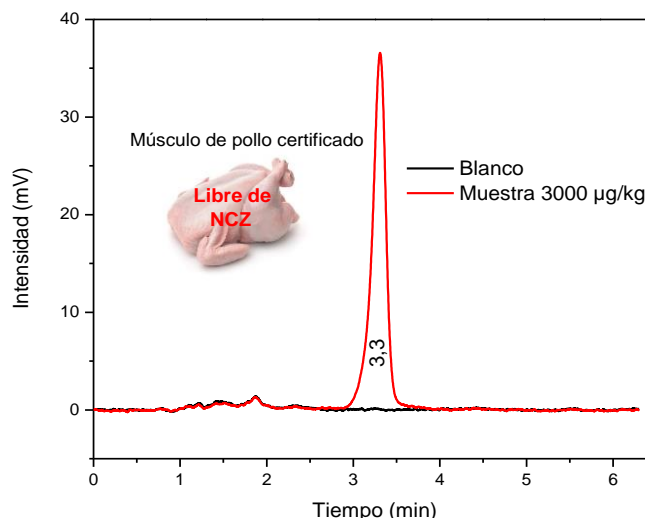


Figura 42. Cromatograma líquido para una muestra de DNC en tejido muscular de pollo enriquecido a una concentración de 3000 µg/kg y su correspondiente blanco.

emplear un electrodo modificado para registrar solamente una medida. Por otro lado, se logra evidenciar que el efecto matriz disminuye a medida que se aumenta la concentración de la DNC en el músculo de pollo, como se observa a concentraciones de 5000 y 7000 µg/kg. El método HPLC-DAD se vio menos afectado por las interferencias del músculo de pollo utilizado, donde se observó una disminución hasta un 5,5 % en la pendiente de la curva de calibración, lo cual sugiere un leve efecto matriz para esta técnica, y está en concordancia con los resultados reportados en el trabajo de Coleman *et al*¹⁴⁴.

Tabla 23. Análisis de regresión de las curvas de calibración para una matriz certificada de músculo de pollo enriquecida a 3000, 5000 y 7000 µg/kg.

Enriquecido (µg/kg)	Método electroanalítico por DPV			Método HPLC-DAD		
	Pendiente	Intercepto	R ²	Pendiente	Intercepto	R ²
3000	1,6412	4,8702	0,9957	124,30	398,67	0,9995
5000	1,9844	9,9870	0,9944	125,47	662,98	0,9998
7000	2,0196	14,153	0,9993	123,01	824,74	0,9972

Tabla 24. Cuantificación de DNC desde una matriz certificada de músculo de pollo enriquecida a 3000, 5000 y 7000 µg/kg.

Enriquecido (µg/kg)	N° de muestra	Método electroanalítico por DPV			Método HPLC-DAD		
		Cantidad encontrada (µg/kg)	Cantidad encontrada promedio (µg/kg)	RSD, %	Cantidad encontrada (µg/kg)	Cantidad encontrada promedio (µg/kg)	RSD, %
Carne fresca	1	0	0	-	0	0	-
3000	1	701			787		
	2	729	743 ± 50	6,7	796	802 ± 19	2,4
	3	799			823		
5000	1	1247			1370		
	2	1140	1262 ± 129	10,3	1321	1322 ± 48	3,6
	3	1398			1275		
7000	1	1645			1648		
	2	1743	1754 ± 116	6,6	1743	1678 ± 56	3,3
	3	1876			1643		

En la tabla 24 se muestran los resultados del estudio de cuantificación en una matriz certificada de músculo de pollo, la cual fue enriquecida con la DNC a distintos niveles de concentración. Para ambos métodos se pudo cuantificar satisfactoriamente la DNC, sin embargo, vale la pena mencionar que debido a la complejidad de la matriz utilizada, se podría incluir una etapa de limpieza en el tratamiento de la muestra, con la intención de mejorar la recuperación analítica de ambos métodos¹⁴⁵. Los valores de RSD obtenidos cumplen con la normativa recomendada por la FDA¹⁴⁶ (RSD ≤ 10%) en la evaluación de residuos de medicamentos veterinarios a concentraciones superiores a 0,1 mg L⁻¹. Por otra parte, las cantidades encontradas de DNC en el tejido muscular de pollo se alinean a los LMR establecidos por la EFSA⁵⁷, lo que demuestra que el método electroanalítico por DPV desarrollado en esta tesis representa una herramienta útil para la identificación y cuantificación de residuos de NCZ en pollos de engorde. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante el método electroanalítico por DPV con el método de referencia HPLC-DAD, como se puede observar en la tabla 25.

Tabla 25. Comparación del método electroanalítico por DPV con el método de referencia HPLC-DAD en la cuantificación de DNC en tejido muscular de pollo.

Enriquecido ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	3000	5000	7000
Estadístico t	1,91	0,76	1,03
Grados de libertad	3	3	3
P(T \leq t) dos colas	0,15	0,50	0,38
Valor crítico de t (dos colas)	3,18	3,18	3,18

* Se consideró un 95 % de nivel de confianza y varianzas desiguales.

5. CONCLUSIONES

- Las películas de tipo BP utilizadas en esta tesis resultaron ser un material económico, estable y fácil de preparar, a partir de dispersiones de MWCNT con una pequeña cantidad de PS en 1,3-dioxolano, las cuales permitieron modificar satisfactoriamente la superficie de un electrodo comercial (GCE o SPE), para construir un sensor electroquímico que sea útil en la detección y cuantificación de la DNC.
- La plataforma nanoestructurada de BP-MWCNT/PS se mostró como una superficie altamente porosa, hidrófoba y conductora, que tiene la habilidad de adsorber en sus intersticios a la DNC para llevar a cabo su detección electroquímica en medio acuoso, además de mejorar la respuesta de corriente en un orden de magnitud con respecto a un electrodo sin modificación, lo que ofrece perspectivas valiosas para validar un método electroanalítico sensible y reproducible.
- La CV resultó ser una técnica de vital importancia en el estudio del comportamiento electroquímico de la DNC, debido a que proporcionó una comprensión más profunda de las propiedades electroquímicas de dicho compuesto, y permitió establecer las condiciones básicas para desarrollar un método electroanalítico. Mediante los estudios realizados por CV se ha establecido que la DNC presenta un comportamiento electroquímico complejo, donde se evidenciaron múltiples picos, los cuales representan la generación de diferentes especies superficiales mediante procesos de oxidación y reducción. Dentro de esas especies superficiales han destacado los pares redox: $\text{ArNO}/\text{ArNHOH}$ y $\text{ArN}_2\text{OAr}/\text{ArN}_2\text{Ar}$. Se comprobó que la velocidad de barrido tiene una marcada influencia en el mecanismo de reacción que experimenta la DNC, y que todas las especies superficiales electrogeneradas son dependientes de un mecanismo controlado por protones. Además, se logró evidenciar que un medio de reacción ácido favorece la reducción de la DNC a un derivado de hidroxilamina, produciendo un aumento en la respuesta de corriente.
- La DPV se ha revelado como una técnica sensible para la determinación analítica de la DNC, que permitió validar un método electroanalítico utilizando el sensor

BP-MWCNT/PS-GCE, el cual se funcionalizó con la DNC por estrategias de adsorción directa e indirecta. La funcionalización por adsorción directa resultó ser una metodología más práctica y eficaz, que permite obtener resultados más reproducibles con una pequeña cantidad de muestra. Por otro lado, la funcionalización por adsorción indirecta se mostró como una metodología más laboriosa, que requiere de una mayor cantidad de muestra para llevar a cabo el análisis, además de un tiempo de acumulación para lograr una sensibilidad adecuada que permita la calibración del método electroanalítico. El sensor BP-MWCNT/PS-GCE acoplado a la técnica de DPV demostró ser atractivo en comparación con otros sensores, debido a la capacidad de realizar múltiples análisis en tiempo corto a través de la renovación de la superficie del electrodo, además de presentar un buen nivel de precisión. Se obtuvieron mejores cifras de mérito cuando se utilizó la funcionalización por adsorción directa, las cuales permiten que este método sea aplicado no solo en el análisis de NCZ en su forma farmacéutica, sino en la determinación de residuos de NCZ en tejido muscular de pollo.

- La AD i-t en el sistema de medición BIAS acoplado al sensor BP-MWCNT/PS-SPE, representó una técnica más sensible pero menos selectiva en comparación con la DPV, debido a las interferencias causadas por el oxígeno presente en la solución electrolítica. La desaireación de la solución electrolítica requiere de mucho tiempo, lo cual hace que el análisis por AD i-t sea más laborioso. La insolubilidad de la DNC en la solución electrolítica conllevó a un proceso de optimización exhaustivo para establecer las condiciones experimentales más adecuadas para la validación del método. Finalmente, el método con AD i-t se logró validar, y se obtuvieron buenos LOD y LOQ, no obstante, la celda de medición BIAS construida de plástico ABS no se recomienda para el análisis de compuestos insolubles en agua, debido a que demanda el uso de solventes orgánicos que producen un desgaste progresivo en la misma.
- El método HPLC-DAD propuesto en esta tesis cumplió con las pruebas de adecuación o idoneidad del sistema, y generó buenas cifras de mérito en el protocolo de validación, que permitieron que sea utilizado como método de

referencia para comparar los resultados obtenidos a partir del método electroanalítico por DPV.

- El método electroanalítico por DPV acoplado al sensor BP-MWCNT/PS-GCE, y utilizando la metodología de funcionalización por adsorción directa, fue aplicado satisfactoriamente en el análisis de NCZ en forma farmacéutica, donde se alcanzaron buenos porcentajes de recuperación con un nivel de precisión aceptable. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas con el método de referencia HPLC-DAD.
- Finalmente, el método electroanalítico por DPV se consideró como la mejor alternativa para el análisis de residuos de NCZ en tejido muscular de pollo. Esto debido a su sencillez y rapidez para llevar a cabo un análisis, además de entregar resultados con un buen nivel de precisión y exactitud. El método demostró ser sensible y selectivo a la DNC en la matriz utilizada, lo que permitió su detección y cuantificación hasta un nivel de concentración de 701 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Este hallazgo confirma que el método electroanalítico desarrollado por DPV cumple con la normativa propuesta por la EFSA, para los LMR permitidos en tejidos comestibles de pollo. De modo que el método desarrollado representa una estrategia sistemática eficaz, que puede ser incorporada en gestión de calidad o en el análisis de rutina como una técnica analítica alternativa a los métodos convencionales, la cual se destaca por no tener un impacto negativo hacia el medio ambiente.

6. REFERENCIAS

- [1] Minter, S.D. (2018). Advances in electroanalytical chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 140(8), 2701-2703.
- [2] Majeed, S., Naqvi, S.T.R., ul Haq, M.N., Ashiq, M.N. (2022). Electroanalytical techniques in biosciences: conductometry, coulometry, voltammetry, and electrochemical sensors. *Analytical Techniques in Biosciences* (pp. 157-178). Academic Press.
- [3] Wang, J. (1988). *Electroanalytical techniques in clinical chemistry and laboratory medicine*. John Wiley & Sons.
- [4] Brett, C.M. (1999). Electroanalytical techniques for the future: the challenges of miniaturization and of real-time measurements. *Electroanalysis*, 11(14), 1013-1016.
- [5] Wang, J. (2000). *Analytical electrochemistry*. Second edition. Wiley–VCH.
- [6] McCreery, R.L (2008). Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chemical Reviews*, 108(7), 2646–2687.
- [7] Ferrari, A.G.M., Elbardisy, H.M., Silva, V., Belal, T.S., Talaat, W., Daabees, H.G., Brownson, D.A. (2020). The influence of lateral flake size in graphene/graphite paste electrodes: an electroanalytical investigation. *Analytical Methods*, 12(16), 2133-2142.
- [8] Girousi, S., Stanic, Z. (2011). The last decade of carbon paste electrodes in DNA electrochemistry. *Current Analytical Chemistry*, 7(1), 80-100.
- [9] Radhi, M.M., Albakry, A.A.A., Jassim, A.M., Alassady, S.A., Al-Mulla, E.A.J. (2016). Electrochemical study of Pb (II) in present of each ascorbic acid, glucose, urea and uric acid using blood medium as an electrolyte. *Nano Biomedicine and Engineering*, 8(1), 9-15.
- [10] Ferrari, A.G.M., Rowley-Neale, S.J., Banks, C.E. (2021). Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field. *Talanta Open*, 3, 100032.
- [11] Pérez-Fernández, B., Costa-García, A., Muñoz, A.D.L.E. (2020). Electrochemical (bio) sensors for pesticides detection using screen-printed electrodes. *Biosensors*, 10(4), 32.
- [12] Piedras, J., Dominguez, R.B., Gutiérrez, J.M. (2021). Determination of uric acid in artificial saliva with compact AMP3291 reader and Au nanoparticles modified electrode. *Chemosensors*, 9(4), 73.
- [13] dos Santos, W.T., Compton, R.G. (2019). A simple method to detect the stimulant modafinil in authentic saliva using a carbon-nanotube screen-printed electrode with adsorptive stripping voltammetry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 285, 137-144.
- [14] Wang, J., Taha, Z. (1991). Batch injection analysis. *Analytical chemistry*, 63(10), 1053-1056.
- [15] Tormin, T.F., Gimenes, D.T., Richter, E.M., Muñoz, R.A.A. (2011). Fast and direct determination of butylated hydroxyanisole in biodiesel by batch injection analysis with amperometric detection. *Talanta*, 85(3), 1274-1278.
- [16] Simões, F.R., Xavier, M.G. (2017). Electrochemical sensors. *Nanoscience and its Applications*, 1, 155-178.
- [17] Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, 34(5), 635-659.

- [18] Mazzaracchio, V., Tomei, M.R., Cacciotti, I., Chiodoni, A., Novara, C., Castellino, M., Arduini, F. (2019). Inside the different types of carbon black as nanomodifiers for screen-printed electrodes. *Electrochimica Acta*, 317, 673-683.
- [19] Holzinger, M., Le Goff, A., Cosnier, S. (2017). Synergetic effects of combined nanomaterials for biosensing applications. *Sensors*, 17(5), 1010.
- [20] García-Miranda Ferrari, A., Rowley-Neale, S.J., Banks, C.E. (2021). Recent advances in 2D hexagonal boron nitride (2D-hBN) applied as the basis of electrochemical sensing platforms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 663-672.
- [21] Lu, Y., Liang, X., Niyungeko, C., Zhou, J., Xu, J., Tian, G. (2018). A review of the identification and detection of heavy metal ions in the environment by voltammetry. *Talanta*, 178, 324-338.
- [22] Bard, A.J. (1983). Chemical modification of electrodes. *Journal of Chemical Education*, 60 (4), 302.
- [23] Iijima, S. (2002). Carbon nanotubes: past, present, and future. *Physica B: Condensed Matter*, 323(1-4), 1-5.
- [24] Ajayan, P.M. (1999). Nanotubes from carbon. *Chemical Reviews*, 99(7), 1787–1799.
- [25] Wang, J. (2008). Electrochemical Glucose Biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 814-825.
- [26] Zhou, M., Guo, S. (2015). Electrocatalytic Interface Based on Novel Carbon Nanomaterials for Advanced Electrochemical Sensors. *ChemCatChem*, 7(18), 2744-2764.
- [27] Wildgoose, G., Banks, C., Leventis, H., Compton, R. (2005). Chemically Modified Carbon Nanotubes for Use in Electroanalysis. *Microchimica Acta*, 152(3-4), 187-214.
- [28] Vidu, R., Rahman, M., Mahmoudi, M., Enachescu, M., Poteca, TD., Opris, I. (2014). Nanostructures: a platform for brain repair and augmentation. *Frontiers in systems neuroscience*, 8, 91.
- [29] Ko, W.Y., Su, J.W., Lin, K.J. (2011). Sonophysically Exfoliated Individual Multi-Walled Carbon Nanotubes in Water Solution and Their Straightforward Route to Flexible Transparent Conductive Films. *Carbon Nanotubes Applications on Electron Devices*.
- [30] Hussein, L., Feng, Y.J., Alonso-Vante, N., Urban, G., Krüger, M. (2011). Functionalized-carbon nanotube supported electrocatalysts and buckypaper-based biocathodes for glucose fuel cell applications. *Electrochimica Acta*, 56(22), 7659-7665.
- [31] Bahr, J.L., Yang, J., Kosynkin, D.V., Bronikowski, M.J., Smalley, R.E., Tour, J.M. (2001). Functionalization of carbon nanotubes by electrochemical reduction of aryl diazonium salts: A bucky paper electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 6536–6542.
- [32] Moscoso, R., Carbajo, J., Squella, J. (2014). 1, 3-Dioxolane: A green solvent for the preparation of carbon nanotube-modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, 48, 69-72.
- [33] Dorim, A.C.Â., Aleixo, H., de Souza Barcellos, E., Okumura, L.L. (2015). Influence of the Solvent on the “Casting” Methodology for MWCNT-Modified Glassy Carbon and Platinum Electrodes. *Electroanalysis*, 27(11), 2663-2669.
- [34] Morita, I.M., Araujo, G.M., Codognoto, L., Simões, F.R. (2019). Functionalized multi-walled carbon nanotubes-modified electrode for sensitive determination of Diuron in seawater samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 99(15), 1565-1574.

- [35] Kumar, A.K.S., Zhang, Y., Li, D., Compton, R.G. (2020). A mini-review: How reliable is the drop casting technique?. *Electrochemistry Communications*, 121, 106867.
- [36] Kumar, A.K.S., Lu, Y., Compton, R.G. (2022). Voltammetry of carbon nanotubes and the limitations of particle-modified electrodes: Are carbon nanotubes electrocatalytic?. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 13(37), 8699-8710.
- [37] Smajda, R., Kukovecz, Á., Kónya, Z., Kiricsi, I. (2007). Structure and gas permeability of multi-wall carbon nanotube buckypapers. *Carbon*, 45(6), 1176-1184.
- [38] Kukovecz, Á., Smajda, R., Kónya, Z., Kiricsi, I. (2007). Controlling the pore diameter distribution of multi-wall carbon nanotube buckypapers. *Carbon*, 45(8), 1696-1698.
- [39] Zhu, W., Zheng, J.P., Liang, R., Wang, B., Zhang, C., Au, G., Plichta, E.J. (2010). Ultra-low platinum loading high-performance PEMFCs using buckypaper-supported electrodes. *Electrochemistry Communications*, 12(11), 1654-1657.
- [40] Hussein, L., Rubenwolf, S., Von Stetten, F., Urban, G., Zengerle, R., Krueger, M., Kerzenmacher, S. (2011). A highly efficient buckypaper-based electrode material for mediatorless laccase-catalyzed dioxygen reduction. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(10), 4133-4138.
- [41] Li, C., Thostenson, E.T., Chou, T.W. (2008). Sensors and actuators based on carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites science and technology*, 68(6), 1227-1249.
- [42] Kim, M., Kim, S., Seong, Y.C., Yang, K.H., Choi, H. (2021). Multiwalled carbon nanotube buckypaper/polyacrylonitrile nanofiber composite membranes for electromagnetic interference shielding. *ACS Applied Nano Materials*, 4(1), 729-738.
- [43] Hart, J.P., Crew, A., Crouch, E., Honeychurch, K.C., Pemberton, R.M. (2004). Some recent designs and developments of screen-printed carbon electrochemical sensors/biosensors for biomedical, environmental, and industrial analyses. *Analytical letters*, 37(5), 789-830.
- [44] Moscoso, R., Carbajo, J., Lopez, M., Núñez-Vergara, L.J., Squella, J.A. (2011). A simple derivatization of multiwalled carbon nanotubes with nitroaromatics in aqueous media: Modification with nitroso/hydroxylamine groups. *Electrochemistry Communications*, 13(2), 217-220.
- [45] Teradal, N.L., Tandel, R.D., Seetharamappa, J., Satpati, A.K. (2019). Electrochemical Investigations of Biomolecules Using Carbon Nanotube and Graphene Based Modified Electrodes. *Nanomedicine & Nanotechnology Open Access*. 4.
- [46] Park, H., Zhao, J., Lu, J.P. (2006). Effects of sidewall functionalization on conducting properties of single wall carbon nanotubes. *Nano letters*, 6(5), 916-919.
- [47] Luo, Y., Chen, X., Wu, S., Cao, S., Luo, Z., Shi, Y. (2020). Molecular Dynamics simulation study on two-component solubility parameters of carbon nanotubes and precisely tailoring the thermodynamic compatibility between carbon nanotubes and polymers. *Langmuir*, 36(31), 9291-9305.
- [48] Kholod, Y.A., Muratov, E.N., Gorb, L.G., Hill, F.C., Artemenko, A.G., Kuz'min, V.E., Leszczynski, J. (2009). Application of quantum chemical approximations to environmental problems: prediction of water solubility for nitro compounds. *Environmental science & technology*, 43(24), 9208-9215.
- [49] Rogers, E.F., Brown, R.D., Brown, J.E., Kazazis, D.M., Leanza, W.J., Nichols, J.R., Rodino, T.M. (1983). Nicarbazin complex yields dinitrocarbanilide as ultrafine crystals with improved anticoccidial activity. *Science*, 222(4624), 630-632.

- [50] Chapman, H.D. (2014). Milestones in avian coccidiosis research: a review. *Poultry science*, 93(3), 501-511.
- [51] Yoder C.A., Graham J.K., Miller L.A. (2006). Molecular effects of nicarbazin on Avian reproduction. *Poultry science*, 85, 1285-1293.
- [52] Gutteridge, W.E. (1987). New anti-protozoal agents. *International journal for parasitology*, 17(1), 121-129.
- [53] EFSA (2018). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Coxar® (nicarbazin) for turkeys for fattening. *EFSA Journal*, 16(4):5214, 18 pp.
- [54] Bacila, D.M., Feddern, V., Mafra, L.I., Scheuermann, G.N., Molognoni, L., Daguer, H. (2017). Current research, regulation, risk, analytical methods and monitoring results for nicarbazin in chicken meat: A perspective review. *Food Research International*, 99, 31-40.
- [55] Mead, G. (Ed.). (2004). *Poultry meat processing and quality*. Woodhead Publishing.
- [56] Dorne, J.L.C.M., Fernández-Cruz, M.L., Bertelsen, U., Renshaw, D.W., Peltonen, K., Anadon, A., Fink-Gremmels, J. (2013). Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: animal and human health aspects. *Toxicology and applied pharmacology*, 270(3), 196-208.
- [57] EFSA (2010). Scientific Opinion on the safety and efficacy of Koffogran (nicarbazin) as a feed additive for chickens for fattening. *EFSA Journal*, 8(3), 1551 1–40.
- [58] FAO/WHO (2015). Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods CAC/MRL 2-2015.
- [59] GPO (2012). Title 21 - Food and drugs. Chapter I - Food and drug administration, department of health and human services. Subchapter e - animal drugs, feeds, and related products part 556 - tolerances for residues of new animal drugs in food. Subpart B - Specific Tol.
- [60] MAPA (2015). SDA normative instruction no. 13, from July 15th, 2015. National plan for control of residues and contaminants - PNCRC/2015.
- [61] Salgado-Figueroa, P., Gutiérrez, C., Squella, J.A. (2015). Carbon nanofiber screen printed electrode joined to a flow injection system for nimodipine sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 220, 456-462.
- [62] National Library of Medicine. (s.f.). Data sources ChemIDplus. Recuperado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/ChemIDplus>
- [63] Pemberton, R.M., Amine, A., Hart, J.P. (2004). Voltammetric behavior of chlorophyll a at a screen-printed carbon electrode and its potential role as a biomarker for monitoring fecal contamination. *Analytical letters*, 37(8), 1625-1643.
- [64] Rajakumaran, R., Babulal, S.M., Chen, S.M., Sukanya, R., Karthik, R., Shafi, P.M., Yo-Shiuan, C. (2021). Ingenious design of iron vanadate engulfed 3D porous reduced graphene oxide nanocomposites as a reliable electrocatalyst for the selective amperometric determination of furaladone in aquatic environments. *Applied Surface Science*, 569, 151046.
- [65] Özkan, S.A., Uslu, B., Aboul-Enein, H.Y. (2003). Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. *Critical reviews in analytical chemistry*, 33(3), 155-181.
- [66] Bard, A.J., Faulkner, L.R., White, H.S. (2001). *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.

- [67] Siangproh, W., Leesutthipornchai, W., Dungchai, W., Orawon, C. (2009). Electrochemical Detection for Flow-Based System: A Review Review. *Journal of Flow Injection Analysis*, 26(1), 5.
- [68] Guy, O.J., Walker, K.A.D. (2016). Graphene functionalization for biosensor applications. *Silicon Carbide Biotechnology*, 85-141.
- [69] Kissinger, P., Heineman, W.R. (Eds.). (2018). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, revised and expanded*. CRC press.
- [70] Stefano, J.S., Cordeiro, D.S., Marra, M.C., Richter, E.M., Muñoz, R. A. (2016). Batch-injection versus Flow-injection Analysis Using Screen-printed Electrodes: Determination of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations. *Electroanalysis*, 28(2), 350-357.
- [71] Quintino, M.S., Angnes, L. (2004). Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 16(7), 513-523.
- [72] Michielli, R.F., Downing, G.V. (1974). Differential pulse polarographic determination of nicarbazin in chicken tissue. *Journal of agricultural and food chemistry*, 22(3), 449-452.
- [73] Wood Jr, J.S., Downing, G.V. (1980). Modified pulse polarographic determination of nicarbazin in chicken tissue at the 0.1-ppm level. *Journal of agricultural and food chemistry*, 28(2), 452-454.
- [74] Knupp, G., Bugl-Kreickmann, G., Commichau, C., Schmidt, T., BUNING-PFAUE, H. (1987). Zur Bestimmung des Coccidiostaticums Nicarbazin in tierischem Gewebe und im Ei. I. Nachweis mittels Pulspolarographie und Hochdruckflüssigchromatographie mit elektrochemischer Detektion. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 185(6), 472-476.
- [75] Ellison, D.K., Tait, W. (1988). Osteryoung square-wave voltammetric determination of nicarbazin in chicken tissue. *Talanta*, 35(9), 734-736.
- [76] Akilarasan, M., Kogularasu, S., Chen, S.-M., Govindasamy, M., Chen, T.-W., Ali, M.A., Farah, M.A. (2018). A Green Approach to the Synthesis of Well-structured Prussian Blue Cubes for the Effective Electrocatalytic Reduction of Antiprotozoal Agent Coccidiostat Nicarbazin. *Electroanalysis*, 30(8), 1661–1669.
- [77] Parks, O.W. (1988). Rapid procedure for determination of nicarbazin residues in chicken tissues. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71(4), 778-780.
- [78] Krabel, B.J., Dickson, D.A., Zimmermann, A.G., Coleman, M.R. (2000). Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feeds. *Journal of AOAC International*, 83(5), 1027-1038.
- [79] Brunelle, S.L., LaBudde, R.A., Lombardi, K., Ward, C. (2022). Determination and Identification of Nicarbazin, Measured as 4, 4'-Dinitrocarbanilide (DNC), in Chicken Tissues by Liquid Chromatography With Tandem Mass Spectrometry: Final Action 2013.07. *Journal of AOAC International*, 105(4), 1008-1016.
- [80] McCarney, B., Traynor, I.M., Fodey, T.L., Crooks, S.R.H., Elliott, C.T. (2003). Surface plasmon resonance biosensor screening of poultry liver and eggs for nicarbazin residues. *Analytica Chimica Acta*, 483(1–2), 165–169.
- [81] Hagren, V., Crooks, S.R., Elliott, C.T., Lövgren, T., Tuomola, M. (2004). An all-in-one dry chemistry immunoassay for the screening of coccidiostat nicarbazin in poultry eggs and liver. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(9), 2429-2433.

- [82] Beier, R.C., Stanker, L.H. (2001). An antigen based on molecular modeling resulted in the development of a monoclonal antibody-based immunoassay for the coccidiostat nicarbazin. *Analytica Chimica Acta*, 444(1), 61-67.
- [83] Moscoso, R., Abarca, S., Yáñez, C., Squella, J.A. (2023). MWCNT buckypaper disc films as alternative to the drop casting method to modify electrode surfaces. *Electrochimica Acta*, 443, 141984.
- [84] Zoski, C.G. (Ed.). (2006). *Handbook of electrochemistry*. Elsevier.
- [85] de Jong, J., Tomassen, M., Driessen, J., Keukens, H., Putzka, H.A., Brambilla, G., Collaborators: Antalick, J.P., Biancotto, G., Brambilla, G., Checa-Moreno, R., Cowles, J., Faggionato, E., Felgueiras, I., Haustraete, K., Johanssen, F., Margry, R., Michels, K., Nunes da Costa, J., Putzka, H.A., Schreuder, C., Schwadorf, K., Testa, C., Ubaldi, A., van der Kamp, H., Van Schalm, K. (2004). Liquid chromatographic method for nicarbazin in broiler feeds and premixtures: Development, validation, and interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 87(6), 1269-1277.
- [86] Protasiuk, E., Olejnik, M., Szprengier–Juszkiewicz, T., Jedziniak, P., Zmudzki, J. (2015). Determination of nicarbazin in animal feed by high-performance liquid chromatography with interlaboratory evaluation. *Analytical Letters*, 48(14), 2183-2194.
- [87] Bose, A. (2014). HPLC calibration process parameters in terms of system suitability test. *Austin Chromatography*, 1(2), 1-4.
- [88] Morelli, D.C., Bernardi, G., Morés, L., Pierri, M.E., Carasek, E. (2020). A green-high throughput–extraction method based on hydrophobic natural deep eutectic solvent for the determination of emerging contaminants in water by high performance liquid chromatography–diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1626, 461377.
- [89] Shvartzman-Cohen, R., Nativ-Roth, E., Baskaran, E., Levi-Kalishman, Y., Szeleifer, I., Yerushalmi-Rozen, R. (2004). Selective dispersion of single-walled carbon nanotubes in the presence of polymers: the role of molecular and colloidal length scales. *Journal of the American Chemical Society*, 126(45), 14850-14857.
- [90] Shvartzman-Cohen, R., Levi-Kalishman, Y., Nativ-Roth, E., Yerushalmi-Rozen, R. (2004). Generic approach for dispersing single-walled carbon nanotubes: the strength of a weak interaction. *Langmuir*, 20(15), 6085-6088.
- [91] Grady, B.P. (2012). Effects of carbon nanotubes on polymer physics. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 50(9), 591–623.
- [92] Hill, D.E., Lin, Y., Rao, A.M., Allard, L.F., Sun, Y.-P. (2002). Functionalization of Carbon Nanotubes with Polystyrene. *Macromolecules*, 35(25), 9466–9471.
- [93] Jorio, A., Saito, R. (2021). Raman spectroscopy for carbon nanotube applications. *Journal of Applied Physics*, 129(2), 021102.
- [94] Dresselhaus, M.S., Dresselhaus, G., Saito, R., Jorio, A. (2005). Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Physics reports*, 409(2), 47-99.
- [95] Pimenta, M.A., Hanlon, E.B., Marucci, A., Corio, P., Brown, S.D.M., Empedocles, S.A., Dresselhaus, M.S. (2000). The anomalous dispersion of the disorder-induced and the second-order Raman bands in carbon nanotubes. *Brazilian Journal of Physics*, 30, 423-427.

- [96] Pimenta, M.A., Jorio, A., Brown, S.D., Souza Filho, A.G., Dresselhaus, G., Hafner, J.H., Dresselhaus, M.S. (2001). Diameter dependence of the Raman D-band in isolated single-wall carbon nanotubes. *Physical Review B*, 64(4), 041401.
- [97] Santoro, G., Domingo, C. (2007). Espectroscopía Raman de nanotubos de carbono. *Óptica pura y aplicada* 40(2), 175-186.
- [98] Ruiz-Vargas, C.S., Zhuang, H.L., Huang, P.Y., Van Der Zande, A.M., Garg, S., McEuen, P.L., Park, J. (2011). Softened elastic response and unzipping in chemical vapor deposition graphene membranes. *Nano letters*, 11(6), 2259-2263.
- [99] Lee, A., Beak, S., Lee, S., Kim, G., Lee, D.C., Kim, S., Jeong, H. (2020). Hydrophilic/hydrophobic characteristics on the carbon nanotube buckypapers with various mechanical and chemical manufacture process. *Diamond and Related Materials*, 110, 108152.
- [100] Dulyaseree, P., Yordsri, V., Wongwiriyan, W. (2016). Effects of microwave and oxygen plasma treatments on capacitive characteristics of supercapacitor based on multiwalled carbon nanotubes. *Japanese Journal of Applied Physics*, 55(2S), 02BD05.
- [101] Zanin, H., Saito, E., Ceragioli, H.J., Baranauskas, V., Corat, E.J. (2014) Reduced graphene oxide and vertically aligned carbon nanotubes superhydrophilic films for supercapacitors devices. *Materials Research Bulletin*, 49, 487-493.
- [102] Mahmood, M.H., Maleque, M.A., Rahman, M. (2022). Hard-Hydrophobic Nano-CuO Coating via Electrochemical Oxidation for Heat Transfer Performance Enhancement. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 47(5), 6013-6023.
- [103] Le, H.H., Das, A., Basak, S., Tahir, M., Wießner, S., Fischer, D., Radusch, H.J. (2016). Effect of different ionic liquids on the dispersion and phase selective wetting of carbon nanotubes in rubber blends. *Polymer*, 105, 284–297.
- [104] Whitten, P.G., Spinks, G.M., Wallace, G.G. (2005). Mechanical properties of carbon nanotube paper in ionic liquid and aqueous electrolytes. *Carbon*, 43(9), 1891–1896.
- [105] Salinas-Torres, D., Huerta, F., Montilla, F., Morallón, E. (2011). Study on electroactive and electrocatalytic surfaces of single walled carbon nanotube-modified electrodes. *Electrochimica Acta*, 56(5), 2464-2470.
- [106] Motoc, S., Manea, F., Baciu, A., Orha, C., Pop, A. (2021). Electrochemical method for ease determination of sodium diclofenac trace levels in water using graphene—Multi-walled carbon nanotubes paste electrode. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(1), 29.
- [107] Gao, F., Yan, Z., Cai, Y., Yang, J., Zhong, W., Gao, Y., Lu, L. (2021). 2D leaf-like ZIF-L decorated with multi-walled carbon nanotubes as electrochemical sensing platform for sensitively detecting thiabendazole pesticide residues in fruit samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 7485-7494.
- [108] Wan, Q., Wang, X., Yu, F., Wang, X., Yang, N. (2009). Poly (taurine)/MWNT-modified glassy carbon electrodes for the detection of acetaminophen. *Journal of Applied Electrochemistry*, 39, 785-790.
- [109] Singal, S., Srivastava, A.K., Dhakate, S., Biradar, A.M. (2015). Electroactive graphene-multi-walled carbon nanotube hybrid supported impedimetric immunosensor for the detection of human cardiac troponin-I. *RSC advances*, 5(92), 74994-75003.

- [110] Wildgoose, G.G., Wilkins, S.J., Williams, G.R., France, R.R., Carnahan, D.L., Jiang, L., Compton, R.G. (2005). Graphite Powder and Multiwalled Carbon Nanotubes Chemically Modified with 4-Nitrobenzylamine. *ChemPhysChem*, 6(2), 352-362.
- [111] Squella, J.A., Bollo, S., Núñez-Vergara, L.J. (2005). Recent developments in the electrochemistry of some nitro compounds of biological significance. *Current Organic Chemistry*, 9(6), 565-581.
- [112] Ung, S., Falguières, A., Guy, A., Ferroud, C. (2005). Ultrasonically activated reduction of substituted nitrobenzenes to corresponding N-arylhydroxylamines. *Tetrahedron letters*, 46(35), 5913-5917.
- [113] Moscoso, R., Carbajo, J., Squella, J.A. (2014). Multiwalled carbon nanotubes modified electrodes with encapsulated 1, 4-dihydro-pyridine-4-nitrobenzene substituted compounds. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 59(2), 2498-2501.
- [114] Ortiz, B., Saby, C., Champagne, G.Y., Bélanger, D. (1998). Electrochemical modification of a carbon electrode using aromatic diazonium salts. 2. Electrochemistry of 4-nitrophenyl modified glassy carbon electrodes in aqueous media. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 455(1-2), 75-81.
- [115] Nuñez-Vergara, L.J., Matus, C., Alvarez-Lueje, A.F., Cassels, B.K., Squella, J.A. (1994). Nitro radical anion formation from nitro-substituted amphetamine derivatives. *Electroanalysis*, 6(5-6), 509-513.
- [116] Ebihara, A., Kawamoto, S., Shibata, N., Yamaguchi, T., Suzuki, F., Nakagawa, T. (2016). Development of a modified Britton-Robinson buffer with improved linearity in the alkaline pH region. *Biojournal of Science and Technology*. 3.
- [117] Qiao, M., Fletcher, D.L., Northcutt, J.K., Smith, D.P. (2002). The relationship between raw broiler breast meat color and composition. *Poultry science*, 81(3), 422-427.
- [118] Zhou, C., Liu, Z., Dong, Y., Li, D. (2009). Electrochemical Behavior of o-Nitrophenol at Hexagonal Mesoporous Silica Modified Carbon Paste Electrodes. *Electroanalysis*, 21(7), 853-858.
- [119] Daftsiotis, A.C., Schall, E.D. (1962). Application of AC Polarography to the Analysis of Drugs in Feeds. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*, 45(2), 278-283.
- [120] Krivić, D., Vladislavić, N., Buljac, M., Rončević, I.Š., Buzuk, M. (2022). An insight into the thin-layer diffusion phenomena within a porous electrode: Gallic acid at a single-walled carbon nanotubes-modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 907, 116008.
- [121] Chiavassa, L.D., La-Scalea, M.A. (2018). Square wave voltammetry of nitrofurans in aqueous media using a carbon fiber microelectrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 22, 1395-1402.
- [122] Ni, Y., Wang, L., Kokot, S. (2001). Simultaneous determination of nitrobenzene and nitro-substituted phenols by differential pulse voltammetry and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 431(1), 101-113.
- [123] Jain, R., Agarwal, D.D., Shrivastava, R.K. (1990). Electrochemical investigations on nitro-substituted hydrazono compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (8), 1353-1358.
- [124] SAĞLAM, Ö., ÖNDER, F.C., Güngör, T., Ay, M., Dilgin, Y. (2018). Electrochemical behavior and voltammetric determination of some nitro-substituted benzamide compounds. *Turkish Journal of Chemistry*, 42(3), 780-793.

- [125] Data, P., Pander, P., Zassowski, P., Mimaite, V., Karon, K., Lapkowski, M., Darowicki, K. (2017). Electrochemically induced synthesis of triphenylamine-based polyhydrazones. *Electrochimica Acta*, 230, 10-21.
- [126] Sadatnabi, A., Mohamadighader, N., Nematollahi, D. (2021). Convergent Paired Electrochemical Synthesis of Azoxy and Azo Compounds: An Insight into the Reaction Mechanism. *Organic Letters*, 23(16), 6488-6493.
- [127] Mendkovich, A.S., Syroeshkin, M.A., Mikhalchenko, L.V., Mikhailov, M.N., Rusakov, A.I., Gul'tyai, V.P. (2011). Integrated study of the dinitrobenzene electroreduction mechanism by electroanalytical and computational methods. *International Journal of Electrochemistry*, 1-12.
- [128] Siraki, A.G. (2013). Free radical metabolites in arylamine toxicity. *In Advances in Molecular Toxicology*, 7, 39-82.
- [129] Brett, C.M., Brett, O. (1993). Principles, methods, and applications. *Electrochemistry*, 67(2), 444.
- [130] Svoboda, V., Cooney, M., Liaw, B.Y., Minteer, S., Piles, E., Lehnert, D., Atanassov, P. (2008). Standardized characterization of electrocatalytic electrodes. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 20(10), 1099-1109.
- [131] Rosa, T.R., Betim, F.S., de Queiroz Ferreira, R. (2017). Development and application of a labmade apparatus using open-source "arduino" hardware for the electrochemical pretreatment of boron-doped diamond electrodes. *Electrochimica Acta*, 231, 185-189.
- [132] Ya'akovovitz, A., Bedewy, M., Rao, A., Hart, A.J. (2016). Strain relaxation and resonance of carbon nanotube forests under electrostatic loading. *Carbon*, 96, 250-258.
- [133] Amani, A.M., Hashemi, S.A., Mousavi, S.M., Abrishamifar, S.M., Vojood, A. (2017). Electric field induced alignment of carbon nanotubes: methodology and outcomes. *Carbon nanotubes-recent progress*. IntechOpen.
- [134] Miller, J.C., Miller, J.N. (1988). Basic statistical methods for analytical chemistry. Part I. Statistics of repeated measurements. *A review. Analyst*, 113(9), 1351-1356.
- [135] Shabir, G.A. (2005). Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *Journal of validation technology*, 10, 314-325.
- [136] Sri, A.N., Prasad, K.S., Tahreem, H., Prashanth, P., Illendula, S., Suresh, C. H. V., Rao, K. N.V. (2023). A novel analytical method development and validation of estimation of meclizine HCL by UV spectroscopic method. *International Journal of Multidisciplinary Research and Growth Evaluation*, 4, 953-956.
- [137] Catarino, R.I., Conceição, A.C., Garcia, M.B.Q., Gonçalves, M.L.S., Lima, J.L., Dos Santos, M.C. (2003). Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 33(4), 571-580.
- [138] Pereira, P.F., Marra, M.C., Lima, A.B., dos Santos, W.T.P., Munoz, R.A.A., Richter, E.M. (2013). Fast and simultaneous determination of nimesulide and paracetamol by batch injection analysis with amperometric detection on bare boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, 39, 41-46.
- [139] Vidal, J.M., Arrebola, F.J., Frenich, A.G., Fernandez, J.M., Mateu-Sanchez, M. (2004). Validation of a gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for analysis of pesticide

residues in six food commodities. Selection of a reference matrix for calibration. *Chromatographia*, 59, 321-327.

[140] FAO and WHO. 2023. Codex Alimentarius Commission Procedural Manual. Twenty-eighth edition, revised. Rome. Recuperado de <https://doi.org/10.4060/cc5042en>

[141] Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. (2001). Validación de métodos analíticos. Recuperado de https://www.academia.edu/10365264/Validacion_de_Metodos_Analiticos_Asoociacion_Espanola_de_Farmaceuticos_de_la_Industria

[142] European Commission. (2002). Commission Decision 2002/657/EC Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results. In.

[143] SANCO. (2007). SANCO/2007/3131: method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

[144] Coleman, M.R., Rodewald, J.M., Brunelle, S.L., Nelson, M., Bailey, L., Burnett, T.J. (2014). Determination and confirmation of nicarbazin, measured as 4, 4-dinitrocarbanilide (DNC), in chicken tissues by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: First action 2013.07. *Journal of AOAC International*, 97(2), 630-640.

[145] Silva, J. M., Azcárate, F. J., Knobel, G., Sosa, J. S., Carrizo, D. B., & Boschetti, C. E. (2020). Multiple response optimization of a QuEChERS extraction and HPLC analysis of diclazuril, nicarbazin and lasalocid in chicken liver. *Food chemistry*, 311, 126014.

[146] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. (2022). CVM GFI #3 General Principles for Evaluating the Human Food Safety of New Animal Drugs Used In Food-Producing Animals. Recuperado de <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cvm-gfi-3-general-principles-evaluating-human-food-safety-new-animal-drugs-used-food-producing>