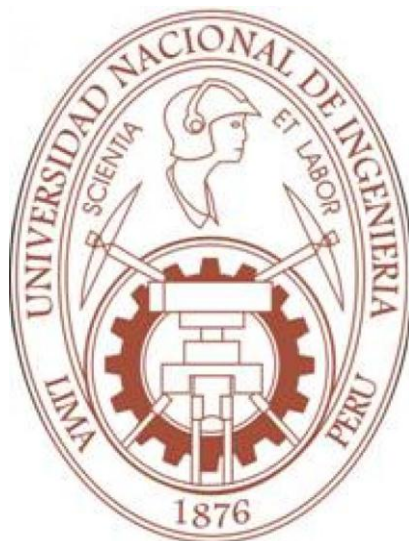


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN QUÍMICA

TITULADA:

“DESARROLLO DE SENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN
ELECTRODO DE CARBÓN VÍTREO MODIFICADO CON POLÍMERO
MOLECULARMENTE IMPRESO PARA LA DETERMINACIÓN DE
DIURON EN MUESTRA DE AGUA”

PRESENTADO POR:

REY ANTONIO FERNÁNDEZ CORI

ASESOR:

Lic. JUAN CARLOS MORALES GOMERO

LIMA-PERU

2016

DEDICATORIA

*Dedicado a mis padres Segundo y Eugenia, por todo el gran amor,
apoyo y consejo que me han dado durante el desarrollo de este proyecto.*

*A mi asesor Juan Carlos Morales, por el apoyo y las
grandes oportunidades ofrecidas.*

A mis amigos y mis profesores.

RESUMEN

El presente trabajo se enfoca en el estudio de sensores basados en polímeros molecularmente impresos, esto surge ante la necesidad de desarrollo de pequeños dispositivos de análisis que sean baratos, portátiles, fiables, selectivos, de fácil manejo y que requieran de pocos microlitros de muestra para determinar un analito en concreto.

Por este motivo un sensor a base de polímeros impresos molecularmente (MIP) fue desarrollado para la determinación de 3- (3,4-diclorofenil) -1,1-dimetilurea (diuron). El MIP se sintetizó mediante polimerización de radicales libres en el cual el diuron actuó como molécula plantilla, el ácido metacrílico (MAA) actuó como monómero funcional y el dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) actuó como agente reticulante. Para la construcción del sensor, un electrodo de carbón vítreo se modificó con Nafión® y MIP / NIP (polímero no impreso) para ver la contribución de MIP, como una película, en el reconocimiento del diuron.

La voltamperometría diferencial de pulsos fue utilizada para la cuantificación de diuron en un rango de respuesta de 0,4 – 1,2 V en solución de buffer de fosfatos 0,1 M (pH = 8) en el cual todos los parámetros que afectan al sensor se optimizaron. El sensor mostró una respuesta lineal de $1,000 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ a $5,879 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ con límites de detección y de cuantificación de $0,58 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ y de $1,93 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ respectivamente. Se realizó un estudio de selectividad en presencia de úrea, y plaguicidas tales como el oxamyl y el glifosato, mostrando una alta selectividad para el diuron. En la aplicación del sensor, se realizó por triplicado la determinación de diuron en agua potable tomado del caño del laboratorio de electroquímica lo que mostró un porcentaje de recuperación del 95% indicando que no hubo un efecto matriz que dificulte la determinación de diuron en este tipo de muestra.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I: OBJETIVOS	11
CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO III: FUNDAMENTO TEÓRICO	15
1. PLAGUICIDAS	16
1.1. Plaguicidas en el Perú	17
1.2. Herbicidas tipo fenilurea	19
1.2.1. Generalidades	19
1.2.2. Diuron	20
a. Generalidades	20
b. Mecanismo de acción del diuron	20
c. Comportamiento electroquímico del diuron	21
d. Toxicidad y ecotoxicidad	23
e. Métodos de determinación de diuron	24
2. SENSOR	25
2.1. Sensor físico	26
2.2. Sensor químico	26
2.2.1. Generalidades	26
2.2.2. Tipos de receptores	27
2.2.3. Tipos de transductores	28
2.3. Sensor electroquímico	29
2.3.1. Transductores conductimétricos	29
2.3.2. Transductores capacitivos o de impedancia	30
2.3.3. Transductores potenciométricos	31
2.3.4. Transductores amperométricos	31
2.3.5. Transductores voltamperométricos	32
3. SENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS	33
3.1. Proceso de impresión molecular	33
3.1.1. Concepto general	33
3.1.2. Proceso de impresión molecular no covalente	35
3.1.3. Proceso de impresión molecular covalente	35
3.2. Componentes para la preparación de polímeros molecularmente impresos	36
3.2.1. Monómero funcional	37
3.2.2. Agente entrecruzador	37
3.2.3. Agente radicalario	37
3.2.4. Disolvente porogénico	38
3.3. Integración del MIP al transductor	39
3.3.1. MIPs obtenidos como películas en la superficie del Electrodo	39
3.3.2. MIPs obtenidos como partículas luego de moliendo del Polímero	40

3.4. Electrodo de carbón vítreo	41
CAPÍTULO IV: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	42
4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	43
4.2. Espectroscopía infrarroja	43
4.3. Espectrofotometría UV/Vis	44
4.4. Voltametría cíclica	44
CAPÍTULO V: PARTE EXPERIMENTAL	47
5.1. Equipos, materiales y reactivos	48
5.2. Preparación de soluciones	49
5.3. Preparación del polímero molecularmente impreso (MIP) y del polímero no impreso (NIP)	50
5.4. PREPARACIÓN DEL SENSOR	51
5.5. ENSAYOS Y TESTES DEL SENSOR	52
5.5.1. Sistema de análisis para determinación de diuron	53
5.5.2. Voltamperometría de pulso diferencial	54
5.5.3. Aplicación del sensor basado en polímero molecularmente impreso para la determinación de diuron	55
5.5.3.1. Estudio de selectividad	55
5.5.3.2. Preparación de muestra de agua	55
CAPÍTULO VI: RESULTADOS Y DISCUSIONES	56
6.1. PREPARACIÓN DEL POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESO (MIP) Y POLÍMERO NO IMPRESO (NIP)	57
6.2. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESO (MIP) Y POLÍMERO NO IMPRESO (NIP)	59
6.2.1. Caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM)	59
6.2.2. Caracterización por espectroscopía FTIR	60
6.2.3. Caracterización por espectrofotometría UV/Vis	61
6.3. ESTUDIO DEL SENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESO (MIP)	62
6.3.1. Remoción electroquímica del diuron del sensor preparado	62
6.3.2. Caracterización electroquímica del sensor a través de estudios Voltamétricos	64
6.3.3. Optimización del sensor	67
6.3.4. Perfil de respuesta del sensor	71
6.3.5. Estudio de selectividad	74
6.4. APLICACIÓN: DETERMINACIÓN DE DIURON EN MUESTRA DE AGUA POTABLE	75
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO	77
REFERENCIAS	80
ANEXO	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción del diuron sobre el fotosistema II	21
Figura 2. Mecanismo propuesto para la oxidación de diuron (adaptado de referencia [28])	22
Figura 3. Maneras de movimiento de pesticidas en el ciclo hidrológico (adaptado de referencia bibliográfica [29])	23
Figura 4. Diagrama de un sensor y sus componentes	25
Figura 5. Esquema de un sensor químico	27
Figura 6. Distintos tipos de potencia aplicado en función al tiempo para las técnicas voltamperométricas: LSV (a), DPV (b), SWV (c) y CV (d)	32
Figura 7. Esquema del proceso de impresión molecular (A) y del proceso de reconocimiento de la molécula plantilla (B) (adaptado de referencia [38])	34
Figura 8. Proceso de impresión no covalente (a) y covalente (b)	36
Figura 9. Ejemplos de reactivos necesarios para la obtención de polímeros molecularmente impresos	38
Figura 10. Esquema de integración del MIP al transductor como película producto de una electropolimerización (A) o como producto de aplicación de radiación UV a la mezcla de componentes depositados en la superficie del transductor (B)	39
Figura 11. Esquema de integración del MIP al transductor como partícula luego de molienda del MIP, siendo ya sea como película obtenida de suspensión de ésta (A) o como mezcla en pasta de carbón implementado a un electrodo (B)	40
Figura 12. Ventana de potencial aproximado de varios electrodos en medio ácido (barra blanca) y en medio básico (barra oscura), siendo el carbón vítreo uno de los que posee mayor ventana de trabajo	41
Figura 13. Voltamperometría cíclica, Potencial con respecto al tiempo	44
Figura 14. Ilustración esquemática de procedimiento de síntesis de MIP	50
Figura 15. Fotografía del electrodo de carbón vítreo modificado	51
Figura 16. Fotografía de sistema de trabajo (A), esquema del sistema de trabajo (B)	52
Figura 17. Señal de excitación aplicada en el DPV (A), respuesta típica en el DPV (B) (adaptado de referencia [45])	54
Figura 18. Compuestos utilizados en el ensayo de selectividad del sensor al diuron	55
Figura 19. Estructura química del analito (A) y del monómero funcional (B) siendo el diuron y el ácido metacrílico respectivamente	57
Figura 20. Imágenes SEM del MIP (a) y NIP (b) sintetizados (imágenes magnificadas 50 000 veces)	59
Figura 21. Espectro IR del MIP sin remover diuron (línea roja) y del NIP (línea negra)	60
Figura 22. Espectro UV/Vis de solución de metanol-ac. Acético (4:1 v/v, a) sola (línea negra) y con diuron 0,1 mM (línea azul), además de la solución de lavado del MIP	61
Figura 23. Voltamperograma cíclico del GCE-MIP (a) y GCE-NIP (b) en solución buffer de fosfatos 0,1 M pH 8,0. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1}	63
Figura 24. Voltamperogramas cíclicos del GCE en solución buffer de fosfatos 0,1 M pH 8,0 (línea negra) y conteniendo de $5,879 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de diuron (línea roja) comparado con el GCE-NIP (línea azul) y GCE-MIP (línea verde) a la misma concentración de diuron	64
Figura 25. Voltamperogramas cíclicos para el sensor modificado GCE-MIP a diferentes concentraciones de diuron. Blanco: solución buffer de fosfato 0,1 M (pH 8,0), $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$	65
Figura 26. Voltamperogramas cíclicos del GCE-MIP en solución buffer de fosfatos 0,1 M (pH 8,0) conteniendo $2,980 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de diuron realizado a distintas velocidades de barrido	66

Figura 27. Variación de corriente de pico anódico (i_{pa}) vs $v^{1/2}$ del electrodo modificado con MIP (GCE-MIP) proveniente del voltamperograma anterior.	66
Figura 28. Efecto del pH en la respuesta del sensor electroquímico GCE-MIP a diuron en buffer de fosfatos 0,1 M	67
Figura 29. Relación que existe en la respuesta del sensor entre el potencial y el pH	68
Figura 30. Proceso de oxidación del diuron (adaptado de referencia [28])	68
Figura 31. Respuesta en DPV para diuron con la menor (a) y mayor (b) sensibilidad. Medidas llevadas a cabo en 0,1 mol L ⁻¹ buffer de fosfatos (pH 8,0), Estep = 0,010 V, Epuls = 0,025 V, tpuls = 10 ms y Estep = 0,010 V, Epuls = 0,100 V, tpuls = 20 ms respectivamente	70
Figura 32. Respuesta de DPV en diuron en solución de buffer de fosfatos 50 mM (pH 8,0), en concentraciones de 0 a 9,616x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ usando GCE-MIP (a) y GCE-NIP (b). Estep = 0.010V, Amplitud = 0.100 y tpuls = 20ms y la comparación (c) entre GCE-MIP (línea roja) y GCE-NIP (línea negra)	71
Figura 33. Respuesta en DPV para diuron en condiciones optimizadas. Medidas llevadas a cabo en 0.05 mol.L ⁻¹ buffer de fosfatos (pH 8,0), Estep = 0.010V, Amplitud = 0.100 y tpuls = 20ms. (a) 0,05 mol.L ⁻¹ buffer de fosfatos (pH 8,0); electrolito conteniendo (b) 1,000x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ ; (c) 1.995 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ ; (d) 2.989 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ ; (e) 3.956 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ ; (f) 4.922 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ y (g) 5.879 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ de diuron.	73
Figura 34. Perfil amperométrico obtenido por adiciones de diferente compuestos con concentración de 2.980x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ , donde diuron se agregó antes (a) y después (b) de añadir los interferentes. Potencial aplicado: 1.080 V	74
Figura 35. Aplicación del método de adición estándar para la cuantificación de diuron en agua potable por DPV. Condiciones analíticas: Estep = 0,010V, Amplitud = 0,100 y tpuls = 20ms; 0,05 mol.L ⁻¹ buffer de fosfatos (pH 8,0); [diuron] = (a) desconocida, (b) 1,00x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ , (c) 1,995 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ , (d) 2,980 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ , (e) 3,956 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ , (f) 4,922 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ , (g) 5,879 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos de los principales grupos, funciones y clases de pesticidas	16
Tabla 2. Acuerdos internacionales firmados por Perú para control de plaguicidas	18
Tabla 3. Estructura molecular de herbicidas tipo fenilurea comunes	19
Tabla 4. Tabla de proporciones de soluciones de KH ₂ PO ₄ 1,0 M y K ₂ HPO ₄ 1,0 M para distintas soluciones buffer	49
Tabla 5. Condiciones de trabajo de la voltamperometría cíclica utilizados para la remoción del diuron del GCE-MIP	53
Tabla 6. Parámetros evaluados durante la optimización del sensor electroquímico propuesto	67
Tabla 7. Lista de parámetros para experimentos de optimización	69
Tabla 8. Sensibilidad y potencial de oxidación máxima obtenidas en distintas condiciones de la voltametría de pulso diferencial	69
Tabla 9. Resultado obtenido de la muestra de agua potable	76

GLOSARIO

Abreviación	Significado
A	Área del electrodo de trabajo
a_{ox}	Actividad química del agente oxidante
a_{red}	Actividad química del agente reductor
C	Concentración
CV	Voltamperometría cíclica
D	Coefficiente de difusión
DPV	Voltamperometría de pulso diferencial
E°	Potencial estándar del electrodo
EDGMA	Dimetacrilato de etilenglicol
E_{red}	Potencial de media celda
E_p	Pico de potencial
E_{pc}	Potencial de pico catódico
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{puls}	Potencial de pulso, amplitud de pulso
ΔE_p	Variación entre potencial de oxidación y reducción, amplitud de pulso
E°_{red}	Potencial estándar de media celda
ΔE_s, Estep	Ancho de pulso o potencial de paso
F	Constante de Faraday
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GCE	Electrodo de carbón vítreo
GCE-NIP	Electrodo de carbón vítreo modificado con polímero no impreso
GCE-MIP	Electrodo de carbón vítreo modificado con polímero molecularmente impreso
i	Corriente
Δi	Variación de corriente
I_{pa}	Corriente de pico anódico
I_{pc}	Corriente de pico catódico
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
K	Conductividad específica
K°	Constante estándar de velocidad
LSV	Voltamperometría lineal
MIP	Polímero molecularmente impreso
MAA	Ácido metacrílico
NIP	Polímero no impreso
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
n, n_a, z	Número de moles de electrones transferidos en la reacción
OMS	Organización Mundial de la salud
PBI	Producto Bruto Interno
PBS	Solución buffer de fosfatos
R	Constante universal de los gases
RSD	Desviación estándar relativa
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú
SWV	Voltamperometría de onda cuadrada
T	Temperatura absoluta

tpuls	Tiempo de pulso
x	Distancia entre electrodo y superficie electroactiva
α	Coefficiente de transferencia
v	Velocidad de barrido

CAPÍTULO I

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Construir un sensor electroquímico basado en electrodo de carbón vítreo modificado con polímero molecularmente impreso para la detección de diuron.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Caracterización mediante técnicas electroquímicas y fisicoquímicas del polímero molecularmente impreso (MIP) y del polímero no impreso (NIP)
- Caracterizar electroquímicamente así como evaluar la sensibilidad y límite de detección del sensor basado en polímero molecularmente impreso en muestras sintéticas de diuron.
- Evaluar la selectividad del sensor al diuron frente a ciertos interferentes.
- Utilizar el sensor construido en la determinación de diuron una muestra de agua potable obtenida del caño del laboratorio de electroquímica.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

El diuron es un herbicida tipo fenilurea que inhibe la fotosíntesis ya que detiene la producción de oxígeno ^[1] y bloquea la transferencia de electrones en el nivel del fotosistema II de microorganismos y plantas fotosintéticas. Este compuesto se ha utilizado para controlar una amplia variedad de malezas herbáceas así como musgos ^[2]. Aunque su uso en los cultivos puede mejorar los rendimientos y márgenes de beneficio, diuron causa impactos ambientales, afectando algas, hongos, plantas y mamíferos. En los seres humanos, la exposición al diuron resulta en la formación de metahemoglobina en la sangre, así como anomalías en el hígado y el bazo. El diuron también actúa como un disruptor endocrino que interfiere en los procesos de liberación, transporte y disposición de las hormonas naturales en el cuerpo ^[2-4].

El diuron tiene baja solubilidad en agua, y cuando se aplica al suelo tiende a acumularse, además que su vida media oscila entre 90 a 180 días en el suelo ^[5], por lo que su alta persistencia, además que en época de fuertes lluvias provoca su lixiviación, causan la contaminación de las aguas subterráneas debido a su lenta tasa de extracción; por lo tanto, se puede encontrar en muchos entornos, incluyendo el suelo, sedimentos y el agua^[2], debido a los graves efectos que el diuron puede tener sobre los seres humanos y otros organismos vivos, es necesario el control de los niveles de estas sustancias en el medio ambiente. Una variedad de métodos analíticos para el seguimiento de diuron se han reportado en la literatura, estos incluyen cromatografía ^[6], espectrometría ^[7], fluorimetría ^[8], electroforesis capilar ^[9] y técnicas electroquímicas. ^[10] .

En las últimas décadas los científicos han tomado interés en el sensor electroquímico basado en polímeros impresos molecularmente que podría ofrecer buenos límites de detección, a bajo costo, con la posibilidad de fácil miniaturización y automatización ^[11]. Además, se encuentra reportado que los sensores utilizando polímeros molecularmente impresos a base de acrílicos o vinílicos tienen una buena estabilidad durante un almacenamiento prolongado (más de 6 meses en muchos casos), como se esperaba para un polímero altamente reticulado, siendo la transducción del tipo electroquímico tener un especial atractivo ya que permite una gama de pequeños dispositivos de reconocimiento basados en el efecto de plantilla, lográndose aplicaciones pertinentes tales como biomarcadores en química clínica, control del medio ambiente, control de calidad en línea de la industria farmacéutica o detección de fraude en alimentos. ^[11- 14]

CAPÍTULO III

FUNDAMENTO TEÓRICO

1. PLAGUICIDAS

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) los plaguicidas son sustancias o mezcla de sustancias utilizadas en producción, cosecha y almacenamiento de los alimentos. Estos son bioactivos capaces de prevenir o combatir especies indeseables que, de alguna manera, pueden interferir con la producción, el procesamiento, el almacenamiento, el transporte y el almacenamiento de alimentos, productos agrícolas en general, madera y productos derivados de la madera, etc. ^[15] Los pesticidas pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura química (grupo funcional) tales como los grupos organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretroides, triazinas, clorofenoles, entre otros, y con base en el tipo de plagas objetivo al cual ataca el cual se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Algunos de los principales grupos, funciones y clases de pesticidas ^[16]

Grupo y función	Clases
Insecticidas (control de insectos)	Organoclorado, organofosforados, carbamatos, benzoilúreas y organometálicos.
Herbicidas (control de plantas dañinas)	Triazinas, ureas (como sulfonilúreas y fenilúreas) , tiocarbamatos, amidas sustituidas, ácidos benzoicos, piridinas, dinitrofenoles.
Fungicidas (control de hongos)	Ditiocarbamatos, dicaroximidias, ftalimidias, benzimidazoles, imidazoles, acilaminas, sales inorgánicas (sulfato de cobre), fosfito de zinc, fósforo blanco, cumarina.
Rodenticidas (control de roedores)	Sales de hierro, acetato de fentina, clinoclamina, cloratos, bromatos de alquibenzilamonio, hipocloritos de calcio, formaldehído.
Algicidas (control de algas)	Sales de hierro, acetato de fentina, clinoclamina, cloratos, bromatos de alquibenzilamonio, hipoclorito de calcio.
Molusquicidas (control de moluscos)	Metaldehído
Nematicidas (control de nematoides)	Metilcarbamatos de benzofuralina, metilcarbamato de oxima y organofosforados.

1.1. Plaguicidas en el Perú

En el Perú, la agricultura hoy en día es fuente principal de ingresos de 2.3 millones de familias que representan el 34 % de los hogares peruanos; genera aproximadamente el 7.6% del Producto Bruto Interno (PBI), teniendo un peso en la producción regional que oscila entre el 20 % y el 50 % (excluyendo Lima) ^[17], siendo el 64% de las familias rurales dedicadas a dicha actividad ubicadas en la sierra ^[18], además entre los principales cultivos se encuentran la papa, el maíz y otros tubérculos, granos y cereales. A nivel económico, representa para estas familias un medio de vida y sustento, ya que la producción sirve para el autoconsumo familiar y para el comercio en mercados locales y regionales, en pequeños medianos, grandes productores, respectivamente, a nivel medioambiental, el modelo de agricultura que se practica contribuye a su contaminación. ^[19]

La FAO apoya al gobierno peruano en la formulación de políticas públicas que contribuyan a crear condiciones favorables para mejorar la producción y la productividad de la agricultura familiar, considerando el manejo sostenible de la agrobiodiversidad. Es así que la FAO junto a la OMS han publicado una serie de boletines sobre directrices para el registro y control de plaguicidas, para su etiquetado y su utilización, esto a través de una serie de convenios y protocolos (tabla 2) con el fin de prevenir los riesgos a la salud y al ambiente que estas sustancias significan. ^[20] A pesar de ello es alarmante la falta de conciencia sobre los peligros de los plaguicidas, no solamente entre los operarios sino también entre el personal técnico que dirige las operaciones agrícolas ^{[19], [21]}.

Tabla 2. Acuerdos internacionales firmados por Perú para control de plaguicidas^[22]

Acuerdos internacionales		
Nombre del Convenio	Año de ratificación	Áreas de atención
Convenio para la Protección del Medio Ambiente y la Zona Marino Costera del Pacífico Sudeste	1988	Vigilancia y control de las actividades humanas que ocasionan diferentes niveles de impacto en la zona marino costera.
Convenio de Basilea para el control de movimientos transfronterizos de desechos peligrosos y su eliminación	1993	Los mecanismos de notificación sobre la conformidad para la exportación e importación de residuos peligrosos a países signatarios.
Convenio de Róterdam sobre el Procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo (PIC) aplicable a ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional	1993	Contar con un mecanismo de autorización previa a la importación y exportación de sustancias químicas peligrosas y plaguicidas (PIC), con toda la información necesaria para conocer las características y los riesgos que implica su manejo de dichas sustancias.
Código Internacional de Conducta de la FAO	1998	Distribución, utilización y manejo seguro de plaguicidas.
Protocolo para la Protección del Pacífico Sudeste	2005	Contra la contaminación proveniente de fuentes terrestres.
Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes	2005	Plaguicidas organoclorados, sustancias de uso industrial y compuestos de generación no intencional con características COPs.

Ante este tipo de resultados toxicológicos, el Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA) ha elaborado el proyecto de reglamento cuyo objetivo es reforzar las acciones de control post registro de plaguicidas químicos de uso agrícola, en el marco de las Buenas Prácticas Agrícolas, de tal manera que se minimicen los daños a la salud y el ambiente por el uso de estos productos, favoreciéndose el desarrollo sostenible de la agricultura nacional. ^[22]

1.2. Herbicidas tipo fenilurea

1.2.1. Generalidades

Desde el descubrimiento y la comercialización de herbicidas de fenilurea poco después de la Segunda Guerra Mundial, el uso de este tipo de herbicidas ha crecido hasta convertirse en una de las clases más importantes de herbicidas utilizados en todo el mundo. Los herbicidas de fenilurea son mayormente utilizados ya sea para pre o post-emergencia del cultivo del algodón, de las frutas o de la producción de cereales. Sin embargo, el diuron (tabla 2) es también utilizado como herbicida total en áreas urbanas y como un algicida en las pinturas anti-incrustantes. ^[23]

La mayoría de los herbicidas tipo fenilurea disponibles en la actualidad son o bien sustituidos con grupos funcionales -N-metoxi-N-metil- (por ejemplo linuron y clorobromuron) o con grupos -N, N-dimetil (por ejemplo isoproturon y diuron). La selección de los herbicidas tipo fenilurea más utilizados se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Estructura molecular de herbicidas tipo fenilurea comunes ^[3]

Estructura química general del herbicida tipo fenilurea			
Herbicidas más utilizados	A	B	D
Diuron [N-3,4-diclorofenil-N',N'-dimetilurea]	Cl	Cl	CH ₃
Isoproturon [N-4-isopropilfenil-N',N'-dimetilurea]		H	CH ₃
Monuron [N-(4-clorofenil)-N',N'-dimetilurea]	Cl	H	CH ₃

Clorotoluron [N-(3-cloro-4-metilfenil)-N',N'-dimetilurea]	CH ₃	Cl	CH ₃
Fenuron [N-3-fenil-N',N'-dimetilurea]	H	H	CH ₃
Fluometuron [N-(3-trifluorometilfenil)-N',N'-dimetilurea]	H	CF ₃	CH ₃
Metobromuron [N-(4-bromofenil)-N'-metoxi-N'-dimetilurea]	Br	H	OCH ₃
Clorobromuron [N-(4-bromoofenil-3-clorfenil)-N'-metoxi-N'-dimetilurea]	Br	Cl	OCH ₃
Linuron [N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxi-N'-dimetilurea]	Cl	Cl	OCH ₃

1.2.2. Diuron

a. Generalidades

El diuron es un herbicida perteneciente a la familia de las fenilamidas de la subclase fenilurea, este herbicida inhibe la fotosíntesis mediante la interrupción de la producción de oxígeno de microorganismos fotosintéticos y plantas. Este compuesto se ha utilizado para controlar una amplia de malas hierbas, así como musgos. ^[24]

b. Mecanismo de acción del diuron

Como ya se ha mencionado, el diuron es un herbicida del tipo fenilurea además de que es un herbicida del tipo sistémico, esto significa que cuando se aplica al suelo es absorbido por el sistema radical de la planta y rápidamente transportados hacia las hojas, vía apoplasto (xilema), por lo que su mecanismo de acción sobre la hierba mala es por medio de la inhibición de la fotosíntesis, bloqueando el sitio de enlace de la plastoquinona (Pq) del fotosistema II, evitando de esta forma el flujo de electrones que ésta permite, y a pesar que no afecta directamente al fotosistema I, de alguna forma la falta de electrones ocasiona que

el fotosistema I no logre satisfacerse de éstos, por lo que al final se bloquea la reducción de NADP^+ a NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), compuesto vital para la obtención de energía. [25], [26]

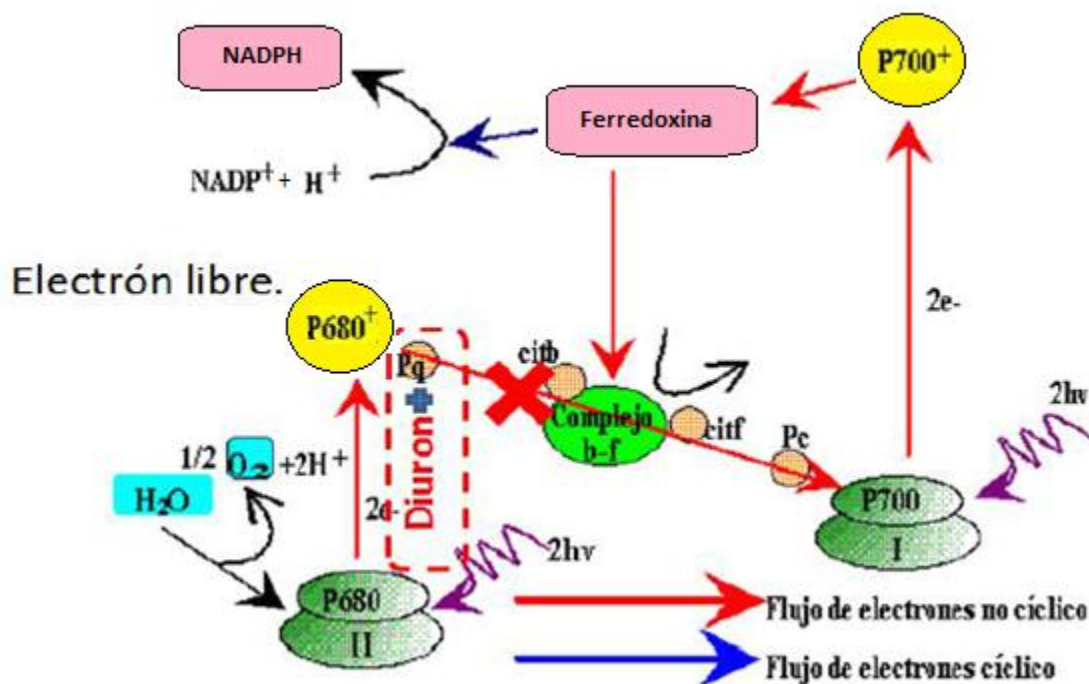


Figura 1. Mecanismo de acción del diuron sobre el fotosistema II [21]

c. Comportamiento electroquímico del diuron

Los estudios electroquímicos de diuron reportados en la literatura muestran su degradación por electrólisis, ya sea en matrices de agua o suelo [27]. Un estudio de la oxidación anódica de diuron sobre un electrodo de carbón vítreo asistido por ultrasonido [28] reveló que el proceso de oxidación es complejo, con la formación de un producto principal, identificado por cromatografía y resonancia magnética nuclear, corresponde a la formación de un N-radical y su correspondiente dímero a través del enlace N-N. Otros dos productos también se aislaron mediante el procedimiento de electrólisis, que corresponde a arreglos intramoleculares del dímero formado (compuestos P1 y P2). El producto principal de

oxidación del diuron sugiere la participación de un ion hidronio y un electrón en el proceso de oxidación, pero varios otros compuestos generados por electrólisis en menores cantidades también sugieren procesos que involucran varios electrones. [28]

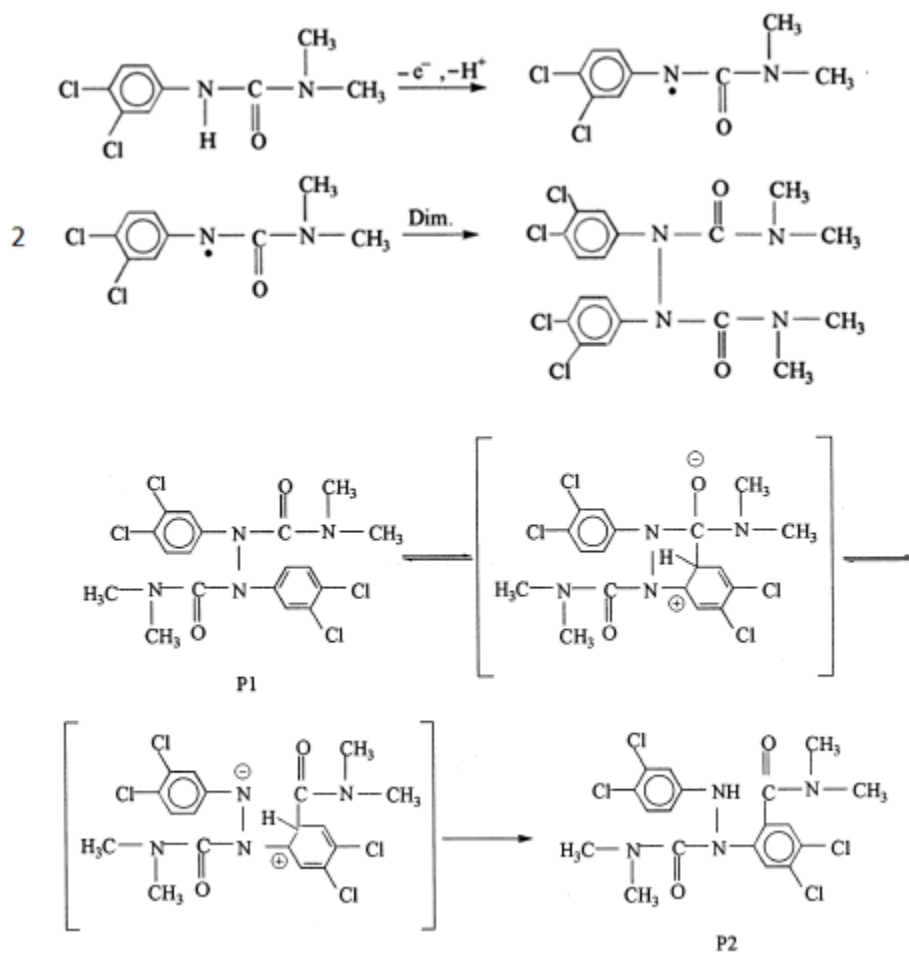


Figura 2. Mecanismo propuesto para la oxidación de diuron (adaptado de referencia [28])

d. Toxicidad y ecotoxicidad

El diuron es un contaminante biológicamente activo, estando presente en suelo agua y sedimentos, es conocido que dicho compuesto es persistente en suelo, aguas superficiales así como en aguas subterráneas, siendo estos factores causantes de varios impactos ambientales, afectando algas, hongos, plantas y mamíferos. [2]

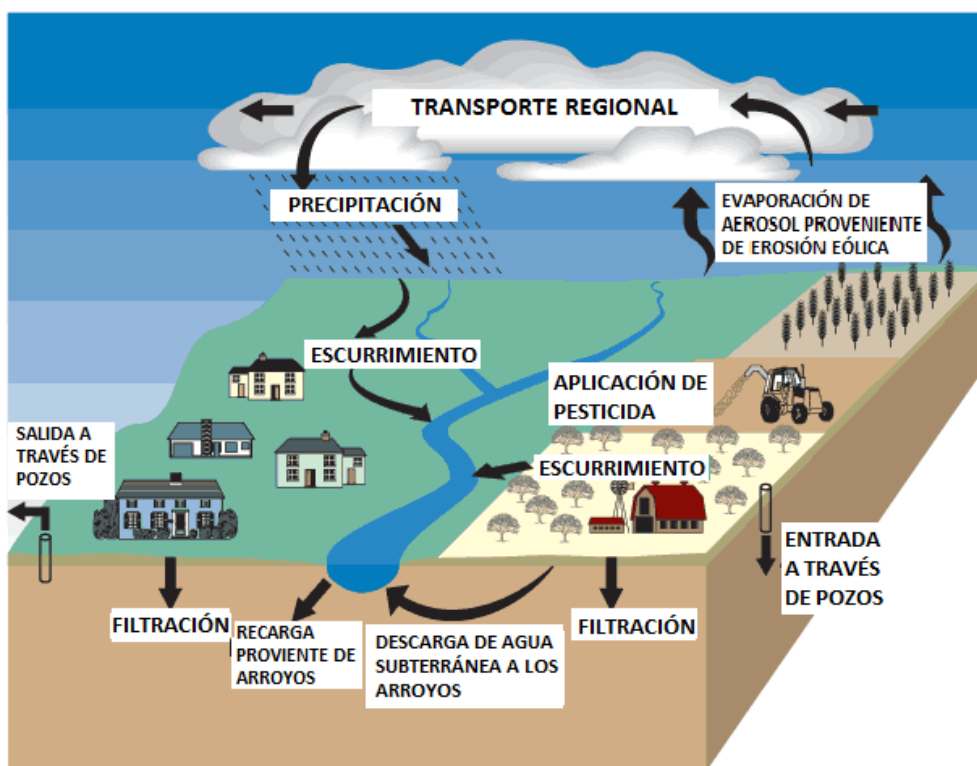


Figura 3. Maneras de movimiento de pesticidas en el ciclo hidrológico (adaptado de referencia bibliográfica [29])

El diuron y sus productos generados por su biodegradación son tóxicos para mamíferos así para aves e invertebrados acuáticos, en los humanos, la exposición de diuron genera la formación de metahemoglobina, el cual es dañino ya que por su alta afinidad al oxígeno, éste no le cede a los tejidos, además que el diuron genera anomalías en el bazo e hígado.

El diuron también actúa como disruptor endocrino el cual interfiere en el proceso de liberación, transporte y dispensación de hormonas naturales en el cuerpo ^[5]. Es de esta manera que surge un reto, el monitorear de manera rápida las cantidades residuales de diuron en muestras de aguas. Se han establecido métodos para la detección de pesticidas que incluyen varias técnicas cromatográficas asociado a varios detectores y con alta sensibilidad, sin embargo estos métodos requieren de un proceso complicado de pretratamiento de muestra, son muy caros, no permite el análisis *in-situ* y requiere de una capacitación adecuada para el manejo de los equipos. ^[30]

e. Métodos de determinación de diuron

Hoy en día, las principales técnicas analíticas suficientemente sensibles para la determinación de residuos de diuron son la cromatografía de gases y la cromatografía líquida, siendo difícil para el caso de cromatografía de gases debido a su baja volatilidad y la inestabilidad, los métodos desarrollados por cromatografía de gases a menudo involucrados un procedimiento de derivatización, pero esto ocasiona que el método difícilmente sea una herramienta robusta para su seguimiento ^[31], por lo que usualmente es utilizado el método HPLC acopladas a distintos detectores (de masa, IR, UV-Vis, fluorimétricos), siendo el más sensible el que cromatógrafo acoplado a dos espectrómetros de masas (LC-MS/MS) llegando a detectar residuos de pesticidas en muestras de agua del grado de los ppb, previo tratamiento a la muestra y derivatizado del analito. ^[31] A pesar que estas técnicas son muy sensibles y precisas requieren de una gran manipulación de las muestras, tomando mucho tiempo en la realización de los análisis y un elevado gasto de reactivos en el pretratamiento de muestra ^[32]. De esta manera es importante el desarrollo de nuevas metodologías como los métodos electroanalíticos para el análisis de residuos de pesticidas.

En los últimos años el desarrollo de un sensores basados en polímeros molecularmente impresos sobre varios transductores electroquímicos ha mostrado mucho interés para el análisis de pesticidas ^[6] por lo que en el presente trabajo se describe el desarrollo de un sensor basado en la modificación de un electrodo de carbón vítreo utilizando polímero molecularmente impreso para el reconocimiento del pesticida diuron.

2. SENSOR

El creciente interés por realizar análisis de forma rápida y económica, así como por optimizar la producción mediante análisis in situ, ha dirigido la investigación hacia la puesta a punto de métodos analíticos que sean compatibles con sus necesidades. ^[33]

Los sensores son dispositivos que transforman la información física o química en una señal útil que pueda ser procesada y, por tanto, que facilite información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos.

Los componentes de un sensor se clasifican en ^[33]:

Receptor: Reconoce un evento físico o química

Transductor: Convierte el evento en señal

Comunicador: Transporta la señal hasta un sistema de detección

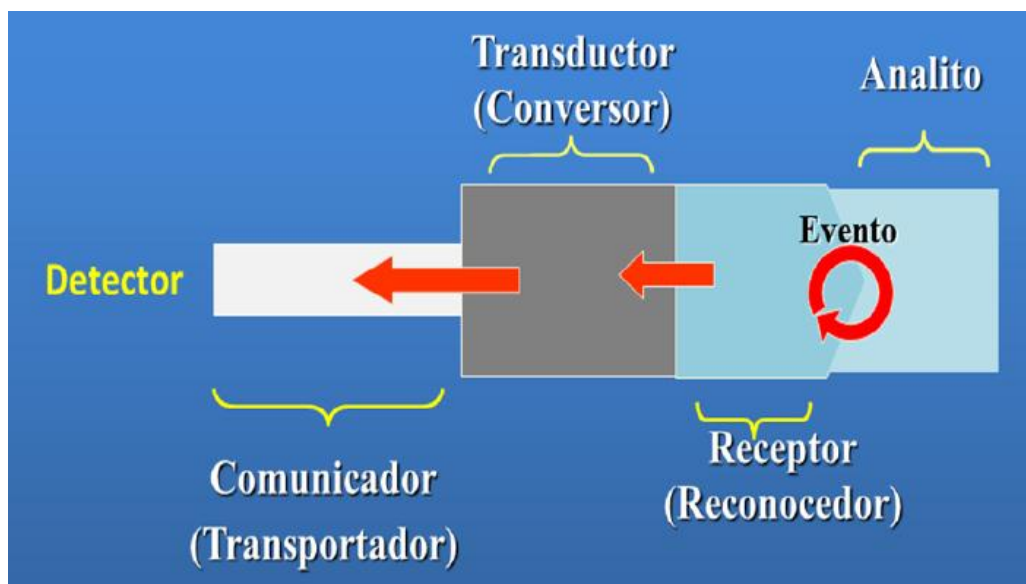


Figura 4. Diagrama de un sensor y sus componentes

Existen dos clases de sensores, clasificados según el tipo de información que sea capaces de transformar:

Físicos: Dispositivos que detectan cambios en parámetros físicos (temperatura, presión, flujo de masa, etc.)

Químicos: Dispositivos que detectan cambios en parámetros químicos (cambios de pH, concentración, composición, etc.)

2.1. Sensor físico

Es un dispositivo que determina variables físicas como: presión, temperatura, fuerza, velocidad, aceleración, deformación etc. Según la señal de salida obtenida se clasifican en activos y pasivos. ^[34]

a. Sensores Activos, los cuales generan directamente una señal eléctrica en respuesta a un estímulo externo sin la necesidad de una fuente de energía externa por lo que toman la energía del mismo estímulo.

b. Sensores Pasivos, los cuales requieren fuente de energía externa o una señal de excitación para poder funcionar.

2.2. Sensor químico

2.2.1. Generalidades

La IUPAC define un sensor químico como un dispositivo que transforma la información química, que va desde la concentración de un componente de la muestra específica para el análisis total de la composición, en una señal analíticamente útil. ^[35]

La información química, que se ha mencionado anteriormente, se puede originar a partir de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado.

Como ya se ha mencionado los sensores químicos contienen dos unidades funcionales básicas: un receptor y un transductor, además de un comunicador que permita el envío de la señal a un sistema de detección y nos muestra una respuesta como se muestra en el esquema.

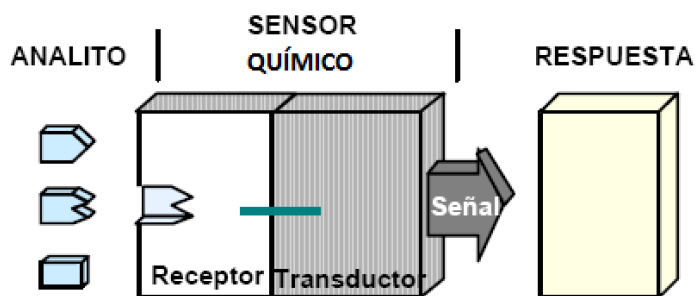


Figura 5. Esquema de un sensor químico

2.2.2. Tipos de receptores

El receptor es la parte del sensor químico donde la información química se transforma en una forma de energía que puede ser medida por el transductor.

La parte del receptor en los sensores químicos puede basarse en diversos principios:

- a. **Física**, donde no hay reacción química se lleva a cabo. Ejemplos típicos son los basados en la medición de la absorbancia, índice de refracción, la conductividad, la temperatura o el cambio de masa.
- b. **Química**, en la que una reacción química con la participación del analito da lugar a la señal analítica.

c. Bioquímica, en el que un proceso bioquímico es la fuente de la señal analítica. Ejemplos típicos son sensores potenciométricos microbianos o inmunosensores. Pueden considerarse como un subgrupo de los químicos. Tales sensores son llamados biosensores.

En algunos casos no es posible decidir de manera inequívoca si un sensor opera sobre un producto químico o en un principio físico. Este es, por ejemplo, el caso cuando la señal es debido a un proceso de adsorción. ^[35]

2.2.3. Tipos de transductores

La parte transductor es un dispositivo capaz de transformar la energía que lleva la información química acerca de la muestra en una señal analítica útil. El transductor, como tal, no muestra la selectividad. ^[35]

De acuerdo a los principios de operación del transductor pueden clasificarse principalmente en:

- a. Transductor óptico**, los cuales transforman los cambios en los fenómenos ópticos, el cual es el resultado de la interacción del analito con la parte del receptor.
- b. Transductor másico**, el cual transforma el cambio de masa en una superficie especialmente modificada en un cambio de una propiedad del material de soporte. El cambio de masa es causado por la acumulación del analito.
- c. Transductor térmico**, basado en la medición de los efectos del calor de una reacción química específica o que implican la adsorción del analito.
- d. Transductor magnético**, basado en el cambio de propiedades paramagnéticas del transductor debido a la interacción con el analito.

- e. **Transductor eléctrico**, basado en medidas que no toman lugar a procesos electroquímicos, pero la señal surge del cambio de las propiedades eléctricas causadas por la interacción con el analito.
- f. **Transductor electroquímico**, el cual transforma el efecto de la interacción electroquímica entre analito y electrodo en una señal útil. Estos efectos pueden ser estimulados eléctricamente o pueden resultar en una interacción espontánea en condiciones de corriente cero. ^[35]

2.3. Sensor electroquímico

Los sensores basados en transductores electroquímicos son dispositivos que son más robustos, su fabricación es más simple y económica que la del resto de transductores, y además, poseen un amplio intervalo de linealidad y tiempos de respuesta muy cortos. Así mismo, los equipos necesarios para recoger y procesar la señal, tales como potenciostatos y conductímetros, son económicos, de fácil mantenimiento, manejo y miniaturización, y son de uso común en la mayoría de laboratorios de análisis. ^[33]

Existen cinco grandes grupos de transductores electroquímicos clasificados según la técnica electroquímica utilizada para obtener la información de la muestra; conductimétricos, capacitivos o de impedancia, potenciométricos, amperométricos y voltamétricos.

2.3.1. Transductores conductimétricos

La conductimetría se basa en el flujo de corriente establecido por la migración de iones de carga opuesta, cuando un campo eléctrico se establece entre dos electrodos inmersos en una solución electrolítica ^[11], por lo que este tipo de transductores se basan en los cambios de conductividad (o alguna propiedad asociada a ésta) provocados por el analito, ya sea en la solución de medida o en la membrana selectiva. En algunos casos, se pueden llegar a medir incluso cambios de conductividad del propio analito. ^[33]

La conductividad es proporcional a la concentración de iones según la ecuación:

$$\Lambda = \frac{K}{C}$$

K: Conductividad específica (S cm-1)

C: Concentración de iones (mol cm-3)

Esta transducción es el menos sensible de las técnicas electroquímicas, porque la conductividad es aditiva, por lo que es imposible discriminar entre dos iones. Las pequeñas diferencias en la conductancia equivalente no son suficientes para discriminar especies. Por otra parte, si la concentración de un ion es muy alta, podría enmascarar otros ^[11].

2.3.2. Transductores capacitivos o de impedancia

Este tipo de transductores se basan en la medida impedancia o capacitancia, siendo el cambio de estos parámetros una forma de hacer seguimiento al fenómeno interfacial que ocurre durante el análisis ^[11].

Para registrar medidas de impedancia se utiliza corriente alterna, estas medidas de impedancia se suelen utilizar para caracterizar algunos líquidos y/o superficies de electrodos modificadas ^[33].

2.3.3. Transductores potenciométricos

Las medidas potenciométricas consisten en la determinación de una diferencia de potencial en condiciones de circuito abierto entre un electrodo de trabajo y uno de referencia.

La diferencia de potencial medida entre los electrodos se relaciona con la concentración del analito de acuerdo con la ecuación de Nernst ^[33]:

$$E_{red} = E_{red}^o + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

E_{red} : Potencial de media celda (V)

E_{red}^o : Potencial estándar de media celda (V)

a_{ox} : Actividad química del agente oxidante

a_{red} : Actividad química del agente reductor

z : número de moles de electrones transferidos en la reacción

F : Constante de Faraday

R : Constante universal de los gases

T : Temperatura absoluta (K)

2.3.4. Transductores amperométricos

La determinación amperométrica requiere se fundamentan en la proporcionalidad existente entre la concentración de una determinada especie electroactiva y la corriente eléctrica registrada al oxidarse o reducirse sobre la superficie de un electrodo polarizado. Esta relación intensidad-concentración se comporta según el siguiente modelo que proviene de la Ley de Fick ^[33], en este caso para un electrodo planar:

$$I = nFAD \left(\frac{\partial C}{\partial x} \right)_o$$

A : Área del electrodo de trabajo

D : Coeficiente de difusión

C : Concentración del analito

x : distancia entre electrodo y la especie electroactiva

Esto también puede darse para especie no electroactivas que forman parte de una etapa de desplazamiento junto con una reacción electroquímica ^[36].

2.3.5. Transductores voltamperométricos

Las medidas voltamperométricas envuelve el monitoreo de la corriente generada debido a un paso de potencial, siendo esta la técnica más selectiva ya que el potencial de oxidación o reducción de un sustrato particular es su propiedad intrínseca. Existen varias técnicas voltamperométricas, esto de acuerdo a la forma de la función potencial aplicada: voltamperometría de paso lineal (LSV) y voltamperometría cíclica (CV) en donde el potencial aplicado cambia linealmente con el tiempo; casos en que la función potencial aplicada no es lineal con el tiempo y se comporta como una función que comprende un incremento constante sobre una rampa lineal para la voltamperometría de pulso diferencial (DPV) o que la función potencial es una función de onda cuadrada para el caso de la voltamperometría de onda cuadrada (SWV) tal como se muestra en la figura. ^[11]

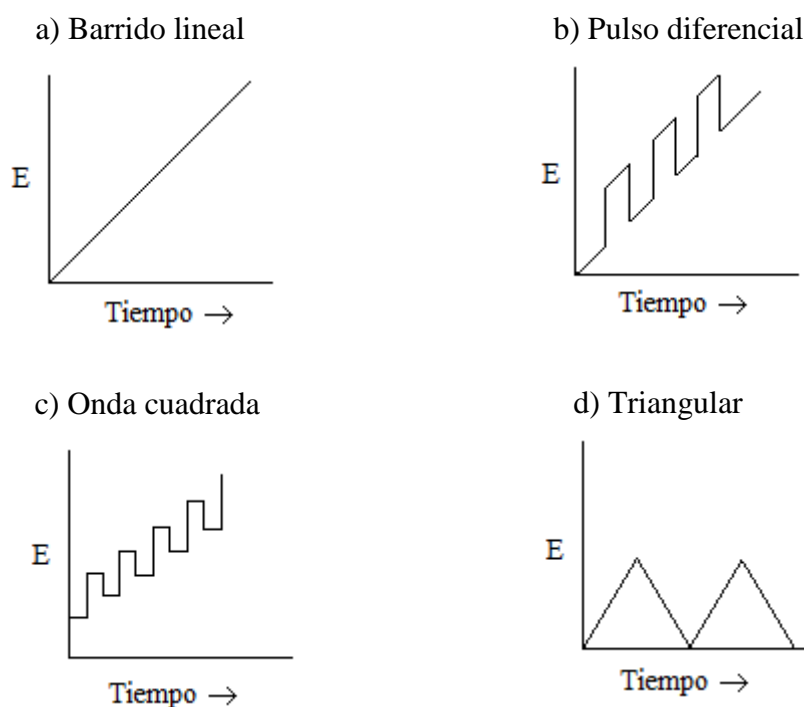


Figura 6. Distintos tipos de potencial aplicado en función al tiempo para las técnicas voltamperométricas: LSV (a), DPV (b), SWV (c) y CV (d).

3. SENSORES ELECTROQUÍMICOS BASADOS EN POLÍMEROS MOLECULARMENTE IMPRESOS

El uso de polímero molecularmente impresos (MIP por sus siglas en inglés) para reconocimiento de elementos en sensores electroquímicos han comenzado a tomar importancia durante los últimos años, esto debido a su bajo costo, pequeño tamaño del sensor y la posibilidad de conseguir bajos límites de detección y su fácil automatización^[37], por lo que para entender acerca de este tipo de sensores debemos primeramente comprender acerca de los polímeros molecularmente impresos.

3.1. Proceso de impresión molecular

3.1.1. Concepto general:

Las impresiones que presentan estos polímeros productos de estos procesos y que son selectivas a una molécula en particular es generado en el proceso de su síntesis como resultado de las interacciones de la molécula con monómeros funcionales, el proceso mencionado se resume principalmente en tres partes^[38] (figura 7):

- i. **Pre-disposición:** en este paso la molécula de interés (molécula plantilla) se asocia, ya sea de manera covalente o no covalente, con el monómero funcional o un conjunto de ellos formando un aducto o derivado polimerizable.
- ii. **Entrecruzamiento:** es el paso en el cual el aducto polimeriza o copolimeriza con un exceso de agente entrecruzante en un solvente inerte y generalmente en presencia de un iniciador, otros casos se realiza por electropolimerización en donde monómero funcional generalmente sería el mismo iniciador de la polimerización.
- iii. **Lavado:** en esta etapa la molécula plantilla es removida del polímero sintetizado por lavado con un solvente adecuado, generalmente se utiliza extracción por Soxhlet o vía hidrólisis ácida o básica.

La última etapa deja a la matriz polimérica con cavidades o “impresiones”, que son complementarias en forma, tamaño, posición de los grupos funcionales y ambiente electrónico al de la molécula plantilla. Además, debido a la rigidez otorgada por el agente entrecruzante hace posible el reenlace y reconocimiento de la molécula plantilla a la matriz polimérica, similar al proceso llave-cerradura ^[38].

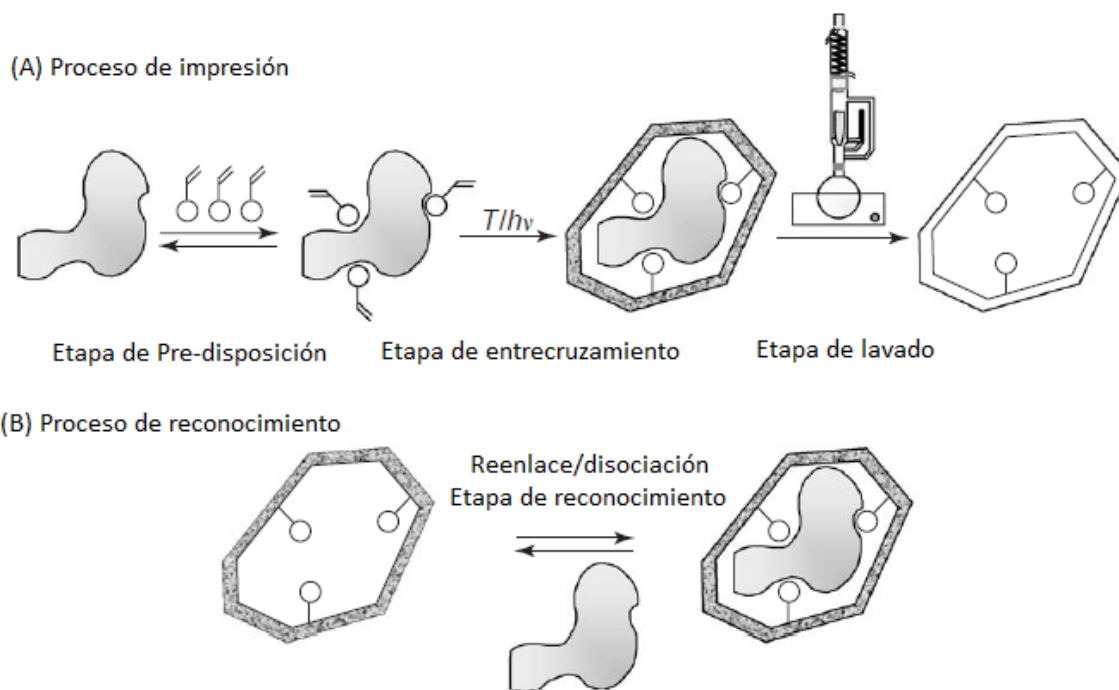


Figura 7. Esquema del proceso de impresión molecular (A) y del proceso de reconocimiento de la molécula plantilla (B) (adaptado de referencia [38])

En el proceso de impresión molecular existen dos estrategias generales de impresión (figura 8):

3.1.2. Proceso de impresión molecular no covalente

En este tipo de proceso, en la etapa de pre-disposición, la molécula plantilla interacciona con los monómeros funcionales que están alrededor de ella ya sea a través de interacciones de tipo Van del Waals, π - π , electrostáticas y de enlaces de hidrógeno, entre los grupos funcionales de ambos componentes. ^[38]

En los procesos de impresión molecular no covalente, el disolvente juega un papel muy importante, ya que influye en la interacción entre la molécula plantilla y el monómero funcional, además de influir en la morfología final del polímero en función de su capacidad porogénica. ^[39]

3.1.3. Proceso de impresión molecular covalente

En el proceso de impresión molecular covalente, el derivado polimerizable se obtiene mediante la interacción entre la molécula plantilla y el monómero funcional a través de un enlace covalente reversible (por ejemplo, ésteres de boranato, bases de Schiff, o cetales), ya luego de la polimerización la molécula plantilla es removida de la matriz polimérica por métodos químicos. ^[38]

Una de las ventajas de este proceso es que el polímero muestra poca dependencia con el disolvente utilizado durante el proceso de polimerización, pero deficiencias tales como la inevitable escisión química de la molécula plantilla a partir del polímero, y la cinética de unión lenta además, debido a la falta de funcionalidad adecuada en la plantilla, no siempre es posible preparar la plantilla polimerizable. ^[38]

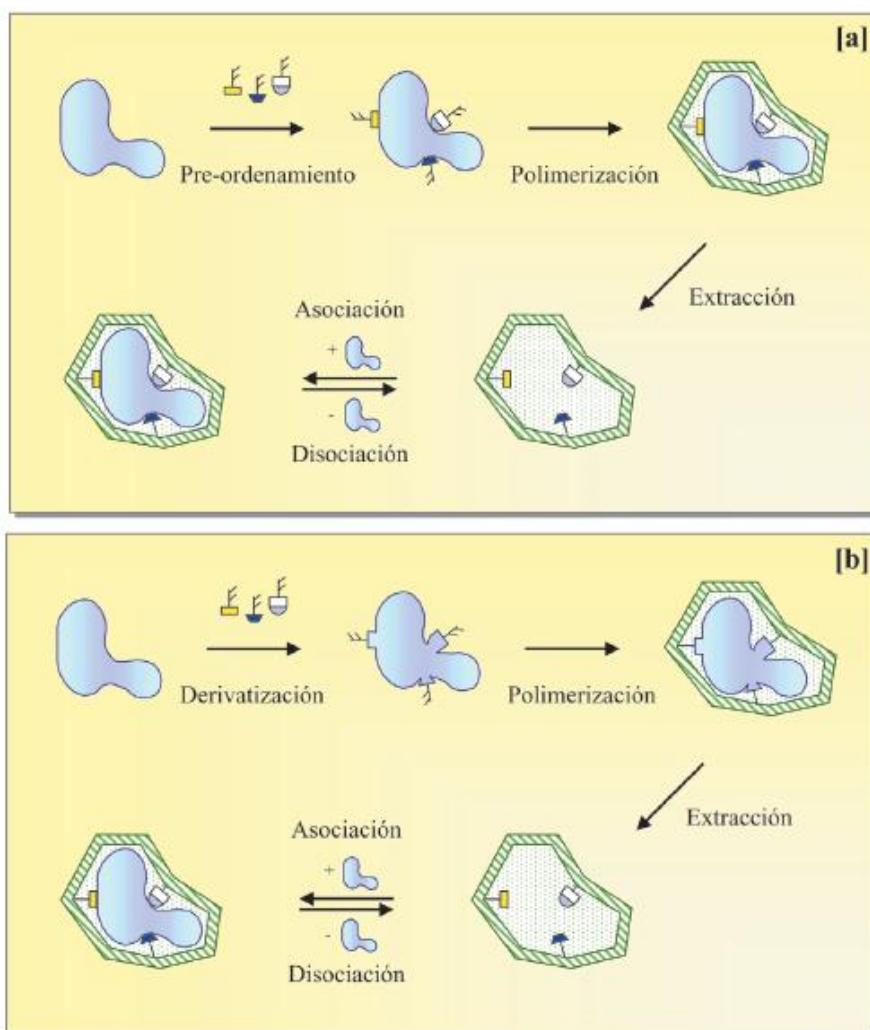


Figura 8. Proceso de impresión no covalente (a) y covalente (b) ^[39]

3.2. Componentes para la preparación de polímeros molecularmente impresos

Los componentes principales para la preparación de polímeros molecularmente impresos son los monómero funcionales, el agente entrecruzador, el iniciador y el disolvente porogénico (figura 9). Dado que la técnica utilizada en el presente trabajo es la síntesis vía no covalente, nos centraremos en dicho proceso.

3.2.1. Monómero funcional

El monómero funcional es un componente clave en la síntesis y la utilidad analítica de los polímeros molecularmente impresos, en general, el monómero funcional se selecciona de acuerdo a la naturaleza de la molécula plantilla. ^[38]

La elección es a menudo basada en su capacidad de formar enlaces de hidrógeno o un par iónico con la molécula plantilla, sea el caso que la molécula plantilla tenga grupos funcionales básicos, se emplea monómeros funcionales con grupos funcionales ácidos (ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido p-vinilbenzoico, etc), caso contrario se utilizaría monómeros funcionales que tengan grupos funcionales básicos tales como bases heteroatómicas débiles como la vinil-piridina. ^[39]

Finalmente, en el caso que la molécula plantilla forme complejos con determinados iones, el empleo de monómeros funcionales quelantes tales como el vinil-imidazol sería la opción más conveniente.

3.2.2. Agente entrecruzador

Para conseguir una alta selectividad y especificidad de los polímeros molecularmente impresos se necesita de un alto grado de entrecruzamiento de esta forma se asegura una rigidez tridimensional, para lograr esto, el “complejo” pre-formado es copolimerizado con una gran proporción de agente entrecruzador, sin embargo, un apropiado nivel de agente entrecruzador debe ser optimizado, ya que de esta manera se mantiene la especificidad de enlace del polímero. ^[39]

3.2.3. Iniciador radicalario

Los radicales libres se pueden obtener por calor o por radiación UV, los iniciadores radicalarios más comunes son los de tipo azo, tales como el 2,2'-azobisisobutironitrilo o el azobisdimetilvaleronitrilo, con los cuales se cuales una velocidad de descomposición

apropiada con un calentamiento de la mezcla moderado (50-60°C) , casos en que la molécula plantilla sea térmicamente inestable, es posible generar radicales libres a bajas temperaturas mediante radiación UV utilizando fotoiniciadores radicalarios como, por ejemplo, la dimetoxifenil acetofenona. [38, 39]

3.2.4. Disolvente porogénico

El disolvente porogénico es importante principalmente en la etapa de pre-disposición del proceso de impresión molecular no covalente. El solvente influye en la morfología del polímero (área superficial interior y tamaño promedio de poro) siendo por esto que se le suele referir al disolvente como porógeno, pero no sólo eso, además influye en la fuerza de las interacciones no covalentes entre el monómero funcional y el anilito, siendo muy importante para la obtención de un MIP altamente selectivo a nuestro analito. [38]

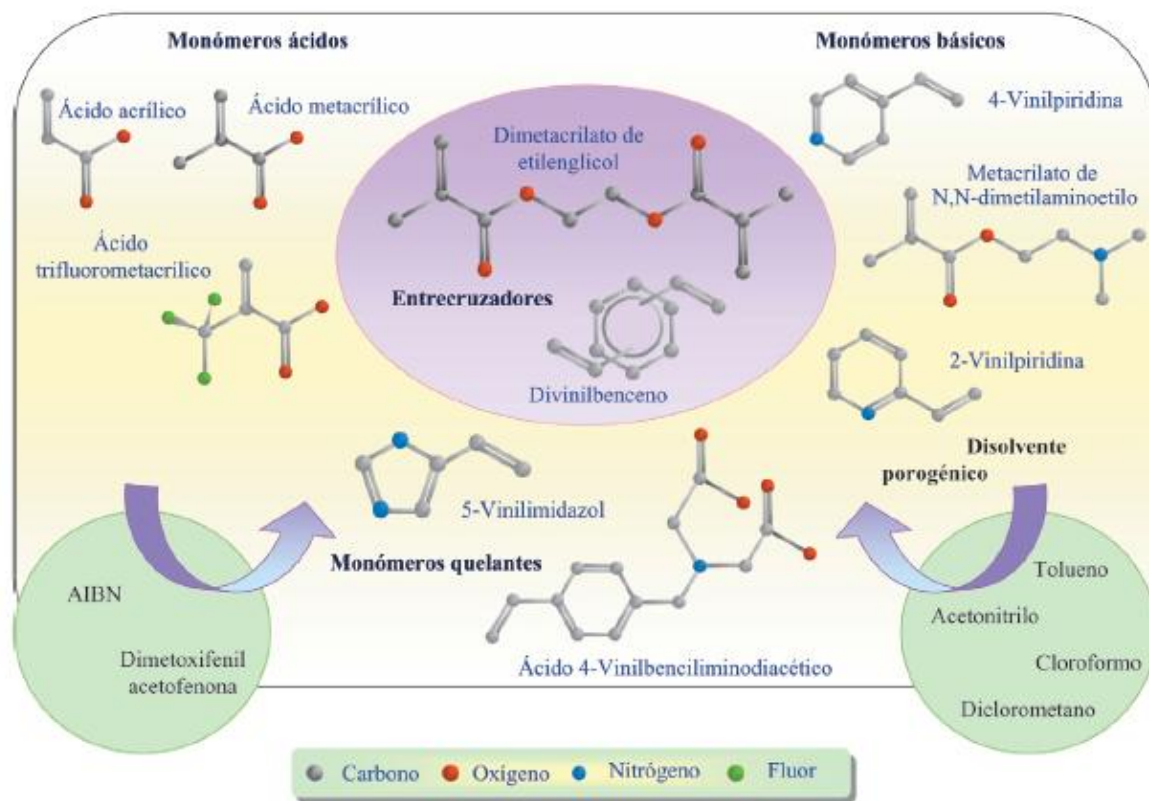


Figura 9. Ejemplos de reactivos necesarios para la obtención de polímeros molecularmente impresos [39]

3.3. Integración del MIP al transductor

Luego de explicar el proceso general de preparación del MIP así como los componentes que afectan en sus propiedades, ahora cabe indicar la integración del MIP al transductor para el desarrollo del sensor, como el presente trabajo se aboca a polímeros sintetizados a partir de compuestos de tipo acrílico o vinílico, su integración al transductor se suele ser de acuerdo a la obtención del MIP:

3.3.1. MIPs obtenidos como películas en la superficie del transductor ^[11]

En este caso, el polímero es sintetizado sobre la superficie del transductor, donde el MIP puede ser obtenido por electropolimerización de los componentes de la síntesis, también existen casos donde el MIP se obtiene por la aplicación de radiación UV a la mezcla de componentes que se encuentra depositado sobre la superficie del transductor tal como se muestra en la figura 10:

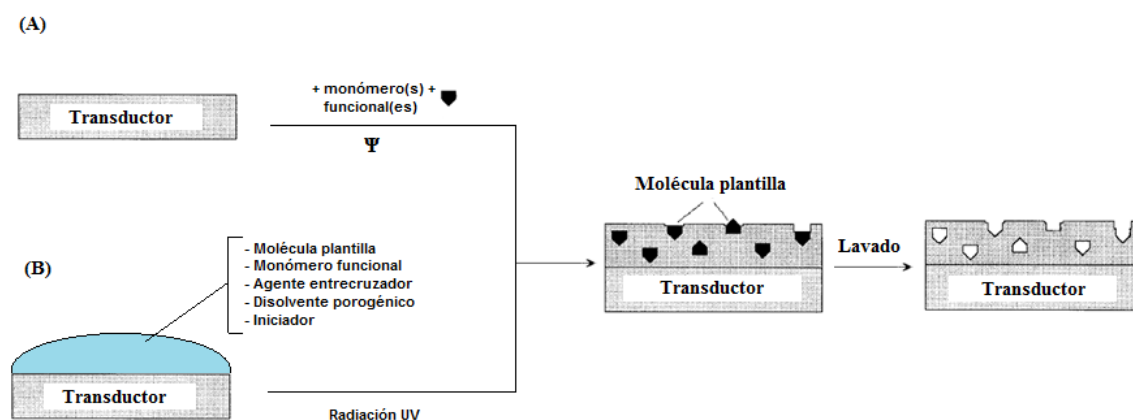


Figura 10. Esquema de integración del MIP al transductor como película producto de una electropolimerización (A) o como producto de aplicación de radiación UV a la mezcla de componentes depositados en la superficie del transductor (B)

3.3.2. MIPs obtenidos como partículas luego de molienda del polímero ^[11]

Como se indica, el MIP es obtenido como un sólido que ocupa todo el bulk luego del proceso de polimerización, para luego ser molido y tamizado, siendo su integración como una película producto de la deposición de una suspensión del polímero obtenido, así también casos en que se mezcla con grafito para utilizarse como pasta de carbono implementándose a un electrodo como se muestra en la figura 11:

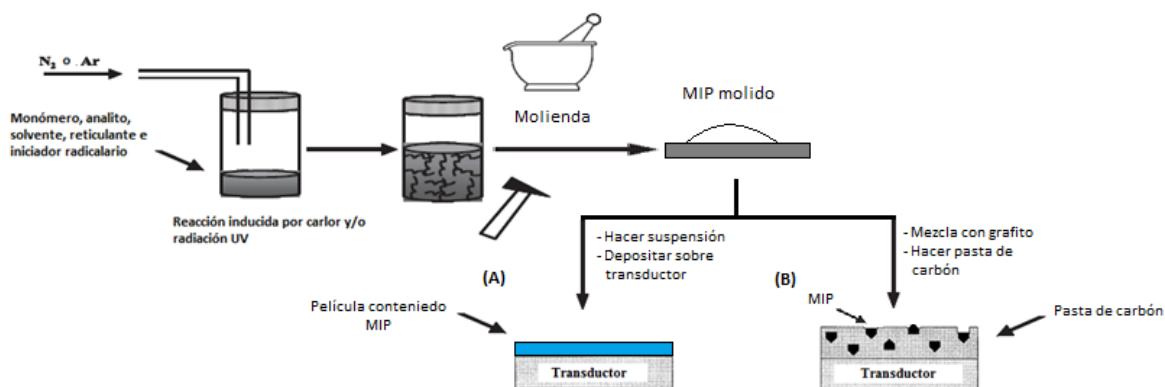


Figura 11. Esquema de integración del MIP al transductor como partícula luego de molienda del MIP, siendo ya sea como película obtenida de suspensión de ésta (A) o como mezcla en pasta de carbón implementado a un electrodo (B)

3.4. Electrodo de carbón vítreo

El electrodo de carbón vítreo ha sido muy popular por sus excelentes propiedades mecánicas y eléctricas, amplia ventana de trabajo, químicamente inerte (resistencia a ser atacado químicamente por varios solventes) y por su relativa reproducibilidad. La estructura del carbón vítreo envuelve una maraña de delgadas capas de grafito entrecruzadas lo que lo hace que posea alta densidad y pequeño tamaño de poro, sin embargo, usualmente se realiza pre-tratamiento para activar al electrodo y obtener reproducibilidad de medidas, además de mejorar las medidas analíticas. Tal pre-tratamiento es usualmente realizado por pulimento utilizando pequeñas partículas de alúmina (menor a $0.05\mu\text{m}$) y luego siendo enjuagado con agua antes de su uso. ^[40]

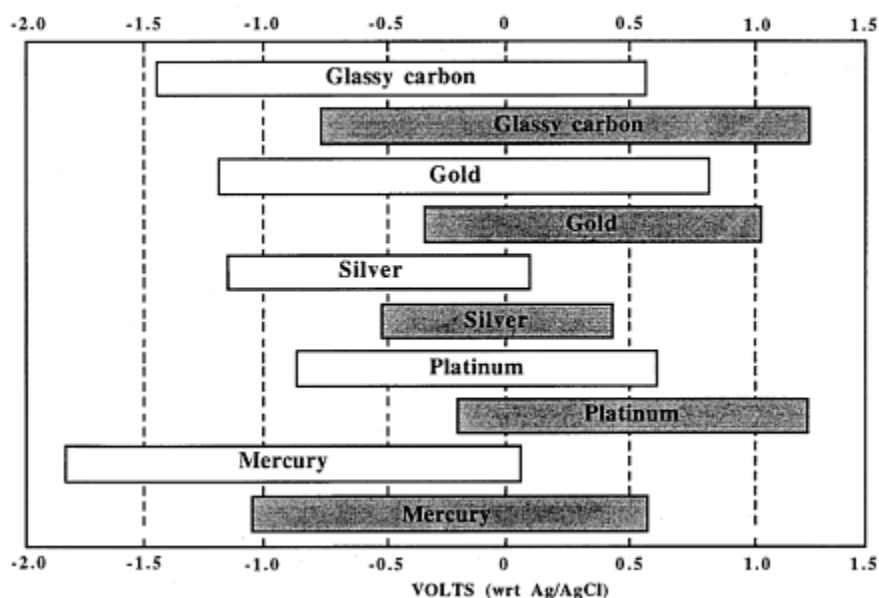


Figura 12. Ventana de potencial aproximado de varios electrodos en medio ácido (barra blanca) y en medio básico (barra oscura), siendo el carbón vítreo uno de los que posee mayor ventana de trabajo ^[41]

CAPÍTULO IV

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

4.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopia electrónica nos proporciona información morfológica y topográfica sobre la superficie de los sólidos que son normalmente necesarios para entender el comportamiento de las superficies. Así, un análisis por microscopia electrónica es a menudo la primera etapa en el estudio de las propiedades de las superficies de un sólido, mediante esta técnica se consigue formar y presentar imágenes micrométricas mediante un haz de electrones que se hace incidir sobre la superficie de la muestra ^[42], en este trabajo se busca mostrar si existe diferencia en la morfología del MIP, el cual contiene la molécula plantilla (diuron) y del NIP.

4.2. Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja nos proporciona información acerca de la estructura química de la muestra analizada por medio de la emisión de un rayo de luz infrarroja sobre la muestra que abarca los $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ya que es la región de mayor interés debido a que dicha energía es absorbida y convertida en energía molecular de vibración, esta energía es cuantizada pero en el espectro se muestra como bandas en vez de líneas ya que una única energía vibracional puede estar acompañado por un número de cambios en la energía rotacional., donde la posición de dicha banda (representado como números de onda con unidades de cm^{-1}) representa la absorción característica de un grupo funcional ^[43], aprovechando esto, en el presente trabajo se quiere mostrar bajo este análisis si el diuron contenido en el MIP afecta a su estructura polimérica.

4.3. Espectrofotometría UV/Vis

En el análisis por espectrofotometría UV/Vis se utiliza radiación electromagnética (luz) de la región visible, ultravioleta cercana (UV) del espectro electromagnético, es decir, longitudes de onda entre 200 y 780nm, la radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro genera transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas, de esta manera esta técnica se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas ^[44]. En el presente trabajo se realizó un análisis por este método a la solución de lavado conformado por una mezcla de metanol y ácido acético en relación de 9:1 v/v para determinar la presencia de diuron en la estructura polimérica del MIP.

4.4. Voltametría cíclica (CV)

Esta técnica se caracteriza por la aplicación al electrodo de trabajo, cuyas condiciones son estacionarias y sin agitación de la disolución, de una señal de potencial triangular (figura 13). El potencial va desde un potencial inicial E_o hasta un potencial final E_f , en el cual se produce una inversión en el sentido del barrido, volviendo a su valor original de E_o . En este ciclo suele darse varias veces, y los potenciales en los que se da esta inversión de la dirección reciben el nombre de potenciales de inversión. ^[40]

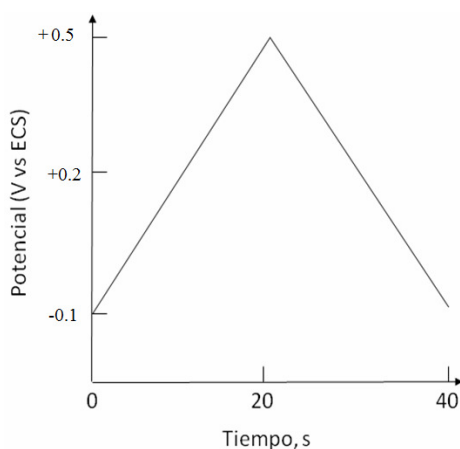


Figura 13. Voltamperometría cíclica, Potencial con respecto al tiempo

El intervalo de potencial de inversión impuesto en cada experimento es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o varios analitos, y la dirección en la que se produce el barrido va a depender de la composición de la muestra. Esta técnica es usada, principalmente, como herramienta para análisis cualitativo. Los parámetros principales que permiten la identificación del analito son: el potencial de pico anódico, el potencial de pico catódico, la corriente de pico anódico, la corriente de pico catódico. [40]

Las ecuaciones empleadas en la Voltamperometría son las siguientes:

Para sistemas reversibles [40]

$$\frac{I_{pc}}{I_{pa}} = 1 \quad \dots 1$$

$$I_p = (2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (\text{ecuación de Randles-Sevcik})$$

Siendo n el número de electrones intercambiados en la reacción, A el área del electrodo (cm^2), C la concentración de reactivo en el seno de la disolución (mol cm^{-3}) y D es el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) de las especies oxidadas y reducidas (supuestos iguales).

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong \frac{59 \text{mV}}{n} \quad \dots 2$$

En estos sistemas, E_p es independiente de la velocidad de barrido, mientras que la corriente I_p es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido ($v^{1/2}$ en unidades $\text{V}^{1/2} \text{s}^{-1/2}$)

Para sistemas irreversibles y cuasi reversibles ^[40]

En los sistemas irreversibles los picos de oxidación y reducción son menos intensos y se encuentran ampliamente separados, donde su cambio de potencial se encuentra relacionado con la velocidad de barrido a través de la siguiente ecuación:

$$E_p = E^\circ - \frac{RT}{\alpha n_a F} \left[0.78 - \ln \frac{k^\circ}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{\alpha n_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad \dots 3$$

Donde α es el coeficiente de transferencia y n_a es el número de electrones en el paso de transferencia de carga. Por lo que E_p ocurre a valores mayores que E° , con sobrepotenciales relacionados con la constante estándar de velocidad (k°) y α , además el pico de corriente es dado por:

$$i_p = (2.99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad \dots 4$$

Siendo este parámetro proporcional a la concentración en el bulk, pero mostrando picos menos intensos (dependiendo del valor de α). Para sistemas cuasi reversibles (con valor de k° entre 10^{-1} y 10^{-5} cm s⁻¹) la corriente es controlada tanto por la transferencia de carga y el transporte de masa, además para estos sistemas la irreversibilidad aumentará conforme se aumente la velocidad de barrido.

CAPÍTULO V
PARTE EXPERIMENTAL

5.1. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

5.1.1. Equipos

- ✓ Sistema MILLIPORE MILLI Q PLUS con una resistividad de 18,2 M Ω .cm
- ✓ Potenciostato DropSens modelo uStat 400
- ✓ Microscopio de Barrido Electrónico (SEM) EMAX
- ✓ Espectrofotómetro UV/Vis
- ✓ Espectroscopio IR
- ✓ Agitador magnético

5.1.2. Materiales

- ✓ Celda de vidrio
- ✓ Electrodo de carbón vítreo
- ✓ Electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl 1,0 M)
- ✓ Alambre de platino
- ✓ Micropipetas
- ✓ Pastilla magnética

5.1.3. Reactivos

- ✓ Ácido metacrílico, Sigma Aldrich
- ✓ Dimetacrilato de etilenglicol, Sigma Aldrich
- ✓ 2,2- azobisisobutironitrilo, Sigma Aldrich
- ✓ Diuron, Sigma Aldrich
- ✓ Nafion, Sigma Aldrich
- ✓ Metanol, Merck
- ✓ Cloroformo, Merck
- ✓ Acetona, Merck
- ✓ Acetonitrilo, Merck
- ✓ K₂HPO₄ grado analítico, Merck
- ✓ KH₂PO₄ grado analítico, Merck

5.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

5.2.1. Soluciones buffer de fosfatos 0,1 M pH = 6.0, 7.0 y 8.0 (para 1,0 L de solución)

Se prepararon soluciones de KH_2PO_4 1,0 M y K_2HPO_4 1,0 M, de 100 mL cada uno, las cuales se utilizaron proporciones de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 4. Tabla de proporciones de soluciones de KH_2PO_4 1,0 M y K_2HPO_4 1,0 M para distintas soluciones buffer

Solución buffer	Volumen de KH_2PO_4 1,0M (mL)	Volumen de K_2HPO_4 1,0 M (mL)
pH 6,0	13,2	86,8
pH 7,0	61,5	38,5
pH 8,0	94,0	6,0

La solución fue diluida hasta 1,0 L con agua ultrapura.

5.2.2. Solución stock de diuron 2,0 mM

Para la preparación de la solución stock de diuron de 2,0 mM de concentración, se disolvió 4,7 mg del pesticida en 10mL de solución de acetonitrilo y agua 4:1 v/v y luego se aplicó ultrasonido hasta la disolución del pesticida en el solvente y se guardó a oscuridad a 4 °C.

5.3. PREPARACIÓN DEL POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESO (MIP) Y DEL POLÍMERO NO IMPRESO (NIP)

Para la preparación del polímero molecularmente impreso, 0,1 mmol de diuron y 0,5 mmol de ácido metacrílico fueron disueltos en 5,0 mL de cloroformo. La mezcla se mantuvo agitando durante 4 horas, consecuentemente, 2,0 mmol de dimetacrilato de etilenglicol y 0,03 mmol de 2,2-azobisisobutironitrilo fueron añadidos dentro del sistema, después la mezcla es nitrogenada por 5 min para remover el oxígeno, y se hizo reaccionar el sistema a 60 °C durante 24 horas, el producto obtenido fue secado a temperatura ambiente durante 24 horas, de la misma manera se preparó el NIP pero sin utilizar la molécula plantilla en el proceso, luego el sólido seco es molido y tamizado. (Ver Fig.14)

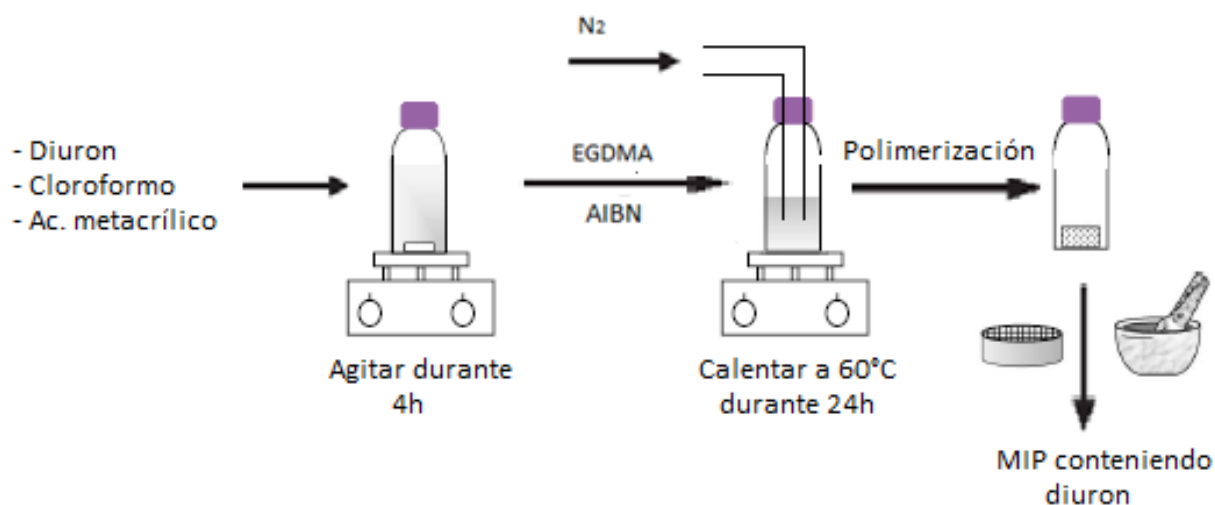


Figura 14. Ilustración esquemática de procedimiento de síntesis de MIP

5.4. PREPARACIÓN DEL SENSOR

Para la preparación del sensor se mezcló 4,0 mg del MIP con 400 μL de metanol y se aplicó ultrasonido durante 20 minutos, luego se tomaron 50 μL de la suspensión anterior y se mezclaron con 50 μL de Nafion[®]. Después se tomó 10 μL de la nueva suspensión y se depositó sobre un electrodo de carbón vítreo (GCE) dejándose secar durante 2 horas para la evaporación del solvente, de esta manera se obtuvo el electrodo de carbón vítreo modificado con MIP (GCE-MIP). De la misma forma se preparó el electrodo de carbón vítreo modificado con el polímero no impreso (GCE-NIP) para compararse con el GCE-NIP en los análisis consecuentes.



Figura 15. Fotografía del electrodo de carbón vítreo modificado

5.5. ENSAYOS Y TESTES DEL SENSOR

Entre las diversas técnicas electroanalíticas disponibles, en este trabajo se utilizó la voltamperometría cíclica (ver sección 4.6.1) para caracterizar el sensor propuesto y la voltamperometría de pulso diferencial para realizar análisis cuantitativos de diuron.

5.5.1. Sistema de análisis para determinación de diuron

Los ensayos del sensor (GCE-MIP) en solución de diuron (PBS, 0,1M, pH 8,0) fueron realizados en una celda de volumen de 10 mL y fueron utilizados electrodo de platino como electrodo auxiliar, electrodo de Ag|AgCl como electrodo de referencia y electrodo de carbón vítreo sin modificar (GCE) y modificados (GCE-MIP y GCE-NIP) como electrodos de trabajo, siendo acoplados a un potenciostato DropSens siendo el sistema mostrado en la figura 16.

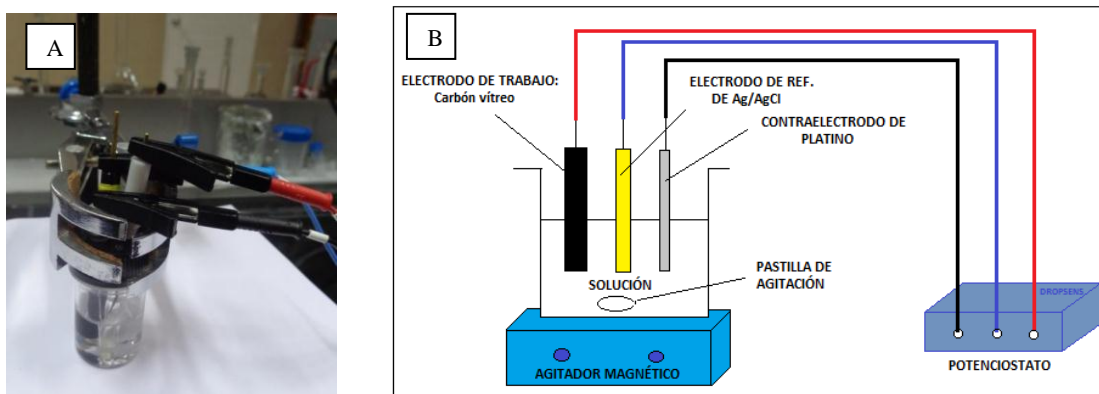


Figura 16. Fotografía de sistema de trabajo (A), esquema del sistema de trabajo (B)

En este sistema de prueba se añadieron 10,00 mL de solución buffer (electrolito) a la celda electroquímica y luego se realizó la remoción de diuron de los electrodos modificados por medio de voltamperometría cíclica utilizando las siguientes condiciones de trabajo:

Tabla 5. Condiciones de trabajo de la voltamperometría cíclica utilizados para la remoción del diuron del GCE-MIP

Parámetro	Valor
Rango de potencial	0,4 – 1,2 V vs Ag/AgCl
Velocidad de barrido	100 mV/s
Paso de potencial	0,01 mV
Número de barridos	50

Luego de ello se realizaron las medidas de determinación de diuron utilizando 10,00 mL de electrolito con volúmenes conocidos de solución patrón de diuron o de muestra conteniendo al analito fueran añadidos para llevar a cabo los experimentos electroquímicos, puesto que la corriente de oxidación resultante está relacionada con la concentración del analito en la celda de medición. Después de la adición del analito en la celda electroquímica la solución se agitó con la ayuda de una barra de agitación magnética durante 3 min y se dio paso a la medición por método de voltamperometría de pulso diferencial.

5.5.2. Voltamperometría de pulso diferencial

Esta es una técnica de pulso que ofrece ventajas como mayor intensidad de señal, mejor resolución del pico, medidas más rápidas y mayor sensibilidad, pudiendo su límite de detección ser comparado al de técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

En esta técnica, la forma de la onda en la señal de excitación, consiste en una serie de pulsos a manera de escalera, donde el potencial de base aumenta gradualmente en pequeños intervalos entre 10 y 100 mV (ancho de pulso= ΔE_s). La amplitud de pulso ΔE_p , se mantiene constante con respecto al potencial de base (Figura 17).

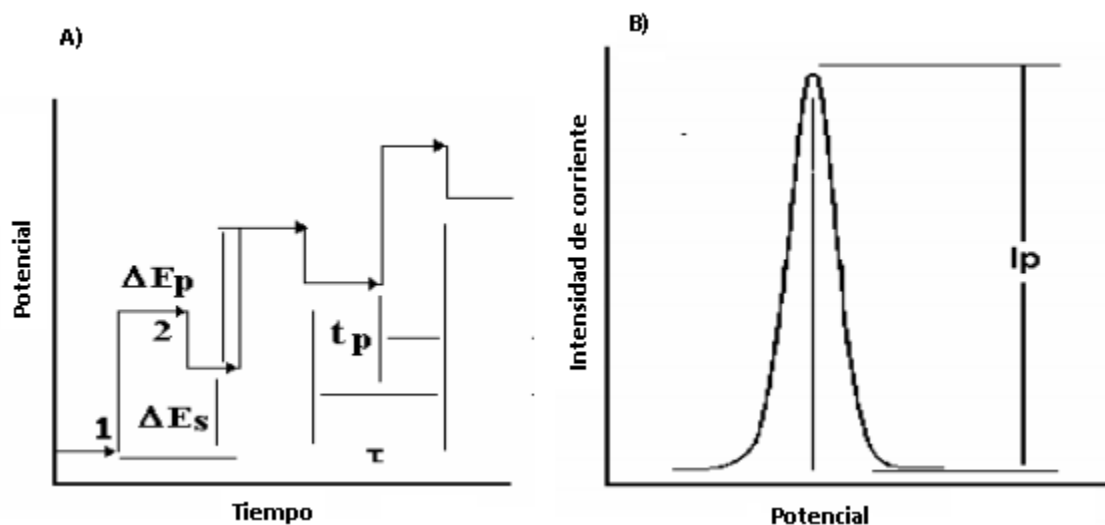


Figura 17. Señal de excitación aplicada en la voltamperometría de pulso diferencial (A), respuesta típica en la voltamperometría de pulso diferencial (B) (adaptado de referencia [45])

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. PREPARACIÓN DEL POLIMÉRO MOLECULARMENTE IMPRESO (MIP) Y POLÍMERO NO IMPRESO (NIP)

El MIP se prepara convencionalmente mediante el método conocido como polimerización en "bulk", en el que se realiza la reacción en un sistema homogéneo donde previamente se forma una interacción no covalente entre el monómero funcional y el analito. Esta reacción se llevó a cabo en viales sellados conteniendo el monómero funcional, el analito, agente entrecruzante e iniciador radicalario. La reacción se produjo en ausencia de oxígeno, ya que éste retarda la polimerización, por lo que se burbujeó gas nitrógeno en la solución para removerla, además que la reacción fue inducida por calentamiento. ^[46]

Cabe señalar que la selección de los componentes para la preparación del MIP depende principalmente del analito, en este trabajo se utilizó el diuron que es un compuesto del tipo fenilurea y cuya estructura se presenta en la figura 19, acorde a la figura, el diuron presenta grupos funcionales tales como grupo fenilo y grupo amida por donde el monómero funcional puede interactuar, acorde a esto se seleccionó el ácido metacrílico (MAA) además de ser uno de los más utilizados, posee grupo funcional carboxilato por el cual puede interactuar con el carbonilo (C=O) del grupo amida del diuron mediante interacción puente hidrógeno ^[46], no posee grupos estéricos cercanos que puedan impedir su interacción con el diuron, otorgándole gran afinidad con el diuron comparada con otros monómeros funcionales, esto demostrándose en estudios computacionales donde el ácido metacrílico muestra el mayor valor de energía de enlace frente a otros 19 monómeros y comprobándose de manera experimental ^[47].

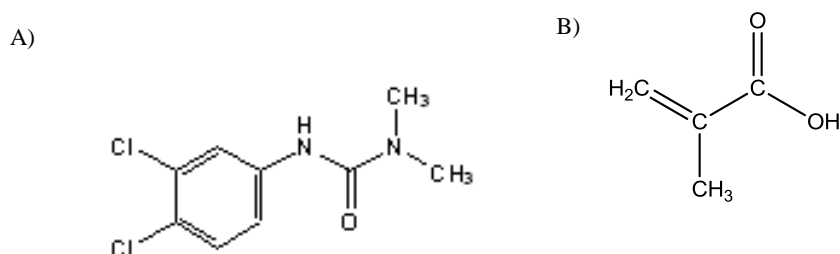


Figura 19. Estructura química del analito (A) y del monómero funcional (B) siendo el diuron y el ácido metacrílico respectivamente

La interacción entre el analito y el monómero funcional es clave para la selectividad del MIP hacia el analito, es ahí en donde la selección del disolvente porogénico toma importancia, ya que dicho solvente debe ser capaz de disolver al diuron y además no debe interferir en gran medida de la interacción entre éste y el monómero funcional, por lo que se seleccionó un solvente de baja polaridad como el cloroformo ya que no competiría en gran medida con la interacción no covalente entre ácido metacrílico y el diuron, esta interacción ocasiona que se forme un especie de complejo entre el ácido metacrílico y el diuron.^{[45],[47]}

Durante la síntesis del MIP, además de los parámetros importantes mencionados anteriormente, la selectividad de estos polímeros es también asegurada con el uso de reactivos que promueven enlaces entrecruzado en el polímero permitiendo de esta manera la estabilidad de complejo "analito-monómero funcional" y por lo tanto la rigidez de sitio selectivo formado ^[47], siendo el dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA) el agente entrecruzante utilizado ya que promueve la formación de polímeros térmica y mecánicamente estables vía co-polimerización con el monómero funcional.^[47]

6.2. CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESO (MIP) Y POLÍMERO NO IMPRESO (NIP)

Para averiguar si el diuron generaba diferencias estructurales y morfológicas en el polímero, fue realizado una serie de técnicas tales como microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopía IR y espectroscopía UV/Vis tanto al MIP como al NIP para realizar comparaciones, obteniéndose los siguientes resultados:

6.2.1. Caracterización por microscopia electrónica de barrido (SEM)

La morfología de MIP sin remover el diuron y NIP se examinó por SEM. Como se muestra en la Fig. 20 a y b, la MIP y NIP exhiben una morfología de forma irregular conformado por agregados de polímero en forma de hojas que tienen varios cientos de nanómetros de tamaño, tanto MIP y NIP poseen la misma morfología indicando que el diuron no afecta en la morfología del polímero.

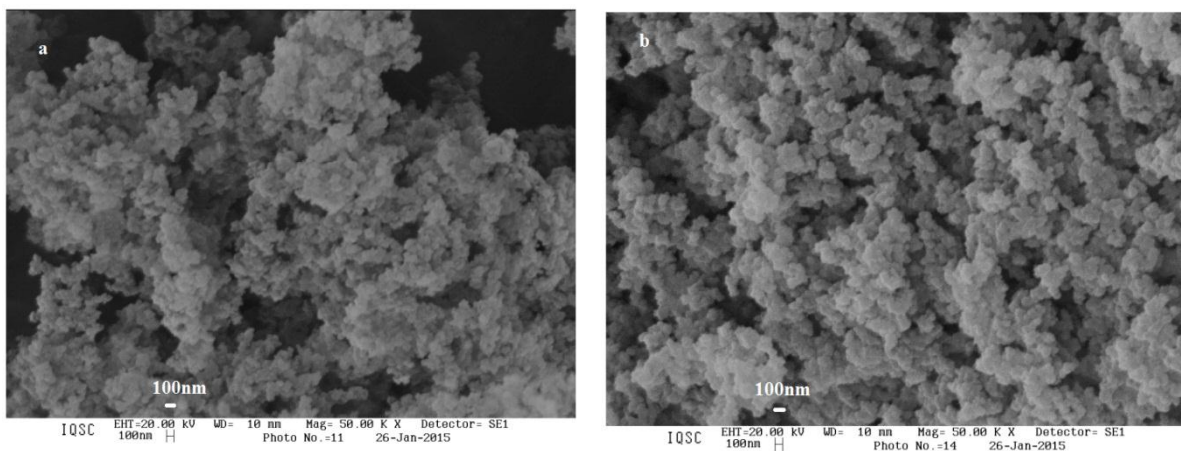


Figura 20. Imágenes SEM del MIP (a) y NIP (b) sintetizados (imágenes magnificadas 50 000 veces)

6.2.2. Caracterización por espectroscopía FTIR

Las estructuras moleculares de MIP y NIP se caracterizaron mediante espectroscopia FTIR, el contenido de los dobles enlaces carbono-carbono (C=C) restantes en el MIP o NIP es un indicio importante de su grado de polimerización, ya que no se observó ninguna banda de absorción presente en la región de 1648-1638 cm^{-1} , indica la ausencia de grupos vinilo en los materiales polimerizados ^[48]. Como se muestra en la Fig. 21, la banda de absorción en 2975 cm^{-1} y pico de absorción a 1457 cm^{-1} podría ser asignado a vibraciones de estiramiento y tijereteo del enlace C-H respectivamente de grupos metilo y metileno presentes en el polímero, el pico de absorción a 1720 cm^{-1} se atribuye a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo (C=O) y el pico de absorción a 1389 cm^{-1} se atribuye a vibraciones de deformación simétrica de enlaces C-H del grupo metilo ^[43], los resultados demuestran que tanto el MIP y NIP tienen estructura molecular similar.

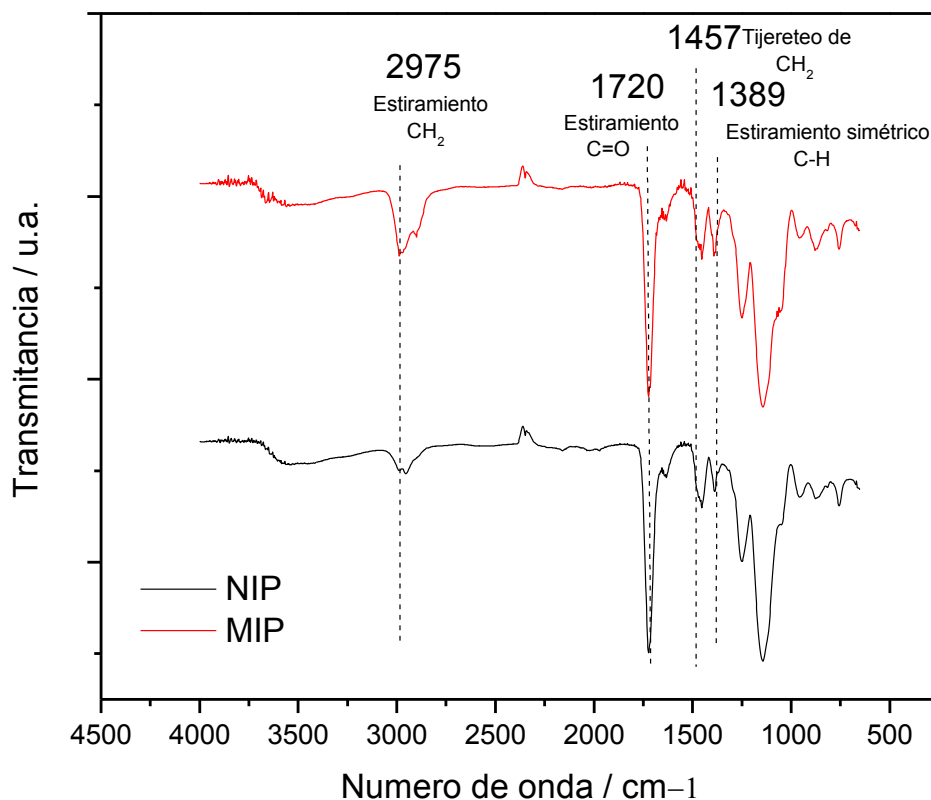


Figura 21. Espectro IR del MIP sin remover diuron (línea roja) y del NIP (línea negra)

6.2.3. Caracterización por espectrofotometría UV/Vis

Tanto el análisis FTIR y SEM demostró que la presencia de diuron no afectó a la estructura polimérica, entonces para demostrar la presencia del diuron en el MIP, parte de MIP se lavó con metanol / ácido acético (4: 1 v / v) y la solución de lavado fue analizado por espectroscopía UV / Vis, de acuerdo a la Fig. 22, un pico a 250 nm de longitud de onda correspondiente a la absorbancia del diuron presente en las soluciones de lavado ^[24] indican la presencia de diuron en la matriz polimérica.

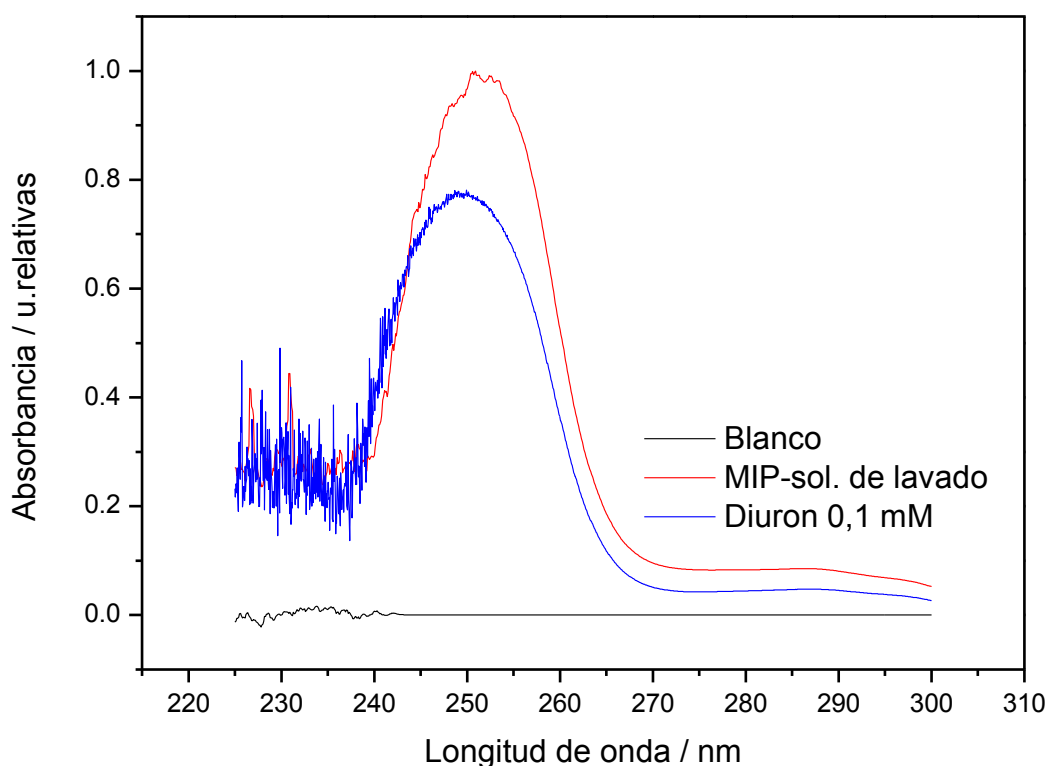


Figura 22. Espectro UV/Vis de solución de metanol-ac. Acético (4:1 v/v, a) sola (línea negra) y con diuron 0,1 mM (línea azul), además de la solución de lavado del MIP (línea roja)

6.3. ESTUDIO DEL SENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN POLÍMERO MOLECULARMENTE IMPRESO (MIP)

6.3.1 Remoción electroquímica del diuron del sensor preparado

El método convencional para la extracción de la molécula plantilla (diuron) es utilizando reactivos orgánicos o soluciones tampón como eluyente, sin embargo, es mucho tiempo y la molécula plantilla no se puede eliminar por completo. Dado que la oxidación de diuron es químicamente irreversible ^[27], las moléculas de diuron podrían ser removidas fácilmente de los sitios de unión del MIP durante la reacción electroquímica. En este trabajo, se realizó voltamperometría cíclica para extraer moléculas de diuron a partir de los polímeros impresos como se observa en la Fig. 23a, en la disminución del pico oxidación a 1,09 V perteneciente a la oxidación irreversible del diuron, por lo tanto el diuron podría ser purgado de manera rápida y completa.

Para la comparación, también se realizó voltamperometría cíclica al GCE-NIP (Figura 23b) el cual no muestra ningún pico de oxidación, además que las medidas electroquímicas se llevaron a cabo en solución buffer libre de diuron por lo que esto implicaba que los picos de oxidación fueron enteramente debido a la oxidación del diuron incrustado dentro de la película del polímero impreso.

Además se observa de la Fig.23a, que el pico de oxidación va reduciéndose con el pasar de los ciclos confirmándose la remoción del diuron, este tipo de prueba también demostraría la presencia del diuron en la estructura polimérica del MIP, del cual no se logró confirmar con el análisis FTIR.

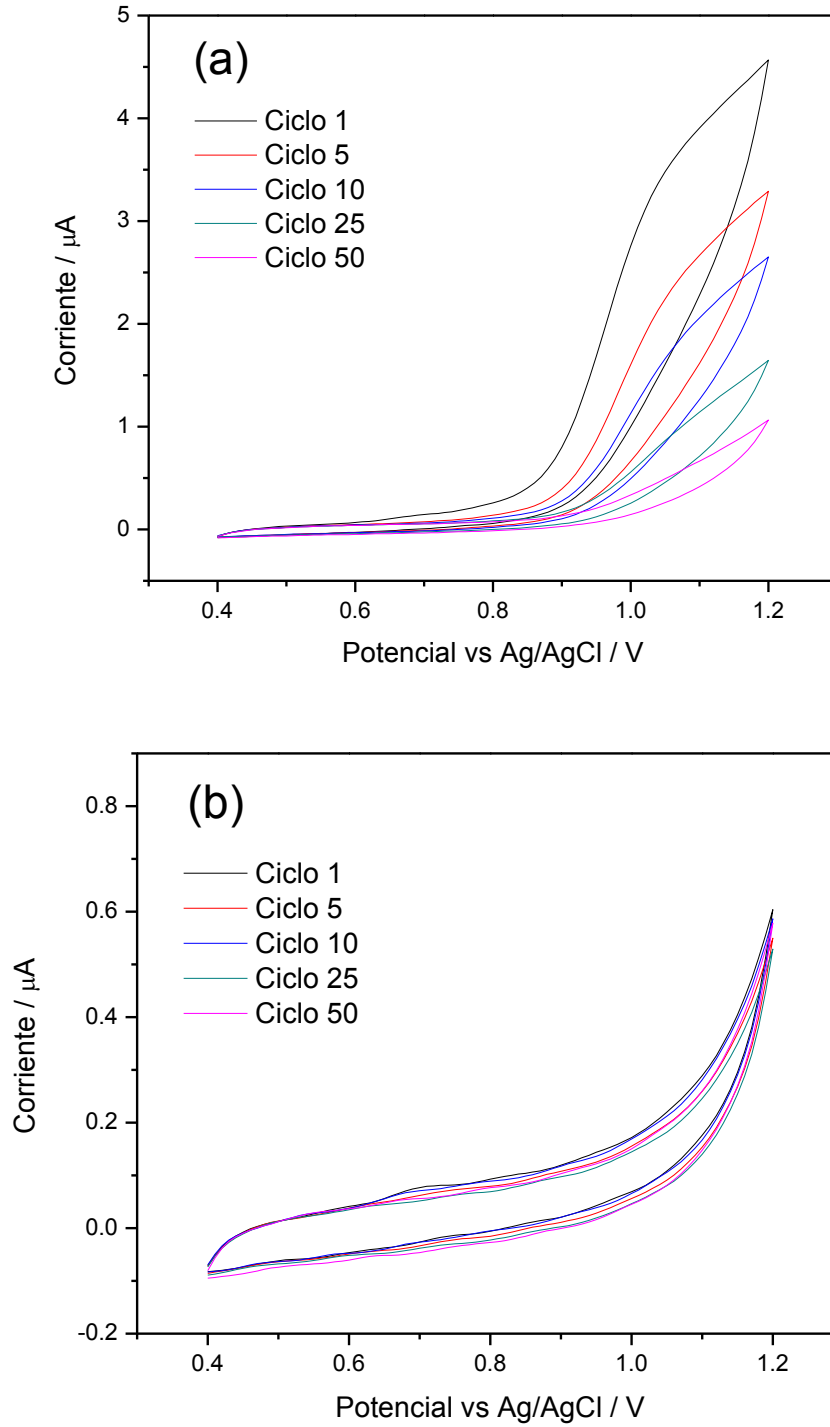


Figura 23. Voltamperograma cíclico del GCE-MIP (a) y GCE-NIP (b) en solución buffer de fosfatos 0,1 M pH 8,0. Velocidad de barrido: 100 mVs⁻¹

6.3.2. Caracterización electroquímica del sensor a través de estudios voltamperométricos

En primer lugar, la caracterización electroquímica del sensor propuesto en presencia de diuron se llevó a cabo utilizando voltamperometría cíclica (Fig. 24), con el fin de evaluar el efecto catalítico de los polímero preparados en la respuesta del sensor por lo que se compararon de los voltamperogramas cíclicos obtenidos del electrodo de carbón vítreo en solución tampón de fosfatos (electrolito) y en una solución que contiene diuron reveló un pico de oxidación que se da aproximadamente a 0,97 V producto de la oxidación irreversible del diuron ^[47], además se comparó la respuesta que presentaba dicho electrodo al diuron frente a los respectivos electrodos de carbón vítreo cuando son modificados por el polímero molecularmente impreso (GCE-MIP) y el polímero no impreso (GCE-NIP), donde se logra observar que el proceso de oxidación se da potenciales un poco mayores (1.00 V) pero muy cercanos al que se presenta en electrodo de carbón vítreo, en el caso del GCE-NIP el aumento se da en menor medida esto pueda deberse a la pre-concentración del analito en los poros de la película polimérica, caso que ocurriría también en la película del GCE-MIP con la diferencia que los valores de corrientes de oxidación son aún mayores dando indicio a que el proceso es catalizado debido a la afinidad que existe entre el hueco selectivo y el analito.

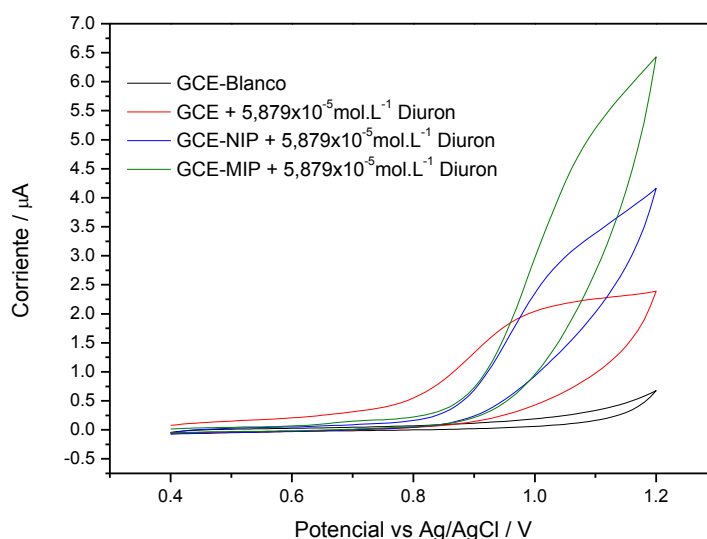


Figura 24. Voltamperogramas cíclicos del GCE en solución buffer de fosfatos 0,1 M pH 8,0 (línea negra) y conteniendo de $5,879 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de diuron (línea roja) comparado con el GCE-NIP (línea azul) y GCE-MIP (línea verde) a la misma concentración de diuron

Para verificar si hay un aumento regular y significativo en la corriente anódica con diferentes concentraciones de diuron, la Figura 25 muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos a diferentes concentraciones de diuron. De la Figura 25 se puede ver claramente que el aumento se produce sólo en la corriente anódica, confirmándose que es un proceso irreversible.

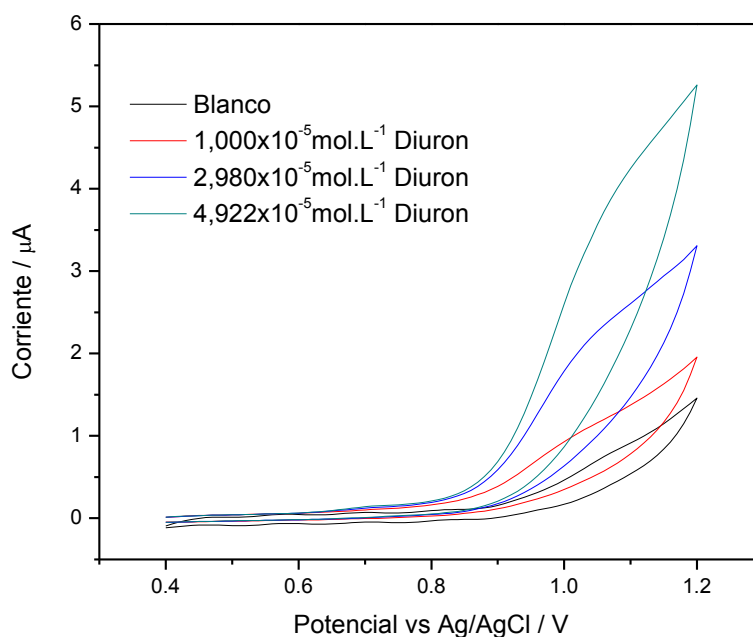


Figura 25. Voltamperogramas cíclicos para el sensor modificado GCE-MIP a diferentes concentraciones de diuron. Blanco: solución buffer de fosfato 0,1 M (pH 8,0), $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Es conocido que un sistema catalítico se comporta como un sistema electroquímico controlado por difusión ^[49], y para verificar este hecho, se evaluó el proceso de oxidación del diuron sobre la superficie del sensor a diferentes velocidades de barrido y los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 26 y 27 .

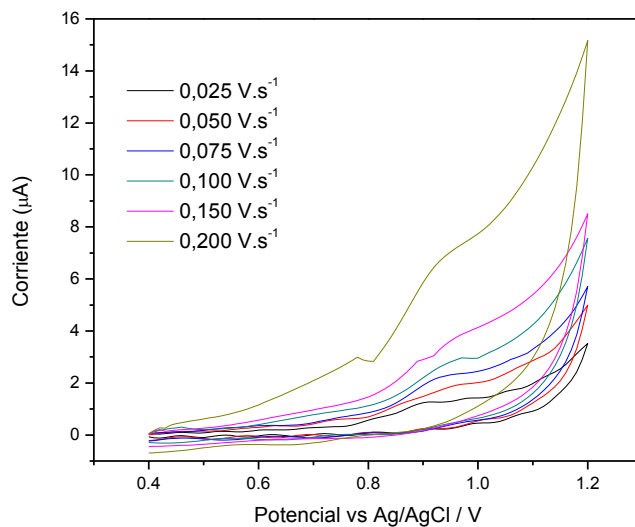


Figura 26. Voltamperogramas cíclicos del GCE-MIP en solución buffer de fosfatos 0,1 M (pH 8,0) conteniendo $2,980 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de diuron realizado a distintas velocidades de barrido

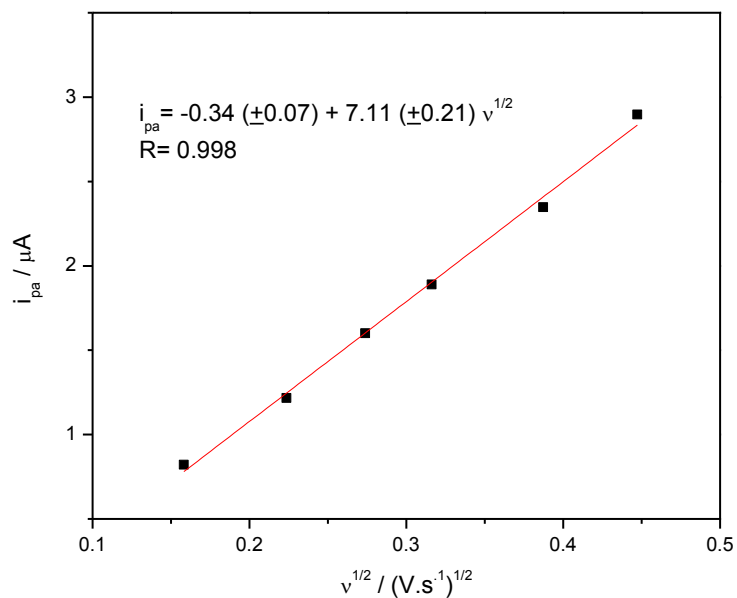


Figura 27. Variación de corriente de pico anódico (i_{pa}) vs $v^{1/2}$ del electrodo modificado con MIP (GCE-MIP) proveniente del voltamperograma anterior.

Se puede observar que existe una dependencia lineal entre la corriente de pico anódico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido en el rango de 0,025 a 0,200 V.s^{-1} , lo que indica que la oxidación del diuron en la superficie del sensor es controlada por difusión de la especie a la superficie del electrodo.

6.3.3. Optimización del sensor

Para el estudio de optimización del sensor para diuron fue empleada la voltimetría de pulso diferencial (siglas en inglés: DPV), en estos estudios se eligieron los parámetros que permiten obtener una mayor sensibilidad, estabilidad y selectividad de las medidas. Para esto, se ha optimizado los parámetros como el pH así como los parámetros que involucran a la misma técnica, acorde a la siguiente tabla.

Tabla 6. Parámetros evaluados durante la optimización del sensor electroquímico propuesto

Parámetros	Rango de valores
pH	6,0 – 8,5
Potencial de paso (Estep) / V	0,01 – 0,02
Potencial de pulso (Epuls) / V	0,025 – 0,100
Tiempo de pulso (tpulso) / ms	10 – 20

Acorde a los estudios sobre pH, el potencial del pico anódico depende del pH de la solución buffer, acorde a la figura 28:

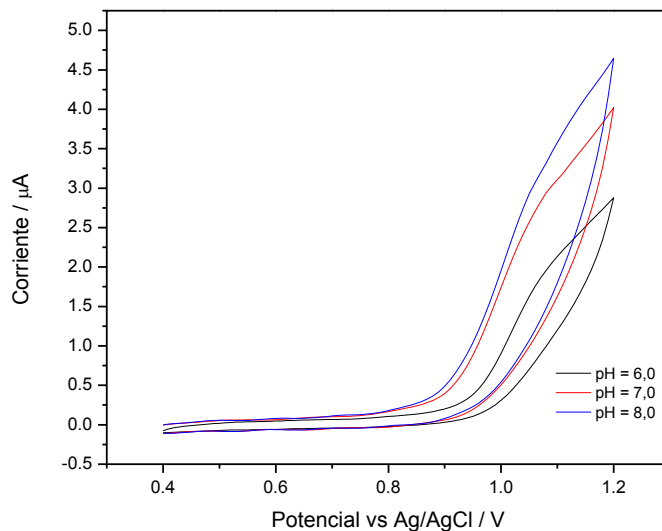


Figura 28. Efecto del pH en la respuesta del sensor electroquímico GCE-MIP a diuron en buffer de fosfatos 0,1 M

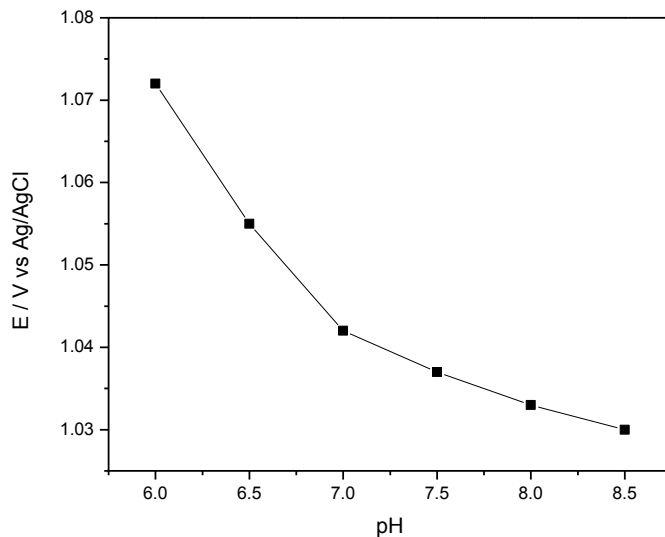


Figura 29. Relación que existe en la respuesta del sensor entre el potencial y el pH

Acorde a la figura 28 se muestra como varia el voltamperograma del diuron dependiendo del pH, observamos que a pH ácidos el potencial del pico tiende a ser más positivos, asimismo se observa en la figura 29 la relación entre pH y el potencial es de forma inversa, al aumentar el pH el potencial del pico anódico se desplaza a potenciales negativos, también puede observarse que existe un aumento en la corriente catódica, esto acorde al comportamiento electroquímico del diuron ya que en su proceso de oxidación depende del pH^[28] como se muestra en la reacción:

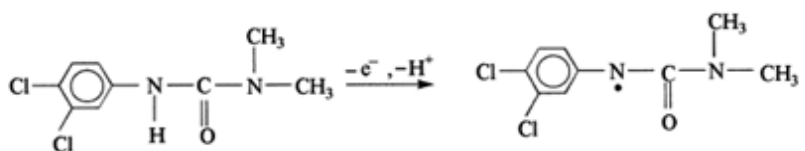


Figura 30. Proceso de oxidación del diuron (adaptado de referencia [28])

Como observa en la figura el aumento de pH favorece a la oxidación del diuron tornándose en un aumento del pico de oxidación del diuron cuando se aumenta el pH, por lo que se escogió el pH = 8,0 un valor adecuado para análisis, ya que aparte de que a mayores pH favorece el proceso de oxidación también aumentaría la rapidez con el que se degrada el diuron en solución^[2].

Para el estudio de los parámetros de la voltametría de pulso diferencial, se realizó utilizando el programa Minitab 16.0, tomándose como factores y niveles alto y bajo del rango de valores los ya indicados en la tabla 6:

Tabla 7. Lista de parámetros para experimentos de optimización

N° condición	Ancho de pulso (E_{step}) / V	Amp. de pulso (E_{puls}) / V	t_{puls} /ms
1	0,010	0,025	10
2	0,010	0,025	20
3	0,010	0,100	10
4	0,010	0,100	20
5	0,020	0,025	10
6	0,020	0,025	20
7	0,020	0,100	10
8	0,020	0,100	20

Por lo que realizó esta serie de experimentos de las cuales se corrieron de manera aleatoria y por triplicado obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 8. Sensibilidad y potencial de oxidación máxima obtenidas en distintas condiciones de la voltametría de pulso diferencial

	Sensibilidad ($\times 10^5 \mu A.L.mol^{-1}$)	Potencial de oxidación máxima (V)
1	0,207 \pm 0,189	1,049 \pm 0,048
2	0,328 \pm 0,367	1,109 \pm 0,051
3	1,064 \pm 0,947	1,070 \pm 0,189
4	1,578 \pm 0,042	1,084 \pm 0,031
5	0,238 \pm 0,378	1,112 \pm 0,160
6	0,237 \pm 0,135	0,898 \pm 0,005
7	1,402 \pm 1,146	1,074 \pm 0,050
8	1,436 \pm 1,537	1,094 \pm 0,127

De la tabla anterior se observa las sensibilidades y el potencial de oxidación máximas obtenidas en los experimentos observándose que la condición N°4 (resaltado con rojo) correspondiente a amplitud pulso (Epuls) de 0,100 V; ancho de pulso (Estep) 0.010 V y tiempo entre un medida y otra (tpuls) de 20ms posee las medidas valor con mayor sensibilidad y con potencial máximo de oxidación de menor variación de los experimentos realizados, por lo que se tomó como el valor óptimo para los siguientes análisis.

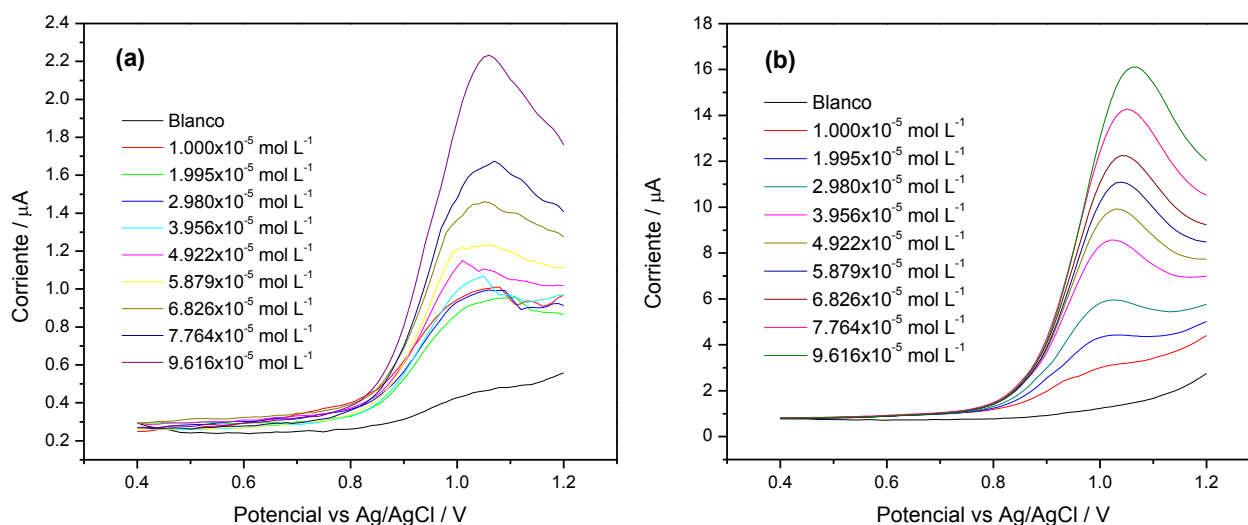


Figura 31. Respuesta en DPV para diuron con la menor (a) y mayor (b) sensibilidad. Medidas llevadas a cabo en 0,1 mol L⁻¹ buffer de fosfatos (pH 8,0), Estep = 0,010 V, Epuls = 0,025 V, tpuls = 10 ms y Estep = 0,010 V, Epuls = 0,100 V, tpuls = 20 ms respectivamente

Esto puede observar claramente en la figura 31, donde se observa las respuestas obtenidas por voltametría de pulso diferencial a diferentes condiciones, uno que se obtuvo con el de menor sensibilidad, que además se logra observar tiene menor resolución y menor grado de correlación que en el otro caso el cual demuestra mejor resolución y grado de correlación.

6.3.4. Perfil de respuesta del sensor

Fue utilizado la voltimetría de pulso diferencial, previamente optimizado los parámetros de la técnica (Estep = 0.010V, Amplitud = 0.100 y tpuls = 20ms), debido a que es una técnica que mide la variación de corriente antes y después del pulso de potencial, esto ocasiona que se logre discriminar la corriente no faradaica, lo que la vuelve una técnica sensible y rápida. Acorde a la figura 32, el electrodo modificado con MIP (GCE-MIP) presenta un comportamiento lineal de respuesta al diuron en el rango de 1.000 a 9.616 x10⁻⁵ mol.L⁻¹, el cual fue comparado en el mismo rango con el electrodo modificado con el polímero no impreso (GCE-NIP) :

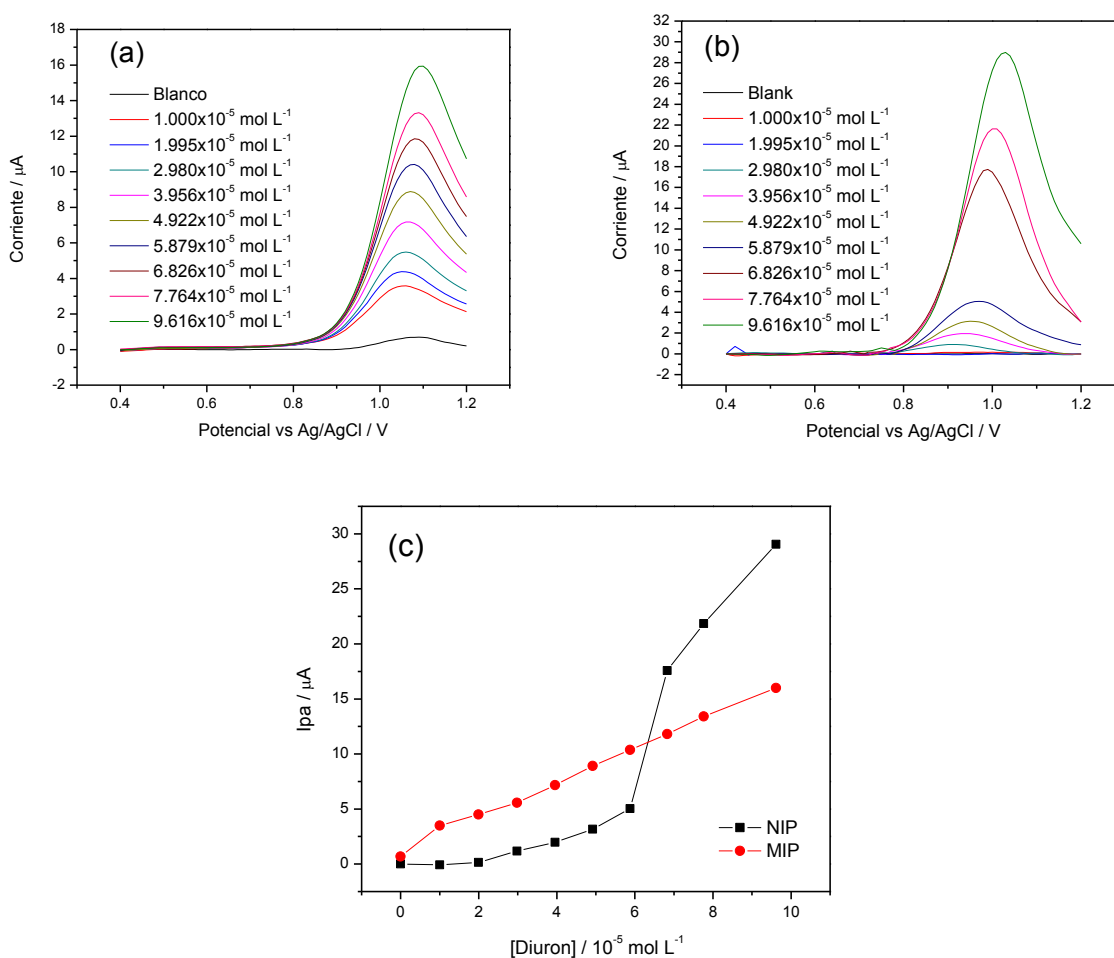


Figura 32. Respuesta de DPV en diuron en solución de buffer de fosfatos 50 mM (pH 8.0), en concentraciones de 0 a 9,616x10⁻⁵ mol.L⁻¹ usando GCE-MIP (a) y GCE-NIP (b). Estep = 0.010V, Amplitud = 0.100 y tpuls = 20ms y la comparación (c) entre GCE-MIP (línea roja) y GCE-NIP (línea negra)

Se observa en la figura 32 que el GCE-MIP presenta mayor respuesta que el GCE-NIP hasta concentración de diuron de $5,879 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, lo que demuestra que en ese rango la afinidad que existe entre las impresiones moleculares del MIP y el diuron ocasiona que este difunda hasta la superficie del electrodo como consecuencia de una pre-concentración del analito previa a la medida que ocasiona el aumento de la sensibilidad ^[47].

Además se observa que a concentraciones mayores de la señalada, el GCE-NIP muestra mayor respuesta que el GCE-MIP, esto debido a que inicialmente en el polímero no impreso (debido a que en su preparación no se utilizó el diuron) no presenta impresiones moleculares selectivas al analito pero aun así presenta cierta porosidad por el cual se puede difundir cierta cantidad del diuron, y que con el aumento de su concentración, la película polimérica empieza a saturarse a tal punto que permite el paso del diuron a la superficie del electrodo, esto se logra observar ya que a concentraciones bajas la corriente no presenta correlación lineal con la concentración pero luego de la saturación empieza a mostrar una tendencia lineal indicando una libre difusión del diuron. ^[49]

Tomando en cuenta este suceso, la curva de calibración se realizó en el rango de 1,000 a $5,879 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. El cálculo del límite de detección fue realizado a partir de la curva de calibración de los datos de la figura 32.

$$\Delta i (\mu\text{A}) = 1,22(\pm 0,30) + 1,55(\pm 0,09)[\text{Diuron}]$$

Los límites de detección y cuantificación fueron $0,58 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ y $1,93 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ respectivamente, el límite de detección se calculó a partir de la relación 3 S/N ^[45], donde S/N corresponde a la relación señal / ruido de la señal. Sin embargo, el límite de cuantificación se calculó que era 3,3 veces el límite de detección o sea 10 S/N ^[45].

Aunque actualmente en el gobierno peruano todavía no se establece un límite máximo permitido de diuron en el agua, la IUPAC en un reporte técnico publicado en el 2003, indica que tanto la Organización Mundial de la Salud como varios gobiernos tales como Nueva Zelanda, Canadá y Australia, consideran límites permisibles del diuron en valores entre 20 a 150 $\mu\text{g/L}$ ^[50], en la cual entra en el rango de medición de nuestro sensor (límite de cuantificación de $1,93 \times 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$ que equivale a 4,53 $\mu\text{g/L}$ de diuron aproximadamente) por lo que se considera que el método de medición de diuron dado por el sensor electroquímico preparado es aceptable.

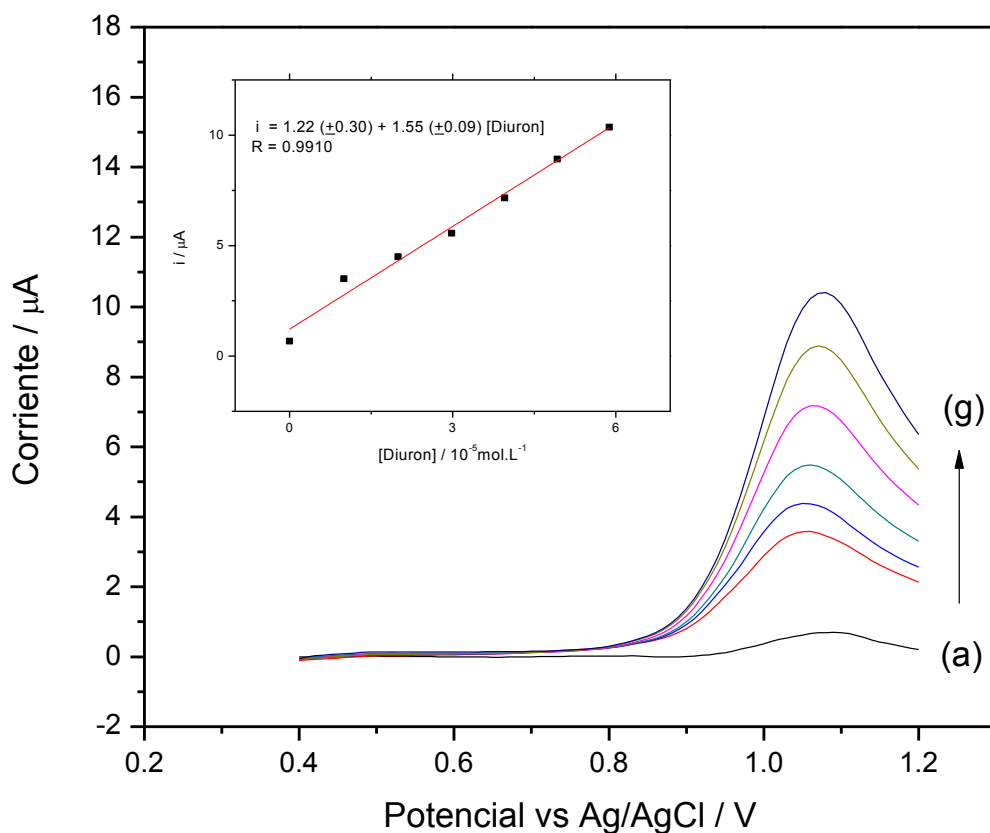


Figura 33. Respuesta en DPV para diuron en condiciones optimizadas. Medidas llevadas a cabo en 0.05mol.L^{-1} buffer de fosfatos (pH 8,0), Estep = 0.010V, Amplitud = 0.100 y tpuls = 20ms. (a) $0,05 \text{mol.L}^{-1}$ buffer de fosfatos (pH 8,0); electrolito conteniendo (b) $1,000 \times 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$; (c) $1.995 \times 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$; (d) $2.989 \times 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$; (e) $3.956 \times 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$; (f) $4.922 \times 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$ y (g) $5.879 \times 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$ de diuron.

6.3.5. Estudio de selectividad

La selectividad del sensor para la detección diuron se evaluó mediante la observación de su respuesta a 2 pesticidas y urea las cuales son solubles en solución de agua / acetonitrilo (1: 4 v/ v). De los plaguicidas analizados, el sensor presenta respuesta sólo para diuron (Fig. 33), este hecho puede explicarse tomando en consideración que el potencial utilizado fue tomado de las condiciones previamente optimizadas para la determinación de diuron y no para los otros pesticidas. Para el plaguicida organofosforado como el glifosato y para el plaguicida carbamato como el oxamyl, que tienen estructuras químicas muy diferentes a la del diuron, no se observa ninguna respuesta, ya puede que sus potenciales de oxidación puedan ser diferentes a de análisis, pero a pesar de ello no afectan en la intensidad de la señal analítica del diuron, ya que según la gráfica la señal para el diuron no hay variado en gran medida ya sea antes o después de haberse agregados los interferentes, lo mismo ocurre para la úrea que a pesar de ser una molécula que posee grupos amino por el que puede interactuar con las grupos funcionales del hueco selectivo del MIP y ser una molécula más pequeña que el diuron, esto no afecta en la señal analítica que presenta el diuron, esto demostraría la selectividad al diuron acorde a los grupos funcionales y distribución espacial de los huecos.

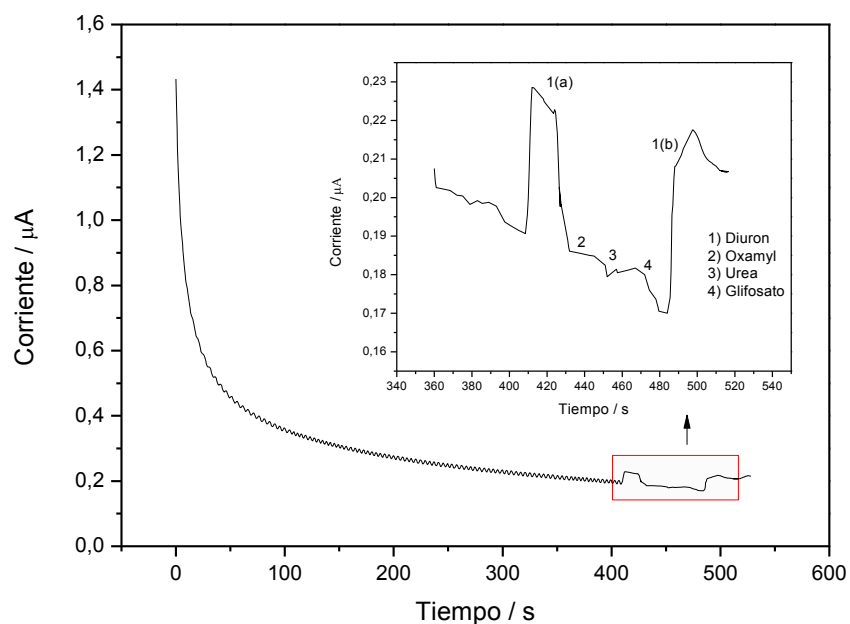


Figura 34. Perfil amperométrico obtenido por adiciones de diferente compuestos con concentración de $2.980 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, donde diuron se agregó antes (a) y después (b) de añadir los interferentes.

Potencial aplicado: 1.080 V

6.4. APLICACIÓN: DETERMINACIÓN DE DIURON EN MUESTRA DE AGUA POTABLE

El sensor se evaluó mediante la cuantificación de diuron en muestra de agua potable obtenida del caño del laboratorio de electroquímica aplicada, la cual fue fortificada con concentración final de diuron de $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ para su análisis por voltamperometría de pulso diferencial, el resultado se obtuvo utilizando el método de adición estándar (figura 35).

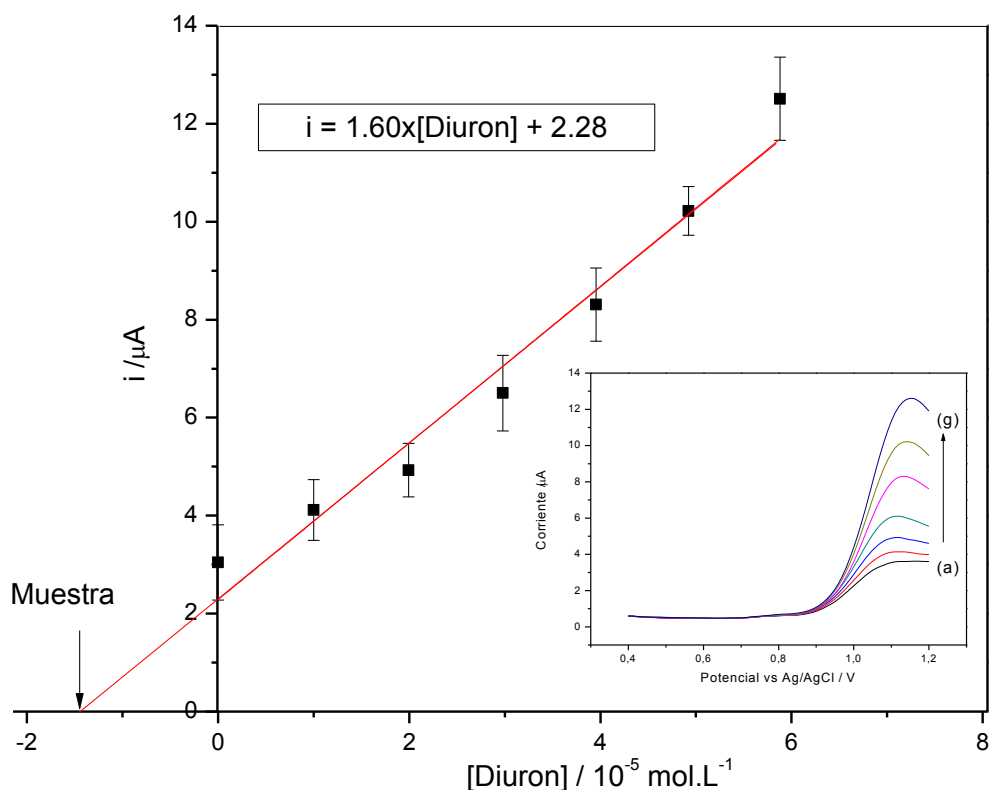


Figura 35. Aplicación del método de adición estándar para la cuantificación de diuron en agua potable por DPV. Condiciones analíticas: Estep = 0,010V, Amplitud = 0,100 y tpuls = 20ms; $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ buffer de fosfatos (pH 8,0); [diuron] = (a) desconocida, (b) $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (c) $1,995 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (d) $2,980 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (e) $3,956 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (f) $4,922 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, (g) $5,879 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

Como se muestra en la tabla 9, el análisis en una muestra fortificada determinó que la recuperación fue de 95% en muestra de agua potable, indicando que el efecto matriz causado por otros componentes que pueda poseer la muestra no es significativo en la determinación de diuron.

Tabla 9. Resultado obtenido de la muestra de agua potable

Muestra	[Diuron] / $\times 10^{-5}$ mol.L ⁻¹		Recuperación (%)
	Añadida	Encontrada (RSD)	
Agua potable	1,50	1,42 (3,45)	95

CAPÍTULO VII
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS
A FUTURO

CONCLUSIONES

- Se logró construir un sensor electroquímico modificando el electrodo de carbón vítreo añadiendo una suspensión del polímero molecularmente impreso preparado por método de drop-coating.
- El polímero molecularmente impreso (MIP) y el polímero no impreso (NIP) fueron caracterizados y comparados por espectroscopía FTIR y por SEM demostrándose que ambos polímeros poseen estructura y morfología similar mientras que los análisis por espectroscopía Uv/Vis y por voltamperometría cíclica demostraron la presencia del diuron en el MIP sintetizado haciéndola diferenciar del NIP.
- Se caracterizó electroquímicamente demostrando que el proceso de oxidación del diuron en el electrodo modificado es irreversible y controlado por la difusión, además se determinó que la respuesta del sensor tiene un intervalo lineal entre $1,000 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ y $5,879 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, con un límite de detección y de cuantificación de $0,58 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ y $1,93 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ respectivamente, además acorde a la IUPAC, muestra límites máximos permitidos para el diuron que puede lograr medirse con nuestro sensor preparado.
- El sensor presentó selectividad al diuron frente a interferentes como el glifosato, oxamyl y urea, los cuales no han afectado en gran medida en la respuesta del sensor.
- Se determinó diuron en muestras de agua potable fortificadas con el analito obteniéndose valores de recuperación de 95% observándose que no hay un gran efecto matriz en la determinación de diuron.

PERSPECTIVAS A FUTURO

- A pesar que se logró construir un sensor electroquímico modificando el electrodo de carbón vítreo añadiendo una suspensión del polímero molecularmente impreso preparado por método de drop-coating, se desea utilizar otros tipos de electrodos tales como electrodos serigrafiados de carbono nanoestructurados, las cuales ya han mostrado tener mejores propiedades eléctricas y catalíticas, además que son pequeños y de fácil uso, lo que ayudaría aumentar la sensibilidad de nuestro sensor y que sea utilizado de manera industrial.
- Aunque se utilizó el método de voltamperometría de pulso diferencial para el análisis del diuron, se espera realizar mediciones por cronoamperometría ya que es un método dinámico que nos permitirá medir al diuron con métodos de análisis por inyección de flujo.
- El sensor presentó selectividad al diuron frente a interferentes como el glifosato, oxamyl y urea, los cuales no han afectado en gran medida en la respuesta del sensor, y se espera comparar con más pesticidas de similar estructura.

REFERENCIAS

- [1] J. S. C. Wessels y R. Van der Veen, The action of some derivatives of phenylurea and of 3-phenyl-1,1-dimethylurea on the Hill reaction. *Biochem. Biophys. Acta.* Volumen 19. 1956. Pág 548.
- [2] S. Giacomazzi, N.Cochet. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere.* Volumen 56. 2004. Págs: 1021 - 1032
- [3] T. Prichard, J. Troiano, J. Marade, F. Guo, M. Canevari. Movement of Diuron and Hexazinone in Clay Soil and Infiltrated Pond Water. *J. Environ. Qual.* Volumen 34. 2005. Págs: 2005-2017
- [4] G. S. A. Ferdandes, A. C. Arena, C. D. B. Fernandez, A. Mercadante, L. F. Barbisan, W. G. Kempinas. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod. Toxicol.* Volumen 23. 2007. Págs: 106 – 112
- [5] A. Wong et al. Sensor for diuron quantitation based on the P450 biomimetic catalyst nickel (II) 1,4,8,11,15,18,22,25 – octabutoxy – 29H, 31H – phthalocyanine. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* Volumen 690. 2013. Págs: 83 – 88
- [6] A.M. Rodrigues, V. Ferreira, V.V. Cardoso, E. Ferreira, M.J. Benoliel. Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* Volumen 1150. 2007. Págs: 267–278.
- [7] C. Lourencetti, M.R.R. Marchi, M.L. Ribeiro. Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV. *Talanta.* Volumen 77. 2008. Pág: 701.

- [8] P. Sharma, S. Gandhi, A. Chopra, N. Sekar, C.R. Suri, Fluoroimmunoassay based on suppression of fluorescence self-quenching for ultra-sensitive detection of herbicide diuron. *Anal. Chim. Acta.* Volumen 676. 2010. Págs: 87–92.
- [9] A.R. Solangi, S.G. Memon, A. Mallah, N. Memon, M.Y. Khuhawar, M.I. Bhangar, Development and implication of a capillary electrophoresis methodology for ciprofloxacin, paracetamol and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations and simultaneously in human urine samples. *Pak. J. Pharm. Sci.* Volumen 24. 2011. Págs: 539–544.
- [10] T. Mugadza, T. Nyokong, Facile electrocatalytic oxidation of diuron on polymerized nickel hydroxo tetraamino-phthalocyanine modified glassy carbon electrodes. *Talanta.* Volumen 81. 2010. Págs: 1373–1379.
- [11] M.C. Blanco - López, M.J. Lobo – Castañón, A.J. Miranda – Ordieres, P. Tuñón – Blanco. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *Trends in Analytical Chemistry.* Volumen 23. Nro 1. 2004. Págs: 36 – 48.
- [12] T. A. Sergeyeva, S. A. Piletsky, A. A. Brovko, E. A. Slichenko, L. M. Sergeeva y A. V. El'skaya. Selective recognition of atrazine by molecularly imprinted polymer membranes. Development of conductometric sensor for herbicide detection. *Anal. Chim. Acta.* Volumen 392. 1999. Págs: 105 - 111
- [13] T. Panasyuk-Delaney, V. M. Mirsky, M. Ulbricht and O. S. Wolfbeis. Impedometric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta.*, Volumen 435. Nro 1. 2001. Págs: 157 – 162
- [14] T. Panasyuk-Delaney, V. M. Mirsky, O. S. Wolfbeis. Capacitive creatinine sensor based on molecularly imprinted polymer. *Electroanalysis.* Volumen 14. 2002. Págs: 221 -224

- [15] A. Galli; D. De Souza; G. S. Garbellini et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. *Química Nova*, Vol.29, Nro 1. 2006. Págs 105 - 112
- [16] A.L. Dos Santos. Desenvolvimento de Sistema biomimético para análise de 3,5,6-TRICLORO-2-PIRIDINOL, o principal metabolito do clorpirifós. Dissertação de Mestrado em Química. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Campus de Araraquara. 2012. Págs: 21 - 44
- [17] <http://www.peruopportunity.org/es/resources/diagnostico-de-la-agricultura-en-el-peru>
- [18] Y. Montoro, R. Moreno, L. Gomero, M. Reyes. CARACTERÍSTICAS DE USO DE PLAGUICIDAS QUÍMICOS Y RIESGOS PARA LA SALUD EN AGRICULTORES DE LA SIERRA CENTRAL DEL PERÚ. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. Volumen 26. Nro 4.2009. Págs: 466-472
- [19] F. Faostat. Statistical Databases. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009
- [20] CONAM, DIGESA, SENASA. Inventario Nacional de Plaguicidas COP. 2006. Págs: 7-11
- [21] O. Ortiz. Evolution of agricultural extension and information dissemination in Peru: An historical perspective focusing on potato-related pest control. *Agriculture and Human Values*. Volumen 23. Nro 4. 2006. Págs: 477- 489
- [22] CONAM, DIGESA, SENASA. Plan Nacional del Convenio de Estocolmo sobre los Contaminantes Orgánicos Persistentes. 2007. Pág: 53

- [23] S. R. Sorensen et. al. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiology Ecology*. Nro 45.2003. Págs: 1 – 11
- [24] A.H. Kamel, F.M. Al Romian. Man tailored biomimetic sensors of molecularly imprinted polymers for selective recognition of some phenylurea herbicides and their application to potentiometric transduction. *International Journal of Chemistry and Material Science*. Vol. 1. Nro 1. 2013. Págs: 1 – 12
- [25] J.P. Hosler, C.F. Yocum, Regulation of Cyclic Photophosphorylation during Ferredoxin-Mediated Electron Transport. *Plant Physiology*. Volumen 83. Nro 4. Págs: 965 - 969
- [26] G. Espinoza, J. Morales. *CATÁLOGO DE HERBICIDAS-Productos utilizados en la industria azucarera*. Centro guatemalteco de investigación y capacitación de la caña de azúcar. Pág: 16
- [27] G. Byzynski Soares, W.T. Lopes da Silva, C.M. Pedro Vaz1. Graphite-Polyurethane Composite Electrode for the Electroanalytical Determination of Herbicide Diuron in Soil Solutions. *Sensor Letters*. Volumen 9. 2011. Págs: 1 – 8.
- [28] K. Macounova, J. Klima, C. Bernard, C. Degrand. Ultrasound-assisted anodic oxidation of diuron. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Volumen 457. 1998. Págs: 141–147
- [29] Wyoming Department of Agriculture. Pesticides in Ground Water - Albany County, Wyoming, 2003-04. 2005. <http://pubs.usgs.gov/fs/2005/3087/>
- [30] P.S. Sharma et al. Molecular imprinting for selective chemical sensing of hazardous compounds and drugs of abuse. *Trends in Analytical Chemistry*. Volumen 34. 2012. Págs: 59 – 77

- [31] J.A. Field, R.L. Reed , T.E. Sawyer ,Madelyn Martinez. Diuron and Its Metabolites in Surface Water and Ground Water by Solid Phase Extraction and In-Vial Elution. *J. Agric. Food Chem.* Volumen 45. Nro 10.1997. Págs: 3897–3902
- [32] M. Stoytcheva. *PESTICIDES-STRATEGIES FOR PESTICIDES ANALYSIS*. Ed. InTech. 2011. Págs: 246-247
- [33] M. Cano Luna. Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos basados en Moléculas Orgánicas Conductoras. Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada. Universidad de Córdoba: España. 2008. Págs: 19- 22.
- [34] I. Sayago Olmo. Estudio del comportamiento del óxido de estaño como material sensor para la detección de mezclas gaseosas contaminantes. Universidad Complutense de Madrid. Mexico. 1993
- [35] A. Hulanicki, S. Glab, F. Inkman. Chemical sensors definition and classification. *Pure & Appl. Chem.* Volumen 63. Nro 9. 1991. Págs: 1247 -1250
- [36] S. Kroger, A.P.F. Turner, K. Mosbach, K. Haupt, Imprinted polymer-based detection of herbicides using differential pulse voltammetry on screen-printed electrodes. *Analytical Chemistry*. Nro 71. 1999. Págs: 3698 – 3702
- [37] Sergey A. Pilesky, A.P.F. Turner. Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymers. *Electroanalysis*. Nro 5. 2002. Págs: 317 – 323
- [38] M.E. Díaz García, A. Fernández-González. *Molecularly Imprinted Polymers*. Encyclopedia of Analytical Sciences. 2da edición. Elsevier Ltd. 2005. Págs: 172 - 182
- [39] A. Fernández González, L. Guardia. *Anales de Química*. Nro 103. Págs: 14 – 22

- [40] J. Wang. *Analytical Electrochemistry*. 2da edición. Wiley-VCH. 2000. Pág: 31, 32, 114
- [41] K. Robards, P. E. Jackson, Paul A. Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods. ELSEVIER. 2004. Págs: 266 – 268
- [42] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch. *Principios de análisis instrumental*. CENGAGE Learning. 6ta edición. 2008. Págs: 19 – 21,608 - 614
- [43] R. M. Silverstein, F. X. Webster and D. J. Kiemle. *Spectrometric indentification of organic compounds*. John Wiley & Sons, Inc. 6ta edición. 2005. Págs: 72, 121-124
- [44] O. Thomas y C. Burgers. *UV-Visible Spectrophotometry of water and wastewater*. 1ra edición. Elsevier. 2007. Págs: 75, 76
- [45] N.W. Turner, E.V. Piletska, K. Karim, M. Whitcombe, M. Malechaa, Naresh Magan, C. Baggiani, S. A. Piletsky. Effect of the solvent on recognition properties of molecularly imprinted polymer specific for ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*. Volumen 20. 2004. Págs: 1060–1067
- [46] C.R. Teixeira Tarley, M.D.Pilar Taboada Sotomayor, L.T. Kubota. POLÍMEROS BIOMIMÉTICOS EM QUÍMICA ANALÍTICA. PARTE 1: PREPARO E APLICAÇÕES DE MIP (“MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS”) EM TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO. *Quim. Nova*. Volumen 28. Nro 6. 2005. Págs: 1076-1086
- [47] A. Wong, M. Vinicius Foguela, S. Khana, F. Midori de Oliveira, C. R. Teixeira Tarley, M.D.P. Taboada Sotomayor. DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL SENSOR MODIFIED WITH MWCNT-COOH AND MIP FOR DETECTION OF DIURON. *Electrochimica Acta*. Volumen 182. 2015. Págs: 122–130

- [48] J. R. Santos, P. R. Lima, C. R. T. Tarleyb and L. T. Kubota. Synthesis, Characterization and Kinetics of Catalytically Active Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Recognition of 4-Aminophenol. *J. Braz. Chem. Soc.* Volumen 20. Nro 5. 2009. Págs: 820-825
- [49] A. J. Bard y L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Editorial John Wiley & Sons, Inc., USA. 2001. Pág: 29
- [50] D.J.Hamilton et al, REGULATORY LIMITS FOR PESTICIDE RESIDUES IN WATER (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* Volumen 75. Nro. 8. 2003. Págs: 1123–1155.

ANEXO

R. Fernández-Cori et al., Nanostructured Sensors for Determination of 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylurea Based in Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) Deposited in Screen Printed Carbon Nanotubes, ECS Trans. Volumen 66. Nro 37. 2015. Págs: 33 – 41. doi:10.1149/06637.0033ecst

Nanostructured Sensors for Determination of 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylurea Based in Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) Deposited in Screen Printed Carbon Nanotubes

J. C. Morales-Gomero^{a,b,1}, R. A. Fernández-Cori^{a,1}, B. C. Huayhuas-Chipana^a, M. D. P. Taboada-Sotomayor^c, J. G. Ruíz-Montoya^a

^a Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Rímac, Lima, Peru

^b Facultad de Ingeniería Industrial, Universidad de Lima, Santiago de Surco, Lima, Peru

^c Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, UNESP - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 14801-970 Araraquara, Brazil

¹ These authors contributed equally to this work

A sensor based on molecularly imprinted polymers (MIP) was developed for determination of 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (diuron). The MIP were synthesized by free radical polymerization in which diuron acted as template, methacrylic acid (MAA) acted as functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) acted as crosslinker. For construction of the sensor, glassy carbon electrode was modified with Nafion® and MIP/NIP (non imprinted polymer) to see the contribution of MIP, as a film, in the diuron recognition. Differential Pulse Voltammetry was used to the quantification of diuron in a range of response 0.4 - 1.2 V in a PBS (pH=8). All parameters affecting the sensor were optimized. The sensor showed a linear response from 1.00×10^{-5} to 9.616×10^{-5} M in PBS 0.1 M (pH=8). The limit of detection was 0.58×10^{-5} mol L⁻¹. The nanostructured sensor was prepared using carbon nanotubes and showed a 4 times greater response than the glassy carbon, showing promising results.

Introduction

Diuron (3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-Dimethylurea: DU) is a phenylurea herbicide which inhibits photosynthesis by preventing oxygen production (1) and blocks the electron transfer at the level of photosystem II of photosynthetic microorganisms and plants. This compound has been used to control a wide variety of annual and perennial broadleaf and grassy weeds, as well as mosses (2). Although its use on crops can improve yields and profit margins, diuron (figure 1) can cause environmental impacts, affecting algae, fungi, plants, and mammals. In humans, exposure to diuron results in the formation of methemoglobin in the blood, as well as liver and spleen abnormalities. Diuron also acts as an endocrine disruptor that interferes in the processes of release, transport, and disposal of natural hormones in body (2-4).

Diuron has low solubility in water, and when applied to the soil tends to accumulate. The half-life of the herbicide ranges from 90 to 180 days in soil (5), so its high persistence also that in heavy rainfall causes its leaching cause the groundwater pollution

due to its slow rate of removal; it can therefore be found in many environments, including soil, sediments, and water (2).

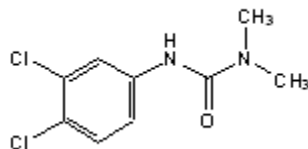


Figure 1. Chemical structure of diuron

Due to the serious effects that pesticides such as diuron can have on humans and other living organisms, is necessary the monitoring of levels of these substances in the environment. A variety of analytical methods for the monitoring of diuron have been reported in the literature, these include chromatographic, spectrometric, fluorometric, capillary electrophoretic, and electrochemical techniques (5).

In recent decades scientists have taken interest in electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymers which could offer good limits of detection, at low costs, with the possibility of easy miniaturization and automation (6). Also, sensors using acrylic or vinyl MIPs are reported to have good stability during prolonged storage (more than 6 months in many cases), as expected for a highly cross-linked polymer. This type of transduction is especially attractive with a view to making readily available a range of small devices based on recognition by a templating effect in relevant applications, such as biomarkers in clinical chemistry, environmental control in the field, on-line quality control in the pharmaceutical industry or detection of food fraud (6-9). In addition, the electrodes modified with single walled nanotubes were widely used to develop new type of biosensors with highly improved sensitivity and performance (10,11).

The objective of this experiment was to develop a nanostructured sensor based on molecularly imprinted polymer (MIP) for determination of diuron. The molecularly imprinted polymer was previously synthesized and then integrated on glassy carbon electrode to observe the binding capacity of MIP like a film. Subsequently, screen printed single walled carbon nanotubes electrodes were modified to observe the contribution of its high electrical properties in response of nanostructured sensor.

Experimental

Reagents and materials

Diuron, Nafion®, methacrylic acid (MAA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), azobisisobutyronitrile (AIBN), KH_2PO_4 and K_2HPO_4 were acquired from Sigma–Aldrich. Chloroform, methanol, acetic acid, acetone and acetonitrile were obtained from Merck. A $2.02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ diuron stock solution was prepared by dissolving 0.0047 g of the compound in 10.0 mL of acetonitrile and kept in the dark at -4°C . Phosphate buffer solution (PBS, 50 mM, pH 8.0) was prepared with KH_2PO_4 and K_2HPO_4 . All aqueous solutions were prepared with ultrapure water ($>18 \text{ M}\Omega\text{cm}$) obtained from a Milli-Q Plus (Millipore) purification system.

Instruments and measurements

Scanning electron microscope (SEM) images were acquired with an XL30 ESEM FEG field emission scanning electron microscope. All Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic measurements were performed on a Bruker Vertex 70 spectrometer. Ultraviolet visible (UV-vis) absorption spectra were recorded by a U-3900 Hitachi spectrometer. Cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) were performed using a Dropsens μ Stat 400 and were carried out with a typical three-electrode system, with a platinum wire as auxiliary electrode and an Ag|AgCl (1 M KCl) reference electrode, the working electrodes were bare and modified screen printed single-walled carbon nanotube electrode (SWCNTe, $d = 4\text{ mm}$) which was obtained from DropSens and glassy carbon electrode (GCE, $d = 4\text{ mm}$).

Synthesis of MIP and NIP

The schematic diagram for the preparation of MIPs is shown in Fig. 2. 0.1mmol of diuron and 0.5mmol of MAA were dissolved in 5mL of chloroform. The mixture was shaken in a water bath at 25 °C for 4 h. Subsequently, 2.0 mmol of EGDMA and 0.03 mmol of AIBN were added into the system and the mixture was sonicated, degassed with nitrogen for 5 min, and placed in a water bath at 60°C for 24 h. The obtained products (MIPs contained the template) were dried at room temperature for 24 h, grinded and sieved. For comparison, non-molecularly imprinted polymers (NIPs) were prepared under the same conditions without the template (DU).

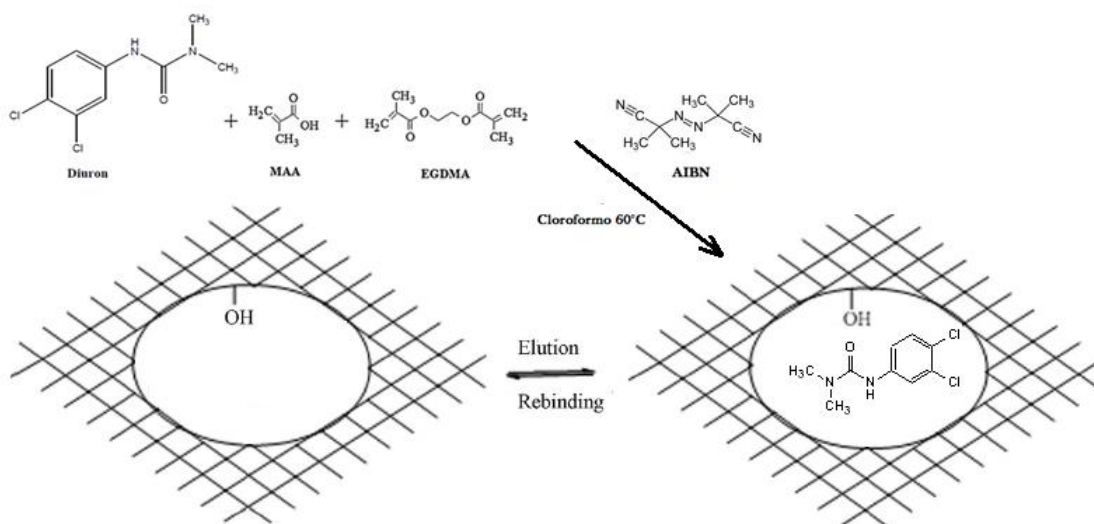


Figure 2. Schematic illustration of synthesis of molecularly imprinted polymer

Electrochemical measurements

A bare glassy carbon electrode was first polished using 0.05 μm alumina slurry, following by thoroughly flushing with ultrapure water, and then cleaned ultrasonically in acetone and ultrapure water successively. Screen printed single-walled carbon nanotube electrode was cleaned using cyclic voltammetry by potential scanning repeatedly between

0.4 and 1.2 V by 20 times. MIPs (4 mg) were dispersed in 0.4 mL of methanol by ultrasonication for 20 min. The above suspension (20 μ L) was mixed with 20 μ L of Nafion® and 10 μ L of this mixture was dropped onto the electrode surface and dried at room temperature overnight. Removal of the template molecules was achieved by cyclic voltammetry to glassy carbon electrode modified with MIP (GCE-MIP) and screen printed carbon nanotube electrode modified with MIP (SWCNTe-MIP) in 50 mM PBS. The cyclic voltammetry was carried out by potential scanning repeatedly between 0.4 and 1.2 V until there was no signal of DU. After extraction of the templates, the electrodes were rinsed thoroughly with ultrapure water and then submitted to binding and selective recognition experiments. The modified electrodes were incubated in 10 mL of different concentrations of DU solution (recognition experiments) for 3 min and examined by DPV.

Results and discussion

The morphology of MIP and NIP unleached was examined by SEM. As shown in Fig. 3a and b, the MIP and NIP exhibited irregular shape in morphology conformed by aggregate of sheets which had several hundreds of nanometers in size, both MIP and NIP had the same morphology indicating that diuron doesn't affect the morphology of polymer.

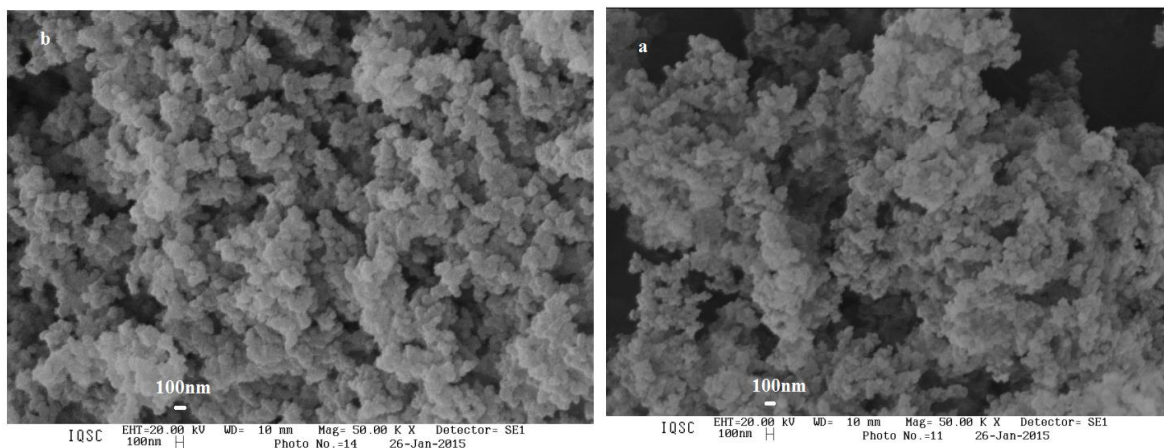


Figure 3. SEM images of MIP (a) and NIP (b)

The molecular structures of MIP and NIP were characterized by FTIR spectroscopy. The content of the remaining carbon-carbon double bonds in the MIP is an important indication of polymerization extent. No band is present in the region of 1648-1638 cm^{-1} , indicating the absence of vinyl groups in the polymerized materials (12). As shown in Fig. 4, the band at 2975 cm^{-1} and peak at 1457 cm^{-1} could be assigned to the stretching and scissor vibration of C-H of methylene groups respectively, the peak at 1720 cm^{-1} is attributed to the stretching vibration of C=O bonds in carbonyl groups and the peak at 1389 cm^{-1} is attributed to the symmetrical deformation of C-H bonds of methyl groups (13). The results clearly indicated that both MIP and NIP has molecular structure similarity indicating that diuron doesn't affect the polymeric structure.

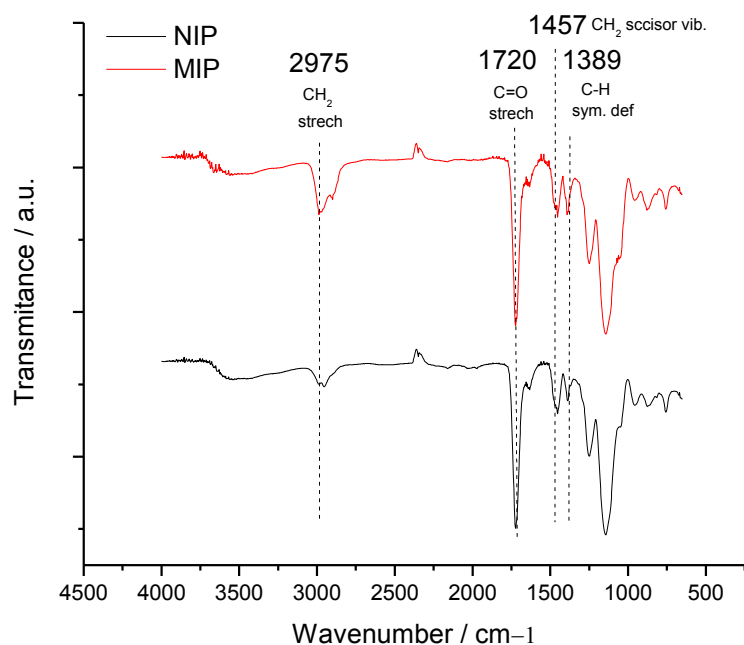


Figure 4. FTIR spectra of MIP with diuron (red line) and NIP (black line)

Both FTIR and SEM analysis demonstrated that presence of diuron didn't affect the polymeric structured, so to demonstrate the presence of diuron in MIP, part of MIP was washed with methanol/acetic acid (4:1 v/v) and the washout solution was analyzed by UV/Vis spectrometry, according to Fig. 5b, a peak at wavelength 250 nm corresponding to absorbance of diuron present in the washout solutions (14), its indicate the presence of diuron in the polymeric matrix.

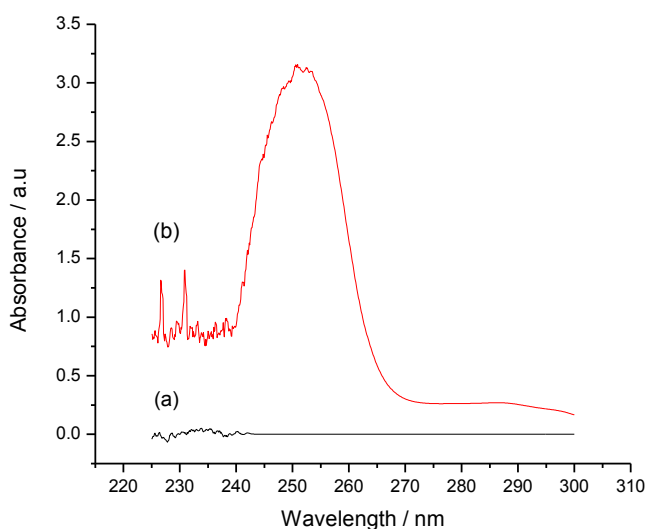
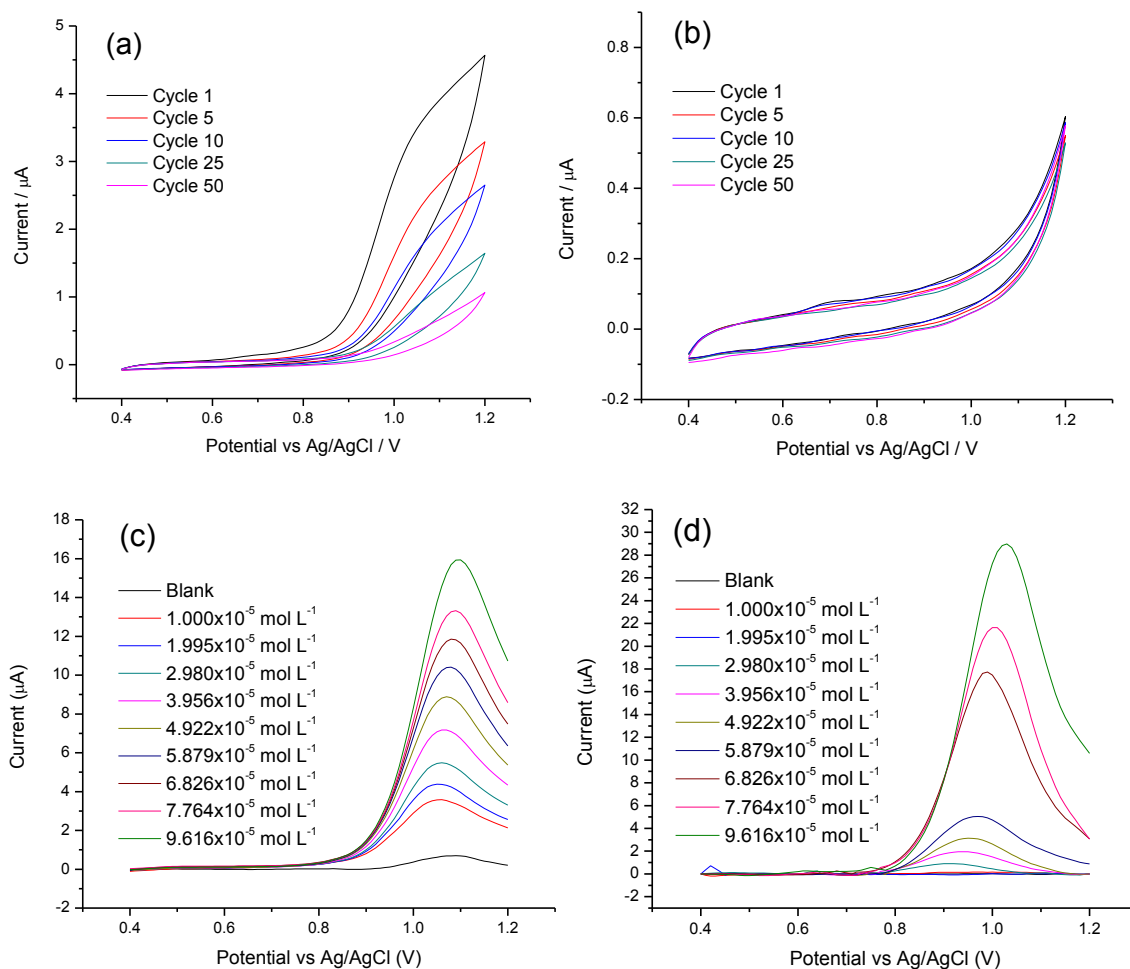


Figure 5. UV/Vis spectrum of methanol/acetic acid (4:1 v/v, a) and solution after the washing of MIP (b)

Template extraction and adsorption of MIP

The conventional method for template extraction is using organic reagents or buffer solution as eluent. However, it is time consuming and the template cannot be removed entirely. Since the oxidation of diuron was chemically irreversible under the experimental conditions (15), DU molecules could easily leach out the binding sites during the electrochemical reaction. In this work, voltammetry cyclic was performed to extract DU molecules from the imprinted polymers as is observed in Fig. 6a, in the decrease a peak oxidation at 1.09 V belonging to irreversible oxidation of DU, thus DU could be purged rapidly and completely. For comparison, cyclic voltammetry was applied to GCE-NIP (Fig. 6b) which didn't show any oxidation peak, also the electrochemical measurements were carried out in PBS free of DU, and this implied that the oxidation peaks were entirely due the DU embedded inside the imprinted polymers film. As a consequence, these results demonstrated that the binding affinity of the imprinted film was due to the specific sites formed by the imprinting effect.



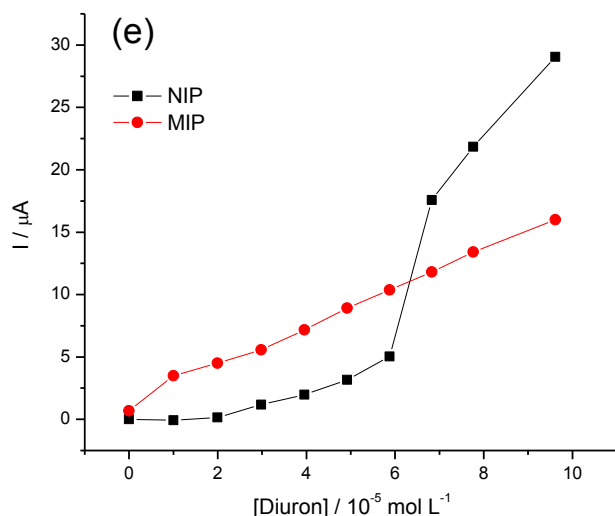


Figure 6. Cyclic voltammetry of GCE-MIP (a) and GCE-NIP (b) in PBS 50 mM pH 8.0. Scan rate: 50 mVs^{-1} , differential potential voltammetry of diuron in PBS 50 mM pH 8.0, with concentration varying from 0 to $9.616 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ using GCE-MIP (c) and GCE-NIP (d). Scan increment: 10 mV, pulse amplitude: 100 mV, Scan rate: 50 mVs^{-1} , and the comparison (e) between GCE-MIP (red line) and GCE-NIP (black)

In the figure 6c, we obtained as limit of detection $0.58 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, the sensibility of the sensor was $1.5505 \text{ uA} / 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. In addition, the higher oxidation current of diuron in GCE-MIP indicated that the binding capacity was better than NIP (Fig.6d,e) in the concentration range from 1.000 to $5.879 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, this confirm that GCE-MIP has a specific binding capacity for the template molecule. Also the oxidation current of diuron in GCE-MIP follow a linear tendency in this concentration range, which could obey the Nernst-Planck equation indicating the diuron diffusion to the surface electrode (16) compared with GCE-NIP which not follow a linear tendency, also to higher concentrations than $5.879 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ the oxidation current of diuron in GCE-NIP is higher than GCE-MIP, it is possibly because to lower concentrations the film of NIP is impeding the free diffusion of diuron to surface electrode and diuron molecules is being retained in the film of NIP so that at high concentrations, all the diuron molecules retained diffuse to the surface electrode causing a sharp increase in the oxidation current and a linear tendency a high concentrations indicating a free diffusion of diuron.

Nanostructured sensor modified with MIP

Taking advantage of the high electrical properties of single walled carbon nanotube, a screen printed single walled carbon nanotube electrode was modified with MIP (SWCNTE-MIP) and NIP (SWCNTE-NIP) and cyclic voltammetry in PBS 50mM pH 8.0 containing $6.826 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Fig. 7) was performed to observe if the nanostructured electrode help to improve the electrochemical response y resolve the problem that happened with the binding capacity of GCE-MIP to concentrations higher than $5.879 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. According to Fig. 7 appear an oxidation peak at 0.808 V which is lower compared to GCE-MIP (1.09 V), this indicate that nanostructured electrode has catalytic properties, also according to table I the oxidation current of diuron in SWCNTE-

MIP is as four times higher than response of SWCNTE-NIP, this attributed a its high electrical properties (10).

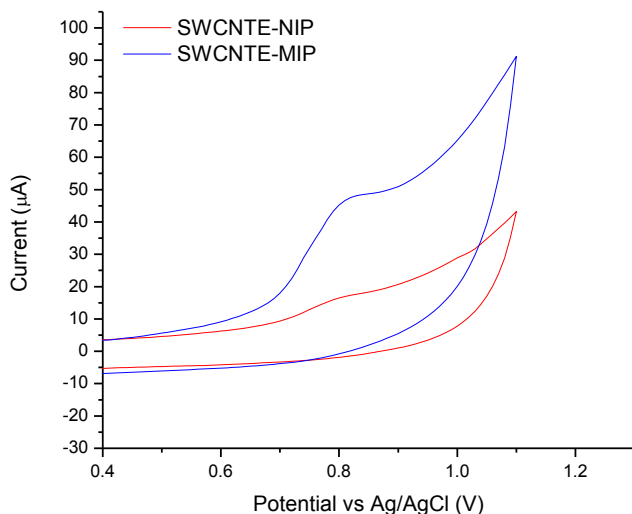


Figure 7. Voltammograms of molecularly imprinted polymer (blue line) and non-molecularly imprinted polymer (red line) in a solution of diuron containing 6.826×10^{-5} mol L⁻¹ in PBS 0.1 M, pH 8.

TABLE I. Current oxidation of diuron in nanostructured electrode modified with MIP and NIP

Electrode	Current oxidation of diuron (µA)
SWCNTE-MIP	32.7
SWCNTE-NIP	7.72

Conclusion

A molecularly imprinted polymer selective recognition of DU was successfully synthesized via free radical polymerization method. Previously analysis using glassy carbon electrode indicate that MIP like a film can recognize DU, and determine DU with a linear range from 1.000 to 5.879×10^{-5} mol L⁻¹. Screen printed singles walled carbon nanotubes electrode was modified with MIP and NIP demonstrating the great support of high electrical properties of nanostructured electrode in the determination of diuron to higher concentrations, also in the decrease of oxidation potential of diuron indicating that has catalytic properties so the imprinted film building on a nanostructured should be promising as it provides more sensibility for template recognition and better potential for diuron determination. This strategy can be further expected to be used to fabricate various molecular imprinting-based on nanostructured sensors for advanced applications. Furthermore, the molecular imprinting techniques discussed herein could also find applications in the fields of separation, trace detection, and environmental monitoring.

Acknowledgments

The authors are most grateful to Facultad de Ciencias of Universidad Nacional de Ingeniería, Department of Analytical Chemistry of Institute of Chemistry of UNESP - Universidade Estadual Paulista, and FINCyT Project Contract 228 IA-2013 for financial support.

References

1. J. S. C. Wessels and R. Van der Veen, *Biochem. Biophys. Acta*, **19**, 548 (1956).
2. S. Giacomazzi and N. Cochet, *Chemosphere*, **56**, 1022 (2004).
3. T. Prichard, J. Troiano, J. Marade, F. Guo, M. Canevari, *J. Environ. Qual.*, **34**, 2005-2017 (2005).
4. G. S. A. Ferdandes, A. C. Arena, C. D. B. Fernandez, A. Mercadante, L. F. Barbisan, W. G. Kempinas, *Reprod. Toxicol*, **23**, 106 – 112 (2007).
5. A. Wong, M. R de Vasconcelos-Lanza, M. D. P. Taboada-Sotomayor, *J. Electroanal. Chem.*, **690**, 83–88 (2013).
6. M. C. Blanco-López, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres and P. Tuñón-Blanco, *Trends Anal. Chem.*, **23**, 1, 36-48 (2004).
7. T. A. Sergeeva, S. A. Piletsky, A. A. Brovko, E. A. Slichenko, L. M. Sergeeva and A. V. El'skaya, *Anal. Chim. Acta*, **392**, 105 (1999).
8. T. Panasyuk-Delaney, V. M. Mirsky, M. Ulbritch and O. S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, **435**, 157 (2001).
9. T. Panasyuk-Delaney, V. M. Mirsky, O. S. Wolfbeis, *Electroanalysis*, **14**, 221 (2003).
10. P. R. Bandaru, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **7**, 2-4 (2007).
11. H. Zhanga, G. Liua and C. Chai, *Sensors and Actuators B*, **168**, 103 (2012).
12. J. R. Santos, P. R. Lima, C. R. T. Tarleyb and L. T. Kubota, *J. Braz. Chem. Soc*, **20**, 5, 820-825 (2009).
13. R. M. Silverstein, F. X. Webster and D. J. Kiemle, *Spectrometric identification of organic compounds*, p.121-124, John Wiley & Sons, Inc., USA (2005).
14. A. H. Kamell and F. M. Al-Romian, *Int. J. Chem. Mater. Sci.*, **1**, 1, 1-12 (2013).
15. G. Byzynski-Soares, W. Tadeu-Lopes da Silva and C. M. P. Vaz, *Sensors Letters*, **9**, 1-8 (2011).
16. A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, p. 29, John Wiley & Sons, Inc., USA (2001).