

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**TESIS**

**“DETERMINACIÓN SELECTIVA DEL CONTAMINANTE AMBIENTAL 1-  
CLORO 2,4-DINITROBENCENO BASADA EN UN MAGNETO SENSOR  
ELECTROQUÍMICO CONSTRUIDO CON POLÍMERO MAGNÉTICO DE  
IMPRESIÓN MOLECULAR (m-MIP)”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO EN QUÍMICA**

**ELABORADO POR  
GERSON ALESSANDRO RUIZ CÓRDOVA**

**ASESOR: Dr. GINO ITALO PICASSO ESCOBAR**

**LIMA-PERÚ**

**2017**

*“Determinación selectiva del contaminante ambiental 1-cloro 2,4-dinitrobenceno basada en un magneto sensor electroquímico construido con polímero magnético de impresión molecular (m-MIP)”*

## ***Dedicatoria***

*Este trabajo le dedico a mi familia por su apoyo incondicional para poder culminarlo.*

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todos los seres que han sido parte fundamental en la ejecución de mi tesis:

1. A mi familia por estar siempre a mi lado en todo momento.
2. A mi asesor Dr. Gino Picasso por su apoyo y exigencia, a mi co-asesora Dra. María del Pilar Taboada por su preocupación por mi avance y su constante orientación.
3. A mis compañeros de trabajo en el Laboratorio de Investigación de Fisicoquímica por su colaboración y compartimiento de ideas conmigo durante la elaboración de la presente tesis.
4. Agradezco al proyecto Convenio N° 513-INNOVATEPERU-ECIP-2015, del Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad y a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

## **Resumen**

Este trabajo propone el desarrollo de un método para la determinación selectiva y sensible del contaminante ambiental 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) mediante la utilización de un magnetosensor, cuyo material de reconocimiento consiste en nanopartículas magnéticas modificadas con polímero molecularmente impreso (m-MIP) selectivo a CDNB, que a su vez es electroquímicamente activo, y que será aprovechado para su cuantificación usando técnicas electroquímicas como voltametría cíclica o de pulsos.

Para la formación del electrodo m-MIP, se utilizó un electrodo de carbono imantado (m-CGE) y una solución heterogénea de m-MIP CDNB en solución tampón de glicina; dicha solución se agitó durante 2 horas para mejor dispersión, luego se introdujo el electrodo durante 20s para finalmente obtener el electrodo m-MIP. Las medidas fueron realizadas en una celda electroquímica de 3 electrodos conteniendo solución tampón Britton-Robinson (pH 2) y etanol en la proporción de 9:1 (v/v), usando una etapa previa de pre-concentración por 15 min a 60 °C.

Se estudió la selectividad del sensor, evaluando la sensibilidad del sensor con ocho compuestos de estructura al CDNB. El sensor respondió para los compuestos *p*-dimetilaminoazobenceno, *p*-nitrobencenoazoresorcinol y dinitrobenceno, obteniéndose corrientes equivalentes al 49.56%, 33.37% y 41.66% de la señal del analito, indicando que el sensor es altamente selectivo.

Los parámetros electroquímicos de trabajo del sensor fueron: intensidad de corriente ( $\mu\text{A}$ ) =  $(2.92 \pm 0.05) \times [\text{CDNB}] (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) - (9 \pm 1)$ , límite de detección (LD) y de cuantificación (LC) de 0.9 y 3.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  respectivamente, el rango de trabajo fue de 4 $\text{mgL}^{-1}$  a 50  $\text{mgL}^{-1}$ . La repetibilidad fue evaluada comparando cinco curvas de calibración, la desviación estándar relativa (RSD) obtenida fue de 2.7%, mostrando un alto coeficiente de recuperación de 105.4%  $\pm$  3.7.

## **.Abstract**

This work proposes the development of a method to determine selectively and sensibly the environmental pollutant 1-chloro 2,4-dinitrobenzene (CDNB) by using a magnetic-sensor, which recognition material consist of modified magnetic nanoparticles with molecularly imprinted polymers (m-MIP) selective to CDNB, which is also electrochemically active, and will be of use for quantification applying electrochemical techniques such as cyclic or pulse voltammetry.

The formation of the m-MIP electrode was made of a magnetized carbon electrode (m-CGE) and a heterogenic m-MIP CDNB solution with a glycine buffer, this solution was stirred by 2 hours for a better dispersion, then m-CGE was introduced by 20s to get the m-MIP electrode. The measures were done in a electrochemical cell of 3 electrodes containing Britton-Robinson buffer (pH 2) and ethanol in the proportion 9:1 (v/v), with a previous stage of pre-concentration by 15min at 60°C.

The selectivity of the sensor was evaluated with 8 different compounds, sensor detected *p*-dimethylaminoazobenzene, *p*-nitrobenzeneazoresorcinol y dinitrobenzene, obtaining equivalent currents 49.56%, 33.37% y 41.66% of analyte signal. Meaning that the sensor is highly selective.

A lineal range between 4 and 50 mg L<sup>-1</sup>, adjusted with the lineal equation  $i (\mu\text{A}) = (2.92 \pm 0.05) \times [\text{CDNB}] (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) - (9 \pm 1)$ . The repetibility of the flims were evaluated in five different days in function of RSD value, being equal to 2.7%, showing a recovery coefficient of  $105.4\% \pm 3.7$ .

## Prólogo

En el presente trabajo de tesis para obtener el Título Profesional de Química titulado “Determinación Selectiva del Contaminante Ambiental 1-cloro 2,4-dinitrobenceno basada en un magneto sensor electroquímico construido con polímero magnético de impresión molecular (m-MIP)” se realizó el estudio de la formación del sensor magnético, la caracterización electroquímica del analito y las diversas variables que afecta la señal de reducción usando técnicas voltamétricas. La tesis se dividió en 4 capítulos fundamentales: el primer capítulo hace referencia a la base científica de los MIP, las técnicas usada y la problemática del CDNB, además la síntesis de este y su modificación para darle la propiedad magnética.

En los capítulos 2 y 3 fundamentalmente explican la formación del sensor, la descripción del sistema electroquímico, la optimización de este, estudiando los parámetros de temperatura, atmosfera de nitrógeno, tiempos de dispersión del MIP en solución, de formación del sensor y de equilibrio, elección la solución electrolítica. Todo esto con el objetivo de obtener una mejor respuesta del CDNB en el sistema electroquímico, de esta manera, se logró disminuir el límite de detección. Luego, la elaboración de una curva analítica y la posterior utilización del método con muestra de agua potable

Por último, el capítulo 4 considera las conclusiones y recomendaciones del trabajo donde se ha destacado la selectividad del sensor, así como su uso en muestra de agua potable. Además, las referencias bibliográficas se tomaron artículos de revistas científicas indexadas entre los años 2001 hasta el actual 2017. En la sección de anexos se encuentran los diferentes encuentros en donde se ha presentado el trabajo, además del manuscrito para revisión y posterior publicación en *Electrochemistry Communications*.

## Índice general

<b>Dedicatoria</b> .....	ii
<b>Agradecimientos</b> .....	iii
<b>Resumen</b> .....	iv
<b>Abstract</b> .....	v
<b>Prólogo</b> .....	vi
<b>Capítulo 1: Introducción</b> .....	1
1 Estado del Arte.....	2
2 Polímeros Molecularmente Impresos (MIP) y Polímeros magnéticos Molecularmente Impresos (m-MIP).....	3
... ..	3
2.1 Síntesis de MIP's.....	3
2.2 Síntesis de m-MIP's.....	4
3 1-cloro 2,4-dinitrobenceno (CDNB).....	5
4 Voltametría Cíclica y de Pulso Diferencial.....	6
4.1 Voltametría Cíclica.....	6
4.2 Voltametría de Pulso Diferencial (VPD).....	6
5 Electrodo magnético de compuesto de grafito-epóxido (m-CGE).....	7
6 Hipótesis.....	8
7 Objetivos.....	8
<b>Capítulo 2: Procedimiento Experimental</b> .....	10
1 Introducción.....	10
2 Parte Experimental.....	10
2.1 Reactivos de Partida y Equipos.....	10
2.2 Estudio de Soluciones Dispersantes.....	11
2.3 Área de Trabajo del E-MIP.....	13
2.4 Caracterización Electroquímica del E-MIP en presencia de CDNB.....	13
2.5 Optimización de los parámetros de medida usando VPD.....	14
2.6 Estudio de Selectividad del E-MIP.....	15

2.7	Curva Analítica y Aplicación en muestra de agua potable.....	
<b>Capítulo 3: Resultados y discusión.....</b>		<b>16</b>
1	Estudios de Caracterización y Optimización del E-MMIP.....	16
1.1	Selección de Solución Dispersante.....	16
1.2	Estimativa del Área de Trabajo del E-MMIP.....	18
1.3	Caracterización Electroquímica del CDNB en el E-MMIP.....	21
1.4	Influencia de la Temperatura y Oxígeno en la respuesta del sensor para CDNB.....	24
1.4.1	Influencia de la Temperatura.....	25
1.4.2	Influencia del Oxígeno.....	26
2	Optimización de los Parámetros electroquímicos y analíticos.....	27
2.1	Optimización de los parámetros DPAdCSV.....	27
2.2	Optimización de la formación de la fase sensora del E-MMIP...	28
2.3	Tiempo de formación del filme de MMIP en la superficie del m-CGE y tiempo de equilibrio para adsorción del CDNB.....	29
2.4	Optimización del electrolito soporte.....	31
3	Selectividad del E-MMIP construido.....	34
4	Perfil analítico y aplicación del E-MMIP construido.....	36
<b>Capítulo 4: Conclusiones y recomendaciones.....</b>		<b>40</b>
1	Conclusiones.....	40
2	Recomendaciones.....	41
<b>Referencias bibliográficas.....</b>		<b>42</b>
<b>Anexos.....</b>		<b>45</b>
<b>A.1</b>	<b>Voltograma del estudio el área activa estimada para m-CGE y E-MNIP.....</b>	<b>45</b>
<b>A.2</b>	<b>Certificado “18° ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA – BRASIL”.....</b>	<b>46</b>
<b>A.3</b>	<b>Certificado “XV ENCUENTRO CIENTÍFICO INTERNACIONAL DE INVIERNO ECI 2016i”.....</b>	<b>47</b>



<b>A.4</b>	Certificado “Workshop – Desarrollo y aplicación de nuevos sensores químicos basados en polímeros biomiméticos”.....	48
<b>A.5</b>	Trabajo presentado para revisar por Electrochemistry Communications: “Electrochemical sensing for 1-chloro-2,4-dinitrobenzene based on magnetic molecularly imprinted polymer particles previously captured by a magneto-sensor” .....	49

## Índice de tablas

<b>Tabla N°1.1</b>	<i>Recopilación de artículos en el estudio de 1-cloro 2,4-dinitrobenceno.....</i>	3
<b>Tabla N°2.1</b>	<i>Soluciones Dispersantes de 3mg mL<sup>-1</sup> con 0.15M NaCl y 0.05%Tween.....</i>	11
<b>Tabla N°2.2</b>	<i>Interferentes.....</i>	14
<b>Tabla N°3.1</b>	<i>Listado de las soluciones dispersantes evaluadas en la optimización del filme de MMIP en la superficie de m-CGE.....</i>	16
<b>Tabla N°3.2</b>	<i>Solución Dispersante vs Diferencia de Corrientes del pico anódico.....</i>	18
<b>Tabla N°3.3</b>	<i>Área activa estimada para los electrodos usados en la tesis.....</i>	21
<b>Tabla N°3.4</b>	<i>Intensidad de Corriente a diferentes tiempos de homogeneización de las MMIP en la solución dispersante N6.....</i>	28
<b>Tabla N°3.5</b>	<i>Intensidad de Corriente a diferentes tiempos de equilibrio y formación para el sensor propuesto en presencia de 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de CDNB.....</i>	29
<b>Tabla N°3.6</b>	<i>Soluciones Buffer Britton-Robinson.....</i>	31
<b>Tabla N°3.7</b>	<i>Intensidad de corriente obtenidas para diferentes soluciones de electrolito soporte.....</i>	33
<b>Tabla N°3.8</b>	<i>Relación de respuesta entre interferente y CDNB usando el E-MMIP.....</i>	34
<b>Tabla N°3.9</b>	<i>Relación de respuesta entre interferente y CDNB usando el E-MNIP.....</i>	35
<b>Tabla N°3.10</b>	<i>Porcentajes de recuperación de muestra contaminada.....</i>	39

## Indice de figuras

<b>Figura N°1.1</b>	<i>Principio general de la impresión molecular.....</i>	4
<b>Figura N°1.2</b>	<i>Curvas de Magnetización de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @SiO<sub>2</sub>-TEOS, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @SiO<sub>2</sub>-MPS y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @MIP.....</i>	6
<b>Figura N°1.3</b>	<i>Esquema de variación de potencial base por pulsos.....</i>	8
<b>Figura N°1.4</b>	<i>Elaboración del electrodo magnético de composito de grafito-epóxido (m-CGE).....</i>	9
<b>Figura N°2.1</b>	<i>Etapas para la formación del Electrodo MIP (E-MIP).....</i>	12
<b>Figura N°2.2</b>	<i>Electrodo MIP (E-MIP). (a) m-CGE sumergido en solución dispersante con MIP, (b) Electrodo MIP formado.....</i>	12
<b>Figura N°3.1</b>	<i>Voltagramas Cíclicos de 0.01mol L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] en KCl 0.1 mol L<sup>-1</sup>, velocidad de barrido 20mV/s .....</i>	17
<b>Figura N°3.2</b>	<i>Voltagramas de Fe(III) 0.1 mol L<sup>-1</sup> en 10mL de KCL 1 mol L<sup>-1</sup> a diferentes velocidades de barrido: 5, 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 mV s<sup>-1</sup> usando E-MMIP .....</i>	19
<b>Figura N°3.3</b>	<i>Intensidad de Corriente (I) vs Raíz cuadrada de la velocidad de barrido (v<sup>1/2</sup>) .....</i>	20
<b>Figura N°3.4</b>	<i>Voltagrama de CDNB 10<sup>-3</sup>mol L<sup>-1</sup> en solución BR-ET (pH en 2.0 y relación 9:1 (v/v)) a 25°C.....</i>	22
<b>Figura N°3.5</b>	<i>Voltagramas cíclicos en respuesta de 0.2 mmol L<sup>-1</sup> etanol en el sistema E-MMIP.....</i>	25
<b>Figura N°3.6</b>	<i>Voltagramas cíclicos del CDNB a 25°C y 60°C.....</i>	26
<b>Figura N°3.7</b>	<i>Voltagramas del CDNB obtenidos con el sensor propuesto en la presencia y ausencia de una atmosfera de nitrógeno.....</i>	27
<b>Figura N°3.8</b>	<i>Voltagramas de 5x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de CDNB en diferentes soluciones electrolíticas estudiadas, para evaluación del pH.....</i>	32
<b>Figura N°3.9</b>	<i>Selectividad del E-MIP.....</i>	36
<b>Figura N°3.10</b>	<i>Perfil de respuesta del sensor propuesto en esta tesis.....</i>	37

<b>Figura N°3.11</b>	<i>Curva Analítica del E-MMIP obtenida con los datos de la figura 3.10.....</i>	38
<b>Figura A.1</b>	<i>Voltagramas de Fe(III) 0.1 mol L<sup>-1</sup> en 10mL de KCL 1 mol L<sup>-1</sup> a diferentes velocidades de barrido: 5, 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 mV s<sup>-1</sup> usando E-MNIP .....</i>	45
<b>Figura A.2</b>	<i>Voltagramas de Fe(III) 0.1 mol L<sup>-1</sup> en 10mL de KCL 1 mol L<sup>-1</sup> a diferentes velocidades de barrido: 5, 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 mV s<sup>-1</sup> usando m-CGE .....</i>	46

## Capítulo 1

### Introducción

En los últimos años, la detección y cuantificación de contaminantes ambientales y salubres han tomado cada año mayor importancia, así como también el uso de materiales de reconocimiento tal como los polímeros molecularmente impresos (MIP) [1-4]. El contaminante ambiental 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) es seleccionado debido a la actividad electroquímica que posee, lo que permitirá su posterior determinación usando polímeros magnéticos molecularmente impresos (m-MIP) y técnicas electroquímicas.

Adicionalmente, los polímeros impresos molecularmente (del inglés *Molecularly Imprinted Polymers* - MIP) fueron ideados como una alternativa sintética a los receptores biológicos, imitando a los anticuerpos, por lo que son conocidos como anticuerpos plásticos o polímeros biomiméticos [1]. De esta forma, los MIP's poseen sitios de reconocimiento moleculares para una molécula específica sintéticamente diseñados [2-3]. Los magneto-MIP (m-MIP) son materiales híbridos, que se obtienen mediante el método *core-shell*, en los cuáles el *core* (centro) se refiere a la magnetita (nanopartícula magnética) y el *shell* (revestimiento) se refiere al MIP, que es sintetizado para ser selectivo al analito de interés [4].

Actualmente, el desarrollo de sensores, biosensores y sensores biomiméticos ha avanzado grandemente principalmente por dos razones, en primer lugar, debido a la evolución en el área de nanomateriales que permiten obtener plataformas sensoras más versátiles, sensibles y selectivas, diferentes a los sistemas macro-estructurados; y en segundo lugar, debido a la posibilidad de construir dispositivos miniaturizados que permitan el análisis *in-situ*, *on-line*, en tiempo real y del tipo *point-of-care* cuyas aplicaciones van desde un simple análisis de agua, hasta el control de la diabetes, la detección de un cáncer, o la previsión de un infarto [5].

Adicionalmente, la importancia en desarrollar nuevas técnicas de identificación y cuantificación de compuesto aromáticos nitrogenados, en matrices complejas y en concentraciones pequeñas, radica principalmente en su importancia en la salud pública, puesto que este tipo de sustancias en concentraciones moderadas puede causar problemas multisistémicos, que, como mínimo afecta al sistema nervioso central, la sangre, el hígado, el sistema cardiovascular y los ojos [6].

## 1. Estado del Arte

La elección de este analito, 1-cloro 2,4-dinitrobenceno, se debe a su actividad electroquímica como se presenta en la Tabla N°1.1, así como sus diferentes rangos de trabajo e índices de recuperación en agua potable. Como se puede apreciar, el uso de m-MIP como fase de reconocimiento para la construcción de un sensor, aún no ha sido estudiada por lo que la propuesta es inédita.

**Tabla N°1.1:** Recopilación de artículos en el estudio de 1-cloro 2,4-dinitrobenceno.

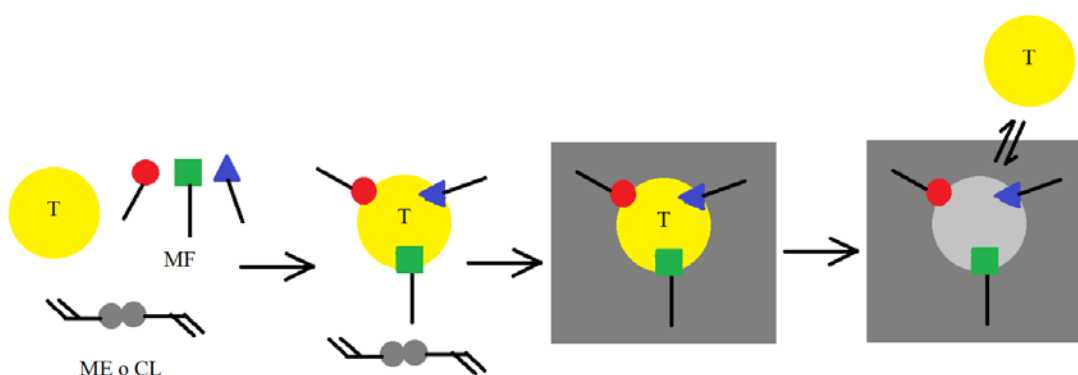
<b>Objetivo del artículo</b>	<b>Técnica Empleada</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
Detección selectiva a 1-cloro 2,4-dinitrobenceno	HPLC	Rango de Trabajo 0.1 – 25 mgL <sup>-1</sup> Recuperación: 83.8% ± 0.8	R. Uzuriaga-Sánchez et al. [26]
Reducción Electroquímica selectiva de 1-cloro 2,4-dinitrobenceno	Polarografía	Reducción a cloronitroanilinas en presencia de metales	A. A. Konarev et al. [13]
Comportamiento Polarografico de 1-cloro 2,4-dinitrobenceno	Polarografía	Reducción del grupo nitro del CDNB en medio básico	A. A. Konarev et al. [14]
Determinación de 1-cloro 2,4-dinitrobenceno	HPLC	Rango de trabajo: 1 – 20 μM, Recuperación: >80%	S. Vaidya et al. [11]
Alergia dérmica al contacto	FLIPR (Fluorescence Imaging Plate Reader)	Rango de Trabajo: 0.04 - 30μM, CDNB precursor de dermatitis	M. Saarnilehto et al. [12]
Mecanismo Electroquímico	Voltametría	Reactividad de CDNB por el enlace C-Cl	M. Prasad et al. [19]

## 2. Polímeros Molecularmente Impresos (MIP) y Polímeros magnéticos Molecularmente Impresos (m-MIP)

Los polímeros molecularmente impresos (MIP's) son polímeros construidos empleando la impresión molecular, este procedimiento genera una cavidad en el polímero, la cual tiene afinidad por la molécula *template* usada. Mientras que los m-MIP's siguen el mismo procedimiento, solo que ahora el MIP estará soportado en un material magnético.

### 2.1. Síntesis de MIP's

El procedimiento comienza con la elección de la molécula *template*, esta molécula interacciona con monómeros funcionales formando un complejo con interacciones covalentes o no-covalentes, a su vez, este interacciona con monómeros *cross-linking* o estructurales y estos polimerizan para finalmente, extraer la molécula *template* con un solvente polar o no polar (Figura N°1.1). Después de la extracción, la cavidad tiene el tamaño, la forma y la posición de los grupos funcionales por lo que hace de este compuesto altamente selectivo. Por lo tanto, los MIP's poseen la más importante característica de los receptores biológicos, la capacidad de reconocer y enlazar moléculas específicas. [7]



**Figura N°1.1.** Principio general de la impresión molecular. La molécula *template* (T) es mezclada con los monómeros funcionales (MF), para luego ser polimerizado por monómeros

*estructurales (ME) o cross-linkers (CL). Finalmente, se extrae la molécula template para obtener el MIP.*

Para la impresión molecular, la molécula *template* es de gran importancia porque influye directamente a la organización de los monómeros funcionales. Pero no todas las moléculas pueden ser *template*, por diversas razones, y una de estas es que el *template* tiene que ser inerte a los monómeros funcionales. La elección de monómeros funcionales está influenciado por su afinidad con la molécula *template*, por lo general, para impresión molecular no covalente, la relación molar entre el *template* y monómero funcional es de 1 a 4. Las 3 mayores funciones del monómero estructural son, control de la morfología del polímero matriz, estabilidad de los sitios enlazantes impresos y estabilidad mecánica del polímero matriz. [8]

Los polímeros no-molecularmente impresos (NIPs) son polímeros control de los MIPs. Su síntesis es similar, prácticamente igual que la síntesis de los MIPs, con la única diferencia que no se agrega la molécula *template*, de esta manera se puede estudiar si la interacción que ocurre entre el polímero y la molécula *template*, se debe a la capacidad de que el MIP reconozca al *template* y no solo a la interacción de los monómeros funcionales y estructurales con el *template*; y si la cavidad originada en la síntesis del MIP es lo que hace del polímero altamente selectivo.

## **2.2. Síntesis de m-MIP's**

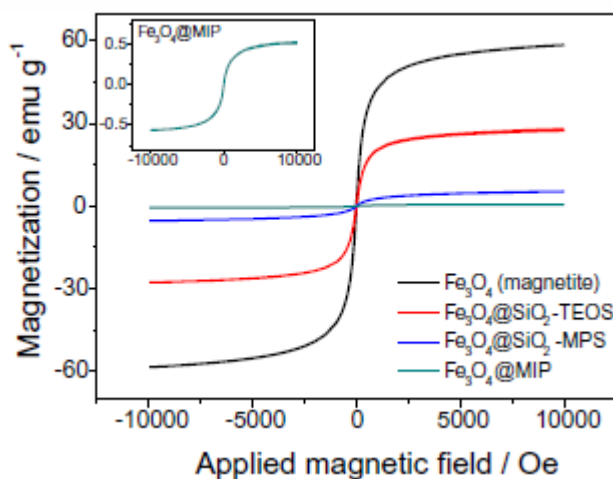
La incorporación de propiedades magnéticas a MIP's (m-MIP's) es bastante útil. Además de otorgarle un campo magnético al MIP, tiene otras características las cuales permiten en inmovilización de enzimas, aislamiento de célula, separación de proteínas o pre-concentración de ciertos compuestos de muestra crudas de manera fácil y sencilla y la reutilización de los sensores. [9-10].

La síntesis de m-MIPs es similar a la síntesis de polímeros de impresión molecular. Para la obtención de m-MIP selectivo para CDNB, se sintetizó sobre una superficie hidrofóbica magnética utilizando polimerización por precipitación en presencia del analito, formando una



estructura *core-shell*. En este procedimiento, se añadieron 1-cloro 2,4-dinitrobenceno, bisfenol A, MDI y floroglucinol en una mezcla de tetrahidrofurano y magnetita. El proceso de polimerización se llevó a cabo durante 2 días, después el material se lavó con metanol/ácido acético y se secó al vacío por 2 días. El m-NIP (polímero no impreso) usado como polímero de control, se preparó usando el mismo procedimiento empleado para el m-MIP, pero sin la molécula del analito. [26]

El polímero sintetizado al provenir de un material supermagnético ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), también presenta un comportamiento similar, aunque con menor intensidad magnética al estar el  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  dentro del polímero. El m-MIP sigue teniendo un comportamiento supermagnético, como se presenta en las curvas de magnetización de la figura N°1.2.



**Figura N°1.2.** Curvas de Magnetización de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4 @SiO_2-TEOS$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4 @SiO_2-MPS$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4 @MIP$ . [4]

### 3. 1-cloro 2,4-dinitrobenceno

1-cloro 2,4-dinitrobenceno (CDNB) es un sensibilizador alérgico, la cual puede provocar sistemas de hipersensibilidad según estudios clínicos humanos y animales. También es conocido como un xenobiotico tóxico que causa estrés oxidativo y muerte celular [11-12].

En la industria, varios compuestos son obtenidos mediante reducción selectiva de dinitrobencenos, además en la literatura también se encuentra su actividad electroquímica de CDNB al poder ser reducida al otorgarle el potencial requerido [13-14].

#### **4. Voltametría Cíclica y de Pulso Diferencial**

##### **4.1 Voltametría Cíclica**

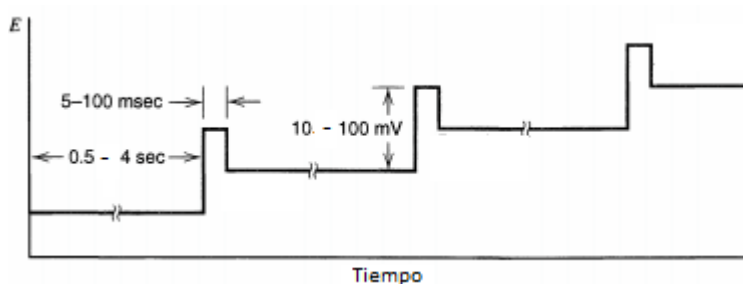
Esta técnica resulta de gran importancia en el campo de la electroquímica, se utiliza para estudios de procesos redox, mecanismo de reacción, etc. Aunque no tiene tanta relevancia para determinaciones cuantitativas, sin embargo, puede otorgar información importante del sistema estudiado. El potencial se varía linealmente desde un potencial inicial hasta un potencial final, luego el sentido de barrido se invierte y el potencial vuelve a su valor inicial, este ciclo de excitación puede ser repetido cuantas veces lo requiera la experiencia. Los potenciales a los que tiene lugar la inversión se llaman potenciales de cambio. El intervalo de potenciales de cambio elegido para un experimento dado, es aquel en el que tiene lugar la oxidación o reducción controlada por difusión de una o más especies.

Cuando se utiliza la voltametría cíclica para estudiar un sistema por primera vez es usual comenzar a llevar a cabo experimentos cualitativos con la finalidad de conocer al mismo, procediendo luego con los semi-cuantitativos y finalmente cuantitativos para poder así obtener los parámetros cinéticos de interés. [15]

##### **4.2 Voltametría de Pulso Diferencial (VPD)**

A diferencia de la voltametría cíclica, la variación de potencial se realiza de forma escalonada, de manera discreta (Figura N°1.3). El potencial base aplicado no es constante en el tiempo sino que tiene pequeñas variaciones, llamados pulsos; la altura de pulso es entre 10 y 100 mV y se mantiene constante con respecto al potencial base, las 2 corrientes tomadas por la técnica son al justo antes del pulso de potencial e inmediatamente después de este. El voltagrama obtenido es la relación entre el potencial y la diferencia de las 2 corrientes tomadas. La intensidad

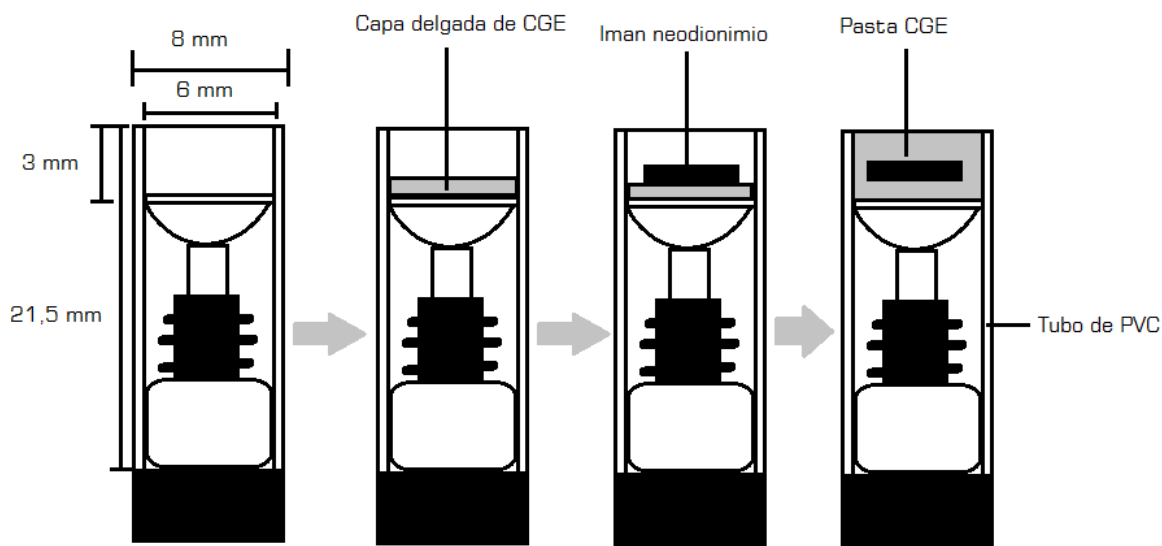
máxima de corriente obtenida es proporcional a la concentración de especies reactantes. Esta técnica puede discriminar las corrientes faradaicas y de carga, además de eliminar en gran parte la corriente de fondo y de poder otorgar una alta sensibilidad y límites de detección bajos [15]



**Figura N°1.3** Esquema de variación de potencial base por pulsos. [15]

## 5. Electrodo magnético de compuesto de grafito-epóxido (m-CGE)

La elaboración del electrodo magnético fue hecha mezclando polvo de grafito y resina epoxida en relación de 1:4 (w/w). Esta mezcla fue homogenizada a mano para asegurar que la dispersión del grafito dentro del polímero sea uniforme. El procedimiento para la creación del m-CGE es mostrada en la Figura 1.4 [16].



*Figura N°1.4 Elaboración del electrodo magnético de compuesto de grafito-epóxido (m-CGE).*

## 6. Hipótesis

Basados en lo anteriormente expuesto, la hipótesis de la presente tesis es usar de la propiedad de los MIPs de reconocer y capturar un compuesto químico específico, para fabricar un sensor para la determinación cuantitativa de dicho compuesto. Así, esta tesis tiene por finalidad la aplicación inédita de nanopartículas magnética híbridas recubiertas con MIP para detectar CDNB como plataforma sensora en magneto-electrodos compósitos de grafito (m-CGE), que servirá como electrodo soporte para la evaluación de la nanopartículas magnéticas en la detección electroquímica del analito.

## 7. Objetivos

El objetivo general de la tesis es desarrollar un método inédito para los m-MIPs en el campo de la electroquímica, y de esta manera obtener un sensor electroquímico selectivo al analito de interés, CDNB.

Los objetivos específicos son:

“Determinación selectiva del contaminante ambiental 1-cloro 2,4-dinitrobenceno basada en un magneto sensor electroquímico construido con polímero magnético de impresión molecular (m-MIP)”

1. Preparar el sensor electroquímico empleando m-MIP y m-CGE, y comprobar la adsorción del CDNB en el sensor y su respuesta electroquímica.
2. Determinar la selectividad del sensor electroquímico teniendo como interferentes diversos tipos de compuestos entre ellos, unos con estructura parecida al analito.
3. Realizar análisis en una muestra real de agua potable contaminada con CDNB.

## **Capítulo 2**

### **Procedimiento Experimental**

#### **2.1. Introducción**

Todos los análisis llevados en esta tesis, se realizaron usando un potenciostato PalmSens 3 v. 4.2. Tanto los MIPs como los NIPs fueron donados del Instituto de Química – UNESP, Brasil, mientras que los electrodos magnéticos de composito de grafito fueron donados de la Universidad Autónoma de Barcelona, España. Los MIPs y NIPs fueron dispersados antes de su utilización con soluciones dispersante que luego serán mencionadas. En el proceso de dispersión, se utilizó un Homogeneizador de Muestras Horizontal (Benfer) para lograr una dispersión más uniforme.

#### **2.2. Metodología**

La metodología de este trabajo para la determinación de CDNB con el sensor electroquímico m-MIP se compone de cinco etapas fundamentales que nos permite el seguimiento del trabajo.

1. Preparación del sensor electroquímico, dispersando homogéneamente el m-MIP en solución, para luego atraerlo magnéticamente con el m-CGE, así como también la determinación del área activa empleando solución electrolítica de KCl y solución de Fe(II).
2. Estudio del espectro electroquímico del CDNB en el sensor, parámetros que influyen en la señal tales como temperatura y oxígeno, empleando voltametría cíclica como técnica de caracterización electroquímica.
3. Optimización de la señal empleando voltametría de pulso diferencial, evaluando la solución electrolítica, diferentes parámetros tales como, el tiempo de formación del sensor m-MIP, acidez de la solución electrolítica, entre otros.
4. Evaluación de la selectividad del sensor con los parámetros anteriormente optimizados, usando moléculas de estructura similar.

5. Calibración de las curvas analíticas para la cuantificación de CDNB, y su aplicación en una muestra de agua potable contaminada con el analito, determinando su porcentaje de recuperación.

La síntesis y caracterización de los MIPs y NIPs fueron realizados y donados por el grupo de investigación del Instituto de Química –UNESP – Brasil, con el respaldo de un artículo publicado en *Materials Science & Engineering*. [26]

### **2.3. Síntesis de m-MIP para CDNB**

Para la síntesis de m-MIP para CDNB, se añadieron 1-cloro 2,4-dinitrobenceno (0.20mmol), bisfenol A (0.70mmol), MDI (0.82mmol) y floroglucinol (0.33mmol) en una mezcla de tetrahidrofurano (8 mL) y 16mg de magnetita – poli (FM – co – EDGMA) (4.5% p/p). El proceso de polimerización se llevó bajo agitación magnética continua durante 2 días, en la oscuridad a temperatura ambiente. Después de la polimerización, el material se lavó con metanol/ácido acético (9:1, v/v) en un extractor Soxhlet y después se secó al vacío por 2 días. El m-NIP (polímero no impreso) usado como polímero de control, se preparó usando el mismo procedimiento empleado para el m-MIP, pero sin la molécula del analito. [26]

### **2.4. Reactivos de Partida y Equipos**

Los reactivos usados en este trabajo fueron de grado analítico, Todas las soluciones fueron preparadas en agua desionizada obtenido de Milli-Q Direct-0.3 (Millipore) y etanol (Merck). 1-cloro 2,4-dinitro benceno (CDNB) fue adquirido de Sigma-Aldrich. La glicina, Tween 20, el cloruro de sodio y cloruro de potasio obtenidos de Merck. El ácido bórico, el ácido acético anhidro y el ácido fosfórico fueron obtenidos de Merck para la preparación del tampón Britton-Robinson. Ferrocianuro de potasio Sigma-Aldrich. El m-MIP fue elaborado en el laboratorio del Instituto de Química da UNESP y los m-CGE fueron donados por la Universidad de Barcelona, España.

Los equipos empleados fueron Homogeneizador de Muestras Horizontal (Benfer), el PalmSens 3 ver. 4.2. y el pH-metro (Orion).

## 2.5. Estudio de Soluciones Dispersantes

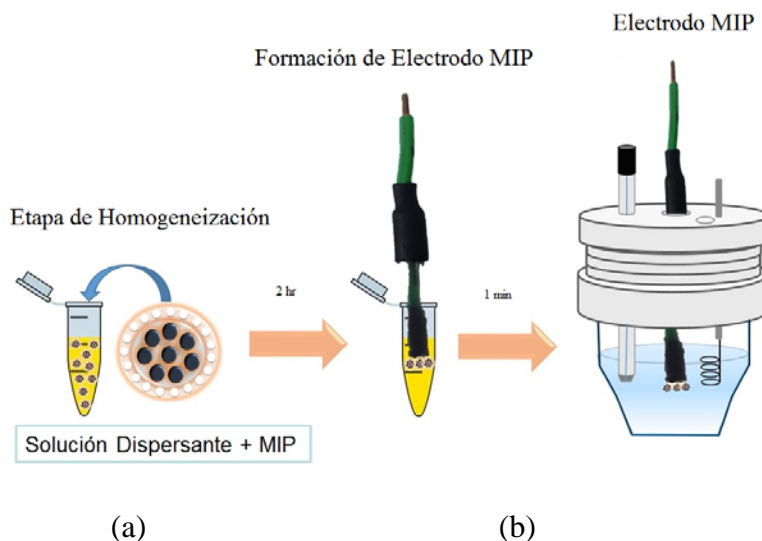
Los análisis se realizaron por voltametría cíclica, con Fe(III) 0.01 mol L<sup>-1</sup> en solución KCl 0.1 mol L<sup>-1</sup>. Se preparó dispersiones de 3 mg mL<sup>-1</sup> de MIP en diferentes soluciones dispersantes (Tabla N°2.1), con el objetivo se determinar cuál solución nos ofrecía una mayor intensidad de corriente como respuesta al comportamiento del Fe<sup>3+/2+</sup>. El empleo del surfactante Tween 20 es para obtener una mejor dispersión del MIP en la solución.

**Tabla N°2.1:** Soluciones Dispersantes de 3 mg mL<sup>-1</sup> MIP con 0.15M NaCl y 0.05%Tween

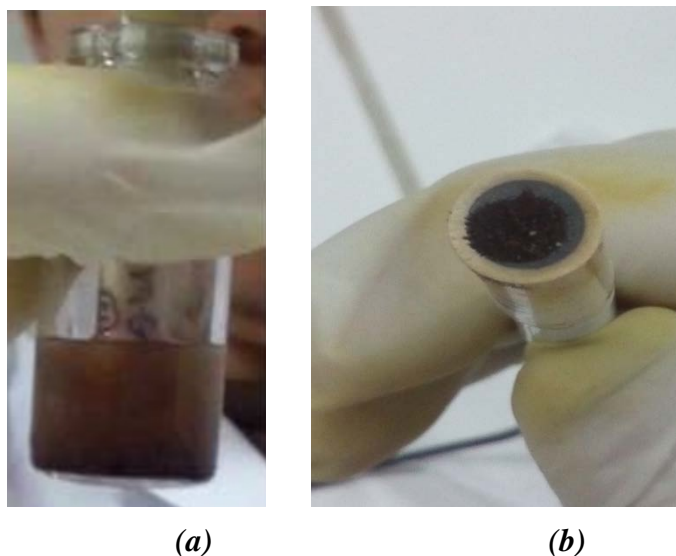
Solución	pH	Composición del Buffer
1	7.40	TRIS 0.1 mol.L <sup>-1</sup>
2	8.40	TRIS 0.1 mol.L <sup>-1</sup>
3	6.00	Citrato 0.1 mol.L <sup>-1</sup>
4	7.00	Citrato 0.1 mol.L <sup>-1</sup>
5	2.00	Glicina 0.1 mol.L <sup>-1</sup>
6	4.00	Glicina 0.1 mol.L <sup>-1</sup>

Luego de homogenizar durante 2 horas, se sumergió el m-CGE durante 60 segundos, para formar el electrodo MIP (E-MIP) (Figura N°2.1 y N°2.2).





**Figura N°2.1** Etapas para la formación del Electrodo MIP (E-MIP). (a) Homogeneización de la dispersión MIP. (b) Formación del sensor E-MIP. (c) Electrodo MIP listo para ser usado en la celda electrolítica.



**Figura N°2.2** Electrodo MIP (E-MIP). (a) m-CGE sumergido en solución dispersante con MIP, (b) Electrodo MIP formado.

## **2.6. Área de Trabajo del E-MIP**

Para determinar el área de trabajo del E-MIP y del E-NIP, se utilizaron las mismas condiciones para la formación del electrodo del estudio anterior. Con la solución dispersantes óptima, se realizaron varios barridos, variando la velocidad de este para así poder hallar el área de trabajo del electrodo en cuestión. Una vez obtenidos los datos, se continuará por el cálculo del área mediante la ecuación de Randles-Secvick, al saber el coeficiente de difusión del hierro en KCl 0.1M es de  $7.62 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [17].

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0^b D_0^{1/2} v^{1/2} \quad (1)$$

Donde el área (A) viene expresada en ( $\text{cm}^2$ ), el coeficiente de difusión de la especie oxidada ( $D_0$ ) en ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ), la concentración en el seno de la disolución de la especie oxidada ( $C_0$ ) en ( $\text{mol} \cdot \text{cm}^3$ ), la velocidad de barrido ( $v$ ) en ( $\text{V/s}$ ) y la corriente de pico ( $I_p$ ).

## **2.7. Caracterización Electroquímica del E-MIP en presencia de CDNB**

Se realizó un barrido usando la voltametría cíclica ( $-0.6\text{V} - 0.6\text{V}$ ,  $20\text{mV/s}$ ) para obtener el espectro electroquímico de la respuesta del E-MIP en presencia de CDNB. El análisis se llevó a cabo en solución buffer Britton-Robinson 0.1M ( $0.1\text{M CH}_3\text{COOH}$ ,  $0.1\text{M H}_3\text{BO}_3$ ,  $0.1\text{M H}_3\text{PO}_4$ ; pH 2) y etanol en relación 9:1 (v/v) con concentración de analito  $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . También se estudió los parámetros como la temperatura y la atmósfera de nitrógeno, para encontrar la intensidad de corriente mayor.

## **2.8. Optimización de los parámetros de medida usando VPD**

Para la optimización, las lecturas se realizaron tomando una solución BR/Etanol (9/1) y agregando solución de CDNB en etanol de modo que la concentración final de analito fuese de  $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Con las condiciones de temperatura y atmósfera de nitrógeno anteriormente usados, se comenzó con el tratamiento de parámetros tales como potencial de deposición, tiempo de deposición, etc. Así como también el tiempo de homogenización del MIP en solución

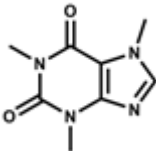
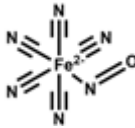
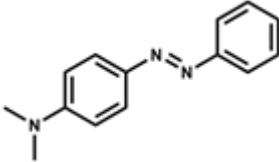
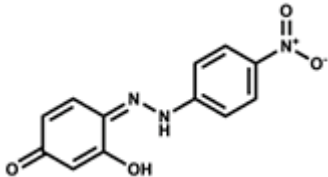
dispersante ( $t_{dis}$ ) (30min – 120min), el tiempo de formación del E-MIP ( $t_{for}$ ) (20s – 60s) y el tiempo de equilibrio ( $t_{eq}$ ) (5min – 15min) donde el CDNB llega por convección al E-MIP. Una vez obtenidos todas las condiciones óptimas, se estudió la concentración del buffer Britton-Robinson de 0.04M – 0.1M, además del pH del mismo, variando de 2-4 unidades de pH. [18].

## 2.9. Estudio de Selectividad del E-MIP

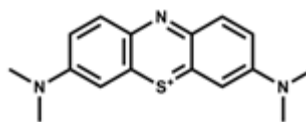
Para determinar la selectividad del E-MIP, se escogió compuestos de estructura similar, o que contengan grupos similares (e.g. anillo bencénico), con la intención de que puedan entrar en las cavidades del MIP.

Las soluciones de estos compuestos (interferentes) fueron hechas utilizando etanol como solvente. Las lecturas de estos interferentes (Tabla N°2.2.) fueron obtenidas usando las condiciones optimizadas anteriormente.

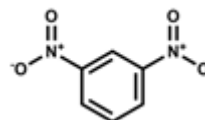
**Tabla N°2.2: Interferentes**

Compuestos	Estructura
Cafeína	
Nitroprusiato de sodio	
p-dimetil aminoazo benceno	
p-nitrobenzenoazo resorcinol	

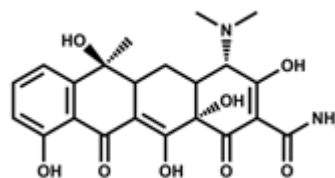
Azul de metileno



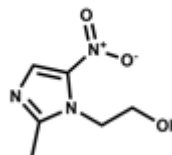
Dinitrobenzato



Tetraciclina



Metronidazol



## 2.10. Curva Analítica y Aplicación en muestra de agua potable

Para esta experiencia, se elaboró una curva analítica para acotar el rango de trabajo de nuestro sistema electroquímico para su uso en la determinación de CDNB en agua potable. Para llevar a cabo las medidas, se realizó por triplicado la curva analítica y así obtener los datos estadísticos para validar el método. Para la determinación del analito, se determinó la respuesta del agua potable en ausencia de analito, de manera de tener un blanco muestra, el cual será usado posteriormente en el cálculo para la cuantificación del CDNB, así como también, la respuesta de agua potable contaminada con analito, ambas medidas se realizaron por triplicado para validar el método.

## Capítulo 3

### Resultados y discusión

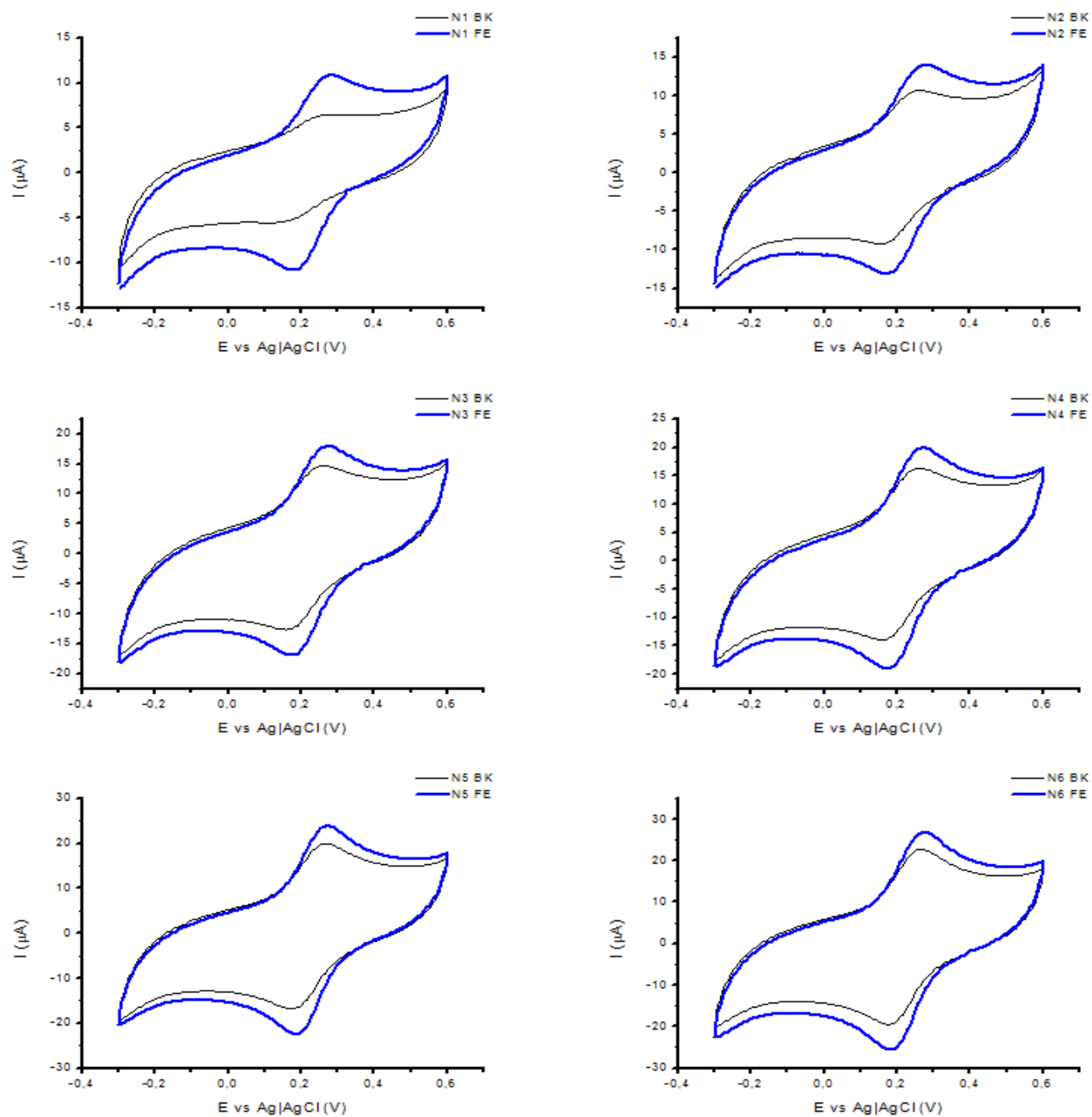
#### 3. Estudios de Caracterización y Optimización del E-MMIP

##### 3.1. Selección de la solución dispersante

Con el objetivo de formar sobre la superficie del m-GCE, películas finas y homogéneas, y para que los E-MMIP obtenidos sean reproducibles y ofrezcan resultados confiables, fueron evaluadas varias soluciones en diferentes pH (Tabla N°3.1) que fueron utilizadas para la dispersión de las MMIP, siendo el parámetro de elección, por su perfil reversible, la sonda ferrocianuro de potasio  $K_3[Fe(CN)_6]$ , usando el procedimiento descrito anteriormente para la formación del E-MMIP, luego se realizará la medida, y cuyos resultados se encuentran en la Figura N°3.1

*Tabla N° 3.1: Listado de las soluciones dispersantes evaluadas en la optimización del filme de MMIP en la superficie de m-GCE*

Soluciones	pH	Componentes
N1	7.40	TRIS $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ + NaCl $0.15 \text{ mol L}^{-1}$ + 0.05% Tween
N2	8.40	TRIS $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ + NaCl $0.15 \text{ mol L}^{-1}$ + 0.05% Tween
N3	6.00	Citrato $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ + NaCl $0.15 \text{ mol L}^{-1}$ + 0.05% Tween
N4	7.00	Citrato $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ + NaCl $0.15 \text{ mol L}^{-1}$ + 0.05% Tween
N5	2.00	Glicina $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ + NaCl $0.15 \text{ mol L}^{-1}$ + 0.05% Tween
N6	4.00	Glicina $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ + NaCl $0.15 \text{ mol L}^{-1}$ + 0.05% Tween



**Figura N° 3.1:** Voltagramas cíclicos de  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  en  $\text{KCl}$   $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . Medidas realizadas a velocidad de barrido de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ . BK: Ausencia de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , FE: Presencia de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ .

Como se puede observar aparentemente todas las soluciones dispersantes, permiten obtener perfiles reversibles para la sonda de ferrocianuro de potasio, debido a que la relación de la intensidad de corriente anódica y catódica es aproximadamente uno, por lo que se puede describir como un proceso redox reversible. Para la elección de la solución dispersante en este estudio, fue escogida aquella solución con la mayor intensidad de corriente (magnitud de intensidad de corriente). Para tal propósito, se compararon las diferencias de corrientes obtenidas (FE) y sus blancos (BK) (Figura N° 3.1), obteniendo los datos presentados en la Tabla N° 3.2.

**Tabla N° 3.2:** Solución Dispersante (Tabla 3.1) vs Diferencia de Corrientes del pico anódico (Figura 3.1)

Soluciones dispersantes	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
N1	-5.809
N2	-4.223
N3	-4.754
N4	-5.598
N5	-5.979
<b>N6</b>	<b>-6.286</b>

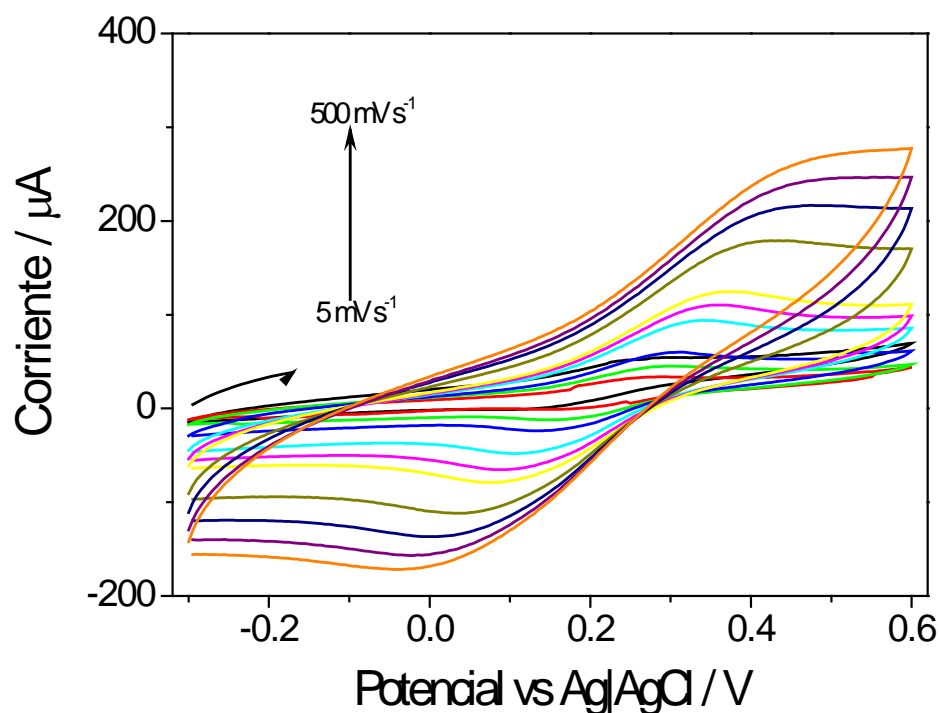
Como se puede observar la magnitud de corriente mayor corresponde a la de la solución dispersante N6, compuesta de glicina ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ), NaCl ( $0.15 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 0.05% Tween, a pH 4.0, por lo que se le eligió para realizar los análisis posteriores.

### **3.2. Estimativa del Área de Trabajo del E-MMIP**

Pensando en que el MMIP, por ser un material no conductor podría disminuir el área activa del m-GCE, y de esta forma, disminuir también la transferencia electrónica del analito para la superficie del electrodo, una estrategia para verificar si esto ocurría o no, sería estimar el área

superficial del m-GCE, y compararla con el E-MMIP obtenido usando la solución dispersante N6.

Así, para estimar el área activa del m-GCE, del E-MMIP y del E-MNIP, se empleó voltametría cíclica de la sonda reversible  $K_3[Fe(CN)_6]$  (Fig. N°3.2) y la ecuación de Randles-Sevcik (eq. 1) [24]. Los parámetros usados para estos experimentos se encuentran bien descritos en la literatura [13,14,18] y se refieren al número de electrones ( $n$ ) requeridos en la oxidación y reducción del Fe(II) a Fe(III) de la sonda siendo igual a 1; y la constante de difusión ( $D$ ) del Fe(III) en solución de KCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $7.62 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [17]. En este caso, fue variada la velocidad de barrido entre  $5 - 500 \text{ mV s}^{-1}$  en una ventana de potencial entre  $-0,300$  y  $+0.600 \text{ V vs Ag|AgCl}$ , manteniéndose la concentración de la especie oxidada ( $C_0$ ), proveniente del  $K_3[Fe(CN)_6]$ , constante a  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ .

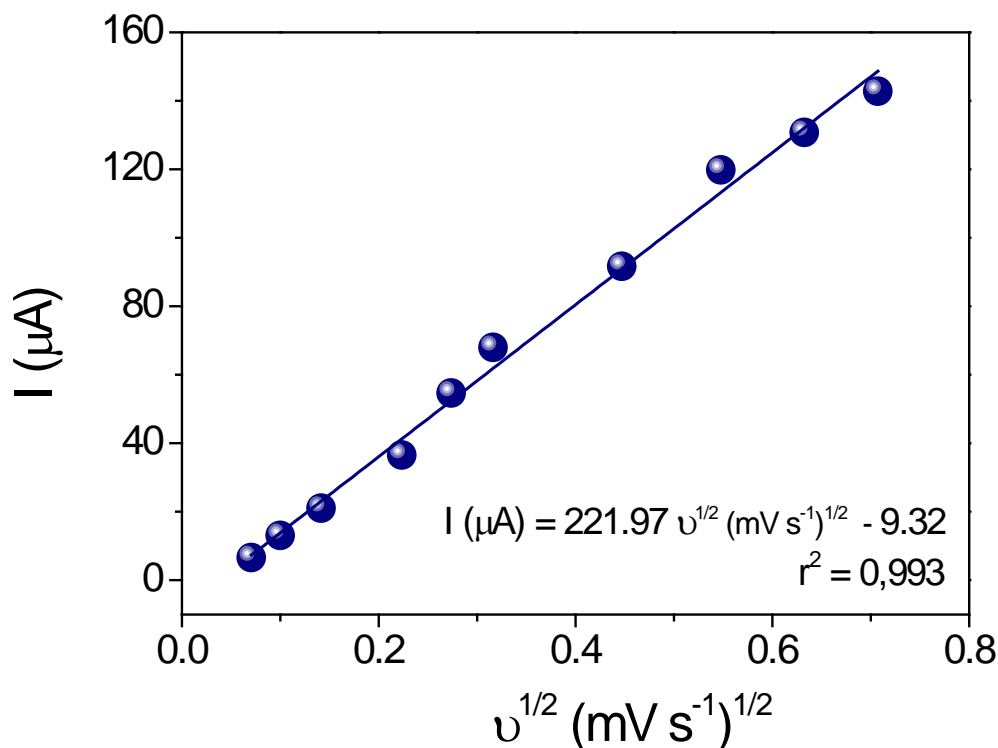


**Figura N°3.2:** Voltagramas de Fe(III)  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  en  $10 \text{ mL}$  de KCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  a diferentes velocidades de barrido:  $5, 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 \text{ mV s}^{-1}$  usando E-MMIP.



Como se puede predecir de la ecuación 1, la intensidad aumenta junto con el aumento de la velocidad de barrido; teniendo en cuenta que la intensidad de corriente es la carga (o electrones) pasada por el electrodo por unidad de tiempo, entonces, a menor tiempo (mayor velocidad de barrido), mayor intensidad de corriente [15].

Para determinar el área activa del E-MMIP, se construyó la recta de la Figura 3.3, comparando la intensidad de corriente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, y conforme la ecuación 1, usando el coeficiente angular de la ecuación lineal de ajuste se puede estimar el cálculo del área activa del electrodo en cuestión.



**Figura N° 3.3:** Intensidad de corriente ( $I$ ) vs Raíz cuadrada de la velocidad de barrido ( $v^{1/2}$ ) del E-MMIP

De manera similar, se realizaron pruebas con el m-CGE (electrodo magnético de compuesto de grafito) sin MIP y el MNIP (m-CGE con una película delgada de MNIP) para fines comparativos (Ver Anexo A.1).

Como se puede observar en la Tabla N° 3.3 el área del E-MMIP es mayor que para el E-MNIP, casi el triple, y en relación al m-CGE más que el triple de su área, por lo que se puede afirmar que cuando se prepare el E-MMIP, este presentará la más alta transferencia electrónica, garantizando una mayor sensibilidad al sistema de análisis, además de la selectividad ofrecida por el MMIP.

**Tabla N°3.3:** Área activa estimada para los electrodos usados en esta tesis

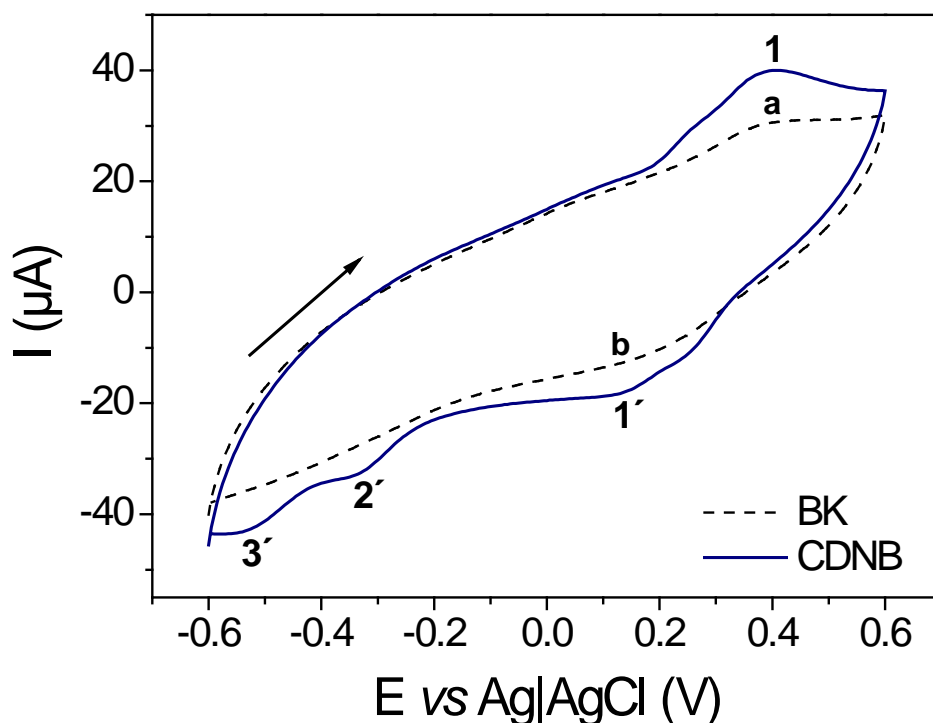
Electrodo de trabajo	Área activa (cm <sup>2</sup> )
<b>E-MMIP</b>	<b>0.0359</b>
E-MNIP	0.0129
m-CGE	0.0105

Adicionalmente, esta mayor área activa para el E-MMIP, puede ser explicada debido a la mayor cantidad de cavidades selectivas presentes en el material impreso molecularmente, a diferencia del E-MNIP, que presenta un área activa ligeramente superior al m-GCE, mostrando que a pesar de los MMIP y MNIP ser materiales aislantes, sus características porosas contribuyen a mejorar y/o mantener la transferencia electrónica entre el analito y la superficie conductora. [26]

### 3.3. Caracterización electroquímica del CDNB en el E-MMIP

Para conocer el comportamiento electroquímico del CDNB en la superficie del electrodo de trabajo, se estudió el comportamiento electroquímico de este mediante la voltametría cíclica. Se utilizó como solución electrolítica al buffer BR (pH en 2.0), la elección de este electrolito

es debido a que es muy usada en la literatura y en especial para este analito [13,14,19,20], y la adición del etanol fue realizada para ayudar en la disolución de CDNB, ya que este es muy poco soluble en agua. De esta manera, se obtuvo el voltagrama mostrado en la Figura N° 3.4.

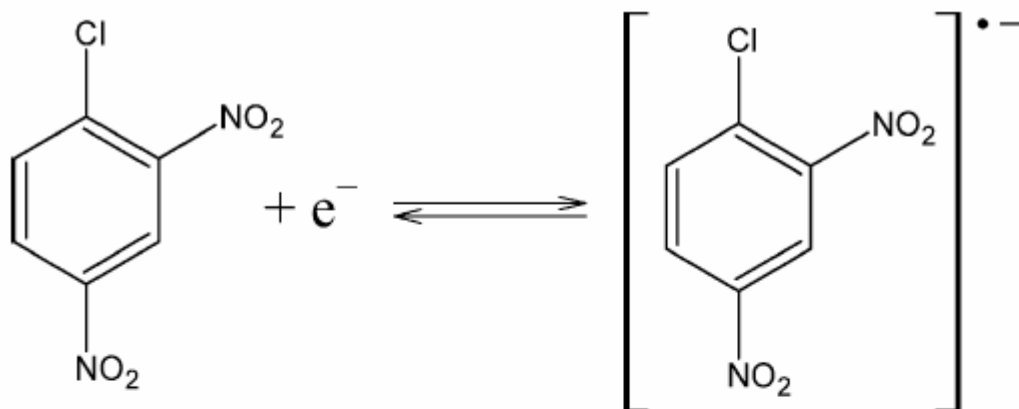


**Figura N°3.4:** Voltagrama de CDNB  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en solución electrolítica BR-ET (pH en 2.0 y relación 9:1 (v/v)) a  $25^\circ\text{C}$  y  $20\text{mV/s}$ .

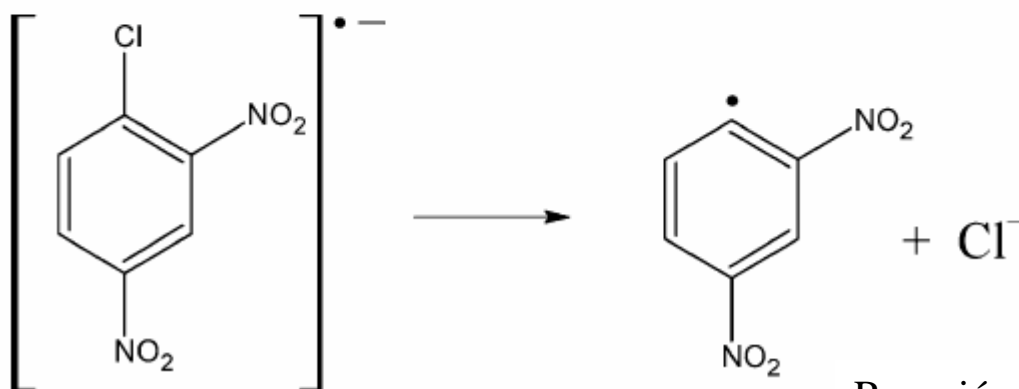
Se pueden observar tres picos en  $0.12 \text{ V}$  (1),  $-0.33 \text{ V}$  (2) y  $-0.54 \text{ V}$  (3) en la zona de reducción, y uno en la región de oxidación a  $0.4 \text{ V}$  (1) indicando la presencia del analito CDNB en la superficie del sensor. Los picos 2 e 3 son relativos al analito, lo cual es corroborado con la literatura consultada, que indican que al pH trabajado aparece para el CDNB un pico de reducción alrededor de  $-0.4 \text{ V}$  vs electrodo de referencia Cu|CuCl, que corresponde a la reducción del grupo nitro [13-14], además la literatura sugiere también que es debido a una fragmentación reductora del enlace carbono-cloro [19-20]. Sin embargo, en este caso ese pico se desdobra en dos (2' y 3') debido a la naturaleza nano-estructurada de la fase sensora.

M. Arun Prasad [19] propone las reacciones mostradas a continuación, explicando que el electrón entrante es acomodado en el orbital  $\pi^*$  de baja energía, rompiendo el enlace C-Cl (Rx 1 y 2), luego las reacciones 3a y 3b pueden ocurrir, la reacción 3a (Rx 3a) puede adquirir el

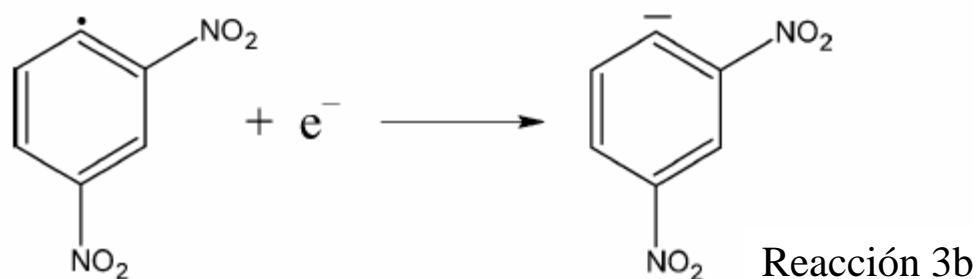
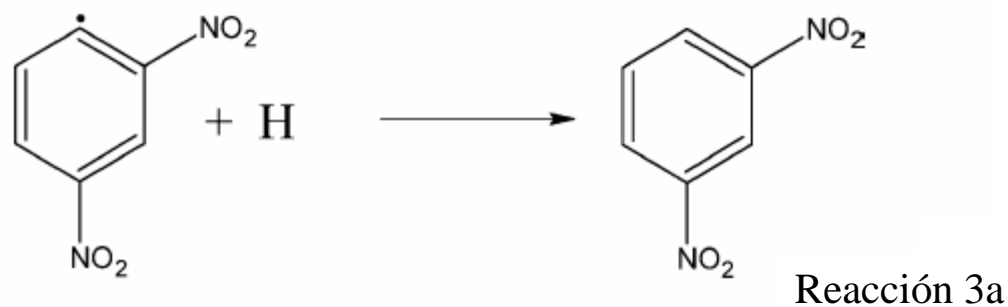
hidrogeno de la solución, mientras que la 3b (Rx 3b) es la transferencia del electrón para formar el anión.



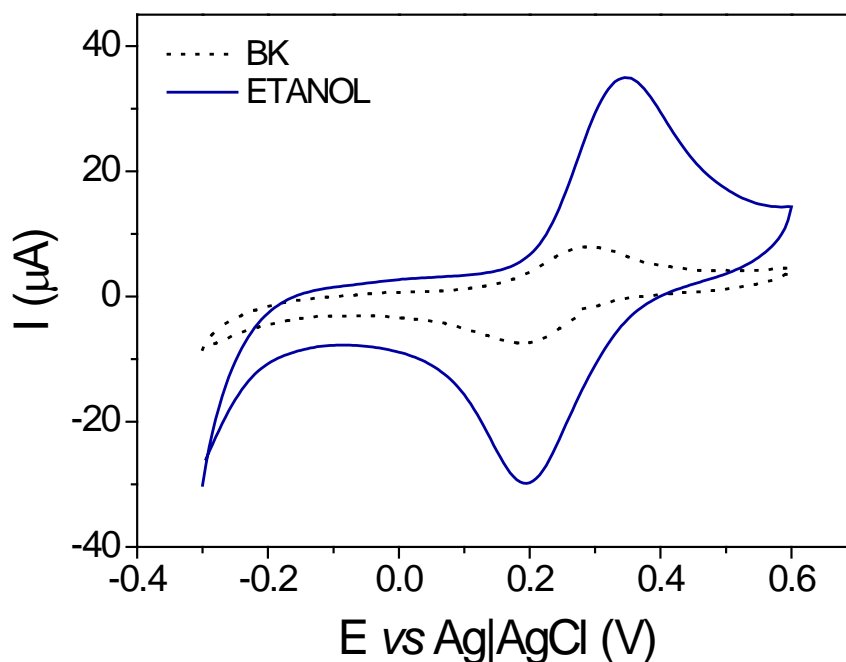
Reacción 1



Reacción 2



Los picos a y a' pueden ser explicados debido a la óxido-reducción del etanol presente en la solución electrolítica, esto puede ser corroborado en los perfiles voltamétricos presentados en la Figura N° 3.5, la cual muestra que a medida que se adiciona etanol al sistema, la corriente en estos dos picos aumenta de forma reversible.

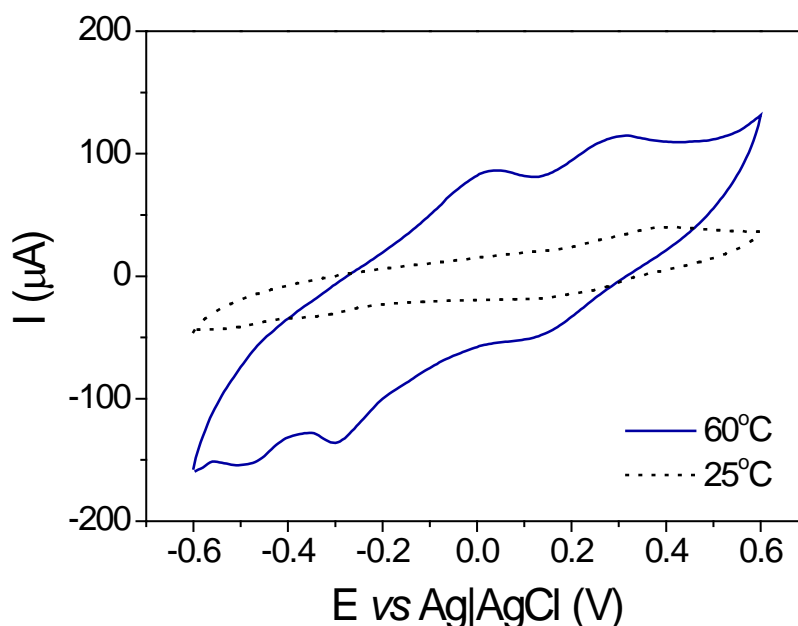


**Figura N°3.5:** Voltagramas cíclicos en respuesta de  $0.2 \text{ mmol L}^{-1}$  etanol en solución electrolítica BR en el sistema E-MMIP a  $25^\circ\text{C}$  y  $20\text{mV/s}$ .

### 3.4. Influencia de la Temperatura y Oxígeno en la respuesta del sensor para CDNB

#### 3.4.1. Influencia de la Temperatura

Se estudió también el efecto de la temperatura, esperando no solo el aumento de la señal, si no también, una mejor disolución del CDNB en la celda de medida, puesto que a  $25^\circ\text{C}$  al agregar mayor cantidad de analito, este no se disolvió completamente, permaneciendo en la parte superior de la celda electrolítica dejando de interactuar con el MMIP en la superficie del electrodo m-CGE. Al elevar la temperatura a  $60^\circ\text{C}$  el perfil voltamétrico se modificó, mostrando mayor intensidad 2' y 3' y disminuyendo el valor de los potenciales de  $-0.33 \text{ V}$  para  $-0.296$ ; y de  $-0.54 \text{ V}$  para  $0.497 \text{ mV vs Ag|AgCl}$ , respectivamente (Figura N°3.6), significando una mejora en la transferencia de masa del analito hacia la fase sensora de MMIP y llevando adicionalmente a una mejora en la resolución de los picos.

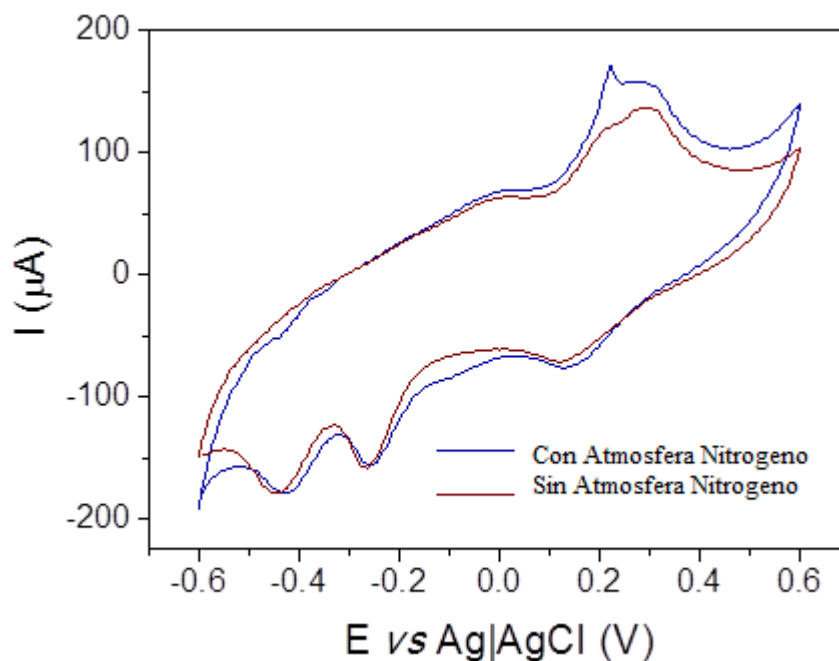


**Figura N°3.6:** Voltagramas cíclicos del CDNB en solución electrolítica BR-ET a 25°C y 60°C, a 20mV/s

Por todas estas razones la temperatura de 60 °C fue tomada para la realización de los estudios posteriores. Temperaturas superiores no fueron evaluadas, por ser energéticamente inviables debido a que el alcohol puede escapar de la solución, variando la concentración de CDNB y reducir la solubilidad de este en la solución.

### 3.4.2. Influencia del oxígeno

Debido a que el oxígeno puede ser un interferente en el sistema electroquímico propuesto, fueron realizados experimentos en atmosfera de nitrógeno y sin atmosfera de nitrógeno, usando en este caso una atmósfera de nitrógeno. Para tal, fue burbujeado gas  $\text{N}_2$  en la solución de medida, permitiendo desplazar el oxígeno disuelto en la solución electrolítica. De esta forma, fueron registrados los voltagramas de la Figura N°3.7, y como se puede visualizar en dicha figura, la influencia del oxígeno es prácticamente imperceptible en la zona donde ocurre la reducción, que es donde el analito CDNB se reduce en el sistema propuesto, por lo que se decidió trabajar sin atmosfera de nitrógeno lo cual es económicamente más viable, en relación a costo por análisis y costo energético.



**Figura N°3.7:** Voltagramas de CDNB en solución electrolítica BR-ET obtenidos con el sensor propuesto en la presencia y ausencia de una atmósfera de nitrógeno a 60°C y 20mV/s.

### 3.5. Optimización de la formación de la fase sensora del E-MMIP

Para la cuantificación del CDNB usando el E-MMIP, se eligió la técnica de voltametría de pulso diferencial adsorptiva con redisolución catódica (DPAdCSV del inglés *differential pulse adsorptive cathodic stripping voltammetry*) [25], debido a que permite mediciones con mayor sensibilidad y sería más adecuada a la configuración del sensor propuesto. [15]

#### 3.5.1. Optimización de los parámetros DPAdCSV

Luego de una serie de experiencias realizadas, para optimizar los parámetros electroquímicos de la DPAdCSV, se obtuvieron los siguientes valores. Potencial de adsorción/deposición de -0.20 V vs Ag|AgCl; tiempo de deposición de 60 s; ventana de potencial entre -0.25 y -0.48 V; amplitud de potencial 4 mV; pulso de potencial de 0.12 V y una velocidad de barrido de 4mV s<sup>-1</sup>.



### **3.5.2. Optimización de la formación de la fase sensora del E-MMIP**

Todos los resultados presentados a continuación corresponden a experimentos realizados por triplicado.

#### **3.5.2.1. Tiempos de homogenización de la solución dispersante**

Este parámetro se refiere al tiempo de homogeneización del MMIP en la solución dispersante N6. Para esto fueron evaluados tiempos de homogenización ( $t_{dis}$ ) de 30 min, 60 min y 120 min, y los resultados de corriente obtenidas para  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> de CDNB son mostrados en la Tabla N°3.4.

*Tabla N°3.4: Intensidad de corriente a diferentes tiempos de homogenización de las MMIP en la solución dispersante N6.*

$t_{dis}$ (min)	Corriente ( $\mu A$ )
30	-34.49
60	-66.73
<b>120</b>	<b>-90.39</b>

Se puede observar que a medida que el tiempo de dispersión aumenta la intensidad de corriente, también. Esto puede ser debido a que al estar más tiempo el MMIP siendo homogenizado en la solución dispersante N6, la uniformidad de la suspensión es mejor, y esta al ser atraída por el campo magnético del m-CGE puede atraer una cantidad mayor de nanopartículas de MMIP aumentando el área activa del sensor, la cual está relacionada directamente con la intensidad de corriente observada, porque al tener mayor área de contacto, la transferencia de carga es mayor. De esta forma, la intensidad de corriente de mayor magnitud fue obtenida, usando suspensiones de MMIP en N6, homogenizadas durante 120 min.

### **3.5.3. Tiempo de formación del sensor de MMIP en la superficie del m-CGE y tiempo de equilibrio para la adsorción del CDNB**

Estos parámetros fueron optimizados para escoger el tiempo de formación del sensor en la superficie del E-MMIP ( $t_{for}$ ) y el tiempo necesario para que la máxima cantidad de analito sea adsorbido en la fase sensora ( $t_{eq}$ ). Para esto fueron evaluados los tiempos de formación de 20 s, 40 s y 60 s, y tiempos de equilibrio de adsorción ( $t_{eq}$ ) de 5 min, 10 min y 15 min. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla N°3.5.

*Tabla N°3.5: Intensidad de corriente a diferentes tiempos de equilibrio y formación para el sensor propuesto en la presencia de  $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de CDNB*

$t_{eq}$ (min)	$t_{for}$ (s)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
5	20	-118.3
5	40	-109.0
5	60	-105.8
10	20	-127.5
10	40	-102.7
10	60	-105.2
<b>15</b>	<b>20</b>	<b>-145.6</b>
15	40	-123.4
15	60	-125.9

Puede observarse en la Tabla N°3.5, que el tiempo de formación del E-MMIP tiende a ser inversamente proporcional a la intensidad de corriente, con lo que, a menores tiempos de formación, la intensidad es mayor. Esta característica puede ser explicada por el grosor de la capa de MMIP formada sobre el m-CGE en función del tiempo, así, mientras mayor sea el tiempo de formación de esa capa, mayor será la cantidad de MMIP sobre el electrodo, y más difícil serán las transferencias de masa y electrónica, siendo reflejado en la disminución de la señal de corriente. [15]

El aumento de la intensidad de corriente con el tiempo de equilibrio ( $t_{eq}$ ), para la adsorción del analito en la fase sensora de MMIP en el sensor propuesto, se puede explicar por la mayor cantidad de moléculas de CDNB llegando a la superficie del E-MMIP, de esta manera, mientras mayor sea el tiempo, mayor será la cantidad de moléculas adsorbidas en la superficie del sensor. Sin embargo este comportamiento no es totalmente creciente, y habrá un tiempo máximo en el cual se obtenga la mayor cantidad de moléculas adsorbidas de analito, y a este tiempo se le denomina tiempo de equilibrio de adsorción, pues mientras mayor sea el tiempo de contacto entre el material adsorbente y el adsorbido, comienza a prevalecer el equilibrio de desorción, pues el etanol del electrolito-soporte en la celda de medida puede competir por la disolución del analito, dificultando el equilibrio heterogéneo de adsorción en las cavidades selectivas del MMIP. En este caso el tiempo de 15 minutos fue suficiente para observar que este equilibrio de adsorción sea alcanzado. Adicionalmente, a mayores tiempos de adsorción, se corre el riesgo de que, debido a la temperatura empleada (60°C), el volumen de la solución de medida empiece a disminuir, ya que al usar etanol su punto de evaporación es bajo y además el uso de etanol es empleado para la solubilidad del analito, lo que perjudicaría la reproductibilidad de los análisis. Con esta información, la intensidad de corriente mayor obtenida fue empleando 15min en tiempo de equilibrio ( $t_{eq}$ ) y 20s en el tiempo de formación del sensor ( $t_{for}$ ).

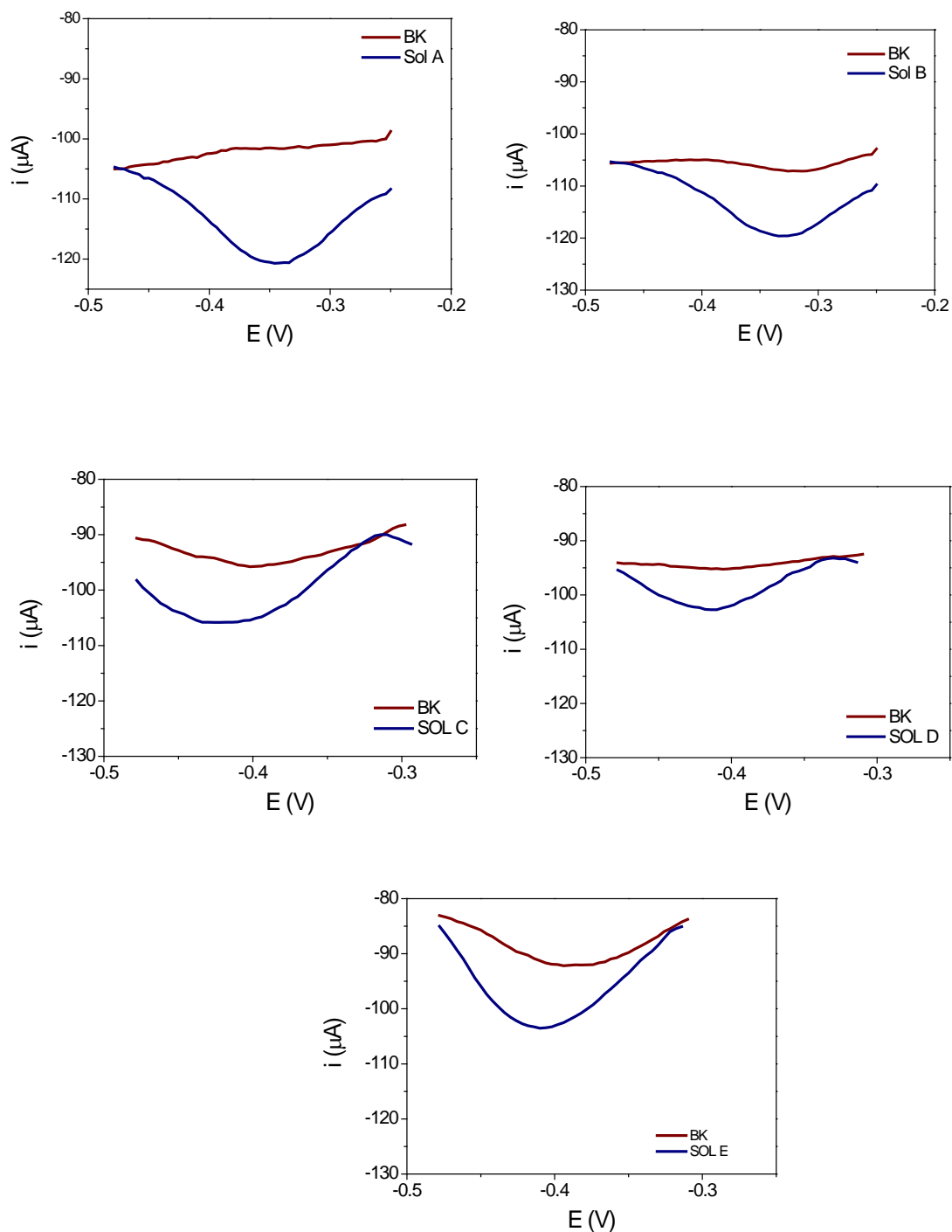
### 3.5.4. Optimización del electrolito soporte

Como fue mencionado anteriormente, la elección del buffer Britton-Robinson (BR) fue tomada tras la revisión de literatura [13,14,19,20]. Sin embargo, como es conocido, la concentración y el pH de la solución electrolítica afecta la respuesta del sistema, por lo que se estudiaron estas variables, como es mostrado en la Tabla N° 3.6. El estudio de pH se hace debido a que la concentración de protones de hidrógeno puede influir a la reducción del CDNB [19], y el estudio de la concentración se realiza para emplear menos recursos y economizar el método propuesto.

**Tabla N°3.6:** Soluciones buffer Britton-Robinson

<b>Solución</b>	<b>pH</b>	<b>Concentración (mol L<sup>-1</sup>)</b>
A	2.00	0.040
B	2.00	0.080
C	4.00	0.040
D	4.00	0.080
E	2.00	0.100

Las experiencias se realizaron en las soluciones electrolíticas mencionadas en presencia de  $5,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de CDNB, con los parámetros anteriormente optimizados, obteniendo de este modo los voltagramas presentes en la Figura N° 3.8.



**Figura N°3.8:** Voltagramas de  $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de CDNB en diferentes soluciones electrolíticas estudiadas, para evaluación del pH. Sol. A-E.: Solución BR (Tabla N°3.6) –ET (9:1) con CDNB. BK: Blanco de la respectiva solución.

Como se realizó anteriormente, para comparar y saber cuál solución es la mejor, se compararon los valores de las intensidades de corriente en la presencia de CDNB y los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla N° 3.7.

**Tabla N°3.7:** *Intensidad de corriente obtenidas para diferentes soluciones de electrolito soporte*

<b>Solución</b>	<b>I (<math>\mu</math>A)</b>
<b>A</b>	<b>19.20</b>
B	12.82
C	11.54
D	7.50
E	11.90

Se puede observar que la intensidad de corriente mayor es el de la solución A, por lo que se elige como solución óptima para las siguientes experiencias y en la optimización del método. Además, el pico de reducción está más cerca de 0 V, con lo se reduce la cantidad de interferentes ya que, a potenciales más altos puede haber diversas reducciones de especies químicas, que no sea la de interés. Aunque el MMIP ofrece selectividad inherente, esta selección del electrolito soporte mejorará aún más el desempeño del sensor propuesto.

Adicionalmente, se observa que a pH 2.0 son obtenidas las mayores intensidades de corriente, y puede ser explicado porque a pH más bajos la reducción es favorecida al haber una mayor cantidad de iones hidrógeno, los cuales intervienen en la reducción de los grupos nitro en el CDNB [13-14], además la menor cantidad de iones en la solución A, al tener una concentración menor ( $0.040 \text{ mol L}^{-1}$ ), permite a una mejor difusión del analito hacia el E-MMIP, aumentando

la adsorción en el MMIP y como consecuencia obteniéndose mayores intensidades de corriente [15].

### 3.6. Selectividad del E-MMIP construido

En esta de parte, serán mostrados los estudios realizados para evaluar la selectividad del E-MMIP, así como también compararla con la del E-MNIP, que es el polímero control. Para esto, fueron usados todos los parámetros que fueron hasta aquí optimizados. En estos experimentos la concentración de cada interferente fue de  $2.5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (Tabla N° 2.2) y la del CDNB fue de  $2.5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

Así, se comparó la intensidad de corriente de estos con la del CDNB, la relación de la respuesta del interferente y la del CDNB son mostradas en las Tablas 3.8 y 3.9 para el E-MMIP y el E-MNIP, respectivamente.

**Tabla N°3.8:** Relación de respuesta entre interferente y CDNB usando el E-MMIP

Interferentes	I ( $\mu$ A)	Relación Interf.- CDNB	%Relación
1-cloro 2,4-dinitrobenceno	30.50	1.000	100.0
Cafeína	4.53	0.148	14.8
Nitro prusiato de sodio	2.49	0.082	8.2
<i>p</i> -dimetil aminoazo benceno	15.10	0.496	49.6
<i>p</i> -nitrobencenoazo resorcinol	10.20	0.334	33.4

Azul de metileno	1.86	0.061	6.10
Dinitrobenceno	12.70	0.417	41.7
Tetraciclina	1.03	0.034	3.4
Metronidazol	1.47	0.049	4.9

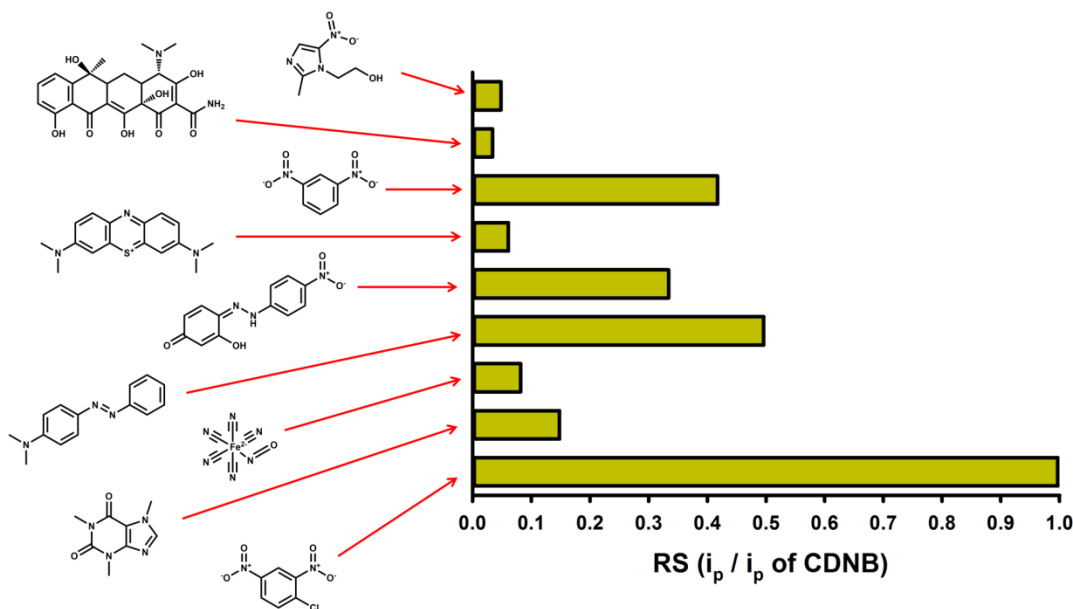
**Tabla N°3.9:** Relación de respuesta entre interferente y CDNB usando el E-MNIP

Interferentes	I ( $\mu$ A)	Relación Interf.-CDNB	%Relación
1-cloro 2,4-dinitrobenceno	22.69	1.000	100.0
Cafeína	4.53	0.200	14.8
Nitroprusiato de sodio	2.49	0.110	11.0
p-dimetil aminoazo benceno	14.94	0.658	65.8
p-nitrobencenoazo resorcinol	14.32	0.631	63.1
Azul de metileno	3.45	0.152	15.2
Dinitrobenceno	12.47	0.550	55.0
Tetraciclina	1.64	0.072	7.2
Metronidazol	1.49	0.066	6.6



De las tablas anteriores se puede observar que la selectividad del E-MMIP frente al E-MNIP es mayor, al tener una relación entre el interferente y el CDNB menor. Además, se puede observar también que los porcentajes de interferencia en el caso del E-MMIP son menores al 50% para todos los analitos, lo cual puede ser atribuido a la capa sensora formada por un polímero molecularmente impreso [21-23].

Para apreciar mejor la comparación de esta selectividad, fue construida la Figura 3.9 con las respectivas estructuras moleculares de los interferentes. Los compuestos que generan mayor interferencia son los que tienen en su estructura grupos nitro, que pueden encajarse en las cavidades del MMIP, y grupo azo a los cuales el electrodo tiende espontáneamente a reducir.



**Figura N° 3.9:** Selectividad del E-MMIP

### 3.7. Perfil analítico y aplicación del E-MMIP construido

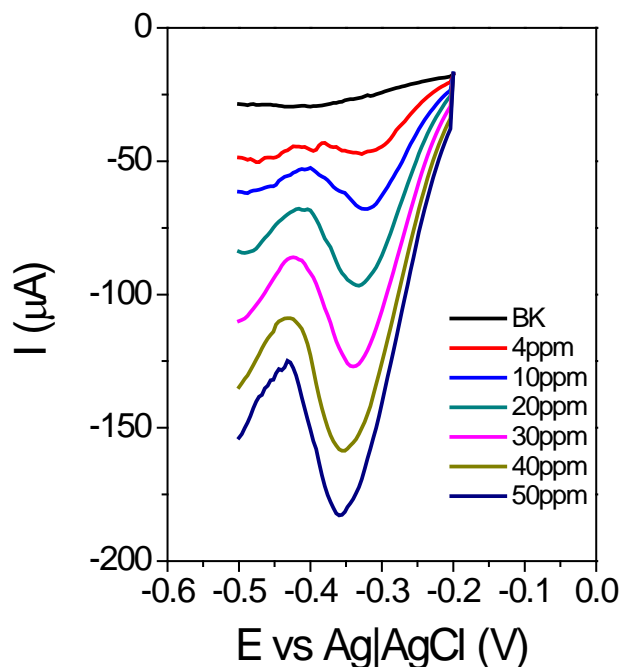
Una vez optimizado la señal de respuesta del E-MMIP propuesto, fueron registrados los voltogramas de pulso diferencial en el rango de 4.0 a 50 mg L<sup>-1</sup> (2.0 a 25 μmol L<sup>-1</sup>, Figura 3.10),

y a continuación fue construida la respectiva curva analítica (Figura 3.11) que se ajustó linealmente ( $r^2$  de 0.999 para  $n = 6$ ) con la siguiente ecuación matemática:

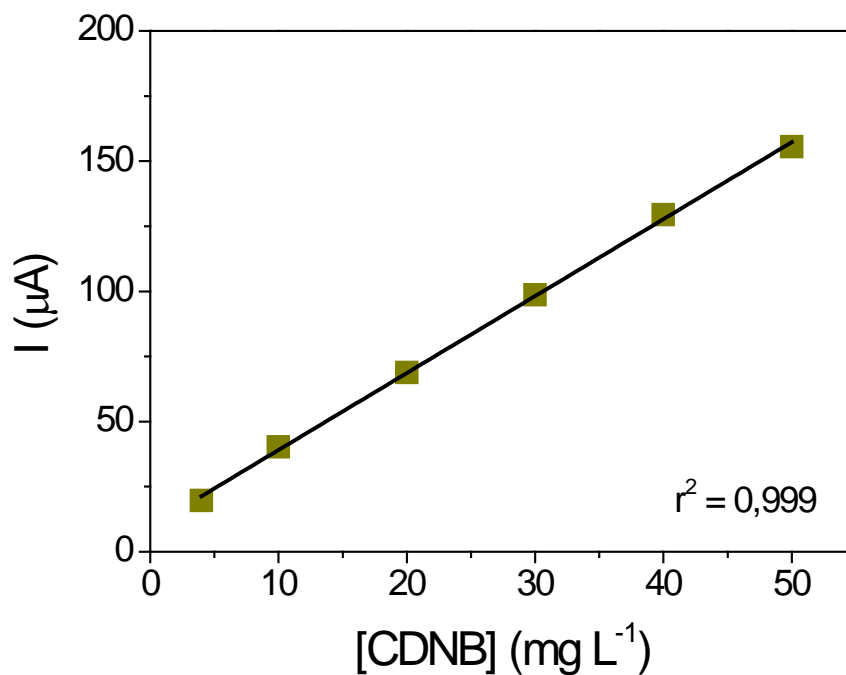
$$I (\mu\text{A}) = (2.92 \pm 0.05) \times [\text{CDNB}] (\text{mg L}^{-1}) - (9 \pm 1) \quad (\text{eq. 2})$$

Con los datos obtenidos en estos experimentos fueron calculados el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC), siendo de ( $0.9$  y  $3.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) respectivamente. Los cuales fueron calculados como tres y diez veces la desviación estándar, respectivamente.

La repetibilidad fue evaluada comparando los valores de cinco pendientes de curvas de calibración, y la desviación estándar relativa (RSD) obtenida fue de 2.7%.



**Figura N°3.10:** Perfil de respuesta del sensor propuesto en esta tesis.  $E_{dep}$ :  $-0.2\text{V}$ ,  $E_o$ :  $-0.25\text{V}$ ,  $E_f$ :  $-0.48\text{V}$ ,  $A_E$ :  $4\text{mV}$ ,  $E_{pulse}$ :  $0.12\text{V}$ ,  $V$ :  $4\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $T$ :  $60^\circ\text{C}$



*Figura N°3.11: Curva analítica del E-MMIP obtenida con los datos de la  
Figura 3.10*

Finalmente, para evaluar la aplicabilidad del sensor propuesto, se analizó agua potable fortificada con CDNB, y también del agua potable sin fortificar para tener la señal de *background* de la matriz, siendo ambas realizadas por triplicado. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla N° 3.10. Se determinó que la recuperación media del CDNB en el agua potable fue de 105.4 (±3.7)%, mostrando la viabilidad del sensor para análisis de muestras reales.

**Tabla N°3.10:** Porcentajes de recuperación de muestra contaminada.

Replicada	%Recuperación	%Recuperación media
N°1	106.4	
N°2	108.6	105.4% ± 3.7%
N°3	101.3	

## **Capítulo 4**

### **Conclusiones y recomendaciones**

#### **4.1. Conclusiones**

En la presente tesis, se introduce una aplicación inédita para los MMIP, dando la posibilidad de utilizarlos como fases de reconocimiento en la construcción de sensores electroquímicos de la alta selectividad, con índices de recuperación satisfactorios para muestras de agua potable.

Se preparó un sensor electroquímico empleando MMIP y m-CGE, el E-MIP, cuyos parámetros electroquímicos y analíticos fueron debidamente optimizados y estudiados siendo estos: solución dispersante de glicina, NaCl y Tween a pH 4.0, solución electrolítica 0.04M Britton-Robinson:Etanol (9:1) pH 2.0, Temperatura de lectura: 60°C, los tiempos de homogeneización, de formación del sensor y de equilibrio son 120min, 20s y 15min, respectivamente. Se comprobó que el analito CDN B es adsorbido por el MMIP, porque la respuesta electroquímica del sensor construido se verifica con la literatura que estudia el comportamiento electroquímico del analito. [13,14,19]

Se determinó la alta selectividad del sensor, pues al someter este a diversos compuestos, la relación entre la señal del interferente y el analito fue menor del 50%, lo que es aceptable cuando se habla de polímeros de impresión molecular. Los compuestos con mayor señal de interferencia fueron los que tenían un anillo benceno en su estructura además de contener grupo nitrogenados en sus estructuras, por lo que se podría esperar que otras especies que contenga esas estructuras puedan interferir, pero no en gran medida como se demostrado en esta tesis.

El sensor construido muestra altos índices de recuperación  $105.4\% \pm 3.7\%$  en agua potable contaminada con CDN B, en el rango de trabajo 4.0 – 50.0 mg L<sup>-1</sup> con coeficiente de correlación

lineal alta ( $r^2 = 0.9999$ ) abriendo una ventana de compuesto para análisis en muestra de agua potable.

#### **4.2.Recomendaciones**

El método podría ser modificado, realizando previamente un proceso de incubación dentro de la solución dispersante, tanto para eliminar errores sistemáticos como para simplificar el procedimiento presentado en esta tesis y extraer selectivamente el analito en bajas concentraciones.

El método de síntesis del MMIP, también podría ser cambiado (*i.e.* método del polirol para la obtención de las nanopartículas de magnetita o en la elección de los monómeros funcionales en la síntesis del m-MIP) y comparar la respuesta electroquímica usando el procedimiento aquí expuesto, con la finalidad de verificar cuáles serían las ventajas de esos cambios en relación a este trabajo.

## **Referencias bibliográficas**

1. Gupta, A.K.; Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.
2. Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicação de MIP (Molecularly Imprinted Polymers) em técnicas de extração e separação. *Química Nova*, v. 28, p. 1076-1086, 2005.
3. Haupt, K.; Linares, A.; Bompert, M.; Sum, B. Molecularly imprinted polymers. *Top Curr Chem* (2012) 325: 1-28.
4. Uzuriaga-Sánchez, R. J.; Khan, S, Wong, A.; Picasso, G; Pividori, M. I.; Sotomayor, M. D. P. T. Magnetically separable polymer (Mag-MIP) for selective analysis of biotin in food samples. *Food Chemistry*, v. 190, p. 460-467, 2016.
5. Arvind Sai Sarathi Vasan, Ravi Doraiswami, Dinesh Michael Mahadeo, Yunhan Huang and Michael Pecht, Point-of Care Biosensor Systems, *Frontiers in Bioscience, Scholar*, v. 5, p. 39-71, January 1, 2013.
6. Finklea J. et al. Nitrocompuestos Alifáticos en: *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. 4ta Ed. Ministerio del Trabajo y Asuntos Sociales, España. 1998.
7. Haupt, K.; Linares, A.; Bompert, M.; Sum, B. Molecularly imprinted polymers. *Top Curr Chem* (2011) 325: 1-28.
8. Cormark A.G., Elorza A., Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization. *Journal of Chromatography B*, 804 (2004) 173-182.
9. Villar-Navarro M., Martin-Valero M., Fernández-Torres R. M., Callejón-Mochón M. Bello-López M. A. Easy, fast and environmental friendly method for the simultaneous extraction of the 16 EPA PAHs using magnetic molecular imprinted polymers (mag-MIPs), *Journal of Chromatography B* (2017) <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.009>.
10. Shilei Ji, Nan Li, Yong Shen, Qi Li, Juan Qiao, Zhibo Li, Poly(amino acid)-based thermoresponsive molecularly imprinted magnetic nanoparticles for specific recognition and release of lysozyme. *Analytica Chimica Acta*, 2016.
11. Soniya S. Vaidya, Phillip M. Gerk, Simultaneous determination of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione and its metabolites for human placental

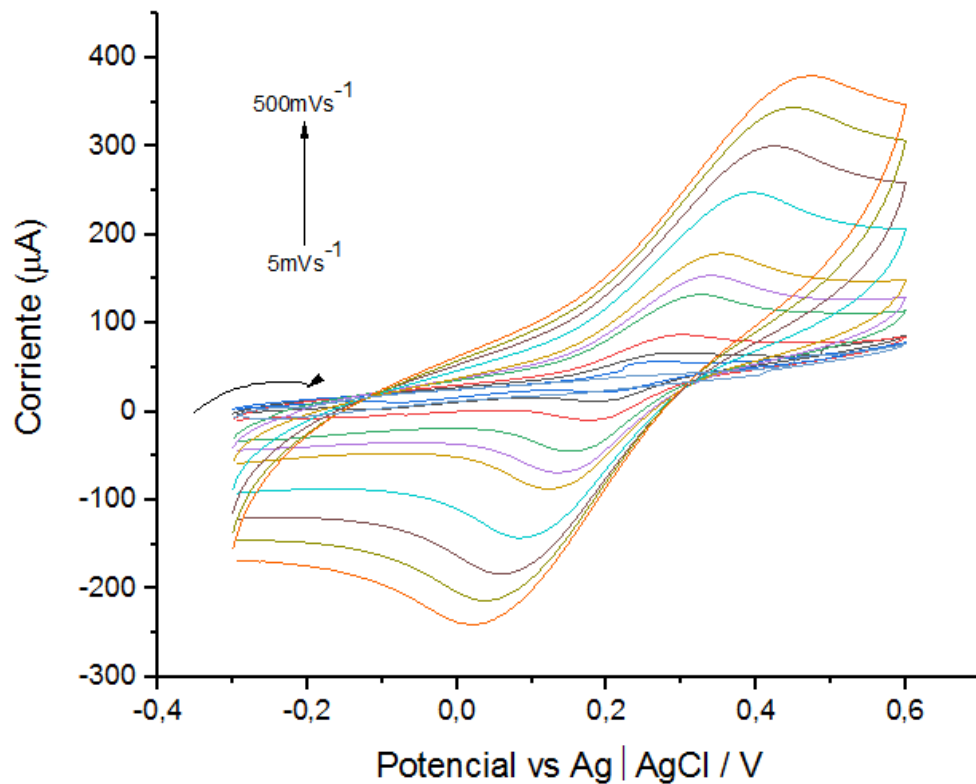
- disposition studies by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 859 (2007) 94-102.
12. Saarnilehto M, Chapman H, Savinko T, Lindstedt K, Lauerma AI, Koivisto A. Contact sensitizer 2,4-dinitrochlorobenzene is a highly potent human TRPA1 agonist. *Allergy* 2014; 69: 1424–1427.
  13. Konarev A. A., Novikov V. T. Electrochemical Selective Reduction of 2,4-dinitrochlorobenzene. *Russian Journal of Electrochemistry*, 2010, Vol. 46, No. 8, pp. 934-940.
  14. Konarev A. A., Novikov V. T. Polarographic Behavior of 2,4-dinitrochlorobenzene and Products of Its Reduction. *Russian Journal of Electrochemistry*, 2013, Vol. 49, No. 1, pp. 81-85.
  15. Allen J. Brad, *Electrochemical Methods – Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc. 2<sup>nd</sup> Ed. 2001, United States of America.
  16. Zacco E., Pividori M. I., Alegret S. Electrochemical Magnetoimmunosensing Strategy for the Detection of Pesticides Residues. *Analytical Chemistry*, Vol. 78, No.6, March 15, 2006.
  17. Gutiérrez A., Bárcena M., Casillas N., Escalante J. I. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de metal hexacianoferrato obtenidas en microemulsiones inversas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(7), 457-470 (2010).
  18. D. Chen, J. Deng, J. Liang, J. Xie, C. Hu, K. Huang, A coreshell molecularly imprinted polymer grafted onto a magnetic glassy carbon electrode as a selective sensor for the determination of metronidazole, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.04.050>.
  19. M.A. Prasad, M. V Sangaranarayanan, Electrochemical reductive cleavage of carbon–chlorine bond in 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, *Electrochim. Acta*. 51 (2005) 242–246. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2005.04.019>.
  20. I. Gallardo, G. Guirado, J. Marquet, Mechanistic studies on the reactivity of halodinitrobenzene radical-anion, *J. Electroanal. Chem.* 488 (2000) 64–72. doi:10.1016/S0022-0728(00)00189-3.
  21. R. Wang, Y. Wang, C. Xue, T. Wen, J. Wu, J. Hong, X. Zhou, Selective separation and enrichment of glibenclamide in health foods using surface molecularly imprinted polymers



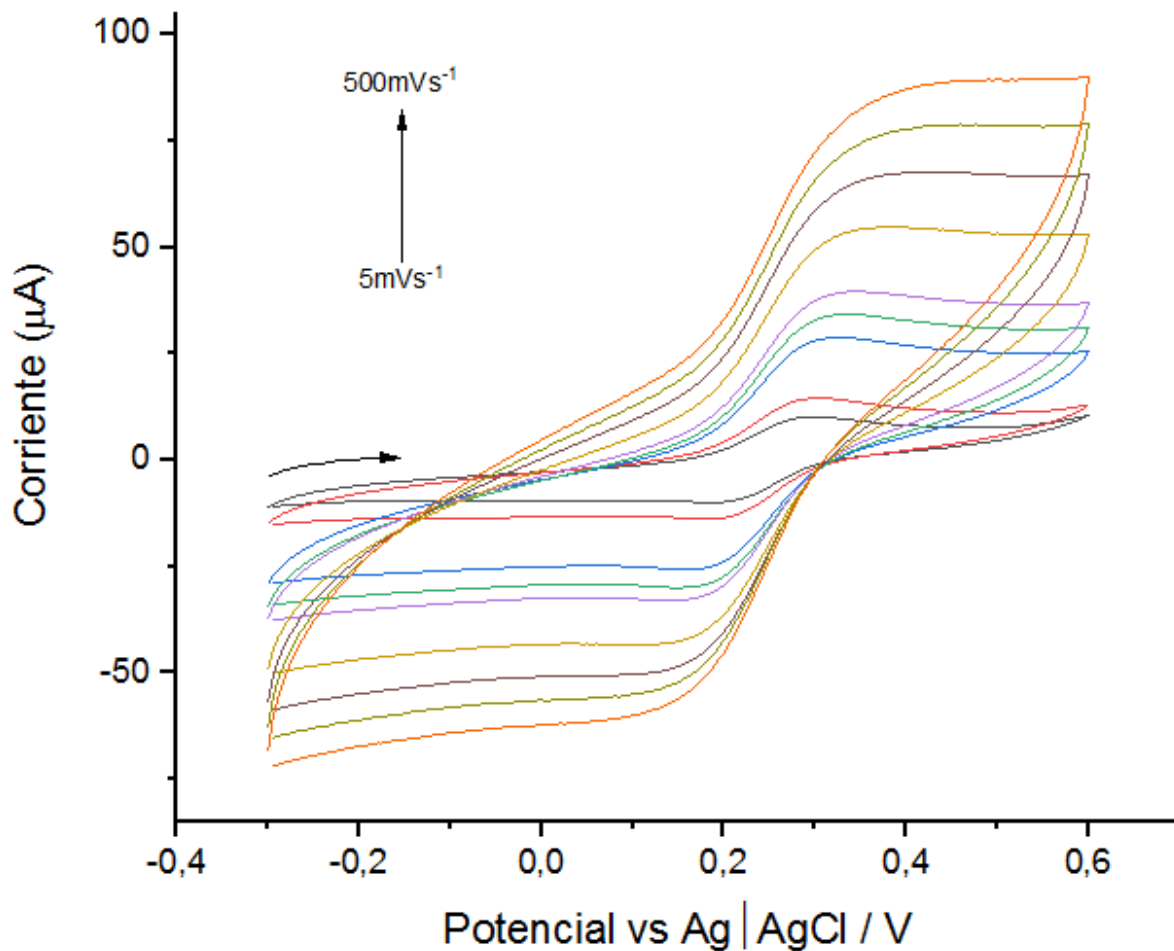
- prepared via dendritic grafting of magnetic nanoparticles, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1015–1021. doi:10.1002/jssc.201201115.
22. T. Zhou, Y. Feng, L. Zhou, Y. Tao, D. Luo, T. Jing, X. Shen, Y. Zhou, S. Mei, Selective and sensitive detection of tetrabromobisphenol-A in water samples by molecularly imprinted electrochemical sensor, *Sensors Actuators B Chem.* 236 (2016) 153–162. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.153.
23. Y. Hu, Z. Zhang, H. Zhang, L. Luo, S. Yao, Selective and sensitive molecularly imprinted sol-gel film-based electrochemical sensor combining mercaptoacetic acid-modified PbS nanoparticles with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au--multi-walled carbon nanotubes--chitosan, *J. Solid State Electrochem.* 16 (2012) 857–867. doi:289 10.1007/s10008-011-1434-4.
24. H. Ding, M. K. Ram, C. Nocilini, Fabrication and characterization of composite Langmuir-Schaefer films of poly(*ortho*-anisidine) conducting polymer and tri-(2,4-di-*t*-amylphenoxy)-(8-quinolinolyl) copper phthalocyanine. *Synthetic Metals* 118 (2001) 81-88.
25. M. J. Uria Toro, L. D. Marestoni, M. D. P. Taboada Sotomayor, A new biomimetic sensor based on molecularly imprinted polymers for highly sensitive and selective determination of hexazinone herbicide. *Sensors and Actuators B* 208 (2015) 299-306.
26. R. Uzuriaga-Sánchez, A. Wong, S. Khan, M. Pividori, G. Picasso, M. D. P. T. Sotomayor, Synthesis of a new magnetic-MIP for the selective detection of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, a highly allergenic compound. *Materials Science & Engineering* 7211 (2016). doi: 10.1016/j.msec.2016.12.019

## Anexos

### A.1. Voltagramas del estudio del área activa estimada para m-CGE y E-MNIP

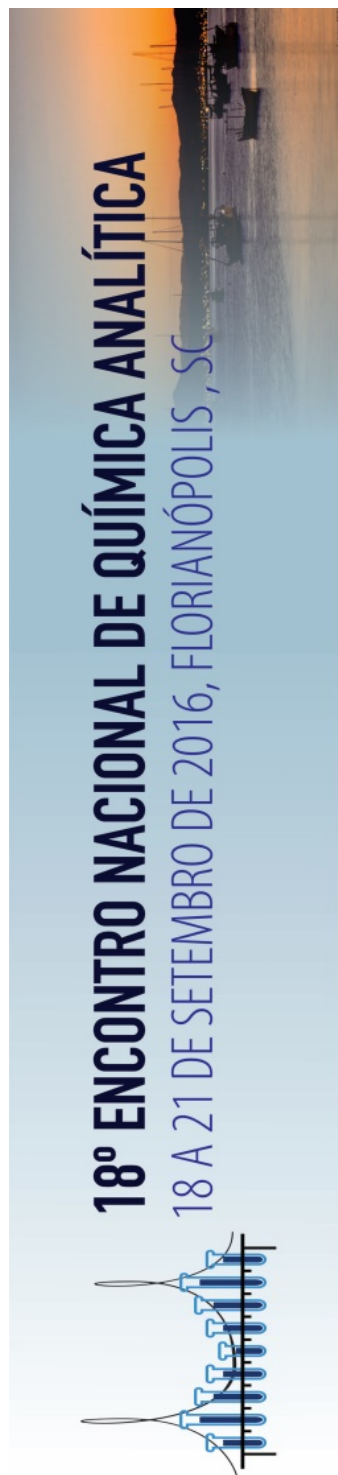


**Figura A.1:** Voltagramas de  $Fe(III)$   $0.1\text{mol L}^{-1}$  en  $10\text{mL}$  de  $KCl$   $0.1\text{mol L}^{-1}$  a diferentes velocidades de barrido: 5, 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500  $\text{mV s}^{-1}$  usando E-MNIP



**Figura A.2:** Voltagramas de Fe(III) 0.1mol L<sup>-1</sup> en 10mL de KCl 0.1mol L<sup>-1</sup> a diferentes velocidades de barrido: 5, 10, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 mV s<sup>-1</sup> usando m-CGE

## A.2 Certificado “18º ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA – BRASIL”.



### CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

**Determinación selectiva del alergénico 1-cloro-2,4-dinitrobenceno basada en magnetosensor electroquímico usando polímero magnético de impresión molecular (m-MIP)**

Gerson Alessandro Ruiz-Córdova, Sabir Khan, Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, Gino Italo Picasso

foi apresentado na forma de pôster no 18º Encontro Nacional de Química Analítica, realizado no período de 18 a 21 de setembro de 2016 em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

  
Daniel L. G. Borges  
Coordenador Geral

**A.3. Certificado “XV ENCUENTRO CIENTÍFICO INTERNACIONAL DE INVIERNO  
ECI 2016”.**

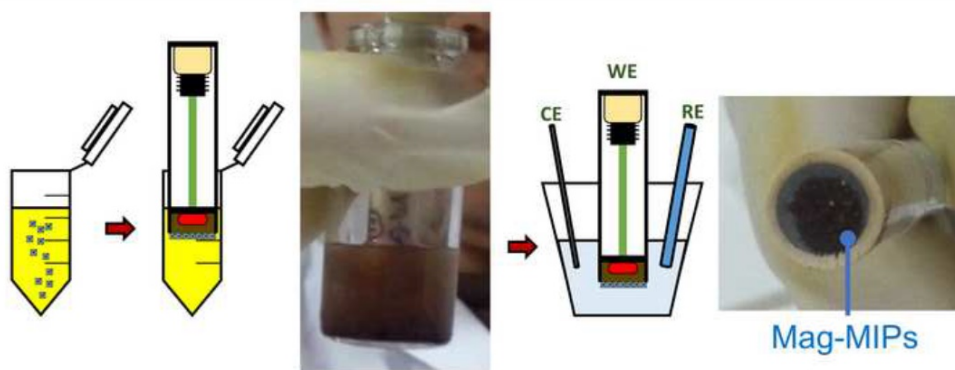


**A.4. Certificado “Workshop – Desarrollo y aplicación de nuevos sensores químicos basados en polímeros biomiméticos”.**



**A.5. Trabajo presentado para revisión a la revista *Electrochemistry Communications*:  
“Electrochemical sensing for 1-chloro-2,4-dinitrobenzene based on magnetic molecularly imprinted polymer particles previously captured by a magneto-sensor”**

Graphical Abstract (for review)



\*Highlights (for review)

### Highlights

- A Mag-MIP for the selective recognition of the allergenic 1-chloro-2,4-dinitrobenzene was used;
- A low-cost home-made magneto-sensor captured the Mag-MIP particles thus altering its surface;
- The magneto-sensor was transferred to the sample;
- The mentioned magneto-sensor served as a working electrode in a voltammetric electroanalysis after analyte binding by the Mag-MIPs.
- The Mag-MIP based sensor exhibited linear response with a low LOD.



\*c. Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1 To be submitted as a *Communication* to *Electrochemistry Communications*  
2 Number of words: 3125 + 3 x 200 (figures) – 950 (30 references) = 2775 < 3000 words

3  
4  
5 **Electrochemical sensing of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene based on**  
6 **magnetic molecularly imprinted polymer particles previously**  
7 **captured by a magneto-sensor**

8  
9  
10 Gerson A. Ruiz-Córdova,<sup>a</sup> Sabir Khan,<sup>b</sup> Luís Moreira Gonçalves,<sup>c</sup> Maria Isabel  
11 Pividori,<sup>d</sup> Gino Picasso<sup>a</sup> and Maria Del Pilar T. Sotomayor<sup>b,\*</sup>

12  
13 <sup>a</sup>Laboratory of Physical Chemistry Research, Faculty of Sciences, National University of Engineering, Lima, Peru  
14 <sup>b</sup>Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, UNESP – Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil  
15 <sup>c</sup>REQUIMTE/LAQV, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal  
16 <sup>d</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

17  
18  
19 \* [mpilar@iq.unesp.br](mailto:mpilar@iq.unesp.br)

20  
21

22 **Abstract**

23

24 The determination of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene was used as a proof-of-concept  
25 to a simple analytical practical configuration applying magnetic molecular imprinted  
26 particles (Mag-MIPs). Mag-MIPs were captured from an emulsion by a home-made  
27 magneto-sensor (where a small magnet was entrapped by a graphite-epoxy composite)  
28 and then, this sensor, was transferred to the analyte containing solution, where, after  
29 binding to the Mag-MIPs, the analyte was directly analysed using differential pulse  
30 voltammetry since the magneto-sensor acted as the working electrode. After optimization  
31 of several parameters, a detection limit of  $0.9 \mu\text{mol L}^{-1}$  with a RSD of 2.7% was achieved.

32

33 **Keywords**

34 1-chloro-2,4-dinitrobenzene;  
35 Differential pulse voltammetry;  
36 Electroanalysis;  
37 Magnetic beads;  
38 Magnetic imprinted extraction;  
39 Modified working electrode

40

41

42

43

## 44 **1. Introduction**

45  
46 Since the early reports on magnetic separation technology, magnetic particles have  
47 been used as powerful and versatile options in many biotechnological applications [1],  
48 including with analytical intents, being the electrochemical biosensing an example of it [2].  
49 The magnetic properties allow in a very simple and selective way, a quick separation due  
50 to straightforward manipulation.

51 Magnetic molecular imprinting polymers (Mag-MIPs) are particles where MIPs (a  
52 biomimetic material containing gaps where the aimed analyte can selectively bind)  
53 surround a metallic core that is easily susceptible to an external magnetic field [3]. MIPs  
54 were idealized as a synthetic alternative to biological receptors, imitating antibodies, in  
55 some ways they can be considered as biomimetic polymers. MIPS have sites of molecular  
56 recognition for a specific molecule. Mag-MIPs combine the advantages of the magnetic  
57 beads with that of molecular imprinted polymers (such as the low cost of synthesis, high  
58 mechanical and chemical stability, and, most notably, a tailor-made selective recognition  
59 [4]) [5–11].

60 In general, MIPs and Mag-MIPs are used in chromatographic applications as an  
61 alternative to conventional adsorbents. Herein, it is intended to have an electrochemical  
62 application making use of a magneto-sensor. Magneto-sensors can capture different  
63 functionalized magnetic beads making it possible to creatively develop different analytical  
64 approaches [6,12–14]. Although electrochemical techniques can be very powerful due to,  
65 among other things, its sensitivity and simplicity they do not prime for their analyte  
66 selectivity, thus they can be severely enhanced if they are combined with a sample  
67 preparation step [15]. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) is a toxic xenobiotic compound  
68 known to cause oxidative stress and cell death and a well-known allergenic [16–18], it was  
69 used as the proof-of-concept analyte.

## 70 71 **2. Experimental**

### 72 73 *2.1 Reagents*

74  
75 All reagents used were of analytical grade.

76 Sodium dodecyl sulfate (SDS), CDNB,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  
77 oleic acid (OA), methacrylic acid (MA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA),

78 methylene diphenyl diisocyanate-4 (MDI), bisphenol A (BPA), phloroglucinol were acquired  
79 from Sigma-Aldrich. Glycine, Tween 20, sodium chloride, potassium chloride, boric acid,  
80 acetic acid, potassium persulfate, n-hexane, chloroform and phosphoric acid were all  
81 purchased from Merck. Metanol and tetrahydrofuran were purchased from ACS Synth.

82       Ultrapure water (resistivity not lower than 18.2 MΩ cm at 298 K) from a Purelab  
83 Classic water purification system was used in all the experiments.

84

## 85 *2.2. Mag-MIPs synthesis*

86

87       Magnetic nanoparticles were prepared by the co-precipitation method, using  
88 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O as the starting materials, and mixed with oleic acid  
89 (OA). This material was then encapsulated in a hydrophobic polymeric matrix, poly-(MA-  
90 co-EDGMA), by the mini-emulsion method. The Mag-MIP selective to CDNB was  
91 synthesized over the magnetic-hydrophobic surface using the precipitation polymerization  
92 in the presence of the analyte, MDI, BPA and phloroglucinol, forming a core@shell  
93 structure.

94       Full details concerning the synthesis of the Mag-MIPs, along with the full  
95 physicochemical characterization of these materials can be found in a recent publication  
96 [18].

97

## 98 *2.3. Apparatus and working electrode manufacturing*

99

100       Electrochemical measurements were performed using a PalmSens 3 potentiostat.  
101 Final electrochemical measurements were performed in a Britton-Robinson buffer solution  
102 (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.04 mol L<sup>-1</sup>, CH<sub>3</sub>COOH 0.04 mol L<sup>-1</sup> and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.04 mol L<sup>-1</sup>). A platinum wire was  
103 used as the counter-electrode (CE), and the pair Ag|AgCl (in KCl, 3 mol L<sup>-1</sup>) was used as  
104 the reference electrode (RE). The working electrode (WE) was home-built, the schematics  
105 of its manufacturing are shown in Figure 1 - A. Graphite powder and epoxy resin were  
106 hand-mixed in a 1:4 (w/w) ratio. This mixture was thoroughly hand-mixed to ensure the  
107 uniform dispersion of the graphite powder throughout the polymer. The resulting paste was  
108 placed to a depth of 3 mm in a cylindrical PVC sleeve body (6 mm i.d.) with a copper plate  
109 as electrical contact. A small neodymium magnet (3 mm i.d.) was placed into the centre of  
110 this electrode after the addition of a thin layer of composite paste in order to avoid direct

111 contact between the magnet and the electrical connector. After filling the electrode body  
112 gap completely with the soft paste, the electrode was tightly packed. An image of the final  
113 electrode is shown in Figure 1 – B. Before each use, the electrode surface was renewed  
114 by a simple polishing procedure [19].

115

### 116 **3. Results and Discussion**

117

118 The aim of this work was to fully take advantage of Mag-MIPs enhancing their  
119 response utilizing a magneto-sensor. This is schematically explained in Figure 1 – C. The  
120 prepared Mag-MIPs for the desired analyte were dispersed in a 3 mg mL<sup>-1</sup> glycine buffer  
121 solution, at a pH of 2.0, 0.1 mol L<sup>-1</sup>, Tween 20, 0.05% and NaCl 0.15 mol L<sup>-1</sup>. Afterwards,  
122 the Mag-MIPs were captured becoming “concentrated” in the surface of the home-made  
123 magneto-sensor. Then, this magneto-sensor with an altered working surface was  
124 transferred to the sample, the analyte bound to the analyte-sized holes in the Mag-MIPs  
125 and were electrochemically quantified, becoming the magneto-sensor a working electrode.  
126 Since the Mag-MIPs were concentrated in the electrode surface and not within a carbon  
127 paste, a higher and quicker analyte binding was achieved.

128 As is shown in literature, at a pH of 2.0, the reduction peak is around -0.4 V  
129 (peak  $\alpha$  in Figure 2 – A) [20]. Moreover, literature suggests that it is a reductive cleavage  
130 of the carbon–chlorine bond [21,22], further mechanistic discussion can be found in  
131 literature [22]. Optimized parameters ended up being the following: potential of deposition  
132 (for 60 s) of -0.20V, electrochemical window from -0.25 to -0.48V, potential step of 4 mV,  
133 potential pulse of 0.12V with a scan rate of 4 mV s<sup>-1</sup> (i.e. 200 ms per pulse). The analytical  
134 methodology was also optimized concerning different times in the several steps, namely  
135 the time of dispersion ( $t_{dis}$ ), i.e. the time the Mag-MIPs were shaken within the Tween  
136 solution creating the emulsion, time of collection ( $t_{col}$ ), i.e. the time the magneto-sensor  
137 spent capturing the Mag-MIPs into its surface, and equilibration time ( $t_{eq}$ ), i.e. the time the  
138 magneto-sensor was placed in the sample previous to the electrochemical stripping.  
139 Longer dispersion times originated larger currents up to certain point since an emulsion  
140 with suitable dispersion was already formed. In the same conditions ([CDNB] of 1 x 10<sup>-3</sup>  
141 mol L<sup>-1</sup>, room temperature, scan rate of 20 mV s<sup>-1</sup>): for 30 min - 35  $\mu$ A, 60 min - 67  $\mu$ A and  
142 120 min - 90  $\mu$ A. Hence a time of 120 minutes was chosen. The optimization of  $t_{col}$  and  $t_{eq}$   
143 is shown in Figure 2 - B, larger currents were obtained for shorter  $t_{col}$  and longer  $t_{eq}$ , it  
144 seems that longer capturing times are creating more than one Mag-MIP layer and,

145 therefore, not just make the analyte further apart from the electrode surface but also  
146 complicate the electron transfer. For a better understanding of the whole process, a  
147 mention to these times also appears in the schematics of Figure 1 – C. The temperature of  
148 analyte binding to the Mag-MIPs was also optimized, and, as it is shown in Figure 2 – B, a  
149 higher temperature, for the same period of time, clearly increases the signal. This is not  
150 surprising since, in general, temperature enhances adsorptive processes.

151 The corresponding calibration curve ( $n = 6$ ) had the following analytical parameters  
152 (Figure 2 – C and Figure 2 – D): a  $r^2$  of 0.999, Peak current ( $\mu\text{A}$ ) =  $(2.92 \pm 0.05) \times [\text{CDNB}]$   
153 ( $\text{mg L}^{-1}$ ) -  $(9 \pm 1)$ , limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 0.9 and  $3.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  
154 respectively. LOD and LOQ were calculated as three and ten times the standard deviation  
155 of the intercept/slope, respectively. Repeatability was evaluated comparing five calibration  
156 curves, the relative standard deviation (RSD) obtained was of 2.7%.

157 The sensor selectivity was evaluated by comparing the obtained signal with the  
158 analyte against other chemical compounds. As it is shown in Figure 3, molecules with a  
159 similar size to CDNB with a nitrobenzene or a aminobenzene group give origin to  
160 significant signals (ca. 50% of CDNB), for all other tested compounds (even molecules  
161 with nitro groups but with a larger size) the results obtained were around 10% or less.  
162 Considering the selectivity of typical MIPs the results were rather suitable for analytical  
163 purposes [11,23,24].

164 Although there are many works using Mag-MIPs or MIPs and electrochemical  
165 detection [6,25–27], the particular analytical configuration in this work is novel. In recent  
166 literature, one can indeed find many different electrode configurations, from innovative  
167 materials like graphene [8,28] to not so recent materials like multiwall carbon nanotubes  
168 [6,29]. These are more complex and more expensive systems, albeit in some case with  
169 other advantages. There has also been innovation in terms of the electrochemical  
170 technique used, per example, impedimetric measurements gave origin to sensible results,  
171 yet with longer times of analysis and added complications to analysis [30]. Nevertheless,  
172 the main difference from this work to the others is its analytical configuration, i.e. usually  
173 the Mag-MIPs are left to bind with the analyte in the sample and then removed using the  
174 magneto-sensor, then the electrochemical measurement is performed in a buffer solution  
175 [6,23,26,27]. Herein, the particles are pre-concentrated in the electrode surface and the  
176 analytical measurement was subsequently. This approach shows advantages in terms of  
177 simplicity, sensitivity and low-cost, with particular versatility while still leaving space for  
178 many improvements. Since the final measurement occurs in the sample and not in a

179 buffer, this allows, for example, to previously modify the electrodes and then use them  
180 whenever they are required (the absence of biological element allows them to have longer  
181 periods of use), thus increasing its portability.

182

#### 183 **4. Conclusions**

184

185 This work shows a different approach to the use of Mag-MIPs, whose application is  
186 enhanced by utilizing a magneto-sensor/working electrode. The magneto-sensor  
187 concentrates the Mag-MIPs in its surface, subsequently, it is transferred into the sample  
188 and, *in situ*, directly voltammetrically analyses CDNB. The developed methodology  
189 produced a LOD of 0.9  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a suitable selectivity and a RSD of 2.7%.

190

#### 191 **Acknowledgements**

192

193 The authors would like to express their sincerest gratitude and indebtedness to the  
194 Research Funding Agencies Programa Nacional de Innovación para Competitividad y  
195 Productividad - InnovatePeru (Convenio 513-INNOVATEPERU-ECIP-2015), CNPq  
196 (303690/2012-7), FAPESP (2014/25264-3 and 2016/06926-0) for the financial support. GP  
197 wishes to acknowledge IGI-Institute of Research of National University of Engineering. The  
198 Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), Madrid (project BIO2016-  
199 75751-R) is also acknowledged. SK wishes to acknowledge PRODOC-CAPES. LMG  
200 (SFRH/BPD/76544/2011) wishes to acknowledge Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
201 (FCT) for his post-doctoral grant.

202

203 Authors declare no conflicts of interest.

204

#### 205 **References**

206

- 207 [1] A. Rembaum, R.C.K. Yen, D.H. Kempner, J. Ugelstad, Cell labeling and magnetic  
208 separation by means of immunoreagents based on polyacrolein microspheres, *J. Immunol.*  
209 *Methods*. 52 (1982) 341–351. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(82\)90006-0](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(82)90006-0).
- 210 [2] P. Yáñez-Sedeño, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Magnetic Particles Coupled to  
211 Disposable Screen Printed Transducers for Electrochemical Biosensing, *Sensors*. 16 (2016)  
212 1585. doi:10.3390/s16101585.

- 213 [3] S. Hussain, S. Khan, S. Gul, M.I. Pividori, M.D.P.T. Sotomayor, A novel core@shell  
214 magnetic molecular imprinted nanoparticles for selective determination of folic acid in  
215 different food samples, *React. Funct. Polym.* 106 (2016) 51–56.  
216 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.07.011>.
- 217 [4] L. Chen, S. Xu, J. Li, Recent advances in molecular imprinting technology: current status{,}  
218 challenges and highlighted applications, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 2922–2942.  
219 doi:10.1039/C0CS00084A.
- 220 [5] S. Liebana, D. Brandao, S. Alegret, M.I. Pividori, Electrochemical immunosensors{,}  
221 genosensors and phagosensors for Salmonella detection, *Anal. Methods.* 6 (2014) 8858–  
222 8873. doi:10.1039/C4AY01373E.
- 223 [6] T. Madrakian, E. Haghshenas, M. Ahmadi, A. Afkhami, Construction a magneto carbon  
224 paste electrode using synthesized molecularly imprinted magnetic nanospheres for selective  
225 and sensitive determination of mefenamic acid in some real samples, *Biosens. Bioelectron.*  
226 68 (2015) 712–718. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.02.001>.
- 227 [7] R.J. Uzuriaga-Sánchez, S. Khan, A. Wong, G. Picasso, M.I. Pividori, M.D.P.T. Sotomayor,  
228 Magnetically separable polymer (Mag-MIP) for selective analysis of biotin in food samples,  
229 *Food Chem.* 190 (2016) 460–467. doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.129.
- 230 [8] Y. Li, J. Liu, M. Liu, F. Yu, L. Zhang, H. Tang, B.-C. Ye, L. Lai, Fabrication of ultra-sensitive  
231 and selective dopamine electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer  
232 modified graphene@carbon nanotube foam, *Electrochem. Commun.* 64 (2016) 42–45.  
233 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2016.01.009>.
- 234 [9] A. Florea, C. Cristea, F. Vocanson, R. Săndulescu, N. Jaffrezic-Renault, Electrochemical  
235 sensor for the detection of estradiol based on electropolymerized molecularly imprinted  
236 polythioaniline film with signal amplification using gold nanoparticles, *Electrochem.*  
237 *Commun.* 59 (2015) 36–39. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2015.06.021>.
- 238 [10] P.S. Sharma, Z. Iskierko, A. Pietrzyk-Le, F. D'Souza, W. Kutner, Bioinspired intelligent  
239 molecularly imprinted polymers for chemosensing: A mini review, *Electrochem. Commun.* 50  
240 (2015) 81–87. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2014.11.019>.
- 241 [11] R. Wang, Y. Wang, C. Xue, T. Wen, J. Wu, J. Hong, X. Zhou, Selective separation and  
242 enrichment of glibenclamide in health foods using surface molecularly imprinted polymers  
243 prepared via dendritic grafting of magnetic nanoparticles, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1015–1021.  
244 doi:10.1002/jssc.201201115.
- 245 [12] M. Yang, H.L. Li, Determination of trace hydrazine by differential pulse voltammetry using  
246 magnetic microspheres, *Talanta.* 55 (2001) 479–484. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00456-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00456-8).
- 248 [13] F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, Disposable  
249 amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics  
250 residues in milk, *Anal. Chim. Acta.* 737 (2012) 29–36.



- 251 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.051>.
- 252 [14] S. V Kergaravat, L. Beltramino, N. Garnero, L. Trotta, M. Wagener, M.I. Pividori, S.R.  
253 Hernandez, Electrochemical magneto immunosensor for the detection of anti-TG2 antibody  
254 in celiac disease, *Biosens. Bioelectron.* 48 (2013) 203–209.  
255 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.012>.
- 256 [15] R.M. Ramos, L.M. Gonçalves, V. Vyskočil, J.A. Rodrigues, Free sulphite determination in  
257 wine using screen-printed carbon electrodes with prior gas-diffusion microextraction,  
258 *Electrochem. Commun.* 63 (2016) 52–55.  
259 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.elecom.2015.12.010>.
- 260 [16] M. Saamilehto, H. Chapman, T. Savinko, K. Lindstedt, A.I. Lauerma, A. Koivisto, Contact  
261 sensitizer 2,4-Dinitrochlorobenzene is a highly potent human TRPA1 agonist, *Allergy Eur. J.*  
262 *Allergy Clin. Immunol.* 69 (2014) 1424–1427. doi:10.1111/all.12488.
- 263 [17] S.S. Vaidya, P.M. Gerk, Simultaneous determination of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 2,4-  
264 dinitrophenyl-S-glutathione and its metabolites for human placental disposition studies by  
265 high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.* 859 (2007) 94–102.  
266 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.09.006>.
- 267 [18] R.J. Uzuriaga-Sánchez, A. Wong, S. Khan, M.I. Pividori, G. Picasso, M.D.P.T. Sotomayor,  
268 Synthesis of a new magnetic-MIP for the selective detection of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene,  
269 a highly allergenic compound, *Mater. Sci. Eng. C.* (2016). doi:10.1016/j.msec.2016.12.019.
- 270 [19] E. Zacco, M.I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, M.-P. Marco, Electrochemical  
271 Magnetoimmunosensing Strategy for the Detection of Pesticides Residues, *Anal. Chem.* 78  
272 (2006) 1780–1788. doi:10.1021/ac0512610.
- 273 [20] A.A. Konarev, V.T. Novikov, Polarographic behavior of 2,4-dinitrochlorobenzene and  
274 products of its reduction, *Russ. J. Electrochem.* 49 (2013) 81–85.  
275 doi:10.1134/S1023193513010072.
- 276 [21] M.A. Prasad, M. V Sangaranarayanan, Electrochemical reductive cleavage of carbon-  
277 chlorine bond in 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, *Electrochim. Acta.* 51 (2005) 242–246.  
278 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2005.04.019>.
- 279 [22] I. Gallardo, G. Guirado, J. Marquet, Mechanistic studies on the reactivity of  
280 halodinitrobenzene radical-anion, *J. Electroanal. Chem.* 488 (2000) 64–72.  
281 doi:10.1016/S0022-0728(00)00189-3.
- 282 [23] T. Zhou, Y. Feng, L. Zhou, Y. Tao, D. Luo, T. Jing, X. Shen, Y. Zhou, S. Mei, Selective and  
283 sensitive detection of tetrabromobisphenol-A in water samples by molecularly imprinted  
284 electrochemical sensor, *Sensors Actuators B Chem.* 236 (2016) 153–162.  
285 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.153>.
- 286 [24] Y. Hu, Z. Zhang, H. Zhang, L. Luo, S. Yao, Selective and sensitive molecularly imprinted sol-  
287 -gel film-based electrochemical sensor combining mercaptoacetic acid-modified PbS  
288 nanoparticles with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au--multi-walled carbon nanotubes--chitosan, *J. Solid State*

- 289 Electrochem. 16 (2012) 857–867. doi:10.1007/s10008-011-1434-4.
- 290 [25] M.C. Blanco-López, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco,  
291 Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers, TrAC Trends Anal.  
292 Chem. 23 (2004) 36–48. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00102-5.
- 293 [26] H. Jiang, D. Jiang, J. Shao, X. Sun, Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles  
294 based electrochemical sensor for the measurement of Gram-negative bacterial quorum  
295 signaling molecules (N-acyl-homoserine-lactones), Biosens. Bioelectron. 75 (2016) 411–  
296 419. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.045.
- 297 [27] T. Alizadeh, Preparation of magnetic TNT-imprinted polymer nanoparticles and their  
298 accumulation onto magnetic carbon paste electrode for {TNT} determination, Biosens.  
299 Bioelectron. 61 (2014) 532–540. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.05.041.
- 300 [28] S. Patra, E. Roy, R. Madhuri, P.K. Sharma, Nanocomposite of bimetallic nanodendrite and  
301 reduced graphene oxide as a novel platform for molecular imprinting technology, Anal.  
302 Chim. Acta. 918 (2016) 77–88. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.046.
- 303 [29] Q. Tang, X. Shi, X. Hou, J. Zhou, Z. Xu, Development of molecularly imprinted  
304 electrochemical sensors based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MWNT-COOH/CS nanocomposite layers for  
305 detecting traces of acephate and trichlorfon, Analyst. 139 (2014) 6406–6413.  
306 doi:10.1039/C4AN01514B.
- 307 [30] A. Zamora-Gálvez, A. Ait-Lahcen, L.A. Mercante, E. Morales-Narváez, A. Amine, A.  
308 Merkoçi, Molecularly Imprinted Polymer-Decorated Magnetite Nanoparticles for Selective  
309 Sulfonamide Detection, Anal. Chem. 88 (2016) 3578–3584.  
310 doi:10.1021/acs.analchem.5b04092.
- 311
- 312

313 **Table and figure captions**

314

315 Figure 1 – A – Schematics of the manufacturing of the magneto-sensor, a copper disc  
316 connector is placed on the tip of the conducting wire (1), then everything is inserted in a  
317 PVC tube (2), then the neodymium magnet is placed (3) and, finally, a thin layer of a  
318 graphite-epoxy composite is placed (4). B – Photo of the built magneto-sensor next to a 1  
319 Brazilian real coin (27 mm diameter) for scaling purposes. C – Schematics of the analytical  
320 procedure, after placing the Mag-MIPs (I) Dispersion of the Mag-MIPs; (II) Magnetic  
321 capture by the magneto-sensor; (III) Analyte binding to the Mag-MIPs.

322

323 Figure 2 – (A) temperature studies, cyclic voltammograms of CDNB,  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ,  
324 obtained at 25 and 60 °C (scan rate of  $20 \text{ mV s}^{-1}$ ); (B) Optimization of  $t_{\text{cool}}$  and  $t_{\text{pre}}$ , as is  
325 observed, studies were performed with a CDNB concentration of  $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  and  $t_{\text{eq}}$   
326 of 120 minutes; larger currents were obtained (red area) for shorter  $t_{\text{cool}}$  and longer  $t_{\text{eq}}$ ; (C)  
327 differential pulse voltammograms obtained in the optimized conditions; (D) calibration  
328 curve: peak current vs. CDNB concentration. The peak currents in (D) correspond to the  
329 voltammograms in (C); peak currents were calculated removing the blank also present in  
330 (C).

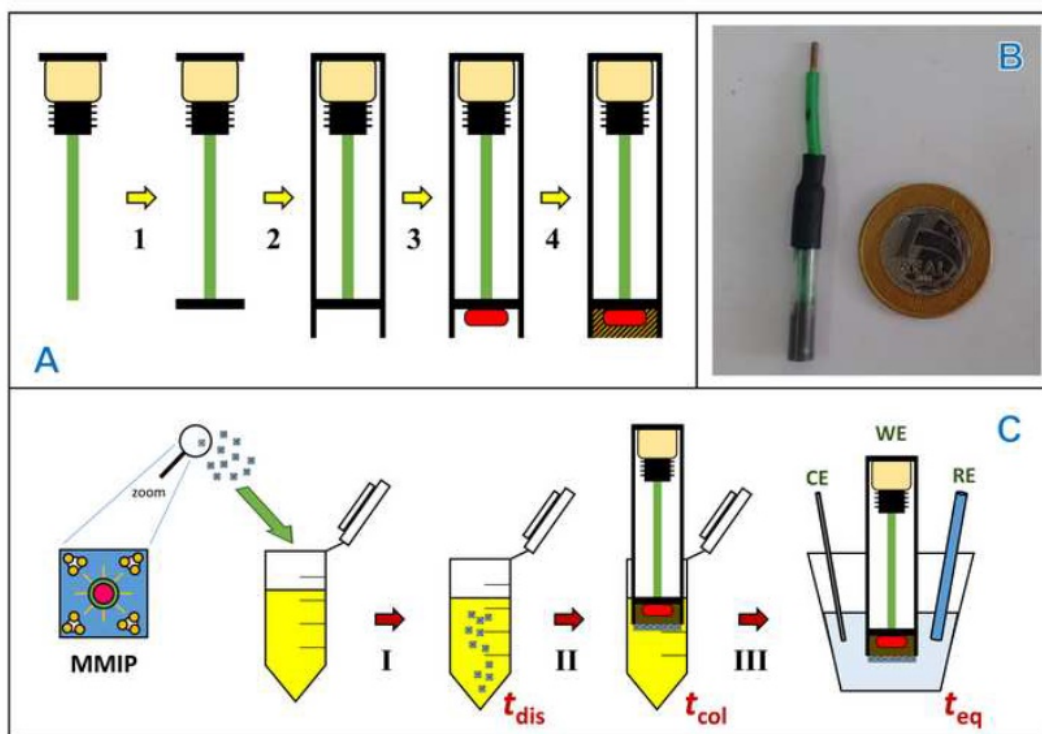
331

332 Figure 3 – Relative signal (RS) obtained with several different compounds, all were  
333 analysed with the concentration of  $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . The analysed compounds from  
334 bottom to top were the following: CDNB, caffeine, sodium nitroprusside, *p*-  
335 dimethylaminoazobenzene, azo violet, methylene blue, 1,3-dinitrobenzene, tetracycline  
336 and metronidazole.

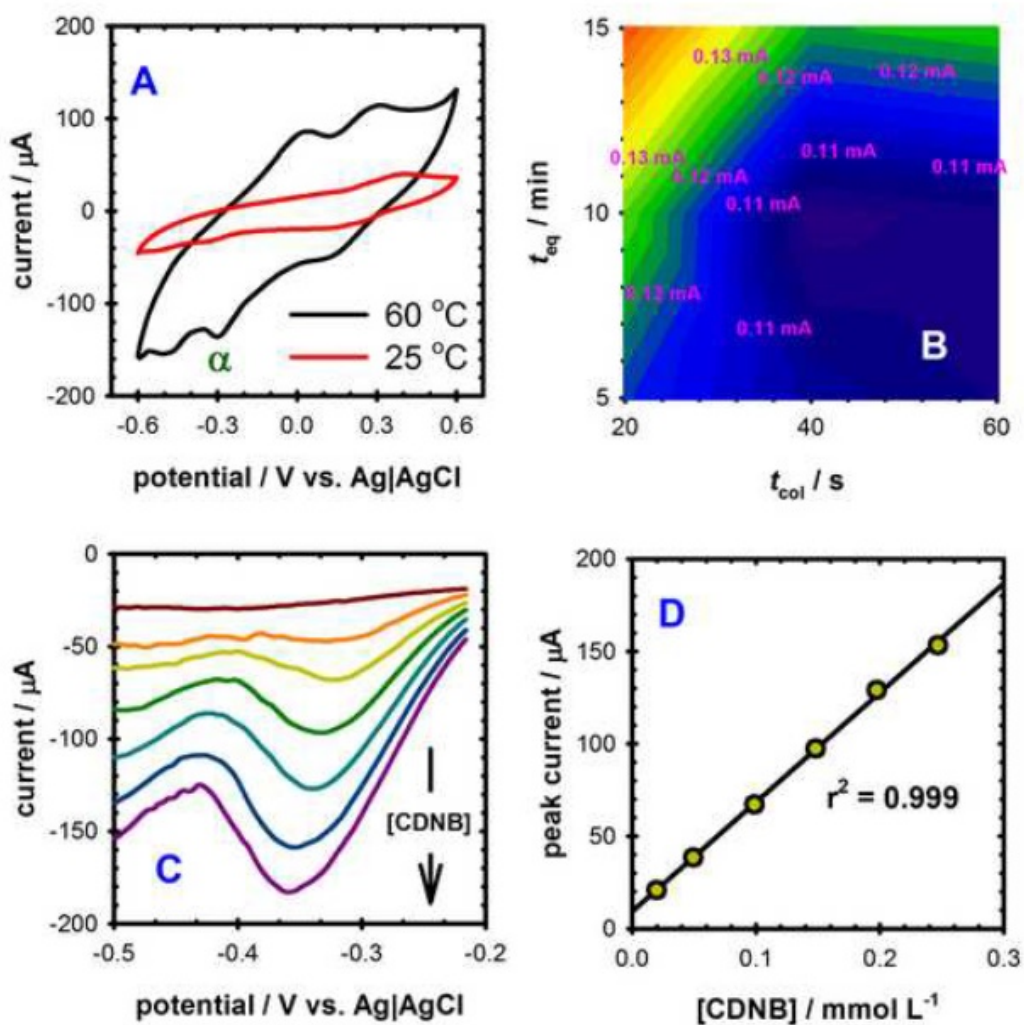
337

*“Determinación selectiva del contaminante ambiental 1-cloro 2,4-dinitrobenceno basada en un magneto sensor electroquímico  
construido con polímero magnético de impresión molecular (m-MIP)”*

d. Figure(s)  
[Click here to download high resolution image](#)



d. Figure(s)  
[Click here to download high resolution image](#)



*“Determinación selectiva del contaminante ambiental 1-cloro 2,4-dinitrobenzo basado en un magneto sensor electroquímico construido con polímero magnético de impresión molecular (m-MIP)”*

d. Figure(s)

[Click here to download high resolution image](#)

