



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DOCTORADO EN QUÍMICA

TESIS

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS
VOLTAMPEROMÉTRICAS BASADAS EN
ELECTRODOS COMPOSITE MODIFICADOS CON
POLÍMEROS IMPRESOS DE IONES PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO, MERCURIO Y
PLOMO EN MUESTRAS DE AGUA POTABLE.

**Para obtener el grado de
Doctor en química**

PRESENTA

Luz Elena Rebolledo Perales

Director

Dr. Gian Arturo Álvarez Romero

Codirector

Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

Comité tutorial

Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

Dra. Irma Pérez Silva



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Química

Department of Chemistry

Número de control: ICBI-AAQ/1516/2023

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

El Comité Tutorial del trabajo de tesis titulado **“DESARROLLO DE METODOLOGÍAS VOLTAMPEROMÉTRICAS BASADAS EN ELECTRODOS COMPOSITE MODIFICADOS CON POLÍMEROS IMPRESOS DE IONES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO, MERCURIO Y PLOMO EN MUESTRAS DE AGUA POTABLE”**, realizado por la sustentante **LUZ ELENA REBOLLEDO PERALES** con número de cuenta **415661** perteneciente al programa del **DOCTORADO EN QUÍMICA**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo con lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

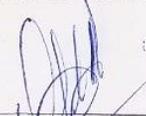
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

“Amor, Orden y Progreso”

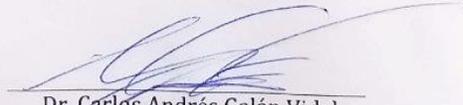
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 14 de junio de 2023


Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
Director del ICBI


Dr. Gaaan Arturo Álvarez Romero
Director de tesis


Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega
Codirector de tesis


Dra. Irma Pérez Silva
Miembro del Comité Tutorial


Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
Miembro del Comité Tutorial

Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P. 42184
Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2200, 2201
Fax 6502
aaq_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 2 de química analítica del área académica de química del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería (ICBI) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), bajo la dirección del Dr. Gian Arturo Álvarez Romero y el Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega; contando con el apoyo del comité tutorial conformado por el Dr. Carlos Andrés Galán Vidal y la Dra. Irma Pérez Silva.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con número 0960762, para realizar mis estudios de doctorado.

Congresos y foros.

- **VIII Simposio Anual de estudiantes relacionados a la ciencia e ingeniería de los materiales**, 10 al 13 de noviembre de 2020, “*Quantitative analysis of lead(II) based on differential pulse anodic stripping voltammetry and MIP-carbon paste electrodes*”; sede virtual: Ciudad de México, México.
- **XXXIII Congreso Nacional de Química Analítica y XXII Simposio Estudiantil** de la Asociación Mexicana de Química Analítica (AMQA), 9 al 11 de junio de 2021. “*Electrodos de pasta de carbono modificados con un polímero impreso con iones para la determinación electroquímica de plomo(II)*”; sede virtual: Saltillo, Coahuila.
- **V Seminario Regional de materiales avanzados**, 6 al 8 de octubre del 2021. “*Electrodos de pasta de carbono modificados con un polímero impreso con iones para la determinación electroquímica de plomo(II)*”; sede virtual: Mineral de la reforma, Hidalgo.
- **XXXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica (SMEQ) y 14th Meeting of the Mexican section of the Electrochemical Society**, 14 al 15 de octubre del 2021. “*Determinación electroquímica de Pb(II) utilizando electrodos de pasta de carbono modificados con polímeros impresos de iones (IIPs)*”; sede virtual. Ciudad de México, México.
- **XXV Congreso SIBAE, de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica**, 03 al 06 de abril de 2022. “*Electrodos de pasta de carbono modificados con un polímero impreso con iones para la determinación electroquímica de Hg²⁺*”; sede virtual: México.
- **XXXIV Congreso Nacional de Química Analítica y XXIV Simposio Estudiantil** de la Asociación Mexicana de Química Analítica, 22 al 23 de septiembre de 2022. “*Electrodos de pasta de carbono modificados con un polímero impreso con iones para la determinación electroquímica de Hg(II)*”; sede presencial: Guanajuato, Guanajuato.

Publicaciones

- Luz Elena Rebolledo Perales, Giaan A. Álvarez Romero, Israel Samuel Ibarra Ortega, Carlos A. Galán Vidal, Irma Pérez Silva, **Análisis cuantitativo de Pb(II) basado en voltamperometría diferencial de pulsos con redisolución anódica y electrodos de pasta de carbono con MIP**. Revista Materiales Avanzados, 33 (2021), 92-96.
- L. E. Rebolledo-Perales, G. A. Álvarez Romero, I. S. Ibarra-Ortega, C. A. Galán-Vidal, and I. Pérez-Silva. **Review - Electrochemical Determination of Heavy Metals in Food and Drinking Water Using Electrodes Modified with Ion-Imprinted Polymers**, J. Electrochem. Soc., 168 (2021) 6, 067516, doi: 10.1149/1945-7111/ac0601.
- Luz Elena Rebolledo-Perales, Giaan Arturo Álvarez-Romero, Israel Samuel Ibarra-Ortega, Irma Pérez-Silva, Carlos Andrés Galán-Vidal. **Electrodos de pasta de carbono modificados con un polímero impreso para la determinación electroquímica de plomo(II)**., Ciencia Acierta, (2021) ISSN: 2683-1848
- Luz E. Rebolledo, Giaan Arturo Álvarez Romero, Israel Samuel Ibarra-Ortega, Carlos Andrés Galán-Vidal and Irma Pérez-Silva. **Electrochemical Determination of Pb(II) Using Carbon Paste Electrodes Modified with Ion Imprinted Polymers (IIPs)**., ECS Trans 106 (2022) 21, doi: 10.1149/10601.0021ecst.
- Luz E. Rebolledo-Perales, Giaan. A. Álvarez Romero, Israel Ibarra, Carlos Andrés Galán-Vidal, Juan Francisco Flores-Aguilar, I Pérez-Silva. **Quantitative Analysis of Pb(II) Based on Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry and IIP-Carbon Paste Electrodes**. J. Electrochem. Soc. 169 (2022) 5, 057504, doi:10.1149/1945-7111/ac6a17.
- Luz E. Rebolledo-Perales, Israel Ibarra, Miriam Franco Guzmán, Gabriela Islas, Giaan A. Álvarez Romero. **A novel ion-imprinted polymer based on pyrrole as functional monomer for the voltammetric determination of Hg(II) in water samples**. Electrochimica Acta 434 (2022) 141258, doi:10.1016/j.electacta.2022.141258.

Agradecimientos personales

A mis padres y hermanos: Gracias por su apoyo y comprensión en los momentos en los que la distancia no me permitió darles un abrazo, pero este logro también les pertenece. Todos me han dado grandes lecciones de que el esfuerzo y trabajo constante siempre se verán recompensados.

A mi familia en el cielo; que siempre preguntaban cuando volvería y se alegraba al verme llegar. Aunque ahora son una estrella más en el cielo, confié en que están orgullosos de la persona en la que me convertí y en la que seguiré trabajando para tener un poquito de la fuerza y coraje que ellos tuvieron.

A mi esposo: ¡Mi vida lo logramos!, Gracias por tu paciencia y comprensión infinita. Eres el mejor compañero de posgrado, de laboratorio y el mejor par académico del mundo, pero sobre todo el mejor compañero de vida. Gracias por motivarme a ser mejor persona, porque al compartirme tus sueños me contagiaste tus enormes ganas de aprender más, de nunca rendirse y de siempre luchar por lo que uno se propone. Sigo admirándote demasiado y aunque no puedo decir otra palabra más que “gracias”, a ti dedico este trabajo con todo mi corazón, te amo mi doctorcito!

A mis asesores Dr. Giaan y Dr. Israel, por todo su conocimiento, dedicación, experiencia, paciencia y comprensión que brindaron para el cumplimiento de este proyecto y hacia mi persona. Gracias por cada palabra de aliento, llamadas de atención, convivencias y divertidas conversaciones, pero sobre todo gracias por haberme aceptado en su grupo de trabajo y brindarme su amistad.

Al Dr. Giaan, deberían darle un premio por haber confiado ciegamente en mí, por aceptar el reto de asesorarme y confiar en lo que podía lograr. La forma de compartir su conocimiento hizo del mundo científico un lugar al que siempre quiero pertenecer. Siempre le estaré enormemente agradecida por su guía, pero sobre todo por su gran amistad.

A mis profesores, y a la Dra. Irma, Dr. Galán, Dra. Páez y Dr. José Antonio. Gracias por compartirme su enorme conocimiento, por su invaluable y cálido apoyo a lo largo de estos años, y sugerencias cuando más las necesite. Todos son para mí una gran fuente de inspiración.

A mis más grandes amigos Miriam, Tanese, Francisco, Hernán y David, y a mis amigos Abril, Jair, Angy, Ricardo, Sandra y Dra. Lupita. Muchas gracias por brindar su amistad. A todos gracias por los momentos de diversión y complicidad. Nunca olvidaré sus muestras de cariño, y siempre los llevaré en mi corazón.

Introducción

La contaminación de agua por metales pesados representa una de las principales problemáticas de salud pública, debido a las descargas conscientes o accidentales de diversas industrias que emplean iones metálicos como parte de sus procesos o productos.

Elementos como plomo (Pb), mercurio (Hg), y arsénico (As), son considerados metales pesados altamente peligrosos ya que su intoxicación es capaz de provocar daños irreversibles en la salud del consumidor debido a su elevado nivel de toxicidad, reactividad y volatilidad. Por lo tanto, la necesidad de desarrollar metodologías rápidas, amigables con el medio ambiente y de bajo costo para la cuantificación oportuna, selectiva y sensible de metales pesados en agua potable, ha despertado el interés por las técnicas electroquímicas como la voltamperometría diferencial de pulsos con redisolución anódica, capaz de realizar determinaciones de ultratrazas de diversos iones metálicos. Sin embargo, los electrodos de trabajo como los elaborados a partir de pasta de carbono (CPE), no poseen las cualidades para una cuantificación adecuada de metales pesados, por lo que para mejorar sus características es posible incorporar al electrodo diversos materiales novedosos que le brinden propiedades adicionales, como los desarrollados a partir de la tecnología de reconocimiento molecular a través de polímeros de impresión de iones (IIPs).

En este trabajo, se exhiben las grandes bondades de los IIPs como parte indispensable en la composición de los CPE para la determinación de Pb(II), Hg(II) y As(III) a través de metodologías electroquímicas optimizadas. El capítulo uno constituye los antecedentes generales que muestran el creciente uso de las técnicas electroquímicas, la importancia y el estado del arte sobre el uso de IIPs en la determinación de iones metálicos.

En el capítulo dos se muestran los objetivos generales y específicos del presente trabajo; mientras que el capítulo tres se detalla la metodología experimental para el

desarrollo y optimización de la síntesis de IIPs, y la determinación electroquímica de cada uno de los metales de interés a través de diversos diseños de experimentos.

Finalmente, en el capítulo cuatro se discuten los resultados obtenidos, resaltando las propiedades de selectividad únicas de los IIPs sintetizados químicamente, posicionando a las metodologías electroquímicas desarrolladas en este trabajo como una alternativa novedosa, rápida y altamente selectiva para determinar trazas de Pb(II), Hg(II) y As(III) en diferentes muestras de agua con o sin pretratamiento de digestión ácida.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I. Antecedentes generales	24
1.1 Resumen.....	24
1.2 Contaminación del agua por metales tóxicos	26
1.3 Metales tóxicos.....	26
1.3.1 Plomo, Pb.....	28
1.3.2 Mercurio, Hg.....	29
1.3.3 Arsénico, As.	30
1.4 Cuantificación de metales pesados	31
1.4.1 Técnicas convencionales.....	31
1.4.2 Técnicas electroquímicas voltamperométricas	32
1.4.2.1 Voltamperometría cíclica (CV)	34
1.4.2.2 Voltamperometría de pulsos.....	35
1.4.2.2.1 Voltamperometría diferencial de pulso (DPV).	35
1.4.2.2.2 Voltamperometría de onda cuadrada (SWV).	37
1.4.2.3 Voltamperometría de redisolución anódica (ASV).....	37
1.4.2.4 Electrodo de trabajo y su modificación.....	38
1.5 Materiales de reconocimiento molecular.....	41
1.5.1 Polímeros de impresión de iones (IIPs): síntesis y componentes	42
1.6 Electrodo modificado con IIPs para cuantificar iones metálicos.	45
1.7 Diseño de experimentos	47
1.7.1 Diseño univariable	48

1.7.2 Diseño multivariable	49
1.7.2.1 Taguchi	49
1.7.2.2 Diseños de superficie de respuesta.....	49
1.7.2.2.1 Diseño Box-Behnken, BBD.....	50
1.7.2.2.2 Diseño de mezclas	51
1.7.2.2.3 Simplex centroide	51
1.8 Validación de métodos analíticos	52
1.8.1 Parámetros analíticos.....	53
1.8.1.1 Linealidad.....	53
1.8.1.2 Sensibilidad	54
1.8.1.3 Límite de detección, LOD.	55
1.8.1.4 Límite de cuantificación, LOQ.....	55
1.8.1.5 Veracidad: sesgo y recuperación.....	56
1.8.1.6 Precisión: repetibilidad y precisión intermedia.	57
1.8.1.7 Selectividad.....	57
CAPÍTULO II: Objetivos	59
2.1 Objetivo general	59
2.2 Objetivos específicos.....	59
CAPÍTULO III: Metodología experimental.....	61
3.1 Resumen.....	61
3.2 Materiales y equipos	62

3.2.1 Equipos	62
3.2.2 Materiales y reactivos.....	62
3.2.3 Sistema electroquímico.	63
3.3 Metodología experimental	64
3.3.1 Síntesis de IIP	64
3.3.2 Optimización de la síntesis de IIPs	66
3.3.2.1 Diseño Simplex Centroide para optimizar los IIPs de Pb(II) y As(III).....	67
3.3.2.2 Método univariable en la optimización del IIP de Hg(II).	69
3.3.3 Elaboración del CPE-IIP	70
3.3.4 Procedimiento electroquímico	71
3.3.5 Evaluación de la retención del CPE-IIP, CPE-NIP y CPE.....	72
3.3.6 Optimización de la metodología electroquímica.....	73
3.3.6.1 Optimización univariable del proceso de carga.....	74
3.3.6.1.1 Mezcla composite.....	74
3.3.6.1.2 Velocidad de agitación.....	75
3.3.6.1.3 Efecto del pH del buffer	75
3.3.6.1.4 Concentración del buffer para determinar Pb(II)	75
3.3.6.1.5 Tiempo de carga.....	76
3.3.6.2 Evaluación de la deposición electroquímica	76
3.3.6.2.1 Potencial de deposición.....	76
3.3.6.2.2 Tiempo de deposición.....	76

3.3.6.2.3 Concentración de electrolito soporte en la determinación de As(III).....	77
3.3.6.3 Optimización de la DPASV.....	77
3.3.6.3.1 Optimización de la DPASV para Hg(II).	77
3.3.6.3.2 Optimización de la DPASV para As(III).....	79
3.3.7 Caracterización analítica del método desarrollado.	79
3.3.7.1 Curvas de calibración.....	80
3.3.7.2 Parámetros analíticos.....	81
3.3.8 Análisis de muestras reales.....	81
3.3.9 Tratamiento de la muestra.....	82
CAPÍTULO IV. Resultados y discusión.....	84
4.1 Resumen.....	84
4.2 Optimización de la síntesis de IIP.....	85
4.3 Caracterización del IIP mediante infrarrojo.....	91
4.4 Evaluación electroquímica del CPE, CPE-NIP y CPE-IIP para cada IIP.	93
4.5 Efecto de la composición del electrodo CPE-IIP.....	95
4.6 Evaluación univariable del proceso de carga de iones.	97
4.6.1 Evaluación de la velocidad de agitación.....	97
4.6.2 Estudio del pH del buffer.	98
4.6.3 Efecto de la concentración del buffer en la determinación de Pb(II)	100
4.6.4 Evaluación del tiempo de carga.....	101
4.7 Evaluación univariable de las condiciones electrodeposición.	102

4.7.1 Potencial de deposición.....	103
4.7.2 Tiempo de deposición	104
4.7.3 Efecto del electrolito soporte en la determinación de As(III).	105
4.8 Optimización de la DPASV con el CPE-Hg(II) mediante Box-Behnken.....	105
4.9 Optimización de la DPASV con el CPE-As(III) mediante el Diseño de Taguchi	109
4.10 Caracterización analítica	110
4.10.1 Parámetros analíticos de la determinación de Pb(II).....	110
4.10.2 Parámetros analíticos de la determinación de Hg(II).	111
4.10.3 Parámetros analíticos de la determinación de As(III).....	112
4.11 Pruebas de selectividad	114
4.12 Determinación de metales en agua mediante DPASV empleando CPE-IIPs.....	117
5.0 Conclusiones.....	118
6.0 Perspectivas.....	121
7.0 Anexo A Evaluaciones realizadas mediante estadísticos t de student.	122
7.1 Evaluación de los valores de R^2 de optimización.....	122
7.2 Evaluación de las respuestas predichas y experimentales.	123
8.0 Referencias.	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Representación de una celda electroquímica.	33
Figura 2 Voltamperograma cíclico típico.	34
Figura 3 a) Representación de la imposición de pulsos de potencial en la DPV respecto al tiempo y b) Voltamperograma típico de la DPV y gráfica tiempo-potencial.	36
Figura 4 Representación de la rampa de potencial en la SWV respecto al tiempo.	37
Figura 5 Electrodeposición del analito previo a la redisolución.	38
Figura 6 Tipos de electrodos empleados para determinar iones metálicos: a) serigrafiado, b) metálico, c) carbón vitreo y d) pasta de carbono.	39
Figura 7 Esquema general de la síntesis de un IIP: a) Prepolimerización, b) Polimerización, y c) Eliminación de la plantilla.	43
Figura 8 Componentes más comunes de la síntesis de IIPs.	44
Figura 9 Representación de la interpretación incorrecta en un diseño univariable.	48
Figura 10 Coordenadas de los experimentos del BBD con tres factores (variables).	51
Figura 11 Representación del diseño Simplex Centroide con factores A, B y C.	52
Figura 12 Síntesis de Pb(II)-IIP mediante polimerización radicalaria.	65
Figura 13 Síntesis de Hg(II)-IIP mediante polimerización radicalaria.	65
Figura 14 Síntesis de As(III)-IIP mediante polimerización radicalaria.	66
Figura 15 Diseño simplex centroide de la síntesis de IIPs de Pb(II) y As(III). Cada combinación o punto está conformado por cierta cantidad de plantilla, monómero (s) y entrecruzante.	67
Figura 16 Método de dispersión para la formación del complejo Pb-EDTA	68

Figura 17 Elaboración del electrodo de pasta de carbono modificado con IIP.	70
Figura 18 Metodología de la determinación de metales con un CPE-IIP: a) proceso de carga, b) analito retenido en las cavidades del IIP, y c) celda electroquímica.	72
Figura 19 Modificación del composite del CPE con diferente cantidad de IIP.	74
Figura 20 Gráficas tridimensionales de superficie de respuesta de la optimización de a) Pb(II)-IIP y b) As(III)-IIP.	88
Figura 21 Espectros de infrarrojo de los monómeros funcionales (a-d), entrecruzante (e), f) Pb(II)-IIP, g) Hg(II)-IIP y h) As(III)-IIP.	92
Figura 22 DPASV del CPE, CPE-IIP y CPE-NIP para Pb(II).	93
Figura 23 DPASV del CPE, CPE-IIP y CPE-NIP para Hg(II).	94
Figura 24 DPASV del CPE, CPE-IIP y CPE-NIP para As(III).	94
Figura 25 Relación de lap respecto a la cantidad de IIP incorporado en los CPE-IIPs	96
Figura 26 Relación de lap respecto a la agitación: a) Pb(II), b) Hg(II) y c) As(III).	98
Figura 27 Relación de lap respecto al pH evaluado: a) Pb(II), b) Hg(II) y c) As(III);	99
Figura 28 Diagramas de Pourbaix de las especies de Pb(II), Hg(II) y As(III), a) En HCl como electrolito soporte en la celda electroquímica, y b) En el buffer del proceso de carga.	100
Figura 29 lap obtenida respecto a la concentración del buffer de acetatos pH 5.00.	101
Figura 30 Relación de lap respecto al tiempo de carga para a) Pb(II), b) Hg(II) y c) As(III).	102
Figura 31 Relación de lap respecto al potencial de electrodeposición: a) Pb(II), b) Hg(II) y c) As(III).	103

Figura 32 Relación de lap respecto al tiempo de electrodeposición: a) Pb(II), b) Hg(II) y c) As(III).	104
Figura 33 Relación de lap de As(III) respecto a la concentración de HCl	105
Figura 34 Gráficos tridimensionales de superficie de respuesta obtenidos a partir de la optimización de variables de DPV para el análisis de Hg(II).	108
Figura 35 DPASV de diferentes concentraciones de Pb(II); (Inserto: curva de calibración de Pb(II) con n=3 y %RSD<10%).	111
Figura 36 DPASV de diferentes concentraciones de Hg(II); (Inserto: curva de calibración de Hg(II) con n=3 y %RSD<10%).	112
Figura 37 DPASV de distintas concentraciones de As(III) (pico anódico a 0.00 V)	113
Figura 38 Intervalos lineal de la curva de calibración de As(III) de la señal de oxidación alrededor de 0.00 V; a) Curva de calibración completa, b) Linealidad a bajas concentraciones y c) Linealidad a altas concentraciones; n=3; %RSD<10%,	113
Figura 39 Porcentajes de recuperación de 50 μ M Pb(II) en presencia de diversos interferentes, n=3, %RSD<10%.	115
Figura 40 Porcentajes de recuperación de 50 μ M Hg(II) en presencia de diversos interferentes a diferentes concentraciones, n=3, %RSD<10%.	115
Figura 41 Porcentajes de recuperación de 50 nM As(III) en presencia de diversos interferentes a diferentes concentraciones, n=3, %RSD<10%.	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 MPL en agua potable para los metales de interés en esta investigación.	27
Tabla 2 Electrodo modificado con diversos materiales para cuantificar metales	40
Tabla 3 Electrodo modificado con IIPs para cuantificar metales.	46
Tabla 4 Proporciones iniciales de la síntesis de IIPs de cada metal.	64
Tabla 5 Matriz de experimentos del diseño simplex centroide para la optimización del Pb(II)-IIP.	68
Tabla 6 Matriz del diseño simplex centroide para la optimización de As(III)-IIP.	69
Tabla 7 Matriz de experimentos univariantes para la optimización de Hg(II)-IIP.	70
Tabla 8 Procedimiento optimizado para determinar metales mediante DPASV.	72
Tabla 9 Optimización del procedimiento mediante DPASV.	73
Tabla 10 Proporciones de la mezcla composite del CPE-IIP.	74
Tabla 11 Matriz de experimentos del diseño de experimento Box Behnken de la optimización de la DPV para determinar Hg(II).	78
Tabla 12 Matriz de experimentos del diseño Taguchi para optimizar la DPV en la determinación de As(III).	79
Tabla 13 Plan de validación para cada metodología desarrollada.	81
Tabla 14 Intervalo de variables para la optimización de cada IIP.	85
Tabla 15 Variable de respuesta de la optimización de la síntesis de Hg(II)-IIP; n=3, %RSD<10%.	85
Tabla 16 Variable de respuesta de la optimización de la síntesis de Pb(II)-IIP; n=3, %RSD<10%.	86

Tabla 17 Variable de respuesta de la optimización de la síntesis de As(III)-IIP; n=3, %RSD<10%.	86
Tabla 18 Combinación de variables optimas de la síntesis de cada IIP.	89
Tabla 19 Retención obtenida en condiciones óptimas de la síntesis de cada IIP. n=3, %RSD<10%.	90
Tabla 20 Iap experimental obtenida mediante el diseño experimental BBD para la determinación electroquímica de Hg(II) a través de DPV.	106
Tabla 21 Iap experimental obtenida mediante el diseño experimental de Taguchi para la determinación electroquímica de As(III) a través de DPV.	109
Tabla 22 Porcentajes de recuperación obtenidos en la prueba de selectividad para cada Pb(II), Hg(II) y As(III).	116
Tabla 23 Determinación de metales en diversas muestras reales con los electrodos modificados con IIPs; n=3.	117
Tabla 24 Resumen y comparación de resultados obtenidos respecto al MPL de cada metal.	120

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Ecuación de la recta.	54
Ecuación 2 LOD	55
Ecuación 3 LOQ	55
Ecuación 4 Sesgo	56
Ecuación 5 Recuperación	56
Ecuación 6 Ecuación de superficie de la optimización del Pb-IIP con $R^2= 73\%$	88
Ecuación 7 Ecuación de superficie de la optimización del As-IIP con $R^2= 98\%$	88
Ecuación 8 Ecuación de superficie de la optimización de DPASV para Hg(II).	107

LISTADO DE ACRÓNIMOS, SIGLAS Y SÍMBOLOS.

Siglas	Significado
%RSD	% de desviación estándar relativa
2-MT	2-Metil Tiofeno, C ₄ H ₄ S
4-VP	4-vinil piridina
ANOVA	Análisis de varianzas
As(III)-IIP	Polímero impreso sintetizado empleando As(III) como plantilla
As₂O₃	Trióxido de arsénico
ASV	Voltamperometría de redisolución anódica
b	Ordenada al origen de la curva de calibración
BBD	Diseño de experimentos Box-Behnken
BR	Britton Robinson
C₂H₃NaO₂	Acetato de sodio
C₂H₆O	Etanol
C₇H₅NaO₂	Benzoato de sodio
CH₃OH	Metanol
CV	Voltamperometría cíclica
DAD	Detector de arreglo de diodos
DPASV	Voltamperometría diferencial de pulsos con redisolución anódica
DPV	Voltamperometría diferencial de pulsos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGDMA	Dimetacrilato de etilenglicol
EPA	Agencia para la protección del medio ambiente de Estados Unidos
CPE	Electrodos de pasta de carbono
CPE-IIP	Electrodo de pasta de carbono modificado o enriquecido con IIP
CPE-NIP	Electrodo de pasta de carbono modificado o enriquecido con NIP
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GCE	Electrodo de carbón vítreo
H₃BO₃	Ácido bórico
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorhídrico

LISTADO DE ACRÓNIMOS, SIGLAS Y SÍMBOLOS (*continuación*).

Siglas	Significado
Hg(II)-IIP	Polímero impreso sintetizado empleando Hg(II) como plantilla
HgS	Cinabrio
Iap	Corriente de pico anódico
IARC	Agencia internacional para la investigación del cáncer
ICP-MASAS	Espectrometría de masa con plasma acoplado Inductivamente
IEC	Comisión electrotécnica internacional
IIP	Polímero de impresión de iones
ISO	Organización internacional de estandarización
ITO	Óxido de indio y estaño
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
KBr	Bromuro de potasio
KH₂PO₄	Fosfato de potasio monobásico
MPL	Límite máximo permitido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LSV	Voltamperometría de barrido lineal
M	Molaridad
m	Pendiente de la recta
MAA	Ácido metacrílico
MIPs	Polímeros molecularmente impresos
mV	Milivolts
n	Número de repeticiones
Na₂S₂O	Persulfato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NIP	Polímero no impreso
NPV	Voltamperometría normal de pulso
OMS	Organización mundial de la salud
Pb(II)-IIP	Polímero impreso sintetizado empleando Pb(II) como plantilla

LISTADO DE ACRÓNIMOS, SIGLAS Y SÍMBOLOS (*continuación*).

Siglas	Significado
Pb-EDTA	Complejo formado entre el Pb(II) y el EDTA
PbSO₄	Sulfato de plomo
Psi	Unidad de presión, libra por pulgada cuadrada
Py	Pirrol, C ₄ H ₅ N
R²	Coefficiente de correlación
S_{x/y}	Desviación estándar de la curva de calibración
SWASV	Voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica
SWV	Voltamperometría de onda cuadrada
X_{ref}	Concentración esperada
Y	Señal analítica, en este trabajo “lap”
\bar{x}	Concentración promedio

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES GENERALES

CAPÍTULO I. Antecedentes generales

1.1 Resumen

La contaminación de agua por metales pesados representa una de las principales problemáticas de la salud pública, atribuida a las descargas residuales de la industria petroquímica, minera, bebidas y alimentaria, que frecuentemente emplean iones metálicos como parte de sus procesos [1].

Se han definido al plomo (Pb), mercurio (Hg) y arsénico (As) como sustancias químicas peligrosas, ya que la intoxicación por ingesta o exposición accidental a estos metales pesados provoca daños progresivos e irreversibles a la salud [2, 3] Por lo tanto, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) estableció límites máximos permitidos (MPL) de 0.015 mg L^{-1} , 0.002 mg L^{-1} y 0.010 mg L^{-1} para Pb(II), Hg(II) y As(III) respectivamente en agua potable, y para su determinación exacta y precisa se han utilizado diversas técnicas convencionales que requieren un exhaustivo pretratamiento de digestión de la muestra aunado a una instrumentación sofisticada que aumenta el costo de análisis [6]. Lo anterior ha despertado el interés por el uso de técnicas electroquímicas ya que su implementación representa un bajo costo y tiempo de análisis cortos, además de la posibilidad de realizar análisis *in situ*. Específicamente, la voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) es la técnica más utilizada para cuantificar iones metálicos ya que elimina la corriente no faradaica y mejora tanto la sensibilidad como el límite de detección (LOD) [7, 8]. Para incrementar la sensibilidad de la metodología, es posible realizar un paso previo de deposición electroquímica y posteriormente realizar el barrido de potencial de la DPV; la intensidad de corriente de pico anódico resultante (i_{ap}) es considerada la respuesta analítica proporcional a la concentración del analito en la muestra [9].

El electrodo de trabajo es el corazón de las técnicas electroquímicas, por lo que se han utilizado una gran variedad de ellos, como los metálicos (Ag, Au, o Pt) [10, 11] y los carbonáceos (pasta de carbono o carbón vítreo) [12, 13]. Sin embargo, la composición del

electrodo de trabajo tiene un rol muy importante en el desarrollo de una metodología electroquímica, y desde hace más de dos décadas, los electrodos de pasta de carbono (CPE) han demostrado ser transductores versátiles al mejorar sus propiedades como sensores con la incorporación de materiales modificantes, obteniendo un electrodo de bajo costo y parámetros analíticos competitivos con las técnicas convencionales, empleando materiales como nanotubos de carbono [14, 15], grafeno y óxido de grafeno reducido [16, 17], nanopartículas metálicas [18, 19], y materiales de reconocimiento como polímeros de impresión de iones (IIPs) [20 - 23].

Los IIPs son materiales novedosos que proporcionan una gran capacidad de reconocimiento a través de cavidades creadas en el procedimiento de polimerización. El IIP se sintetiza en presencia de una plantilla correspondiente al analito de interés y un monómero funcional para formar el complejo plantilla-monómero. Posteriormente, se agrega un agente entrecruzante para crear las cavidades de reconocimiento y estabilizar la matriz polimérica. Finalmente, la plantilla se elimina y de esta forma se crean o revelan las cavidades que proporcionan un reconocimiento selectivo en forma, tamaño e interacciones hacia la plantilla con la cual ha sido sintetizado [24, 25].

El objetivo de la presente tesis fue desarrollar metodologías electroquímicas para la determinación de Pb(II), Hg(II) y As(III) en muestras de agua a través de la técnica DPV, empleando electrodos de pasta de carbono modificados con polímeros de impresión de iones, permitiendo obtener métodos selectivos, altamente sensibles y de bajo costo. Los CPE modificados con IIPs (CPE-IIP) permitieron resolver las limitaciones de los electrodos convencionales a través de una fácil renovación de su superficie mejorando el tiempo de análisis, obteniendo en cada renovación nuevas cavidades para el reconocimiento de iones metálicos y minimizando el pretratamiento de digestión de la muestra.

1.2 Contaminación del agua por metales tóxicos

El agua constituye un elemento esencial para el desarrollo de la vida, pero no toda se encuentra en condiciones aptas para el consumo humano, ya que la presencia de sustancias peligrosas deteriora su calidad y provocan su contaminación [26].

El suministro de este recurso depende fundamentalmente de la naturaleza geoquímica del terreno y de los aportes naturales proporcionados por la lluvia que finalmente llegan a los ríos, lagos y lagunas [27]; sin embargo, más del 70% de estos cuerpos hídricos presentan algún grado de contaminación por metales pesados debido a algunas actividades y descargas de industrias como la minería, química, petroquímica, alimentaria, textil, pesticidas y el uso de materiales de fontanería o soldadura [28].

Los metales tóxicos provocan daños irreparables en el organismo e incluso la muerte dependiendo de la forma de intoxicación, por ejemplo en 2016 de acuerdo con la OMS (Organización Mundial de la Salud) 1.6 millones de personas perdieron la vida a causa del consumo de agua y alimentos contaminados con metales pesados. El caso más conocido de contaminación por metales pesados ocurrió en 1956 en la bahía de Minamata, donde el consumo de pescado contaminado con metilmercurio provocó daños permanentes e irreparables en el sistema de nervioso central de las personas intoxicadas, aunado a la muerte de organismos acuáticos [29].

1.3 Metales tóxicos

La Organización Mundial de la Salud define diez sustancias químicas que constituyen una preocupación para la salud pública: aire contaminado, asbestos, benceno, dioxinas, flúor, pesticidas, cadmio, y entre ellos, tres de los metales pesados tóxicos Pb, Hg y As, es decir, elementos naturales con alto peso atómico y una densidad 5 veces mayor a la del agua [30, 31].

De acuerdo con la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) la definición de “metal pesado” solo está relacionada con características fisicoquímicas de los metales pero no con su toxicidad; aunque convencionalmente se ha relacionado “pesadez” con toxicidad, el término “metal tóxico” sería preciso para identificar a los metales considerados dañinos para el organismo, incluidos algunos metaloides, que aún en bajas concentraciones pueden inducir toxicidad [32, 33]. La intoxicación por un metal se debe a varios factores como a la especie que forma en determinado medio, dosis y vía de ingreso al organismo como inhalación (partículas en forma de vapor), dérmica (contacto con la piel) y oral (ingesta de bebidas o alimentos contaminados), siendo esta última la que se presenta con mayor frecuencia originando la definición de metal tóxico sistémico, ya que en caso de intoxicación son distribuidos a los órganos de todo el cuerpo a través de la sangre, afectando a más de uno a la vez [34, 35].

Debido a la preocupación por las características tóxicas de metales como el Pb, Hg y As, organizaciones como la EPA han establecido límites máximos permitidos (**Tabla 1**) que aseguran que el agua será agradable a los sentidos y no causará efectos nocivos a la salud del consumidor [36, 37].

Tabla 1 MPL en agua potable para los metales de interés en esta investigación.

Metal	Límite máximo permitido en agua potable.
Plomo, Pb	0.015 mg L ⁻¹
Mercurio, Hg	0.002 mg L ⁻¹
Arsénico, As	0.010 mg L ⁻¹

MPL: límite máximo permitido.

1.3.1 Plomo, Pb.

El plomo es un metal pesado de color gris, con símbolo químico Pb, peso atómico de 207.2 g mol⁻¹, densidad relativa de 11.34 g mL⁻¹, resistente al ataque de ácidos como el H₂SO₄ y HCl, pero soluble en HNO₃. Posee un comportamiento anfótero, ya que reacciona con ácidos formando sales ácidas, pero también con bases formando sales metálicas y óxidos [38].

Durante siglos, diversos compuestos fueron utilizados para fines domésticos como el acetato de plomo que sirvió como edulcorante, conservante del vino, inhibidor de la fermentación de la sidra, agente antiinflamatorio y abortivo; mientras que el carbonato y sulfuro de plomo se utilizaban como ingredientes de medicamentos [39]. El Pb metálico, se utilizaba para la fabricación de láminas, ollas, monedas, balas, pesas, baterías ácidas, pintura textil, materiales fotográficos y tuberías, la cual es la principal fuente de contaminación por este metal [40].

Por lo tanto, dada su toxicidad y abundancia el plomo es reconocido como uno de los metales más peligrosos y responsable del 0.6% de la morbilidad mundial, ya que al ingresar al organismo inhibe o imita las acciones del calcio e interactúa con las proteínas provocando osteoporosis, aunado a problemas gastrointestinales, daño hepático y renal, hipertensión, y trastornos neurológicos que pueden causar convulsiones e incluso la muerte [41, 42]. Aunque no ha sido comprobada la acción cancerígena del plomo, la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC) ha clasificado a sus especies inorgánicas y metálica en los grupos 2A y 2B, como probablemente cancerígenos para los humanos [43].

1.3.2 Mercurio, Hg.

El mercurio es conocido como un metal pesado tóxico y omnipresente en la cadena alimentaria, ya que se encuentra en el organismo debido a la ingestión de alimentos y agua contaminados [44].

La toxicidad de este metal depende de la especie en que se encuentre ya sea elemental (metálico), inorgánico u orgánico. Algunas aplicaciones del mercurio inorgánico datan de la prehistoria en pinturas rupestres para representar el color rojo a través de la molienda del cinabrio (HgS). La especie orgánica también llamada metilmercurio, es obtenida por la transformación natural del mercurio y se considera la principal fuente de intoxicación crónica debido al consumo de alimentos (mariscos y pescados) y agua contaminados, provocando retraso mental y crisis convulsivas, retraso del desarrollo, trastornos del lenguaje, pérdida de la memoria y parálisis cerebral [45, 46]. El mercurio elemental o metálico es ligeramente soluble y poco tóxico al ingerirse, pero genera vapores a cualquier temperatura provocando intoxicaciones crónicas. Fue ampliamente utilizado en la fórmula de cosméticos para aclarar la piel, en el tratamiento de la sífilis, y actualmente en instrumentos como termómetros, barómetros, en la extracción de oro y plata de las minas, y en amalgamas dentales donde forma casi el 50% de la composición del material.

Desde un punto de vista instrumental, el mercurio metálico también era utilizado como parte principal del electrodo de gota de mercurio en polarografía (descubierta en 1920); sin embargo, ambos perdieron importancia debido a la obtención de límites de detección no satisfactorios, desarrollo de instrumentos comerciales de menor costo y la creación del convenio de Minamata, que hace énfasis en la reducción del uso y emisiones de compuestos de mercurio al medio ambiente [47]. Las advertencias del uso de este elemento favorecieron el desarrollo de la voltamperometría que conocemos en la actualidad, de nuevas metodologías y electrodos amigables con el medio ambiente.

1.3.3 Arsénico, As.

El arsénico es un metaloide ampliamente distribuido en la corteza terrestre capaz de inducir toxicidad en niveles bajos de exposición y ha sido ampliamente utilizado en la producción de pesticidas, como conservador de la madera, en la fabricación de vidrio, cosméticos, cerámica y fuegos artificiales. Se estima que varias personas están crónicamente expuestas al agua contaminada por arsénico en todo el mundo, especialmente en países como Argentina, Camboya, Chile, China, Nepal, Pakistán, Vietnam, Estados Unidos, Taiwán y México [48, 49].

La gravedad de los efectos adversos del arsénico a la salud está relacionada con su forma química arsénico o arsenato. El arsenito, As(III) o también llamado arsénico inorgánico es considerado el más tóxico al no tener sabor ni olor, además que se encuentra presente en pescados, mariscos y disuelto en agua a bajas concentraciones de oxígeno, dependiendo del pH se puede encontrar como H_3AsO_3 , $H_2AsO_3^{-1}$, $HAsO_3^{-2}$ y AsO_3^{-3} . Por otro lado, el arsenato (especie orgánica) o As(V) es más común en pescados, aguas subterráneas y superficiales bien oxigenadas; se encuentra como H_3AsO_4 , $H_2AsO_4^{-1}$, $HAsO_4^{-2}$ y AsO_4^{-3} ; la forma común para determinarlo es el ion arsenato monoácido, $HAsO_4^{-2}$ [50, 51].

Los síntomas inmediatos de intoxicación aguda pueden incluir vómito, dolor abdominal, diarrea, entumecimiento en manos y pies, e incluso la muerte, mientras que la exposición prolongada a altos niveles de arsénico inorgánico a través del consumo de agua y alimentos contaminados incluyen cambios de pigmentación, durezas y callosidades en las palmas de las manos y las plantas de los pies. Estos efectos pueden ser precursores de cáncer de piel, vejiga y pulmón [52].

1.4 Cuantificación de metales pesados

La presencia de Pb, Hg y As en el agua potable, considerados los metales intrínsecamente más tóxicos, ha sido confirmada en estudios realizados a los habitantes de los estados más afectados del país reportando concentraciones que superan los límites establecidos en normas internaciones. Sin embargo, ningún metal tóxico tiene alguna función vital para el organismo y aún en bajas concentraciones son capaces de inducir toxicidad e impactar de forma negativa en la salud debido a que no son degradables [53]. Por lo tanto, la determinación oportuna de iones metálicos para evitar pérdidas humanas y catástrofes ambientales se ha convertido en una prioridad mundial [54]. Algunas técnicas para cuantificar iones metálicos han sido reportadas por diversos medios nacionales como las Normas Mexicanas oficiales (NOM) e internacionales como American Society for Testing and Materials (ASTM) [55]. Sin embargo, su uso está condicionado por la exactitud, precisión, sensibilidad, límite de detección y principalmente selectividad que pueden aportar en la identificación y cuantificación inequívoca de ultratrazas del metal analizado [56, 57].

1.4.1 Técnicas convencionales

Las técnicas analíticas para cuantificar iones metálicos en agua potable que han sido tradicionalmente utilizadas son las de absorción atómica, que emplean los átomos en estado de vapor y su posterior activación por energía electromagnética o térmica, midiendo la energía absorbida o emitida al pasar a un estado activado o al volver del estado activado, dando lugar a las técnicas de absorción, fluorescencia o emisión atómica. Sin embargo, estas técnicas determinan la concentración total del metal de interés y no de cada una de sus especies [58].

Por otro lado, la combinación del proceso de obtención de vapor atómico con plasma iónico con sistema de detección de espectrofotometría de masas da lugar a otra técnica para detectar iones metálicos llamada espectrometría de masa con plasma acoplado

inductivamente (ICP-MASAS) [59, 60]. Otras determinaciones se han llevado a cabo a través de electroforesis capilar [61, 62], y cromatografía de gases de alta resolución [63, 54]. La cuantificación exacta, precisa y selectiva de iones metálicos en las técnicas mencionadas depende de las características de los metales y muestras a analizar, ya que algunas veces no pueden ser cuantificados de la misma forma que otros; como ocurre en la determinación de mercurio, donde es necesario la técnica de vapor frío, mientras que en la determinación de plomo debe realizarse por horno de grafito en lugar de la flama [65]. El uso de equipos, aditamentos sofisticados, condiciones, materiales especiales de análisis y el exhaustivo pretratamiento de la muestra finalmente aumenta el costo y tiempo del análisis [66].

Se ha reconocido la necesidad de desarrollar nuevas metodologías que resuelvan las limitaciones de las técnicas convencionales; y en este sentido, la electroquímica, a través de las técnicas voltamperométricas son las más utilizadas para determinar iones metálicos por ser altamente sensibles, presentar sencillez de instrumentación, capacidad de realizar determinaciones simultáneas, bajo consumo de energía y posibilidad de realizar análisis *in situ* [67].

1.4.2 Técnicas electroquímicas voltamperométricas

La electroquímica es una herramienta poderosa en el análisis de reacciones regidas por la transferencia de electrones, relaciona el flujo de electrones con los cambios químicos o electroquímicos en la reacción. En la actualidad, son ampliamente utilizadas para evaluar el perfil electroquímico y/o realizar la determinación de metales pesados en diversas matrices complejas. La voltamperometría relaciona el potencial, tiempo y corriente en una celda electroquímica de tres electrodos: electrodo de trabajo (WE), de referencia (RE) y contraelectrodo o electrodo auxiliar (AE) como se muestra en la **Figura 1**; la medición de corriente ocurre en función del tiempo y potencial aplicado. Estas técnicas, involucran el

uso de un potenciostato para controlar el potencial entre el electrodo de trabajo y de referencia, mientras la corriente producida fluye entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. Los electrodos son conectados eléctricamente a una estación de trabajo electroquímica que a su vez está conectada a una computadora con el software adecuado para obtener y analizar los datos recabados durante el experimento [68].

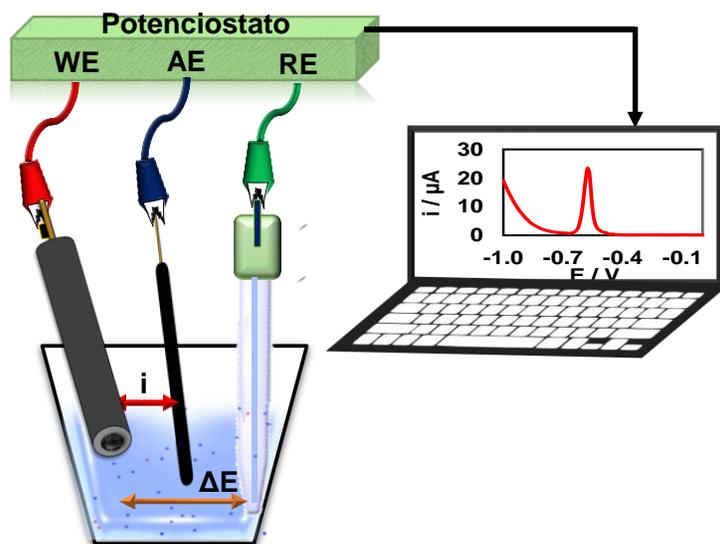


Figura 1 Representación de una celda electroquímica.

La primera técnica voltamperométrica reportada y ganadora de un premio nobel de química fue la polarografía, con el uso de un electrodo con un flujo constante de gota de mercurio. Sin embargo, el progresivo desuso de dicho electrodo debido a su baja selectividad y a los acuerdos del convenio de Minamata propició la creación de una nueva generación de electrodos de trabajo amigables con el medio ambiente para ser aplicados en voltamperometría cíclica y/o de pulsos [69, 70].

1.4.2.1 Voltamperometría cíclica (CV)

La voltamperometría cíclica es utilizada para conocer o monitorear el mecanismo de reacción que ocurre en la superficie del electrodo de especies químicas electroactivas, proporciona información tanto cinética como termodinámica de estos procesos. Como se muestra en la **Figura 2**, la CV inicia en el potencial de corriente nula; como el potencial es definido en función del tiempo, la exploración o barrido de potencial lineal ocurre en términos de V/s en sentido anódico o catódico según las necesidades del experimento. El potenciostato controlará el potencial aplicado al electrodo de trabajo respecto al de referencia y el electrolito soporte compensará la mayor cantidad de resistencia posible de la celda; finalmente el barrido es invertido hasta regresar al potencial inicial; este ciclo puede repetirse de forma periódica, de acuerdo con lo que se desea investigar [71].

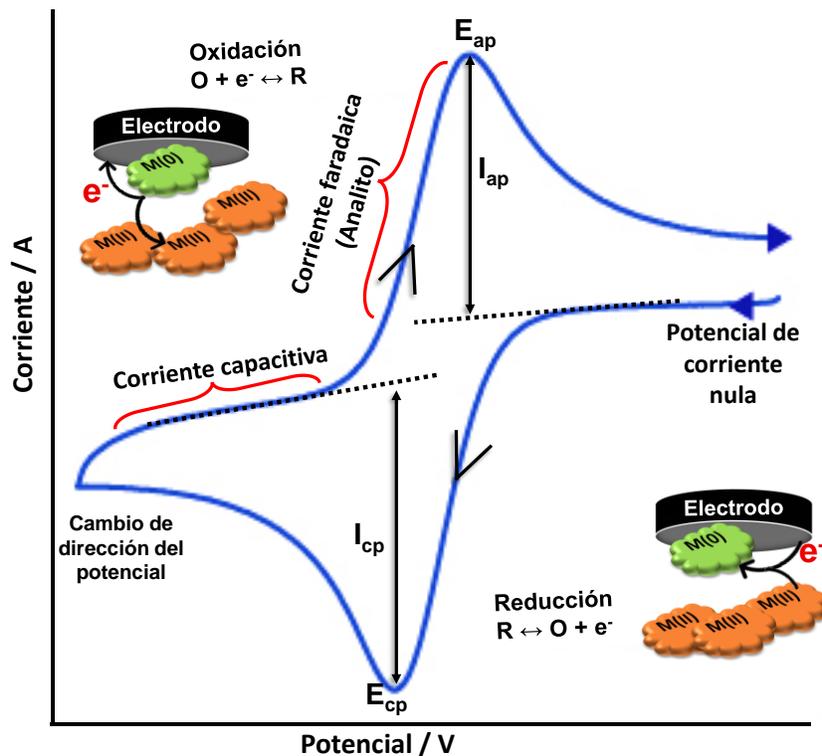


Figura 2 Voltamperograma cíclico típico.

La corriente que fluye en el electrodo de trabajo y el contraelectrodo es monitoreada durante el experimento, generando el gráfico o voltamperograma de corriente en función de del potencial aplicado. La **Figura 2** representa un voltamperograma cíclico típico con picos de corriente en sentido catódico relacionados con procesos de reducción, y de oxidación en sentido anódico, ambos con contribuciones faradaicas y no faradaicas. Dependiendo de las especies en el electrolito soporte y su concentración, será la cantidad y forma de los picos obtenidos [72, 73].

1.4.2.2 Voltamperometría de pulsos

Se puede modificar la forma en que se aplica el potencial en una voltamperometría, de forma que en lugar de tener una rampa de potencial se tengan “escalones” o pulsos de potencial. Dependiendo de la forma del pulso, se puede tener la voltamperometría normal de pulso (NPV), voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y voltamperometría diferencial de pulso (DPV). El pulso de potencial permite discriminar la corriente faradaica de la no faradaica, lo que hace que cuando las voltamperometrías por pulsos son aplicadas a metodologías analíticas, se aumenta la sensibilidad y precisión de las mediciones además de disminuir el límite de detección, por lo que rápidamente la SWV y DPV fueron empleadas en la determinación de iones metálicos [74, 75].

1.4.2.2.1 Voltamperometría diferencial de pulso (DPV).

La DPV se lleva a cabo mediante la imposición de pulsos de potencial definidos de acuerdo con cuatro parámetros que caracterizan a la técnica: amplitud, paso de potencial, ancho y duración del pulso. Como se muestra en la **Figura 3a**), inicialmente se impone la amplitud del potencial y se mantiene constante por cierto tiempo (ancho de pulso), posteriormente el potencial disminuye hasta el paso de potencial para crear el pulso; la duración del ancho corresponde al tiempo entre el inicio de dos pasos de potencial

consecutivos [76]. La corriente es medida al inicio y final de la aplicación de potencial (o del pulso aplicado) con el objetivo de sustraer los efectos indeseables de la corriente no faradaica, obteniendo la diferencia entre ambas al momento de imponer la amplitud de potencial y al final del pulso, para generar la voltamperometría diferencial.

El gráfico con forma de pico se muestra en la **Figura 3b)**, en el que la altura de este será proporcional a la concentración del analito [77, 78]. Debido a que en los extremos del pulso se tiene menor corriente de fondo y mayor corriente no-faradaica, la diferencia de corrientes ($\Delta I = I_2 - I_1$) permite detectar a los analitos presentes en la solución a bajas concentraciones, y de esta forma obtener un método con bajos límites de detección y alta sensibilidad [79].

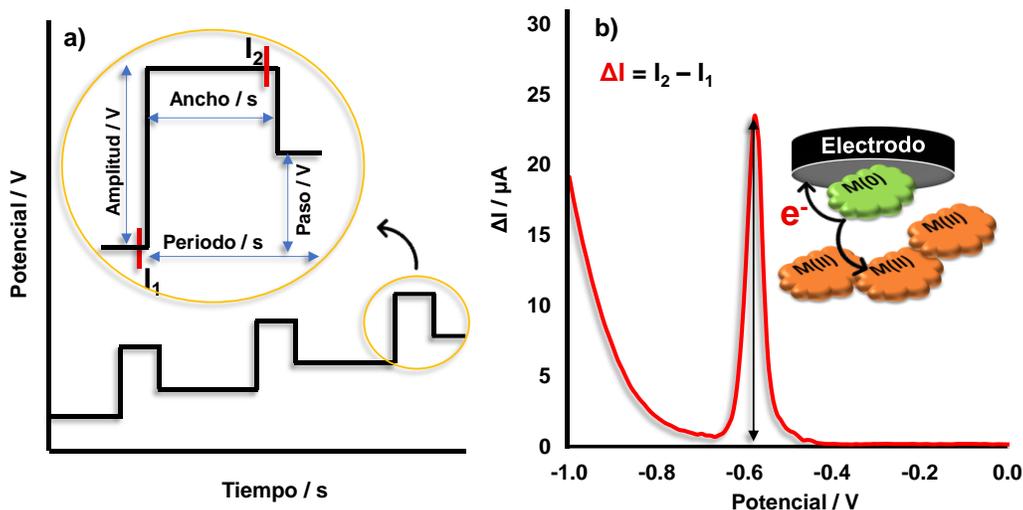


Figura 3 a) Representación de la imposición de pulsos de potencial en la DPV respecto al tiempo y b) Voltamperograma típico de la DPV y gráfica tiempo-potencial.

1.4.2.2 Voltamperometría de onda cuadrada (SWV).

Esta técnica es considerada una de las más rápidas y sensibles para determinar iones metálicos, ya que el pulso es aplicado de forma simétrica considerando sólo tres parámetros: amplitud del pulso, duración y frecuencia (**Figura 4**), obteniendo pulsos más cortos y por lo tanto, determinaciones más rápidas [80]. En la SWV, se aplican largos valores de amplitud de forma constante sobre una rampa de potencial, obteniendo una forma de escalera con potencial base, ya que después de la aplicación de un pulso la amplitud del siguiente iniciará con el mismo valor de amplitud que el primero, pero en sentido contrario [81, 82].

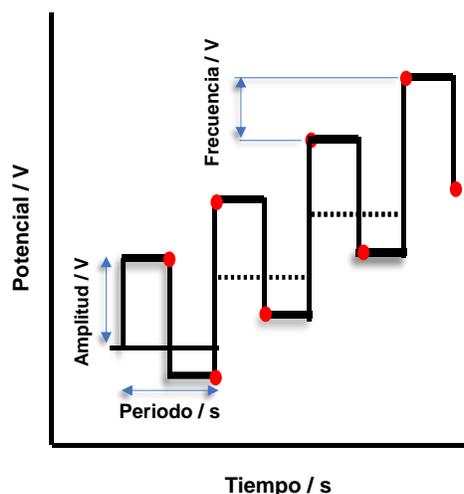


Figura 4 Representación de la rampa de potencial en la SWV respecto al tiempo.

1.4.2.3 Voltamperometría de redisolución anódica (ASV).

Una rama especial de la voltamperometría es el análisis por redisolución. La combinación de ASV con las técnicas de pulsos propició la creación de la voltamperometría diferencial de pulsos con redisolución anódica (DPASV) y voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica (SWASV). Como se muestra en la **Figura 5**, inicialmente el metal es electrodepositado en la superficie del electrodo de trabajo al imponer durante cierto tiempo un potencial suficientemente catódico que provoque su completa reducción;

después de un tiempo de relajación o equilibrio, se lleva cabo la redisolución anódica a través del barrido de potencial con DPV o SWV en la que ahora ocurrirá la oxidación de la especie metálica.

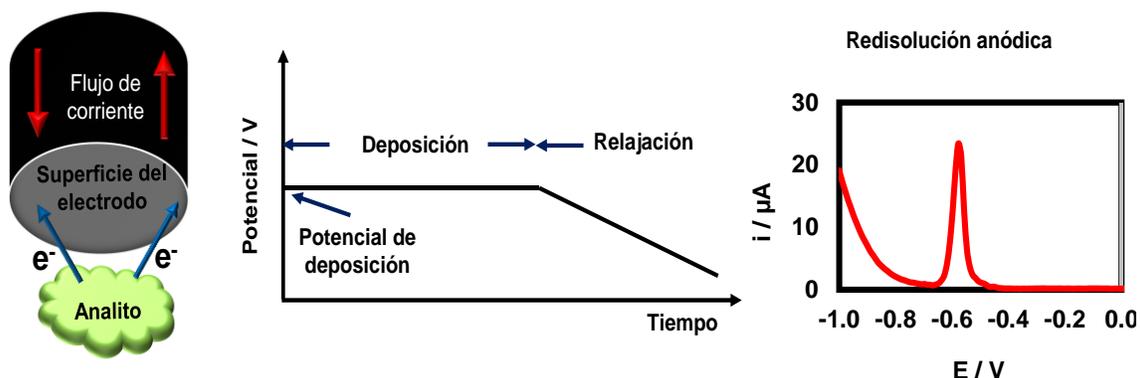


Figura 5 Electrodeposición del analito previo a la redisolución.

El resultado es un voltamperograma con un pico de corriente anódica de la especie metálica, la altura del pico es proporcional a la cantidad de la especie metálica electrodepositada y por lo tanto, a la concentración del metal en la muestra. Con estas técnicas es posible incrementar la sensibilidad del método y disminuir sustancialmente el límite de detección; sin embargo, la composición del electrodo de trabajo es un factor importante para aprovechar las ventajas de las técnicas de redisolución [83-85].

1.4.2.4 Electrodo de trabajo y su modificación

Dado que en los métodos voltamperométricos la corriente fluye a través del electrodo de trabajo después de una perturbación del potencial en una celda electroquímica, su selección es de vital importancia de acuerdo con las necesidades del método a desarrollar, ya que de éste dependerán muchas de las características y condiciones de la determinación de iones metálicos. En este sentido, aunado al progresivo

desuso del electrodo de gota de mercurio, ha sido fundamental buscar alternativas efectivas que implique el uso de electrodos amigables con el medio ambiente. A lo largo de los años, se ha reportado el uso de diversos electrodos como los electrodos serigrafiados (**Figura 6 a**), metálicos (Ag, Au y Pt) (**Figura 6b**), y carbonáceos; dentro de estos últimos se encuentran el grafito; carbón vitreo (GCE) (**Figura 6c**) y pasta de carbono (**Figura 6d**) [86, 87].

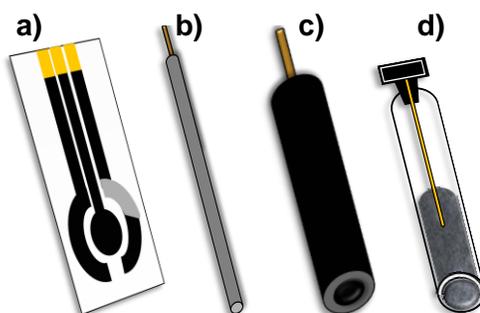


Figura 6 Tipos de electrodos empleados para determinar iones metálicos: a) serigrafiado, b) metálico, c) carbón vitreo y d) pasta de carbono.

Los electrodos mencionados por sí mismos no poseen ni la selectividad ni la sensibilidad para determinar trazas de iones metálicos, siendo necesaria su modificación incorporando materiales novedosos que mejoren sus características. En la **Tabla 2**, se resumen algunas de las características reportadas en la determinación de iones metálicos para metodologías que emplean electrodos modificados con nanotubos de carbono, grafeno/óxido de grafeno reducido, nanopartículas, polímeros y polímeros conductores.

Tabla 2 Electrodoos modificados con diversos materiales para cuantificar metales

Electrodo modificado	Analito, muestra y técnica	Características	Ref.
GCE con CeO ₂ y MWCNTs	Pb(II), Hg(II) y Cu(II) con DPASV en agua.	* Regresión cuadrática polinomial * LOD: (5.50x10 ⁻³ a 0.06) μM * Sensibilidad: (0.18 a 3.16) μA mM ⁻¹ cm ⁻² * Muy selectivo	[88]
Serigrafiado con hierro y quitosano.	As(III) en aguas residuales mineras con SWASV.	* Intervalo lineal: no reportado. * LOD: 0.02 μM * Sensibilidad: 2.78 μA μM ⁻¹ * Poco selectivo en presencia de Cu(II).	[89]
GCE con AuNPs y MWCNTs.	Hg(II) en agua potable y embotellada con DPASV.	* Intervalo lineal: (1.00x10 ⁻⁴ a 0.02) μM * LOD: 0.03 μM * Sensibilidad: 0.03 μA μM ⁻¹ cm ⁻² * No selectivo en presencia de Cu(II).	[90]
GCE y quitosano	Pb(II) y Cd(II) en agua de pozos con SWASV	* Intervalo lineal por adición estándar: (9.65x10 ⁻⁵ a 9.65x10 ⁻³) μM y (99.6 a 1103) μM * LOD: 3.00x10 ⁻⁴ μM y 0.04 μM * Sensibilidad: (24.06 y 201.95) A μM ⁻¹ * No selectivo	[91]
GCE con grafeno, AuNPs y bismuto	Pb(II) y Cd(II) en agua potable y embotellada con SWASV	* Intervalo lineal: (1.93x10 ⁻⁴ a 0.19) μM * LOD: (9.04x10 ⁻⁴ a 0.02) μM * Poco selectivo con metales de diferente número de oxidación.	[92]
Serigrafiado y AuNPs	Cr (VI) en agua con LSV	* Intervalo lineal: (0.19 a 1443) μM * LOD: 0.07 μM * Selectivo.	[93]
CPE con GO	Pb(II) en agua residual y pescado, con SWASV	* Intervalo lineal: (0.0001 a 2.50) μmol ⁻¹ L * LOD: 9.40x10 ⁻³ μM * Sensibilidad: 87.00 μA μM * Poco selectivo en presencia de Cu(II).	[94]
CPE y lignina	Pb(II) en agua de grifo con SWASV	* Intervalo lineal: (3.00 a 21.00) μM * LOD: 2.50x10 ⁻⁵ μM * Sensibilidad: 0.02 μA μM ⁻¹ * Selectividad no reportada.	[95]
Electrodo de vidrio con ITO, Porfirina y PPy	Cd(II) en agua potable con DPV	* Intervalo lineal: (0.60 a 3.40) μM * LOD: 0.02 μM * Sensibilidad: 19.80 μA μM * No selectivo a Cu(II) y As(III).	[96]

GCE: electrodo de carbón vitreo, **MWCNTs:** nanotubos de carbono de pared múltiple, **DPASV:** voltamperometría diferencial de pulsos con redisolución anódica, **LOD:** límite de detección, **SWASV:** voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica, **AuNPs:** nanopartículas de oro, **LSV:** voltamperometría de barrido lineal, **GO:** óxido de grafeno, **CPE:** electrodo de pasta de carbono, **ITO:** óxido de indio y estaño, **DPV:** voltamperometría diferencial de pulsos, **PPy:** polipirrol.

Se puede observar que en la mayoría de los reportes de la **Tabla 2**, se requiere el uso de más de un modificante, aunado a que algunas metodologías emplean el método de adición patrón para eliminar el efecto matriz de las muestras debido a la poca o nula selectividad del electrodo en presencia de diversos componentes de las muestras.

En la búsqueda de una estrategia que permita obtener una metodología electroquímica rápida y altamente selectiva, se ha reportado el uso de materiales de reconocimiento con los cuales es posible identificar, en una muestra incluso sin tratamiento previo, únicamente al analito de interés [97, 98].

1.5 Materiales de reconocimiento molecular

La demanda de nuevos materiales selectivos para la cuantificación de diversos contaminantes ha propiciado la evolución de la tecnología de impresión molecular, dando lugar a materiales sintetizados en diferentes formatos con una función de reconocimiento y estequiometría específicos, que imitan el comportamiento sustrato-enzima de los bioreceptores. Esto ha permitido el diseño y desarrollo de polímeros con comportamiento bio-mimético, logrando un reconocimiento específico hacia el analito de interés.

En vista de que el principio básico de la impresión molecular consiste en “imprimir”, “revelar” o crear en materiales sintéticos cavidades que se ajustan complementariamente al analito de interés (utilizado como plantilla), la capacidad de reconocimiento de los materiales impresos molecularmente proporciona alta selectividad y eficiencia debido a dichas cavidades creadas con el uso de la molécula plantilla (orgánica o inorgánica), dando lugar a los denominados polímeros molecularmente impresos (MIPs) que tendrán interacciones monómero-plantilla a través de enlaces covalentes, no covalentes, fuerzas de Van Der Waals y puentes de hidrógeno [99-104]. Por otro lado, los polímeros de impresión de iones (IIPs), proporcionan gran capacidad de reconocimiento mediante interacciones químicas de coordinación entre un ion metálico (plantilla) y el ligando (monómero funcional).

Debido a la composición, estabilidad química y térmica de un IIP contra las posibles interferencias químicas en una muestra, estos han sido ampliamente utilizados en la determinación electroquímica de iones metálicos [105, 106].

1.5.1 Polímeros de impresión de iones (IIPs): síntesis y componentes

La obtención de cualquier polímero ocurre a través de una polimerización o síntesis para producir largas cadenas poliméricas y generar una matriz tridimensional a través de diversas rutas químicas. Tomando en cuenta este proceso, el desarrollo de un IIP está basado en la síntesis de polímeros estables con propiedades de reconocimiento molecular hacia una molécula plantilla, debido a las cavidades complementarias en forma, tamaño e interacciones, logrando “identificarla” para realizar su posterior detección y cuantificación mediante técnicas analíticas [107].

De acuerdo con la **Figura 7**, los IIPs se sintetizan en presencia de una molécula plantilla (analito de interés a cuantificar) y un monómero funcional (con grupos funcionales complementarios) en un disolvente apropiado para formar un complejo de prepolimerización monómero-plantilla estable y proporcionar un IIP con mayor afinidad mediante enlaces metálicos de coordinación o puentes de hidrogeno según la naturaleza del monómero (**Figura 7a**). Posteriormente, se realiza la adición de un agente entrecruzante para generar y dar estabilidad a la matriz polimeriza tridimensional alrededor del complejo (**Figura 7b**), y un iniciador radicalario que propiciará el inicio de la polimerización. Después del tiempo de síntesis y de obtener el polímero, se elimina la molécula plantilla mediante lavados ácidos y agua desionizada con el objetivo de “revelar” o imprimir” las cavidades capaces de reconocer en forma, tamaño e interacciones al analito de interés (plantilla) (**Figura 7c**) [108, 109].

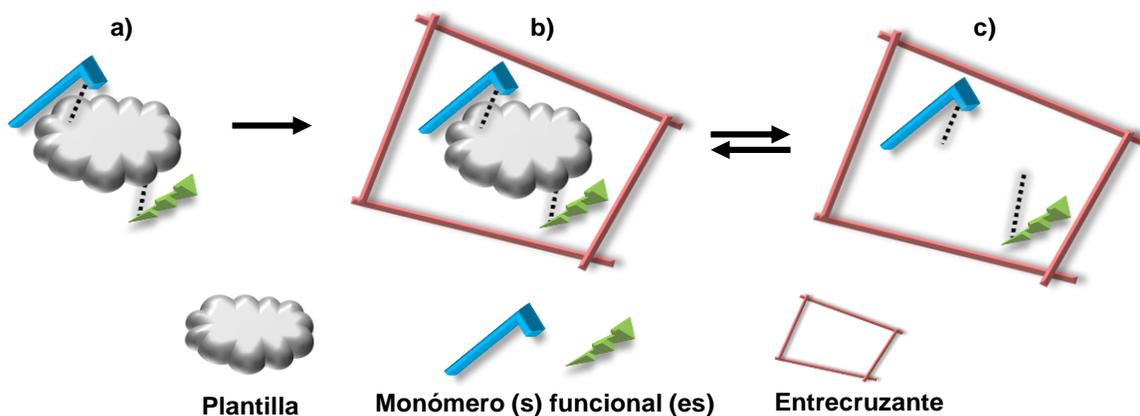


Figura 7 Esquema general de la síntesis de un IIP: a) Prepolimerización, b) Polimerización, y c) Eliminación de la plantilla.

Para comprobar la capacidad del IIP para reconocer selectivamente al analito en comparación con otras especies relacionadas, se sintetiza un polímero no impreso (NIP), en las mismas condiciones que el IIP pero en ausencia de la molécula plantilla. El NIP tendrá los mismos grupos funcionales que el IIP debido a las condiciones de su síntesis, pero no cavidades de reconocimiento; por lo tanto, es posible que al contacto con una solución que contenga únicamente al analito de interés se observe una pequeña respuesta, no comparable con la gran respuesta y selectividad que se obtendría con un IIP [110, 111].

Ya se ha establecido, que los IIPs son novedosos materiales poliméricos con capacidad de reconocimiento a través de cavidades creadas en el procedimiento de síntesis; sin embargo, en la síntesis de un polímero impreso, el tipo de polimerización, componentes y su relación molar tienen un rol muy importante para obtener capacidad de reconocimiento molecular [112]. En los últimos años, la implementación de polímeros de reconocimiento molecular ha permitido la búsqueda de nuevas técnicas de síntesis que permitan obtener IIPs de gran estabilidad química, buenos rendimientos, morfología homogénea, reutilizables, de bajo costo y con aplicación en varios campos de la ciencia (química, biología e ingeniería) [113, 114].

Algunas de las características principales de los componentes y su selección se mencionan a continuación [115, 116]; y ejemplos de ellos se muestran en la **Figura 8**.

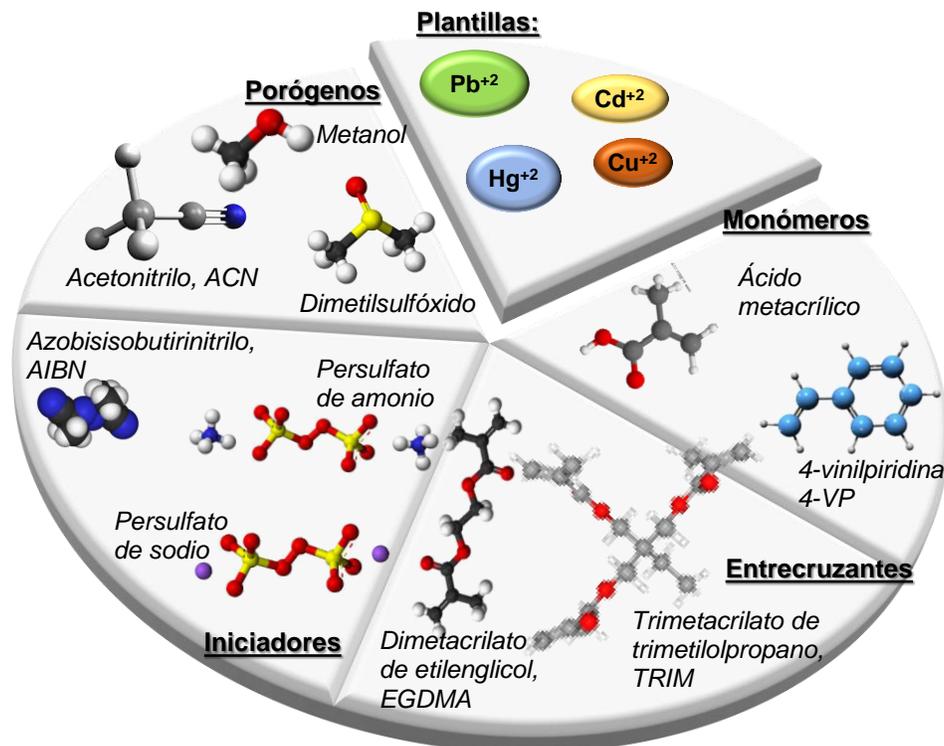


Figura 8 Componentes más comunes de la síntesis de IIPs.

- **Plantilla:** Los iones metálicos de interés, son usualmente utilizados como plantillas en las síntesis de IIPs y en la medida que aumenta su tamaño, menor será la probabilidad de formación de las cavidades debido a impedimentos estéricos respecto a los monómeros.
- **Monómero:** Son seleccionados de acuerdo con su habilidad para interactuar con los grupos funcionales de la plantilla, por lo tanto, deben existir interacciones complementarias con la plantilla para aumentar la afinidad y selectividad de las cavidades.

-
- **Entrecruzante:** Es el responsable tanto de la generación de la matriz tridimensional como estabilizar el complejo monómero-plantilla para un adecuado reconocimiento de la plantilla.
 - **Iniciador:** Este elemento propicia el inicio de síntesis a través de una polimerización radicalaria. Su activación ocurre mediante el uso de radiación electromagnética en el intervalo UV-Vis o por incremento de la temperatura entre 50°C y 60°C.
 - **Porógeno (disolvente):** Debe ser capaz de solubilizar a todos los componentes de la síntesis y tener baja polaridad para evitar interferencia en la formación del complejo monómero-plantilla. Influye sobre la morfología del IIP en la formación de macroporos.

De acuerdo con diversos autores, la relación óptima teórica para sintetizar un IIP con gran rendimiento y alta selectividad, es 1:4:20 de plantilla, monómero (s) y entrecruzante, respectivamente (respecto a la plantilla). Sin embargo, las necesidades de investigación, tiempo, recursos y grupos funcionales de cada componente generalmente rigen su selección y relación molar en la síntesis.

1.6 Electroodos modificados con IIPs para cuantificar iones metálicos.

Los métodos sensibles y selectivos para la detección de metales pesados se han convertido en una prioridad en el monitoreo ambiental, por lo que el uso de los IIPs como modificante de la superficie de un electrodo de trabajo para cuantificar iones metálicos exhibe excelentes características analíticas. Existe una gran cantidad de reportes sobre el uso de IIPs para determinar iones metálicos empleando técnicas electroquímicas, como se indica en la **Tabla 3**. Sin embargo, en cada trabajo es notable el uso de más de un monómero o ligantes en la síntesis, así como modificantes adicionales en la superficie del electrodo empleado para realizar las determinaciones.

Tabla 3 Electrodoos modificados con IIPs para cuantificar metales.

Electrodo modificado, plantilla y monómero (s)	Determinación, muestra y técnica	Características analíticas	Ref.
GCE con IIP, estireno, nafi3n y 8-hidroxiquinona /IIP de ZnCl ₂ , oxina, estireno	Zn(II) en agua potable con SWASV	* Intervalo lineal: (5x10 ⁻⁴ a 0.01) μM * LOD: 5.00 μM * Sensibilidad: no reportada.	[117]
Electrodo de platino con IIP y nafi3n. IIP de Pb(NO ₃) ₂ , acrilamida, CNTs sobre THF.	Pb(II) en agua potable, cosméticos con DPV	* Intervalo lineal: (4.82 a 24.13) μM * LOD: 2x10 ⁻² μM. * Sensibilidad: no reportada.	[118]
GCE con IIP y dimetil fumarato, IIP de Pb(NO ₃) ₂ , 4-VP y 2-(2-aminofenil)-1H-bencimidazol.	Pb(II) en agua natural ya jugo de frutas con DPV	* Intervalo lineal: (4.82x10 ⁻⁴ a 0.38) μM * LOD: 2.41x10 ⁻⁴ μM * Sensibilidad: 7962 μA μM ⁻¹	[119]
Electrodo de oro con IIP de AuNPs, As(III) y o-fenilendiamina.	As(III) en agua con CV	* Intervalo lineal por adici3n estandar: (2.00x10 ⁻⁵ a 9.00x10 ⁻³) μM * LOD: 7.10x10 ⁻⁶ μM * Sensibilidad: 12.466 μA μM ⁻¹	[120]
CPE con IIP de nitrato de mercurio de MAA y 1,5-dipenilcarbazona	Hg(II) en agua potable y orina con DPV	* Intervalo lineal por adici3n estandar: (0.10 a 40) μM * LOD: 0.07 μM * Sensibilidad: 6.36 μA μM ⁻¹	[121]
CPE con MWCNTs, IIP de MeHg con 2-mercaptobenzotiazol y AA.	MeHg en agua con DPASV	* Intervalo lineal: (2.79 a 3.04) μM * LOD: 2.68x10 ⁻³ μM * Sensibilidad: 1.28x10 ⁻³ μA μM ⁻¹	[122]
Electrodo de oro con suero bovino, rGO, AuNPs e IIP electro-polimerizado.	Cu(II) en agua de r3o y de granja con DPV	* Intervalo lineal por adici3n estandar: (1.00x10 ⁻⁴ a 8.00x10 ⁻⁷) μM * LOD: 1.12x10 ⁻⁸ μM * Sensibilidad: 0.01 μA μM ⁻¹	[123]
GCE con rGO e IIP electro-polimerizado con CdCl ₂ , Py y quitosano.	Cd(II) en lechuga, naranja y peras a trav3s de DPV	* Intervalo lineal: (4.45x10 ⁻³ a 0.44) μM * LOD: 2.05x10 ⁻³ μM * Sensibilidad: 5.96x10 ⁻³ μA μM ⁻¹	[124]
Serigrafado con IIP electro-polimerizado con Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O y PAA	Cd(II) en agua potable, de grifo y marina con CV	* Intervalo lineal: (1.00x10 ⁻⁴ a 1.2x10 ⁻²) μM * LOD: 1.70x10 ⁻⁵ μM * Sensibilidad: 1.28 μA log μM ⁻¹	[125]

GCE: electrodo de carb3n vitreo, **IIP:** pol3mero de impresi3n de iones, **SWASV:** voltamperometr3a de onda cuadrada con redisi3n an3dica, **LOD:** l3mite de detecci3n, **DPV:** voltamperometr3a diferencial de pulsos, **CV:** voltamperometr3a c3clica, **CPE:** electrodo de pasta de carbono, **DPASV:** voltamperometr3a diferencial de pulsos con redisi3n an3dica, **Py:** pirrol, **rGO:** 3xido de grafeno reducido, **PAA:** 3cido fenilac3tico, **AuNPs:** nanopart3culas de oro, **MWCNTs:** nanotubos de carbono de pared m3ltiple, **AA:** 3cido acrilico, **MAA:** 3cido metacrilico, **4-VP:** 4-vinilpiridina, **CNTs:** nanotubos de carbono, **THF,** tetrahidrofurano.

Las condiciones de la superficie de un electrodo modificado tienen un efecto significativo en la intensidad de corriente al realizar determinaciones voltamperométricas o amperométricas. Dado que la preparación de la superficie en múltiples ocasiones implica activación, limpieza electroquímica, tratamiento térmico y/o renovaciones exhaustivas sin la certeza de obtener homogeneidad en el proceso, una excelente alternativa es el uso de electrodos de pasta de carbono modificados con IIPs, ya que permiten resolver estas limitaciones a través de una fácil renovación de la superficie de trabajo, mejorando el tiempo de análisis, y permitiendo lograr una superficie homogénea nueva con cavidades de IIPs listas para el reconocimiento de iones metálicos en diversas muestras [126, 127].

1.7 Diseño de experimentos.

La cuantificación oportuna y exacta de metales tóxicos en agua potable o de riego está directamente relacionada con la salud de los consumidores, por lo tanto, es indispensable minimizar el error en el análisis cuantitativo de estos contaminantes. Aunado al desarrollo de nuevos electrodos y metodologías electroquímicas, es imperativo optimizar el método en busca de maximizar o minimizar (según aplique) la señal analítica, a través del estudio de diversas combinaciones de los niveles de las variables que influyen en la señal obtenida; por lo tanto, el diseño de experimentos es una herramienta estadística útil para este propósito [128].

En estos diseños, se realizan cambios sistemáticos y controlados a las variables de interés, para medir su efecto sobre la variable de respuesta, por lo tanto, es fundamental conocer el intervalo en el que afectan el sistema de cuantificación. Dependiendo de las necesidades de optimización y el detalle de esta, se pueden llevar a cabo diseños de experimentos univariados o modelos más robustos multivariados [129, 130].

1.7.1 Diseño univariable

El estudio de una sola variable en diferentes niveles con el objetivo de optimizarla corresponde al diseño más común y sencillo, llamado *univariable*. Al aplicar este diseño en un sistema con varias variables a optimizar, estas serán evaluadas una a la vez manteniendo el resto en un valor constante optimizado o no.

Un método analítico puede ser optimizado en su totalidad a través de este diseño, sin embargo, la inversión de tiempo y recursos no serían viables, aunado a que no se podrían obtener los efectos de interacción entre las variables y la interpretación o toma de decisiones serían erróneas como se muestra en la **Figura 9**, donde la zona de color de mayor intensidad representa la región óptima y los niveles evaluados de las variables se encuentran muy lejos de esta.

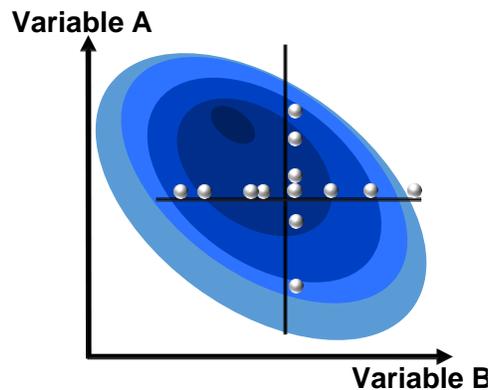


Figura 9 Representación de la interpretación incorrecta en un diseño univariable.

Por otro lado, cuando no se conocen las variables que afectan la respuesta y el nivel en el que influyen sobre la respuesta, el método univariable puede ser usado para establecer el intervalo de valores de dichas variables que pueden ser empleados en un diseño de experimentos robusto, y acercarse más a la región óptima del experimento [131].

1.7.2 Diseño multivariable

Conocido como un conjunto de técnicas o diseños estadístico-matemáticos, los diseños de experimentos multivariados estudian el comportamiento de una señal analítica o variable de respuesta, a través de los niveles de las variables de interés. La combinación de estas variables es determinada a través de una matriz con la que se puede explorar la región a optimizar y definir finalmente la zona optimizada a través de gráficas lineales o de superficie, de una forma más efectiva, con el menor tiempo y recursos posibles [132]. Algunos diseños multivariados son los de Taguchi y superficie de respuesta; que adicionalmente muestran la interacción entre las variables a través del uso de técnicas de regresión múltiple, análisis de varianza y respuesta superficial [133].

1.7.2.1 Taguchi

El diseño de experimentos de primer orden de Taguchi evalúa la robustez de un método mediante un arreglo ortogonal para conocer el efecto individual de las variables a optimizar a dos niveles. Generalmente se identifican como L4, L8, L12, etc., refiriéndose a un arreglo ortogonal de 4, 8 o 12 experimentos. Este diseño no proporciona un análisis matemático, pero es considerado un multivariable porque pueden ser estudiadas más de dos variables al mismo tiempo. El análisis del diseño finalmente proporcionará la combinación de las variables que maximiza la respuesta a través de las gráficas de efectos principales [134, 135].

1.7.2.2 Diseños de superficie de respuesta

El objetivo principal de estos diseños es la creación de modelos matemáticos ajustados a la señal analítica obtenida y su confirmación mediante análisis estadísticos. Inicialmente, es necesario conocer el intervalo de influencia de las variables de interés (el enfoque univariable es útil para este fin); posteriormente se selecciona el diseño de

superficie de respuesta que se ajuste a las necesidades de experimentación para obtener la matriz de combinaciones de las variables a optimizar y realizar los experimentos correspondientes para obtener la variable de respuesta. Se confirma el ajuste del modelo a través de las interacciones entre variables, ecuación y gráfica de superficie, y análisis de varianzas, ya que la optimización en más de dos niveles de las variables permite el modelado de la superficie de respuesta a través de términos cuadráticos que muestran la curvatura en las gráficas de superficies [136, 137].

Estos diseños implican el desarrollo de un gran número de experimentos para encontrar la región óptima de las variables, pero la información que proporcionan es valiosa para el entendimiento del sistema convirtiéndolos en una excelente herramienta para la optimización de metodologías.

1.7.2.2.1 Diseño Box-Behnken, BBD

Uno de los diseños de superficie ampliamente utilizados por toda la información que proporcionan, la exactitud de predicción de la región óptima y la menor cantidad de experimentos realizados respecto a otros es el Diseño Box-Behnken (BBD) [138]. Como se muestra en la **Figura 10**, el BBD es un tipo de diseño rotatorio factorial fraccionado que permite la combinación de tres niveles de cada variable: los extremos y el centro, ambos equidistantes a un punto central; el análisis del diseño proporciona un modelo matemático completo con términos lineales, de interacción y cuadráticos, con el que se puede predecir la respuesta y las condiciones optimizadas para esta [139]. Los experimentos a realizar dependen de la cantidad de variables a optimizar, sin embargo, su arreglo lo convierte en uno de los diseños más eficientes utilizados en diversas áreas, ya que tiene la capacidad de evitar condiciones experimentales extremas [140].

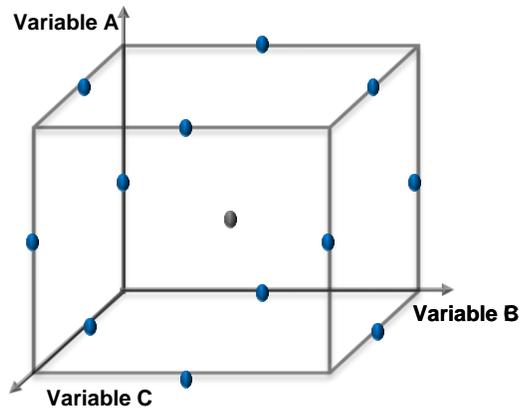


Figura 10 Coordenadas de los experimentos del BBD con tres factores (variables).

1.7.2.2.2 Diseño de mezclas

El diseño de experimentos de mezclas disminuye la cantidad de experimentos a realizar para encontrar la interacción óptima de las variables, y es ampliamente utilizado en sistemas donde la combinación de factores debe cumplir un valor específico y el tiempo de obtención de un resultado o producto es demasiado largo [141]. La proporción de las variables en las mezclas no varía de forma independiente como en otros diseños (las proporciones influyen directamente en la variable de respuesta); por lo tanto, la suma de las proporciones o niveles codificados de las variables de cada experimento siempre es igual a 1 o el 100% de la mezcla; de aquí que el valor de 1 y 0 en un diseño con dos variables, significa el producto final solo estará compuesto por un componente. Al ser un diseño de superficie de respuesta, la mezcla óptima se encontrará a través de ecuación y gráfica de superficie de respuesta [142, 143]. Existen diversos diseños de experimentos de mezclas y uno frecuentemente utilizado es el simplex centroide.

1.7.2.2.3 Simplex centroide

El diseño de mezclas más común es el simplex centroide, con un arreglo experimental que involucra los vértices, borde y en ocasiones el centro del centroide como

se muestra en la **Figura 11**. Los vértices representan los componentes o variables puros en la mezcla, en el centro de cada borde se encuentra la combinación binaria de las variables correspondientes y en el centro global se analiza la mezcla de todos los componentes. En este diseño se refleja la ventaja de los diseños de mezclas, ideales para procesos en los que la obtención de un experimento es demasiado larga, debido a la pequeña cantidad de experimentos a realizar para determinar la composición óptima [144, 145].

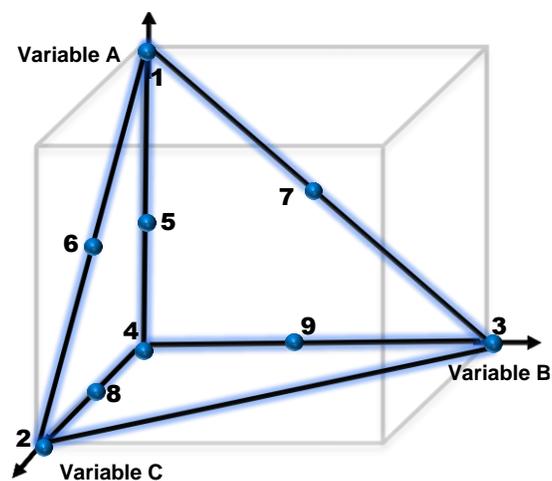


Figura 11 Representación del diseño Simplex Centroidal con factores A, B y C.

1.8 Validación de métodos analíticos

Las nuevas metodologías analíticas siempre deben ser sometidas a un proceso de validación o caracterización analítica, con el fin de demostrar que son adecuadas y aceptables para su uso. Esto se logra a través de la obtención de sus características analíticas, comprobando que estas se encuentran dentro de los criterios de aceptación establecidos, es decir, ser lo suficientemente confiables [146].

El enfoque clásico de validación únicamente a través de la comparación contra un material de referencia certificado no es suficiente para evaluar la competitividad de las

nuevas metodologías respecto a las tradicionales en términos de precisión, exactitud y selectividad [147]. Por tanto, diversas organizaciones internacionales como Eurachem e ISO/IEC, han desarrollado normas y guías que describen el procedimiento para realizar la validación considerando las características de desempeño o parámetros analíticos de un método, como son: intervalo de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación, sesgo, repetibilidad, reproducibilidad y selectividad [148].

1.8.1 Parámetros analíticos

El desarrollo de un método y su validación están íntimamente relacionados, ya que algunas de las características como linealidad, precisión, exactitud y robustez se evalúan durante el desarrollo de este, e incluso un conjunto de experimentos puede proporcionar información sobre diversas características del desempeño. Por ello, es importante realizar un plan de validación que refleje el nivel de confianza, orden y extensión de la evaluación de cada parámetro analítico del método con el objetivo de generar un equilibrio entre el tiempo y recursos invertidos en la validación [149].

1.8.1.1 Linealidad

El intervalo entre el límite de cuantificación y la concentración superior analizada antes de la presencia de cualquier curvatura de la línea de tendencia (ya que esto sugiere falta de ajuste por un efecto no lineal) representan el intervalo lineal del método analítico. Ambos extremos del intervalo se verán afectados por factores como el alcance del instrumento, la muestra empleada y la saturación de la señal analítica, por lo que la selección de los puntos de la curva de calibración juega un papel muy importante para evitar la incorrecta cuantificación del analito [150].

Aunque no se puede probar completamente la linealidad de un método analítico, es posible concluir si es adecuado o no para modelar los datos de cuantificación a través del

coeficiente de correlación (R^2) y desviación estándar de cada concentración analizada (residuales de la curva de calibración). La curva de calibración se realiza con al menos seis diferentes concentraciones de estándares del analito para después graficarlas contra la señal analítica registrada eliminando los valores atípicos que visualmente no se ajustan en la tendencia lineal; finalmente se realizan el análisis de mínimos cuadrados, el cálculo de los residuales y se obtiene la ecuación de la recta (**Ecuación 1**). Debido a que el valor de R^2 y los residuales se relacionan con la incertidumbre de calibración, a mayor valor de R^2 (cercano a 1) y pequeños valores de los residuales (cercanos a cero), menor será la incertidumbre y la relación concentración-sígnal analítica será más proporcional [151].

$$y = mx + b$$

Ecuación 1 Ecuación de la recta.

Donde m , corresponde a la pendiente de la recta, x es la concentración esperada y b , la ordenada al origen.

1.8.1.2 Sensibilidad

La sensibilidad analítica es definida como el gradiente de la curva de respuesta del instrumento, es decir, la variación en la señal analítica correspondiente a un cambio en la concentración del analito. Por lo tanto, un método se considerará sensible si de acuerdo con las señales obtenidas es posible identificar a dos concentraciones cercanas una de otra dentro del intervalo lineal [152].

Aunque generalmente no se evalúa a través de una prueba estadística, es posible conocer la sensibilidad de un método por las características de este, como en las mediciones potenciométricas con comportamiento Nernstiano donde se espera que la señal varíe 59 mV/pH; o la pendiente de la recta del intervalo lineal en un método donde la concentración del analito se determina directamente de una curva de calibración, por lo

tanto, la pendiente, en unidades de señal/concentración ha sido reconocida como la sensibilidad del método [153].

1.8.1.3 Límite de detección, LOD.

Es la mínima cantidad del analito presente en la muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones establecidas en la metodología desarrollada, con un nivel de confianza de 95% establecido por convención y relacionado con el valor 3 de la **Ecuación 2**, del cálculo del LOD [154].

$$\text{LOD} = \frac{3 S_{y/x}}{m} \qquad \text{Ecuación 2 LOD}$$

Donde $S_{y/x}$, corresponde la desviación estándar de los puntos de la curva de calibración y m , la pendiente de la recta lineal.

1.8.1.4 Límite de cuantificación, LOQ

El límite de cuantificación (LOQ), representa la mínima concentración del analito que puede ser determinada de forma aceptable en términos de repetibilidad y exactitud, la **Ecuación 3** se usa para estimar el LOQ. Se espera que la desviación estándar de los residuales sea constante a concentraciones bajas, por lo tanto, en el cálculo del LOQ se utiliza el mismo valor de $S_{y/x}$, pero con un factor de multiplicador de 10, correspondiente al 10% de desviación estándar esperada de las mediciones [155].

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_{y/x}}{m} \qquad \text{Ecuación 3 LOQ}$$

Donde $S_{y/x}$, corresponde la desviación estándar de los puntos de la curva de calibración y m , la pendiente de la recta lineal.

Los cálculos de LOD y LOQ, deberán realizarse después de establecer la linealidad del método, ya que en ambas ecuaciones (**Ecuación 2** y **Ecuación 3**) es necesario el uso de algunas variables obtenidas del análisis de mínimos cuadrados.

1.8.1.5 Veracidad: sesgo y recuperación

La veracidad es una característica importante para asegurar que las mediciones del método serán exactas, ya que al comparar la concentración obtenida de una muestra adicionada, material o estándar de referencia respecto a su valor esperado, la proximidad de ambas concentraciones reflejará la capacidad del método para determinar cierta concentración del analito con exactitud. Existen dos enfoques principales para determinar la exactitud de una metodología: a través de la determinación absoluta del sesgo mediante la **Ecuación 4**, o el porcentaje de recuperación obtenido con la **Ecuación 5**.

$$\text{Sesgo} = \bar{X} - x_{\text{ref}}$$

Ecuación 4 Sesgo

$$\text{Porcentaje de recuperación, \%R} = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} * 100$$

Ecuación 5 Recuperación

En ambos casos, \bar{x} corresponde a la concentración obtenida de la muestra o material de referencia, y x_{ref} , es la concentración esperada de dicho material [156]. Las pruebas de sesgo y recuperación se pueden realizar con diferentes concentraciones del material de referencia o analito.

1.8.1.6 Precisión: repetibilidad y precisión intermedia.

La precisión del método es fundamental para obtener mediciones confiables, está relacionada con la proximidad de los resultados de una muestra (material de referencia o reactivo de pureza conocida) entre sí bajo condiciones de repetibilidad o precisión intermedia. En la prueba de repetibilidad se realizan determinaciones repetidas del analito, bajo las mismas condiciones experimentales, muestra y/o condiciones ambientales en un corto periodo. Por otro lado, la precisión intermedia frecuentemente proporciona mayor variación que en la repetibilidad ya que las mediciones se realizan bajo las mismas condiciones de muestra y/o condiciones ambientales, pero con diferentes equipos o electrodos en periodos prolongados [157]. Para comprobar que ambas pruebas son independientes de la concentración verdadera del analito en la muestra, usualmente se analizan al menos dos diferentes concentraciones del analito dentro de la linealidad del método y cercano a lo que se pretende encontrar en una muestra real, evaluando los resultados a través de un criterio de aceptación de desviación estándar relativa desde 5% hasta 10% [158].

1.8.1.7 Selectividad

Una metodología ideal para la cuantificación de metales pesados sería aquella que pueda realizarse in situ en una muestra sin tratamiento previo, es decir, que el método sea altamente selectivo de forma que la señal analítica no sea influenciada de ninguna forma por el efecto de la matriz. La selectividad es una característica del desempeño de un método, definida como el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar, y se evalúa a través del sesgo relativo o porcentaje de recuperación de la señal analítica del analito (**Ecuación 4 y 5**) que deberá permanecer sin alteraciones en presencia de diversas concentraciones de interferentes potenciales [159].

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

CAPÍTULO II: Objetivos

De acuerdo con lo comentado anteriormente, la necesidad de contar con técnicas que permitan la determinación rápida, selectiva, de bajo costo y oportuna del contenido de metales pesados en cuerpo hídricos, aunado a la evolución de la tecnología de impresión molecular y de las herramientas quimiométricas, permitió plantear los siguientes objetivos para la investigación.

2.1 Objetivo general

Establecer metodologías voltamperométricas basadas en el uso de electrodos de pasta de carbono modificados con polímeros impresos de iones para la cuantificación confiable de arsénico, mercurio y plomo en muestras de agua potable.

2.2 Objetivos específicos

Diseñar, sintetizar y caracterizar polímeros de impresión de iones (IIPs) de elevada selectividad a plomo, mercurio y arsénico.

Evaluar las condiciones óptimas del sistema electroquímico mediante DPASV en la determinación de plomo, mercurio y arsénico.

Validar y aplicar la metodología analítica desarrollada en el análisis de plomo, mercurio y arsénico en muestras de agua potable.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III: Metodología experimental.

3.1 Resumen

La cuantificación mediante DPASV se realizó utilizando electrodos de pasta de carbono modificados con IIPs. Dicho estudio se desarrolló a través de metodologías individuales para cada metal: Pb(II), Hg(II) y As(III), las cuales consisten en cinco etapas:

- 1) Síntesis y optimización de IIP,
- 2) Optimización del proceso de carga y de la deposición electroquímica,
- 3) Evaluación de la DPASV,
- 4) Caracterización analítica y,
- 5) Análisis de muestras reales.

Debido a que el desarrollo experimental para cada metal presenta similitudes, a continuación se describe la metodología general del desarrollo en este capítulo.

Inicialmente, se realizó la síntesis para obtener el IIP para cada metal de acuerdo con un procedimiento de síntesis previamente desarrollado por el grupo de trabajo [160], con algunas modificaciones; esta sección destaca el uso de herramientas quimiométricas en la etapa de optimización de la síntesis a través de los diseños de experimentos simplex centroide para Pb(II) y As(III) y univariable para Hg(II), permitiendo una máxima interacción analito-IIP. Por otro lado, el sistema electroquímico fue investigado en un sistema univariable donde se evaluaron los factores críticos en el proceso de carga como: tiempo de carga, velocidad de agitación, pH, potencial y tiempo de la deposición electroquímica, ya que estos influyen sobre la intensidad de corriente asociada a cada metal. Los parámetros propios de la DPASV fueron optimizados mediante un diseño de Box-Behnken para la determinación de Hg(II) y mediante un diseño de experimentos de Taguchi para la determinación de As(III), con el objetivo de encontrar la combinación que permitiera maximizar la intensidad de corriente, es decir, con mayor capacidad de retención del

respectivo metal. En la siguiente sección, se muestran los estadísticos utilizados en la caracterización analítica para obtener el límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud, recuperación, sensibilidad y selectividad.

Finalmente, se detalla el procedimiento de pretratamiento de las muestras de agua de cuerpos hídricos complejos utilizadas para determinar cada uno de los metales.

3.2 Materiales y equipos

3.2.1 Equipos

Todas las técnicas electroquímicas se realizaron en un potenciostato Metrohm PGASTAT302N y el software Nova®. Las mediciones de pH fueron ejecutadas en un potenciómetro marca Hanna utilizando un electrodo de vidrio. Los análisis electroforéticos se realizaron en un equipo Beckman Coulter P/ACE 5500, con detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 215 nm; los datos obtenidos fueron adquiridos y analizados mediante el software P/ACE MDQ versión 2.3. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron con un espectrofotómetro Perkin Elmer System 2000 FTIR (espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier) en un intervalo de (4000-400) cm^{-1} en película y pastilla de KBr (Bromuro de potasio).

3.2.2 Materiales y reactivos

- Plantillas: sulfato de plomo, (PbSO_4), nitrato de mercurio ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, >99.90%), óxido de arsénico (As_2O_3).
- Monómeros: 4-vinil piridina (4-VP, 95.00%), ácido metacrílico, (MAA, 99.00%), pirrol (Py, $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$, 98.00%), 2-metil tiofeno (2-MT, $\text{C}_4\text{H}_4\text{S}$, 98.00%), (el pirrol y 2-metil tiofeno, fueron destilados en una atmósfera de nitrógeno antes de cada polimerización para asegurar la presencia del monómero).

-
- Entrecruzante: dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA, 98.00%).
 - Iniciador: persulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\geq 98.00\%$).
 - Soluciones patrón de Pb(II), Hg(II), y As(III).
 - Ácido clorhídrico 0.10 M y 3.00 M (HCl, $>37.00\%$) como electrolito soporte; buffers de fosfatos, acetatos y Britton Robinson, ácido fosfórico (H_3PO_4 , $>85.00\%$), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 , $>99.00\%$), ácido bórico (H_3BO_3 , $>99.50\%$), acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, $>99.00\%$), ferricianuro de potasio(III) (99.00%). Disolventes: metanol (CH_3OH , $\geq 99.90\%$) y etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 96.00%).
 - Electrodo de pasta de carbono: polvo de grafito ($<20 \mu\text{m}$, $>99.00\%$), aceite de parafina.
 - Electroforesis: electrolito soporte, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.01 M, buffer de boratos pH 9.00, e hidróxido de sodio (NaOH) 0.10 M y 1.00 M.

Los reactivos mencionados fueron grado analítico marca Sigma Aldrich® excepto el ácido nítrico (HNO_3 , 70.00%) de Karal®, ácido acético (CH_3COOH , 99.70%), bromuro de potasio (KBr), EDTA y benzoato de sodio de J. T Baker®, y agua desionizada (18.20 mΩ/cm) obtenida en un equipo desionizador marca MilliPore®.

3.2.3 Sistema electroquímico.

Los experimentos se realizaron en una celda electroquímica de tres electrodos compuesta por un CPE enriquecido con IIP (CPE-IIP) como electrodo de trabajo (5.00 mm de diámetro y 30.00 mm de longitud), un electrodo de referencia de Ag/AgCl saturado (125.00 mm de longitud con sistema de doble unión marca Metrohm) y contraelectrodo de barra de grafito de alta pureza ($>99.00\%$, 5.00 mm de diámetro y 50.00 mm de longitud).

3.3 Metodología experimental

Los experimentos se realizaron por triplicado para asegurar la precisión de las determinaciones con valores de %RSD<10%.

3.3.1 Síntesis de IIP

Se realizó la síntesis de IIPs a través de una polimerización por precipitación por radicales libres, realizando modificaciones al método desarrollado por el grupo de trabajo [160]. De acuerdo con las **Figura 12, 13 y 14** para Pb(II), Hg(II) y As(III), en la primera etapa (**Figura 12a, 13a y 14a**) se llevó a cabo la prepolimerización en 20 mL de metanol durante 2 h para formar el complejo monómero-plantilla para cada metal, de acuerdo con la relación molar indicada en la **Tabla 4**.

Tabla 4 Proporciones iniciales de la síntesis de IIPs de cada metal.

Metal-IIP	Plantilla mmol	Monómero (s) mmol	Entrecruzante mmol	Iniciador mmol	Relación molar en el IIP ***
Pb(II)-IIP	1.00	2.00 : 2.00 (MAA : 4-VP)*	20.00	1.00	1:4:20
Hg(II)-IIP	1.00	4.00 Py	30.00	50.00	1:4:30
As(III)-IIP	1.00	4.00 : 2.00 (2MT : MAA)**	30.00	50.00	1:6:30

Pb(II)-IIP: polímero impreso sintetizado empleado Pb(II) como plantilla, **4-VP:** 4-vinilpiridina, **MAA:** ácido metacrílico, **Hg(II)-IIP:** polímero impreso sintetizado empleado Hg(II) como plantilla, **Py:** pirrol, **As(III)-IIP:** polímero impreso sintetizado empleado As(III) como plantilla, **2MT:** 2-Metil Tiofeno, * **Relación de monómeros MAA:4VP**, donde la suma debe ser 4 mmol. ** **Relación de monómeros 2MT:MAA**, donde la suma debe ser 6 mmol. *** **Relación molar en el IIP**, correspondiente a la plantilla, monómero (s) y entrecruzante, respecto a la plantilla.

En la siguiente etapa (**Figura 12b, 13b y 14b**), fue adicionado EGDMA como entrecruzante, persulfato de sodio como iniciador y nitrógeno de ultra alta pureza durante 10 minutos para eliminar el oxígeno y evitar ralentizar la reacción. Posteriormente, se llevó a cabo la polimerización radicalaria en un baño de aceite a 60°C con agitación constante

durante 16 h. Transcurrido el tiempo de reacción, en repetidas ocasiones el IIP se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y se lavó con diferentes disolventes como etanol, HNO_3 1.00 M en metanol, HNO_3 2.00 M y agua desionizada hasta obtener pH neutro, utilizando el mismo procedimiento de centrifugación.

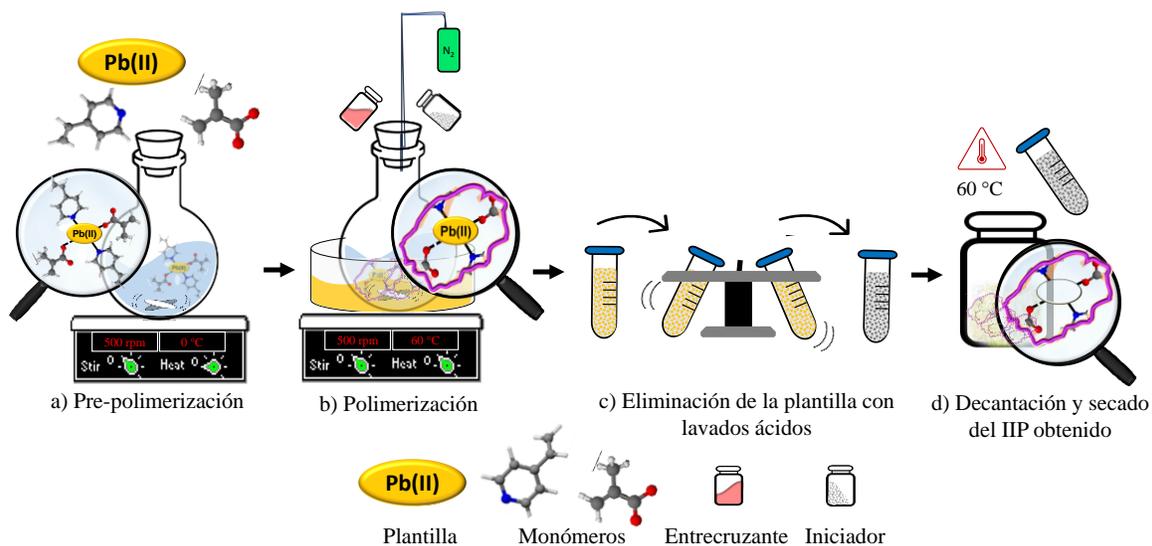


Figura 12 Síntesis de Pb(II)-IIP mediante polimerización radicalaria.

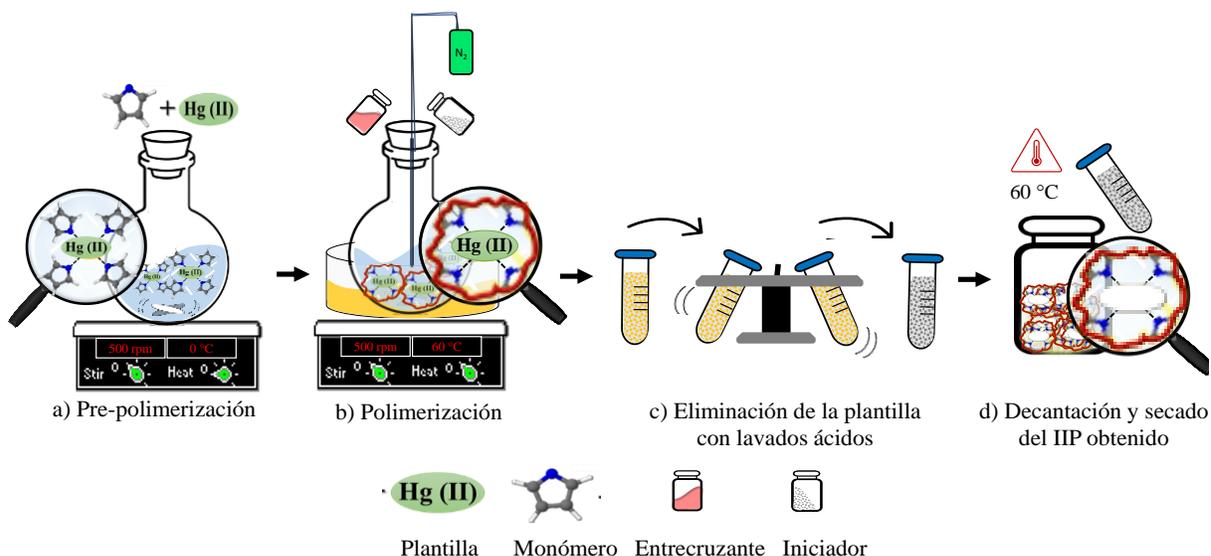


Figura 13 Síntesis de Hg(II)-IIP mediante polimerización radicalaria.

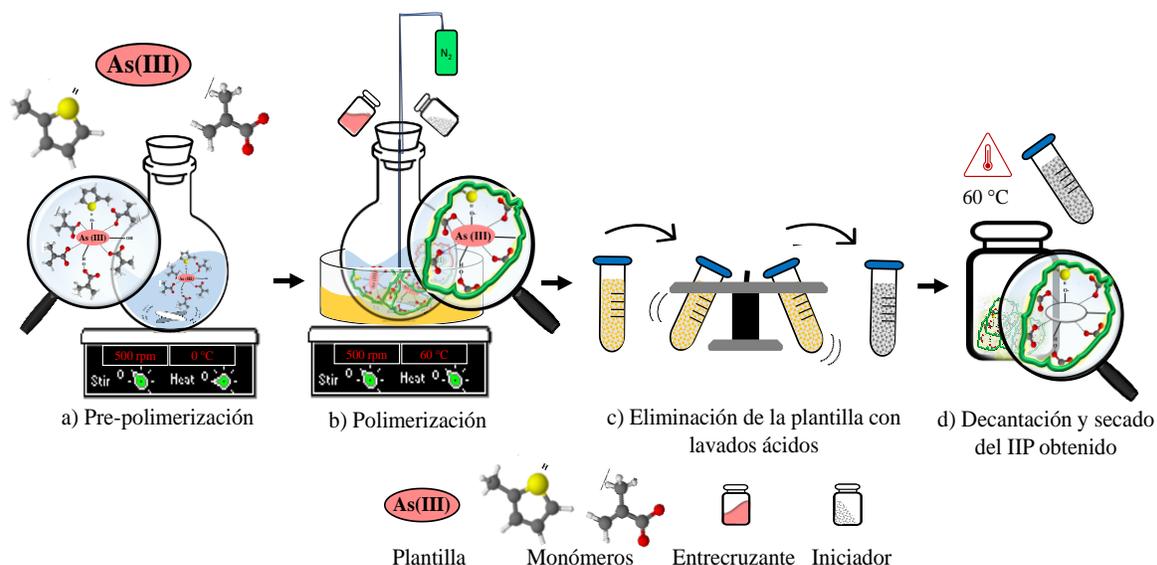


Figura 14 Síntesis de As(III)-IIP mediante polimerización radicalaria.

Finalmente, la serie de lavados permitió la eliminación de la plantilla de la matriz polimérica, liberando las cavidades de reconocimiento selectivas (**Figura 12c, 13c y 14c**). Cada polímero obtenido se secó a 60°C durante 12 h, obteniendo un polvo de color blanco en el Pb(II)-IIP y As(III)-IIP, y de color beige para el Hg(II)-IIP. Adicionalmente, se sintetizó un NIP para cada relación molar descrita, considerando el mismo procedimiento de síntesis del IIP sin la adición de plantilla.

3.3.2 Optimización de la síntesis de IIPs

Para determinar la combinación óptima de la síntesis que maximice la retención de cada metal, se realizó la evaluación de tres principales variables: cantidad de plantilla, monómero funcional y agente entrecruzante, con el cual se establece la interacción del monómero con la plantilla debido a la influencia directa de ambos en la formación del pre-complejo; mientras que la cantidad de entrecruzante, propiciará la formación de la matriz polimérica alrededor del complejo monómero-plantilla, y es el responsable de la estabilidad de las cavidades de reconocimiento selectivo hacia cada metal. La variable de respuesta

utilizada en la optimización Pb(II)-IIP, fue el porcentaje de retención monitoreado a través de electroforesis capilar; mientras que para el Hg(II)-IIP y el As(III)-IIP, se utilizó la intensidad del pico de corriente anódica mediante DPASV, asociada a cada metal.

3.3.2.1 Diseño Simplex Centroide para optimizar los IIPs de Pb(II) y As(III).

La optimización de las síntesis de Pb(II)-IIP y As(III)-IIP se realizó a través del diseño de mezclas simplex centroide, las diez síntesis realizadas en diferentes combinaciones codificadas desde 0 hasta 1 de la plantilla (variable A), relación de monómeros (variable B) y entrecruzante (variable C) se muestran en la **Figura 15**.

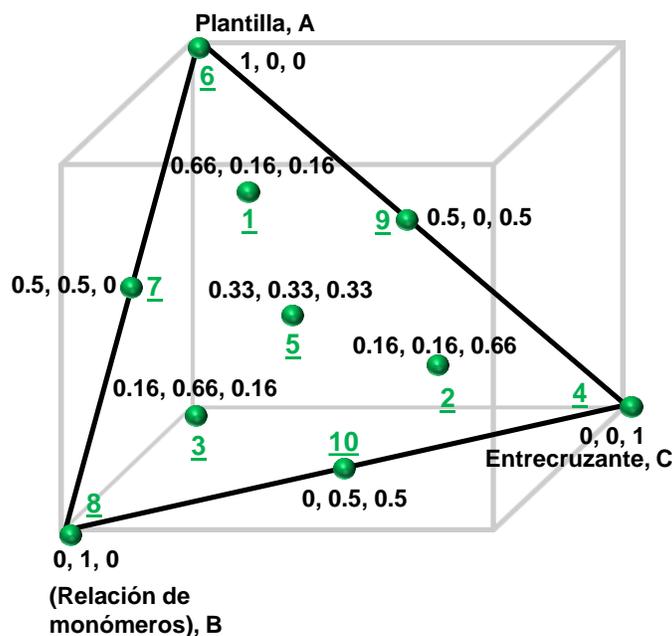


Figura 15 Diseño simplex centroide de la síntesis de IIPs de Pb(II) y As(III). Cada combinación o punto está conformado por cierta cantidad de plantilla, monómero (s) y entrecruzante.

La **Tabla 5**, muestra las combinaciones de las variables de la síntesis del Pb(II)-IIP, donde la evaluación del efecto de la cantidad de plantilla se realizó desde 0.50 mmol hasta

1.00 mmol, el efecto de la interacción entre los monómeros MAA y 4-VP manteniendo una suma 4 mmol entre ambos, y la cantidad de entrecruzante de 10.00 mmol hasta 40.00 mmol.

Tabla 5 Matriz de experimentos del diseño simplex centroide para la optimización del Pb(II)-IIP.

No.	(A) Plantilla / mmol	(B) MAA : 4-VP* / mmol	(C) Entrecruzante / mmol	Relación molar en el IIP**
1	0.83	(0.67 : 3.33)	15	(1:5:18)
2	0.58	(0.67 : 3.33)	30	(1:7:52)
3	0.58	(2.67 : 1.33)	15	(1:7:26)
4	0.50	(0.00 : 4.00)	40	(1:8:80)
5	0.66	(1.33 : 2.67)	20	(1:6:30)
6	1.00	(0.00 : 4.00)	10	(1:4:10)
7	0.75	(2.00 : 2.00)	10	(1:5:13)
8	0.50	(4.00 : 0.00)	10	(1:8:20)
9	0.75	(0.00 : 4.00)	25	(1:5:33)
10	0.50	(2.00 : 2.00)	25	(1:8:50)

MAA: ácido metacrílico, 4-VP: 4-piridina. *Relación de monómeros MAA:4-VP, donde la suma debe ser 4 mmol, ** Relación molar en el IIP, correspondiente a la plantilla, relación de monómeros y entrecruzante, respecto a la plantilla.

La variable de respuesta en la optimización del Pb-IIP fue el porcentaje de retención obtenido de acuerdo con el procedimiento de dispersión de la **Figura 16** y determinación electroforética desarrollada por el grupo de trabajo, a través de la formación del complejo Pb-EDTA. Las determinaciones se realizaron con 10 μ M de Pb.

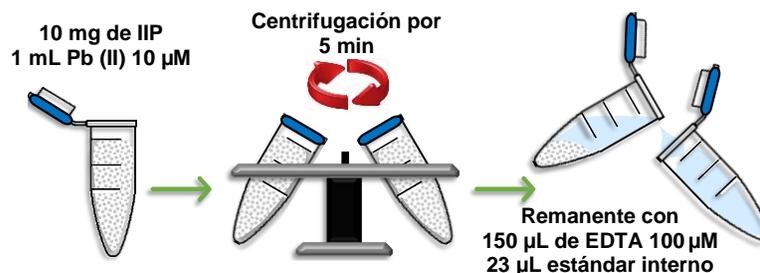


Figura 16 Método de dispersión para la formación del complejo Pb-EDTA

En cuanto al As(III)-IIP, la **Tabla 6** muestra las diez síntesis realizadas en diferentes intervalos de plantilla (0.50 mmol a 2.50 mmol), relación molar de 2-MT y MAA (1.00 mmol a 6 mmol) y entrecruzante (10.00 mmol a 50.00 mmol). La variable de respuesta empleada en este diseño fue la intensidad de corriente del pico anódico correspondiente a As(III).

Tabla 6 Matriz del diseño simplex centroide para la optimización de As(III)-IIP.

No.	(A) Plantilla / mmol	(B) 2-MT : MAA* / mmol	(C) Entrecruzante / mmol	Relación molar en el IIP**
1	0.83	(3.67 : 2.33)	16.66	(1:7:20)
2	1.50	(3.00 : 3.00)	10.00	(1:4:7)
3	1.50	(1.00 : 5.00)	30.00	(1:4:20)
4	0.50	(1.00 : 5.00)	50.00	(1:12:100)
5	1.83	(1.67 : 4.33)	16.66	(1:3:9)
6	1.16	(2.33 : 3.67)	23.30	(1:5:20)
7	2.50	(1.00 : 5.00)	10.00	(1:3:4)
8	0.83	(1.67 : 4.33)	36.60	(1:7:44)
9	0.50	(3.00 : 3.00)	30.00	(1:12:60)
10	0.50	(5.00 : 1.00)	10.00	(1:12:20)

2-MT: 2-metil tiofeno, **MAA:** ácido metacrílico. * **Relación de monómeros 2-MT:MAA**, donde la suma debe ser 4 mmol, ** **Relación molar en el IIP**, correspondiente a la plantilla, relación de monómeros y entrecruzante, respecto a la plantilla.

3.3.2.2 Método univariable en la optimización del IIP de Hg(II).

La propuesta de síntesis del Hg(II)-IIP consistió en el uso de pirrol como único monómero funcional, esta propuesta es novedosa pues no se había reportado antes en la literatura. Las variables se evaluaron de forma univariable (una a la vez hasta encontrar el nivel óptimo), a través de la intensidad de pico de corriente anódica mediante DPASV. La evaluación a cuatro niveles se realizó en los siguientes intervalos: plantilla (0.50 mmol a 2.00 mmol), monómero (5 mmol a 20 mmol) y entrecruzante (10 mmol a 40 mmol), como se indica en la **Tabla 7**.

Tabla 7 Matriz de experimentos univariados para la optimización de Hg(II)-IIP.

Variable optimizada	No.	Plantilla mmol	Monómero, mmol	Entrecruzante mmol	Relación molar en el IIP*
Monómero	1	1.00	5.00	20.00	(1:5:20)
	2	1.00	10.00	20.00	(1:10:20)
	3	1.00	15.00	20.00	(1:15:20)
	4	1.00	20.00	20.00	(1:20:20)
Entrecruzante	5	1.00	10.00	10.00	(1:10:10)
	6	1.00	10.00	20.00	(1:10:20)
	7	1.00	10.00	30.00	(1:10:30)
	8	1.00	10.00	40.00	(1:10:40)
Plantilla	9	0.50	10.00	30.00	(1:20:60)
	10	1.00	10.00	30.00	(1:10:30)
	11	1.50	10.00	30.00	(1:7:20)
	12	2.00	10.00	30.00	(1:5:15)

* Relación molar en el IIP, correspondiente a la plantilla, monómero y entrecruzante, respecto a la plantilla.

3.3.3 Elaboración del CPE-IIP

En la evaluación de la respuesta electroquímica de todos los experimentos, se utilizó un electrodo de pasta de carbono modificado con IIP (CPE-IIP), un CPE-NIP y un CPE sin modificar, para fines comparativos. La preparación del electrodo modificado para cada metal (**Figura 17**) consistió en mezclar de forma homogénea cierto porcentaje de IIP con polvo de grafito (hasta tener una masa de 0.30 g) y 0.13 g de aceite de parafina.

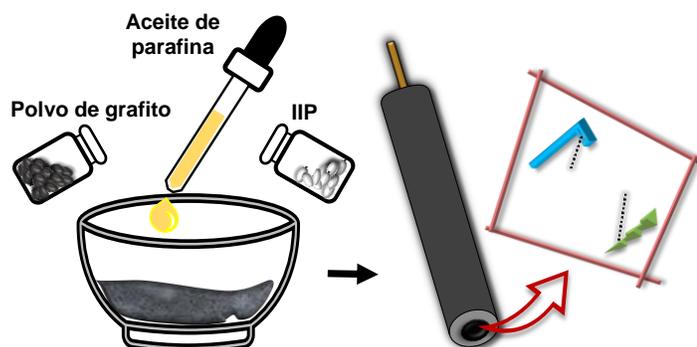


Figura 17 Elaboración del electrodo de pasta de carbono modificado con IIP.

La pasta resultante se compactó en un tubo de plástico (0.50 mm de diámetro y 25.00 mm de profundidad) colocando en uno de los extremos un contacto eléctrico que se conecta al potenciostato, mientras que la pasta expuesta en el otro extremo (superficie del electrodo) se renovó y homogeneizó mediante un proceso de pulido antes de cada experimento hasta que no se observaron porosidades.

3.3.4 Procedimiento electroquímico

La metodología para la determinación de cada uno de los metales se llevó a cabo en tres etapas: carga, deposición electroquímica y redisolución anódica.

Para realizar el proceso de carga, la superficie expuesta y pulida del CPE-IIP permaneció sumergida en el buffer correspondiente de acuerdo con pH del metal de interés (**Figura 18a**). El tiempo, velocidad de agitación y pH del medio juegan un papel crucial en proceso de carga para evitar efectos de convección, protonación de los grupos funcionales del IIP y en la retención del metal en las cavidades de reconocimiento del IIP como se muestra en la **Figura 18b**). Al término del tiempo de carga, el electrodo es lavado con agua desionizada y colocado en la celda electroquímica con 10 mL de electrolito soporte (**Figura 18c**). En la etapa de electrodeposición, se impuso un potencial de deposición negativo que permitió la completa reducción del metal de interés retenido en el IIP, sin provocar la formación de H₂. Finalmente, se llevó a cabo la redisolución anódica a través del barrido de potencial de la voltamperometría diferencial de pulso. La altura del pico de corriente anódica alrededor de -0.60 V para Pb(II) y 0.00 V para Hg(II) y As(III), es considerada la señal analítica en términos de lap.

Las mediciones en ausencia de iones metálicos se realizaron sumergiendo el electrodo previamente pulido en la celda electroquímica con 10 mL del electrolito soporte; posteriormente se realizó la etapa de electrodeposición y redisolución anódica descritos anteriormente.

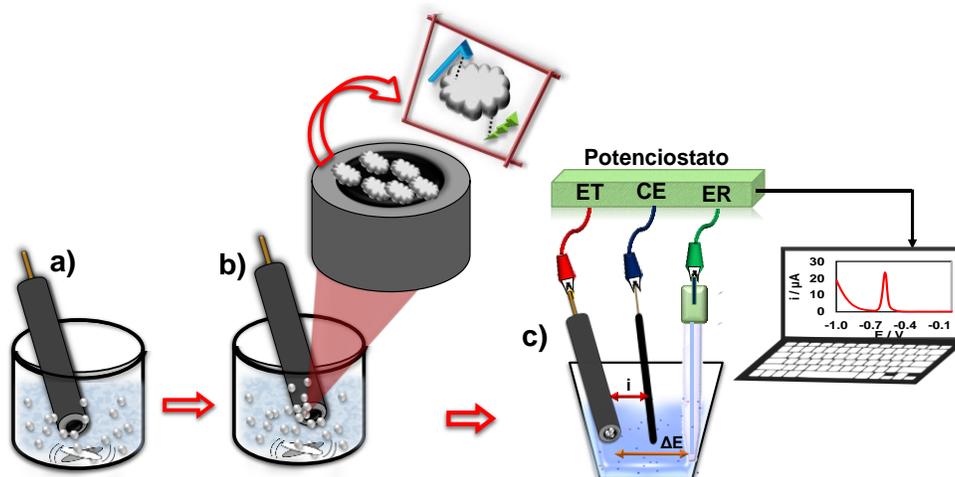


Figura 18 Metodología de la determinación de metales con un CPE-IIP: a) proceso de carga, b) analito retenido en las cavidades del IIP, y c) celda electroquímica.

Las condiciones optimizadas de la metodología para el análisis de cada metal se describen en la **Tabla 8**.

Tabla 8 Procedimiento optimizado para determinar metales mediante DPASV.

Metal	Electrolito soporte	Proceso de carga	Deposición electroquímica	Redisolución anódica		
				Barrido de potencial / V	Parámetros de la DPV Paso y Amplitud / V	Ancho y duración / s
Pb(II)	HCl 0.10 M	Buffer de acetatos pH 4.50 y Pb(II)	-1.10 V por 50 s	-0.80 a 0.00	0.01 / 0.10	0.01 / 0.10
Hg(II)	HCl 0.10 M	Buffer de acetatos pH 4.00 y Hg(II)	-1.20 V por 60 s	-0.20 a 0.20	0.01 / 0.15	0.005 / 0.14
As(III)	HCl 3.00 M	Buffer de fosfatos pH 11.00 y As(III)	-0.40 V por 60 s	-0.20 a 0.40	0.015 / 0.15	0.0096 / 0.05

DPV: voltamperometría diferencial de pulso.

3.3.5 Evaluación de la retención del CPE-IIP, CPE-NIP y CPE.

Se evaluó la capacidad del Pb-IIP, Hg-IIP y As-IIP para retener al metal de interés usando el CPE-IIP, CPE-NIP y CPE sin modificar. Cada electrodo fue sometido al

procedimiento electroquímico mencionado anteriormente, pero en condiciones iniciales no optimizadas en ausencia y presencia de los iones metálicos para determinar la capacidad de retención del CPE-IIP respecto al CPE-NIP y CPE. Para esto, se emplearon concentraciones 100 μM , 10 μM y 50 nM de Pb(II), Hg(II) y As(III), respectivamente de forma individual con electrodos modificados con 10% de IIP.

3.3.6 Optimización de la metodología electroquímica.

Una vez comprobada la capacidad de retención del IIP respecto al NIP y CPE, se realizó la optimización de toda la metodología presentada anteriormente en la **Tabla 8** con el fin de maximizar la Iap asociada a cada metal y permitir la determinación de trazas y ultra trazas de cada uno. Las variables y niveles optimizados se resumen en la **Tabla 9**.

Tabla 9 Optimización del procedimiento mediante DPASV.

Variable a optimizar		Metal		
		Pb(II) / 10 μM	Hg(II) / 50 μM	As(III) / 50 nM
Optimización univariable	% IIP	0 a 25	0 a 20	0 a 25
	Tiempo, min	1 a 14	0 a 20	0 a 20
	Agitación, rpm	200 a 700	0 a 600	0 a 200
Proceso de carga	pH del buffer	2 a 7	2 a 5	10 a 12
	Concentración del buffer, M	0.05 a 0.25	No optimizado	No optimizado
Optimización univariable	Potencial, V	-0.90 a -1.30	-0.60 a -1.30	-0.40 a -0.80
	Tiempo, s	20 a 70	30 a 80	50 a 90
Deposición electroquímica	Concentración de electrolito	No optimizado	No optimizado	(0.00 a 6.00) M
Parámetros DPV	Paso y amplitud	No optimizado	(0.005 a 0.015) V BBD	(0.005 a 0.015) V Taguchi
	Ancho y duración		(0.05 a 0.15) s	(0.05 a 0.15) s

DPV: voltamperometría diferencial de pulso, **IIP:** polímero de impresión de iones, **rpm:** revoluciones por minuto, **BBD:** diseño de experimentos Box Behnken.

3.3.6.1 Optimización univariable del proceso de carga.

Todas variables asociadas al proceso de carga fueron optimizadas de forma univariable: la cantidad de IIP en el CPE-IIP, el tiempo que este permanece sumergido en el buffer a cierta velocidad de agitación y el pH del buffer empleado.

3.3.6.1.1 Mezcla composite.

La cantidad de IIP en la mezcla composite del CPE-IIP juega un papel muy importante ya que puede afectar la intensidad de lap. Por lo tanto, se realizó una optimización univariable utilizando distintos porcentajes de IIP con intervalos de 5% (**Figura 19** y **Tabla 10**), para evaluar el efecto de la proporción de los componentes de la mezcla composite a través de DPASV para cada metal.

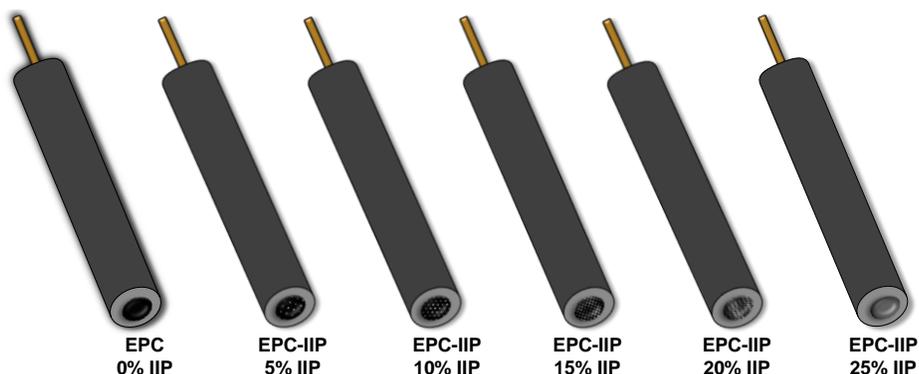


Figura 19 Modificación del composite del CPE con diferente cantidad de IIP.

Tabla 10 Proporciones de la mezcla composite del CPE-IIP.

% IIP	Masa total de IIP y grafito / g	Cantidad de IIP / g	Cantidad de grafito / g	Cantidad de parafina / g
0.00	0.30	0.00	0.30	0.13 g
5.00	0.30	0.02	0.28	0.13 g
10.00	0.30	0.03	0.27	0.13 g
15.00	0.30	0.05	0.25	0.13 g
20.00	0.30	0.06	0.24	0.13 g
25.00	0.30	0.08	0.22	0.13 g

IIP: polímero de impresión de iones, ***Proporción en el CPE-IIP**, correspondiente a la plantilla, monómero y entrecruzante, respecto a la plantilla.

3.3.6.1.2 Velocidad de agitación

La velocidad de agitación es un parámetro crítico ya que los iones metálicos llegan a la superficie del electrodo por efecto de convección durante el tiempo de carga, mejorando la interacción de los iones con el IIP. Por lo tanto, se optimizó la agitación con intervalos de 100 rpm (Pb(II), y Hg(II)) y 50 rpm (As(III)) para evaluar la variación de la lap respecto a la velocidad y establecer las rpm que proporcionen la mayor lap.

3.3.6.1.3 Efecto del pH del buffer

El pH del buffer de carga puede provocar la protonación del monómero en las cavidades de reconocimiento o la formación de hidroxocomplejos del metal de interés; por lo que su influencia sobre la lap se evaluó a través de estudios a diferentes pH en intervalos de una unidad utilizando el buffer universal Britton Robinson (BR).

Para lograr la retención del analito en el Pb-IIP, Hg-IIP y As-IIP, el CPE-IIP de cada metal fue sumergido durante el tiempo de carga en 20 mL de buffer BR 0.10 M ajustando los diferentes valores de pH con una solución concentrada de NaOH.

3.3.6.1.4 Concentración del buffer para determinar Pb(II)

La concentración del buffer de acetatos (seleccionado como óptimo en la optimización del pH de carga) fue evaluado para mejorar la intensidad de lap asociada a la oxidación de Pb, alrededor de -0.60 V.

El CPE-IIP fue sumergido en un buffer de acetatos a diferentes concentraciones de 0.05 M a 2.00 M con intervalos de 0.05 M para determinar la concentración del buffer que maximice la lap del proceso de oxidación del Pb.

3.3.6.1.5 Tiempo de carga

El tiempo que permanece el electrodo sumergido en el buffer que contiene al metal influye directamente en la capacidad de reconocimiento del IIP de acuerdo con la cantidad de iones que serán retenidos en las cavidades, debido a los posibles efectos de convección derivados de la agitación constante; por lo tanto, para determinar el tiempo que incremente la lap asociada a cada metal, se evaluó de forma univariable con intervalos de 5 minutos.

3.3.6.2 Evaluación de la deposición electroquímica

El potencial catódico y su tiempo de imposición son necesarios para acumular la especie con número de oxidación 0 de cada metal sobre la superficie del CPE-IIP, ya que estos influyen directamente sobre el desempeño del CPE-IIP, es por ello que se realizó la optimización univariable del potencial y tiempo de deposición electroquímica para maximizar la lap de cada metal. El CPE-IIP de cada metal fue sometido al proceso de carga optimizado, y posteriormente colocado en la celda electroquímica con 10 mL de electrolito soporte para imponer los parámetros de deposición electroquímica.

3.3.6.2.1 Potencial de deposición

La evaluación del potencial catódico se realizó en el rango mostrado en la **Tabla 9**, en intervalos de potencial de 0.10 V. El objetivo fue seleccionar un potencial que maximice la intensidad de lap, sin provocar la formación de H₂ de la solución y finalmente establecerlo como el óptimo para las siguientes mediciones de cada metal.

3.3.6.2.2 Tiempo de deposición

La duración del potencial de deposición impuesto puede provocar un exceso de metal sobre la superficie del CPE-IIP y con esto disminuir la lap debido al desprendimiento

del IIP cargado; por lo tanto, se evaluó el tiempo de deposición en intervalos de 10 s de acuerdo con el rango para cada metal indicado en la **Tabla 9**.

3.3.6.2.3 Concentración de electrolito soporte en la determinación de As(III).

La conductividad en la determinación electroquímica se encuentra influenciada principalmente por la concentración del electrolito soporte empleado; aunado a que en ocasiones se requieren medios fuertemente ácidos para permitir sólo la reducción del metal de interés y evitar la formación de otras especies indeseables. La evaluación univariable del efecto de la concentración de HCl sobre la lap asociada a la oxidación de As(0) empleando el CPE-IIP se realizó de 1.00 M a 6.00 M con intervalos de 1.00 M.

3.3.6.3 Optimización de la DPASV.

Un pulso de potencial impuesto en la DPV se define por el paso de potencial (A), amplitud de potencial (B), ancho de pulso (C) y duración del pulso (D). Al estar correlacionadas estas variables entre sí, es posible realizar diseños de experimentos más robustos para lograr su optimización con la menor cantidad de experimentos y así obtener la combinación de variables que proporcionen señales anódicas bien definidas y con la mayor intensidad de corriente, la cual fue establecida como variable de respuesta.

3.3.6.3.1 Optimización de la DPASV para Hg(II).

La optimización del pulso de potencial impuesto en la DPV para la determinación de 50 μM de Hg(II) se realizó a través de 27 experimentos con diferentes combinaciones de las variables anteriormente mencionadas mediante un diseño de experimento Box Behnken como se indica en la **Tabla 11**. Utilizando el software Minitab® y el análisis de varianza (ANOVA), la relación entre la variable de respuesta lap y los factores relacionados a la DPV se obtendrá mediante la ecuación de función de respuesta.

Tabla 11 Matriz de experimentos del diseño de experimento Box Behnken de la optimización de la DPV para determinar Hg(II).

No.	(A) Paso de potencial / V	(B) Amplitud de pulso / V	(C) Ancho de pulso / s	(D) Duración de pulso / s
14	0.0102	0.1500	0.0054	0.1000
1	0.0054	0.0500	0.0102	0.1000
3	0.0054	0.1500	0.0102	0.1000
22	0.0102	0.1500	0.0102	0.0500
15	0.0102	0.0500	0.0150	0.1000
6	0.0102	0.1000	0.0150	0.0500
20	0.0150	0.1000	0.0150	0.1000
27	0.0102	0.1000	0.0102	0.1000
7	0.0102	0.1000	0.0054	0.1500
9	0.0054	0.1000	0.0102	0.0500
24	0.0102	0.1500	0.0102	0.1500
11	0.0054	0.1000	0.0102	0.1500
5	0.0102	0.1000	0.0054	0.0500
23	0.0102	0.0500	0.0102	0.1500
18	0.0150	0.1000	0.0054	0.1000
21	0.0102	0.0500	0.0102	0.0500
12	0.0150	0.1000	0.0102	0.1500
4	0.0150	0.1500	0.0102	0.1000
17	0.0054	0.1000	0.0054	0.1000
16	0.0102	0.1500	0.0150	0.1000
13	0.0102	0.0500	0.0054	0.1000
19	0.0054	0.1000	0.0150	0.1000
26	0.0102	0.1000	0.0102	0.1000
10	0.0150	0.1000	0.0102	0.0500
25	0.0102	0.1000	0.0102	0.1000
8	0.0102	0.1000	0.0150	0.1500
2	0.0150	0.0500	0.0102	0.1000

3.3.6.3.2 Optimización de la DPASV para As(III).

La DPV para la determinación de As(III) 50 nM fue realizada empleando el diseño de Taguchi a través de un arreglo ortogonal L9, optimizando la técnica voltamperométrica mediante 9 experimentos como se muestra en la **Tabla 12**, y tomando como variable de respuesta la intensidad de lap obtenida en cada experimento.

La combinación óptima será representada mediante los gráficos de interacción para cada variable evaluada, obtenidos después de analizar el diseño en Minitab® con la variable de respuesta (lap).

Tabla 12 Matriz de experimentos del diseño Taguchi para optimizar la DPV en la determinación de As(III).

No.	(A) Paso de potencial / V	(B) Amplitud de pulso / V	(C) Ancho de pulso / s	(D) Duración de pulso / s
1	0.0054	0.0500	0.0054	0.0500
2	0.0054	0.1000	0.0096	0.1000
3	0.0054	0.1500	0.0150	0.1500
4	0.0096	0.0500	0.0096	0.1500
5	0.0096	0.1000	0.0150	0.0500
6	0.0096	0.1500	0.0054	0.1000
7	0.0150	0.0500	0.0150	0.1000
8	0.0150	0.1000	0.0054	0.1500
9	0.0150	0.1500	0.0096	0.0500

3.3.7 Caracterización analítica del método desarrollado.

Los métodos desarrollados por un laboratorio deben ser validados para asegurar que son adecuados para el uso previsto, evaluando la confianza de sus resultados a través de los parámetros analíticos.

De acuerdo con la guía “La adecuación al uso de los métodos analíticos, una guía de laboratorio para validación de métodos y temas relacionados”, publicada por la Eurachem en 2014 y la norma internacional ISO/IEC-17025:2017 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”, los parámetros analíticos de un método desarrollado por un laboratorio pueden incluir, pero no se limitan a: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación, sesgo, repetibilidad, reproducibilidad y selectividad.

El modelo matemático de las metodologías desarrolladas en este trabajo es considerado de medición directa debido a que la señal analítica es obtenida directamente por el instrumento de medición. Por lo tanto, la construcción de curvas de calibración para cada metal es el primer paso para obtener las características de desempeño de cada CPE-IIP.

3.3.7.1 Curvas de calibración

Se construyeron curvas de calibración para cada CPE-IIP, preparando 25 mL de cada punto de calibración a través de la dilución de una solución patrón de cada metal y agua desionizada. La Iap, obtenida para Pb(II) a -0.60 V, Hg(II) a 0.00 V y As(III) a 0.00 V fue registrada como la señal analítica de cada una de las concentraciones de la curva.

3.3.7.2 Parámetros analíticos.

Cada uno de los parámetros analíticos evaluados fue sometido al plan de validación descrito en la **Tabla 13**.

Tabla 13 Plan de validación para cada metodología desarrollada.

Característica a evaluar	Mediciones a realizar
Linealidad	Al menos 6 distintas concentraciones de soluciones estándar.
Sensibilidad	No se realizan. Se obtiene de la curva de calibración.
LOD	No se realizan. Se obtiene a partir de la Ecuación 2
LOQ	No se realizan. Se obtiene a partir de la Ecuación 3
Recuperación, %R	2 concentraciones con n=3, dentro del intervalo lineal.
Sesgo	2 concentraciones con n=3 dentro del intervalo lineal.
Repetibilidad	2 concentraciones con n=10 dentro del intervalo lineal.
Precisión intermedia	2 concentraciones dentro del intervalo lineal, 2 CPE-IIP y n=10.
Selectividad	Concentración fija del metal y al menos 2 concentraciones diferentes del interferente, n=3

3.3.8 Análisis de muestras reales.

Cada una de las metodologías optimizadas y validadas se aplicaron en la determinación de su respectivo metal en muestras de agua de grifo, embotellada comercial, de presas y cascadas del estado de Hidalgo con pretratamiento de digestión ácida y sin este. Las muestras se analizaron a través de una alícuota diluida en el buffer correspondiente a cada metal, con el objetivo de trasladar la muestra al medio optimizado de cada método. Las mediciones se realizaron por triplicado con cada CPE-IIP, obteniendo

la lap para el posterior cálculo de la concentración mediante la ecuación de la recta de la metodología correspondiente.

3.3.9 Tratamiento de la muestra

Con fines de comparación en el análisis de muestras reales sin y con procedimiento de pretratamiento, las muestras de agua evaluadas fueron digeridas utilizando un medio ácido para lograr su preconcentración. 100 mL de muestra fueron colocados en un vaso de precipitado y cubierto con un vidrio de reloj, empleado una campana de extracción se añadieron 2 mL de HNO_3 y 5 mL de HCl , ambos concentrados. La muestra se mantuvo en una parrilla de calentamiento a 90°C hasta que el volumen se redujo a 20 mL; posteriormente, se enfrió a temperatura ambiente y se realizaron lavados con agua desionizada de las paredes del material de vidrio empleado. Las muestras se diluyeron a 25 mL con agua desionizada antes de la determinación de cada metal. Finalmente, la muestra fue diluida en el buffer correspondiente, y sometida al proceso de carga y determinación electroquímica optimizados de cada metal.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO IV. Resultados y discusión.

4.1 Resumen

Este capítulo muestra los resultados obtenidos para el desarrollo de cada metodología de cuantificación de Pb(II), Hg(II) y As(III). Los resultados se muestran en el orden metodológico del capítulo III, por lo tanto, cada sección aborda los resultados obtenidos por los tres metales analizados.

Inicialmente fueron optimizadas las variables de la síntesis de los IIPs a través de diversos diseños de los que se muestran las variables de respuesta tanto experimental como predicha por cada diseño, además del análisis estadístico, las gráficas de superficie, valores óptimo de cada variable y la respuesta experimental de dicha combinación.

Después de sintetizar los IIPs en condiciones óptimas, se muestra la caracterización fisicoquímica a través de los espectros de infrarrojo de cada IIP con y sin el analito de interés dentro de las cavidades de reconocimiento.

Con los electrodos modificados y el procedimiento electroquímico de cada IIP se comprobó la capacidad del CPE-IIP para retener al metal respecto al CPE y el CPE-NIP. Se presentan también las gráficas bidimensionales de las optimizaciones univariadas del procedimiento de carga de iones y deposición electroquímica; así como los resultados de la optimización robusta de la técnica electroquímica y la caracterización analítica de cada método.

Finalmente, se presenta la recuperación obtenida en el análisis de cada metal en diferentes muestras de agua con y sin pretratamiento de digestión ácida.

4.2 Optimización de la síntesis de IIP

El intervalo de plantilla, relación de monómeros y agente entrecruzante, utilizados en la optimización de los IIPs de cada metal se muestra en la **Tabla 14**.

Tabla 14 Intervalo de variables para la optimización de cada IIP.

IIP	Plantilla mmol	Monómero (s) mmol	Entrecruzante mmol	Diseño experimental a utilizar
Pb	0.50 a 1.00	4.00 de (MAA : 4-VP)*	10 a 40	Simplex centroide
Hg	0.50 a 2.00	5.00 a 20.00 de Py	10 a 40	Univariable
As	0.50 a 2.50	6.00 de (2-MT : MAA)**	10 a 50	Simplex centroide

MAA: ácido metacrílico, **4-VP:** 4-vinilpiridina, **Py:** pirrol, **2-MT:** 2-metiltofenol, * **Relación de monómeros MAA: 4-VP**, donde la suma debe ser 4 mmol, ** **Relación de monómeros 2-MT : MAA**, donde la suma debe ser 6 mmol.

El análisis de cada IIP sintetizado con las combinaciones proporcionadas por los diseños, permitió obtener la variable de respuesta para Hg(II) (**Tabla 15**), Pb(II) (**Tabla 16**), y As(III) (**Tabla 17**).

Tabla 15 Variable de respuesta de la optimización de la síntesis de Hg(II)-IIP; n=3, %RSD<10%.

No.	Relación molar en el IIP*	Rendimiento de la reacción	Iap experimental / μA
1	(1:5:20)	43.79%	6.97 \pm 0.66
2	(1:10:20)	17.10%	13.60 \pm 0.50
3	(1:15:20)	0.00%	Sin reacción
4	(1:20:20)	0.00%	Sin reacción
5	(1:10:10)	0.00%	Sin reacción
6	(1:10:20)	16.75%	8.14 \pm 0.09
7	(1:10:30)	65.75%	13.60 \pm 0.50
8	(1:10:40)	73.52%	5.06 \pm 0.49
9	(1:20:60)	58.26%	16.63 \pm 1.36
10	(1:10:30)	65.75%	13.60 \pm 0.50
11	(1:7:20)	30.24%	12.23 \pm 1.18
12	(1:5:15)	37.61%	7.50 \pm 0.62

* **Relación molar en el IIP**, correspondiente a la plantilla, monómero (s) y entrecruzante, respecto a la plantilla.

** **El rendimiento de la reacción es** calculado de acuerdo con la Ecuación 5, en función de la masa esperada y la obtenida.

Tabla 16 Variable de respuesta de la optimización de la síntesis de Pb(II)-IIP; n=3, %RSD<10%.

No.	Relación molar en el IIP*	Rendimiento de la reacción**	%Retención experimental
1	(1:5:18)	95.14%	3.38 ± 0.33
2	(1:7:52)	99.64%	4.68 ± 0.46
3	(1:7:26)	95.61%	9.78 ± 0.97
4	(1:8:80)	94.01%	88.04 ± 8.80
5	(1:6:30)	94.96%	0.78 ± 0.78
6	(1:4:10)	96.85%	5.54 ± 0.55
7	(1:5:13)	78.87%	2.20 ± 0.22
8	(1:8:20)	96.84%	77.43 ± 7.70
9	(1:5:33)	88.04%	0.77 ± 0.77
10	(1:8:50)	91.65%	31.95 ± 3.10

* **Relación molar en el IIP**, correspondiente a la plantilla, monómero (s) y entrecruzante, respecto a la plantilla.

** **El rendimiento de la reacción es** calculado de acuerdo con la Ecuación 5, en función de la masa esperada y la obtenida.

Tabla 17 Variable de respuesta de la optimización de la síntesis de As(III)-IIP; n=3, %RSD<10%.

No.	Relación molar en el IIP*	Rendimiento de la reacción	Iap experimental / μ A
1	(1:7:20)	90.57%	3.38 ± 0.33
2	(1:4:7)	68.34%	4.68 ± 0.46
3	(1:4:20)	93.93%	9.78 ± 0.97
4	(1:12:100)	98.97%	88.04 ± 8.80
5	(1:3:9)	78.85%	0.78 ± 0.78
6	(1:5:20)	95.57%	5.54 ± 0.55
7	(1:3:4)	80.01%	2.20 ± 0.22
8	(1:7:44)	97.10%	77.43 ± 7.70
9	(1:12:60)	91.67%	0.77 ± 0.77
10	(1:12:20)	96.46%	31.95 ± 3.10

* **Relación molar en el IIP**, correspondiente a la plantilla, monómero (s) y entrecruzante, respecto a la plantilla.

** **El rendimiento de la reacción**, es calculado de acuerdo con la Ecuación 5, en función de la masa esperada y la obtenida.

En todos los casos, la variable de respuesta aumenta o disminuye dependiendo de la relación molar de las variables evaluadas, debido a que están directamente relacionadas con el rendimiento de la reacción y con la probable creación de cavidades de reconocimiento.

En la optimización univariable de la síntesis de Hg(II)-IIP, inicialmente al evaluar la cantidad de monómero, se obtuvo la máxima intensidad de lap al utilizar 10 mmol con una relación molar de 1:10:30 de plantilla, monómero y entrecruzante respectivamente, mientras que al emplear las relaciones molares 1:15:20 y 1:20:30 se obtuvieron bajos rendimientos del IIP debido a interacciones no específicas en el complejo plantilla-monómero y un bajo grado de entrecruzamiento, provocando que la síntesis no se desarrollará favorablemente. Este efecto también se observó durante la optimización del entrecruzante al utilizar 10 mmol de EGDMA, demostrando el impacto del entrecruzante en la morfología del polímero y, por lo tanto, el rendimiento del IIP fue significativamente bajo. Finalmente, para la optimización de la plantilla, se observó un máximo de lap en el nivel más bajo evaluado (**Tabla 15**). La combinación óptima para maximizar la lap hacia la oxidación de Hg corresponde a un IIP sintetizado con 0.50 mmol de plantilla, 10.00 mmol de monómero y 30.00 mmol de entrecruzante, con una relación molar 1:20:60, los cuales se encuentran dentro de las proporciones utilizadas convencionalmente en la literatura.

La evaluación de la respuesta obtenida en la optimización de la síntesis del Pb(II)-IIP (**Tabla 16**) y As(III)-IIP (**Tabla 17**), se realizó usando el software de análisis estadístico Minitab®, a través de la ecuación de superficie de respuesta de los diseños simplex centroide; en la **Ecuación 6** se muestra la correspondiente para el análisis de Pb(II) y mientras que la **Ecuación 7** corresponde a aquella para As(III), donde A, B y C representan a la plantilla, relación de monómeros y agente entrecruzante, respectivamente. Se puede observar que se obtuvo la respuesta predicha por los diseños sustituyendo el valor de las variables de cada experimento en la ecuación correspondiente a cada metal, en algunos casos la respuesta predicha es muy cercana a la experimental como se muestra en las **Tabla 16 y 17**.

$$\% \text{Retención Pb(II)} = 5.2 (A) + 77.1 (B) + 87.7 (C) - 151.3 (AB) - 178.3 (AC) - 197.3 (BC) + 407.9 + AB^2 + 114.6 AC^2 - 892.3 BC^2$$

Ecuación 6 Ecuación de superficie de la optimización del Pb-IIP con $R^2 = 73\%$

$$\text{lap As(III)} = 29.1 (A) + 22.4 (B) + 106.2 (C) + 59.7 (AB) - 2.4 (AC) - 198.9 (BC).$$

Ecuación 7 Ecuación de superficie de la optimización del As-IIP con $R^2 = 98\%$

El análisis estadístico de cada diseño permite concluir que los datos obtenidos se ajustan a un modelo cuadrático, con coeficientes de correlación aceptables estadísticamente de acuerdo con el análisis t de student para coeficientes de correlación descrito en el **Anexo 7.1**.

La ecuación de superficie permitió modelar las gráficas para cada metal (**Figura 20a** para Pb(II) y **Figura 20b** para As(III)), con la cual se visualiza la combinación de cada variable que proporcionaría la máxima retención teórica del metal en el IIP en términos de la máxima lap.

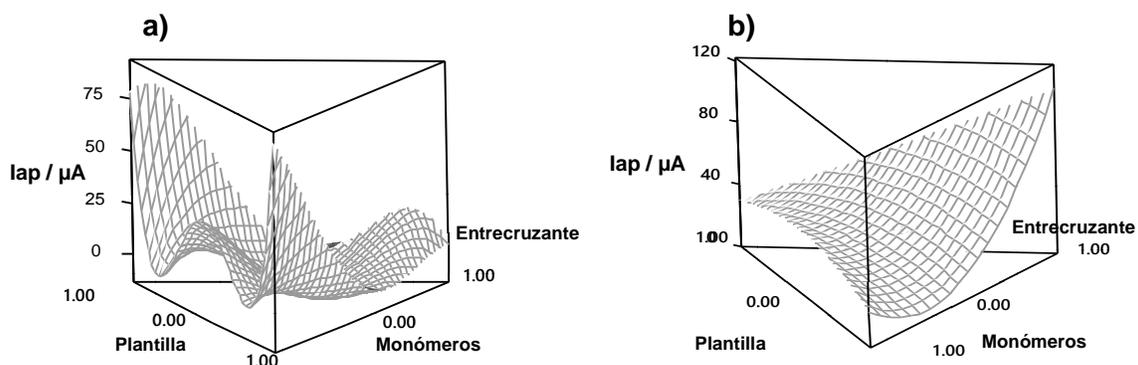


Figura 20 Gráficas tridimensionales de superficie de respuesta de la optimización de a) Pb(II)-IIP y b) As(III)-IIP.

En todos los casos, la impresión molecular de cada IIP se obtuvo gracias a la formación del complejo monómero-platilla, con interacciones complementarias que aumentan la afinidad y la selectividad de las cavidades generadas en la matriz polimérica.

Cuando se utilizaron relaciones más altas de entrecruzamiento, el rendimiento del IIP aumentó considerablemente sugiriendo la probable formación de un polímero macro poroso, el cual es mecánicamente más robusto y permitirá que la plantilla acceda a la matriz permanentemente porosa; sin embargo, también se puede producir una matriz demasiado rígida (entrecruzada) que dificulta tanto la eliminación completa de la plantilla como la interacción monómero-plantilla, reflejándose en esos casos en una disminución de la variable de respuesta (Iap). Por otro lado, un exceso de la plantilla y monómero produce altas interacciones no específicas entre ellos, debilitando los enlaces de coordinación; en consecuencia, el reconocimiento de la plantilla disminuyó considerablemente.

A través de la herramienta Minitab®, se obtuvieron las combinaciones óptimas de las variables de la síntesis de Pb(II)-IIP y As(III)-IIP (**Tabla 18**). Respecto al diseño univariable del Hg(II)-IIP, fue asignada como óptima la combinación que presenta la mayor señal de retención en términos de la Iap.

Tabla 18 Combinación de variables optimas de la síntesis de cada IIP.

IIP	Plantilla / mmol	Monómero (s) / mmol	Entrecruzante / mmol	Relación molar en el IIP***
Pb-IIP	0.50	MAA : 4-VP* 0.00 : 4.00	40.00	(1:8:80)
Pb-NIP	0	MAA : 4-VP* 0.00 : 4.00	40.00	(0:8:80)
Hg-IIP	0.50	Py 10.00	30.00	(1:20:60)
Hg-NIP	0	Py 10.00	30.00	(0:20:60)
As-IIP	0.50	2-MT : MAA** 1.00 : 5.00	50.00	(1:12:100)
As-NIP	Sin plantilla	2-MT : MAA** 1.00 : 5.00	50.00	(0:12:100)

* Relación de monómeros MAA : 4-VP, donde la suma debe ser 4 mmol, ** Relación de monómeros 2-MT: MAA, donde la suma debe ser 6 mmol, *** Relación molar en el IIP, correspondiente a la plantilla, monómero (s) y entrecruzante, respecto a la plantilla.

Finalmente, se evaluó la capacidad de los polímeros para reconocer selectivamente al analito, sintetizando el IIP en las condiciones óptimas reportadas en la **Tabla 18**, así como un NIP obtenido en las mismas condiciones optimizadas que el IIP pero en ausencia de la molécula plantilla. La señal analítica obtenida de cada material se muestra en la **Tabla 19**.

Tabla 19 Retención obtenida en condiciones óptimas de la síntesis de cada IIP. n=3, %RSD<10%.

Polímero	Relación molar en el IIP*	Respuesta predicha	Respuesta experimental
Pb-IIP	1:8:80	88.00%	87.00% ± 8.70%
Pb-NIP	0:8:80	No existe	21.70% ± 0.30%
Hg-IIP	1:20:60	17.00 µA ± 1.63 µA	18.20 µA ± 1.40 µA
Hg-NIP	0:20:60	No existe	1.50 µA ± 0.10 µA
As-IIP	1:12:100	106.15 µA	113.50 µA ± 2.50 µA
As-NIP	0:12:100	No existe	28.32 µA ± 0.50 µA

* **Relación molar en el IIP**, correspondiente a la plantilla, monómero (s) y entrecruzante, respecto a la plantilla.

Las señales experimentales fueron muy cercanas estadísticamente a las predichas por los diseños de experimentos empleados, tal como se demuestra en el **Anexo 7.1** mediante el estadístico t de student. Con esto se comprueba la eficiencia del diseño en la determinación de la combinación de las variables que maximiza la Iap y por lo tanto, la retención de iones metálicos en los IIPs. En los tres metales, el IIP mantuvo una retención al menos 4 veces mayor que el NIP, demostrando la selectividad del IIP hacia el ion metálico empleado como plantilla. La señal obtenida en el NIP se presenta debido a que la cadena polimérica está altamente entrecruzada y sus grupos funcionales son llevados a una posición fija y estable, por lo tanto son capaces de retener solo una pequeña parte del metal pero sin aportar selectividad.

4.3 Caracterización del IIP mediante infrarrojo

Las bandas características de los grupos funcionales presentes en los monómeros y materiales sintetizados (con y sin eliminación de la plantilla), se observaron a través del análisis de espectroscopia de infrarrojo realizado en intervalo de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} (**Figura 21**).

El análisis de las bandas del monómero 4-VP (**Figura 21a**), muestra el anillo de la piridina con una señal alrededor de 1490 cm^{-1} y 1543 cm^{-1} , mientras que en el espectro típico del pirrol (**Figura 21b**) se muestran una fuerte banda alrededor de 3450 cm^{-1} correspondiente al enlace vibracional de estiramiento N-H y otra a 700 cm^{-1} para C=C. En el MAA (**Figura 21c**) se observa la vibración del enlace C=O alrededor de 1690 cm^{-1} y la banda representativa del compuesto alrededor de 3000 cm^{-1} para el O-H. Finalmente, en la **Figura 21d**) se observan las bandas de los enlaces C-C, C-H y C-S del 2-metiltiofeno alrededor de 1433 cm^{-1} , 1216 cm^{-1} y 1000 cm^{-1} respectivamente. La **Figura 21 e)** pertenece al agente entrecruzante EGDMA, con fuertes bandas de estiramiento del enlace C=O (1720 cm^{-1}), C-O-C (1147 cm^{-1}) y de C=C (1600 cm^{-1}). La matriz polimérica de cada IIP de las **Figura 21f), g) y h)** para el As-IIP, Hg-IIP y Pb-IIP respectivamente, presenta bandas alrededor de 3000 cm^{-1} , como resultado del enlace C-H en anillos aromáticos, atribuidos al estiramiento simétrico y asimétrico del carbono sp^2 ; la ausencia de las bandas atribuidas al enlace C=C (1600 cm^{-1}) refleja la polimerización química satisfactoria de cada material IIP y NIP. Adicionalmente, las bandas asociadas a las vibración de C-H, y estiramiento en el plano de N-H y C-S, disminuye en los polímeros correspondientes, indicando la ausencia de monómeros libres. Previo a la eliminación de la plantilla (espectros de líneas continuas), las bandas asociadas a los enlaces de coordinación se observan con mayor intensidad en los IIPs respecto a los NIPs y a los mismos materiales pero después de la remoción de la plantilla, debido a que la eliminación de la plantilla revela las cavidades tridimensionales que son complementarias tanto en la forma como en la funcionalidad a esta última. Un

adecuado grado de entrecruzamiento permite que las cavidades mantengan su forma aún después de retirar la plantilla y por lo tanto, los grupos funcionales se mantienen en una configuración óptima para volver a unirlos, permitiendo que dicha cavidad "reconozca selectivamente" al analito.

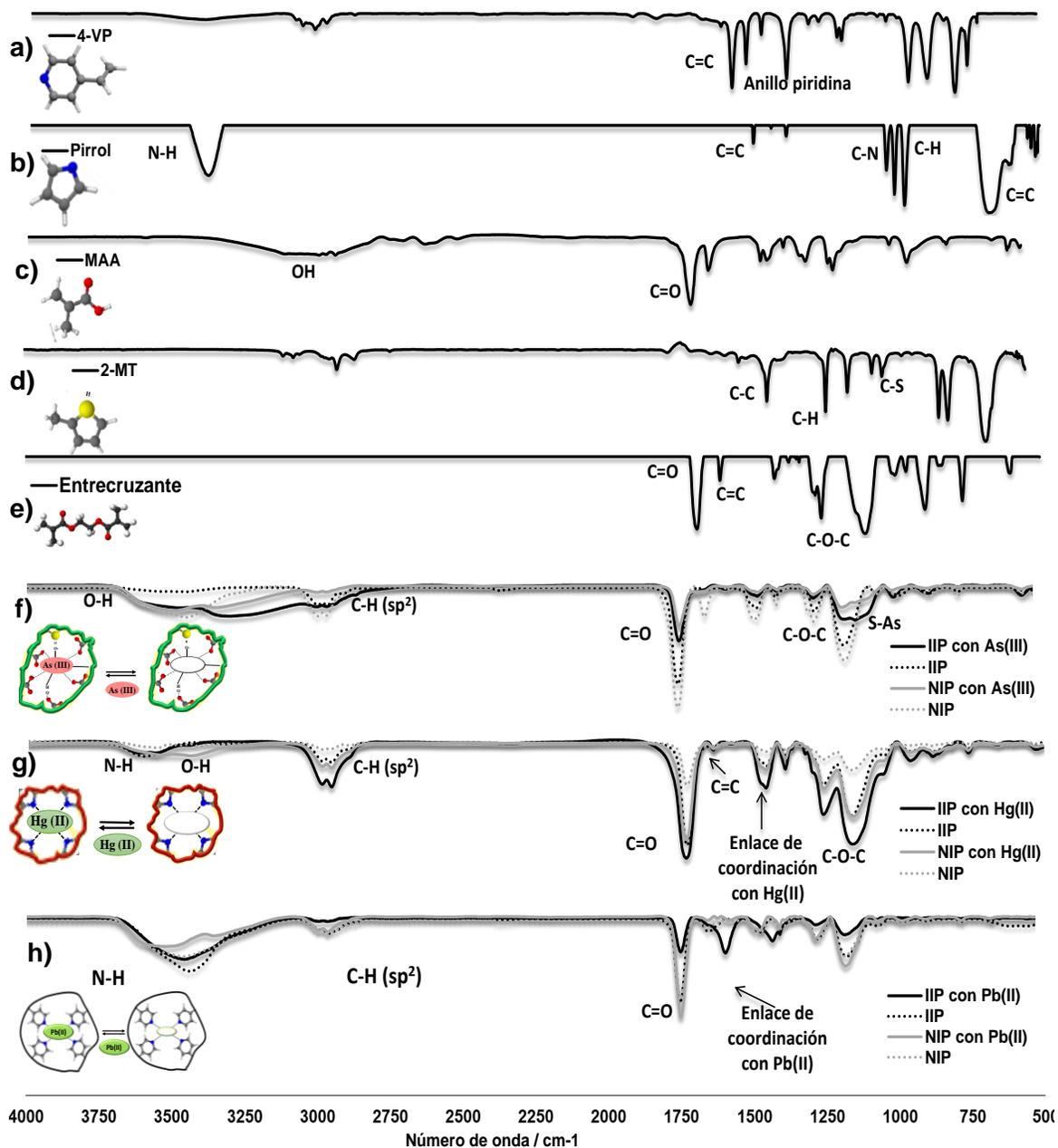


Figura 21 Espectros de infrarrojo de los monómeros funcionales (a-d), entrecruzante (e), f) Pb(II)-IIP, g) Hg(II)-IIP y h) As(III)-IIP.

4.4 Evaluación electroquímica del CPE, CPE-NIP y CPE-IIP para cada IIP.

Los electrodos (incluido un CPE sin modificar) se probaron en una solución con el metal de interés (líneas continuas) y en ausencia de él (líneas punteadas) siguiendo el procedimiento de carga y electroquímico presentado en el Capítulo III. En cada metodología se impuso un potencial negativo para reducir el metal a su estado de oxidación 0, seguido de la DPASV considerando tres réplicas para cada experimento.

El voltamperograma obtenido de la oxidación de Pb(0) a Pb(II) se muestra en la **Figura 22**, donde la lap se encuentra alrededor de -0.60 V. La **Figura 23**, muestra los voltamperogramas de la oxidación de Hg(0) a Hg(II) con un único pico de corriente anódica alrededor de 0.00 V. Finalmente, la **Figura 24**, muestra la señal de oxidación del As(0) a As(III) en un potencial de 0.00 V; el pico observado a mayores potenciales podría ser asociado a la oxidación de As(III) a As(V).

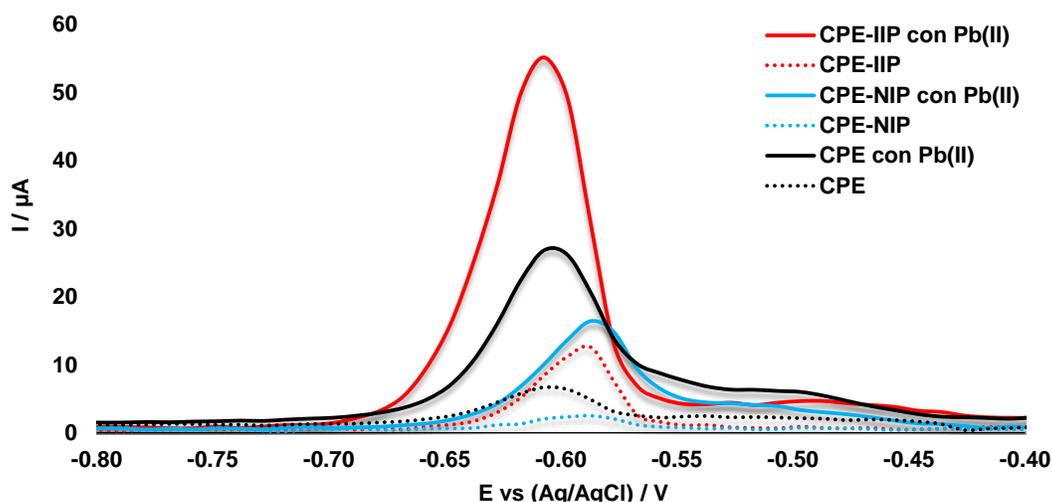


Figura 22 DPASV del CPE, CPE-IIP y CPE-NIP para Pb(II).

Condiciones de análisis: 100 μM de Pb(II) en buffer de acetatos 0.10 M pH 5.00 por 10 min con agitación a 500 rpm; electrodeposición, -1.0 V por 40 s; DPASV: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

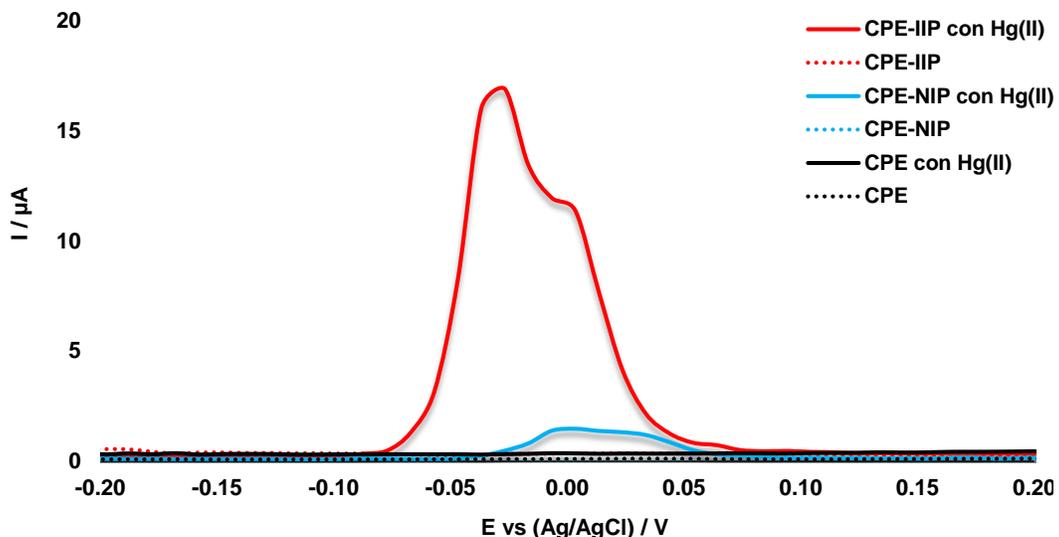


Figura 23 DPASV del CPE, CPE-IIP y CPE-NIP para Hg(II).

Condiciones de análisis: 50 μM Hg(II) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 3.00, por 10 min con agitación a 400 rpm; electrodeposición, -0.7 V por 40 s; DPASV: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

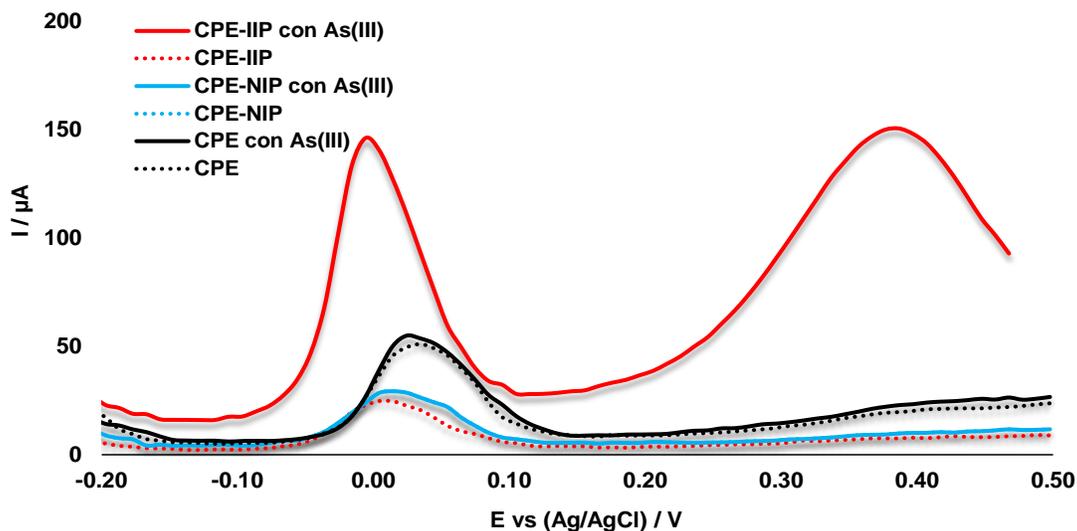


Figura 24 DPASV del CPE, CPE-IIP y CPE-NIP para As(III).

Condiciones de análisis: 50 nM de As(III) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 11.00, por 10 min con agitación a 150 rpm; electrodeposición, -0.6 V por 60 s; DPASV: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

Los CPE-IIPs en condiciones óptimas cargados con el respectivo metal, presentaron una capacidad de retención superior respecto al CPEs y CPE-NIPs al obtener mayores lap; sin embargo, la señal obtenida no es comparable con la de los CPE-IIPs debido a la ausencia de la plantilla.

La evaluación del CPE, CPE-IIPs y CPE-NIPs, comprueba las bondades que la impresión molecular aporta en la determinación de metales a través de los IIPs incorporados en los electrodos de pasta de carbono, ya que la estabilidad de la matriz polimérica y del complejo monómero-plantilla de las cavidades en el IIP proporciona alta afinidad y reconocimiento hacia el metal debido a su forma, tamaño e interacciones con las que fue sintetizado. Las propiedades de reconocimiento de los IIPs al ser incorporados en los CPE-IIPS, representan una excelente alternativa para la determinación de trazas de metales pesados en muestras reales.

4.5 Efecto de la composición del electrodo CPE-IIP

La evaluación del efecto de la proporción de los componentes en el CPE-IIP para determinar la mezcla que maximice la señal anódica de metal mediante DPASV, se realizó usando cinco CPE-IIPs diferentes para cada metal considerando proporciones de IIP desde 0% hasta 25%. Las intensidades de lap de cada metal obtenidas con su respectivo CPE-IIP se muestran en la **Figura 25**.

Los CPE-IIPs demostraron mayor capacidad para retener al metal al incrementar el porcentaje de IIP en la mezcla composite expresándose como un aumento gradual de la intensidad de lap, esto se atribuye a que a mayor cantidad de IIP en la superficie del electrodo, mayor número de cavidades capaces de retener al metal en el proceso de carga. Sin embargo, al incorporar 25% de Pb(II)-IIP, 15% de Hg(II)-IIP y 25% de As(III)-IIP, dificultó la renovación de la superficie de los electrodos que perdieron homogeneidad, propiciando irregularidades con una cantidad de cavidades probablemente variable al renovar. En

cuanto a la respuesta electroquímica, al tener mayor cantidad de IIPs en la superficie de cada CPE-IIP, se observa una notable disminución de la *lap* (**Figura 25**) debido a que el polímero es un material no conductor y en alta proporción respecto al grafito provoca resistencia al paso de corriente generando un decremento de la señal analítica.

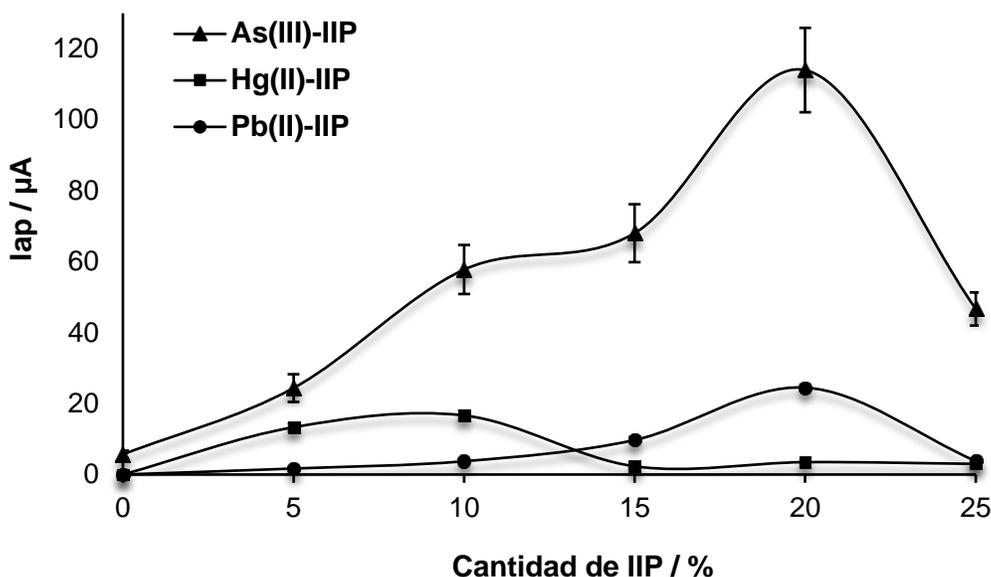


Figura 25 Relación de *lap* respecto a la cantidad de IIP incorporado en los CPE-IIPs

Condiciones de análisis de Pb(II): 10 μM de Pb(II) en buffer de acetatos 0.10 M pH 5.00 por 10 min con agitación a 500 rpm; electrodeposición, -1.0 V por 40 s. Condiciones de análisis de Hg(II): 50 μM Hg(II) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 3.00, por 10 min con agitación a 400 rpm; electrodeposición, -0.7 V por 40 s. Condiciones de análisis de As(III): 50 nM de As(III) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 11.00, por 10 min con agitación a 150 rpm; electrodeposición, -0.6 V por 60 s; DPASV para todos los metales: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

Se demostró que 20% de Pb(II)-IIP, 10% de Hg(II)-IIP y 20% de As(III)-IIP incorporados en sus respectivos CPE-IIP maximizan la *lap* para cada metal, y por lo tanto, se fijaron como las composiciones óptimas para las siguientes mediciones experimentales.

4.6 Evaluación univariable del proceso de carga de iones.

La optimización del proceso de carga de iones metálicos de cada metodología desarrollada en esta investigación se realizó a través de la evaluación de la velocidad de agitación, pH del buffer empleado y tiempo de carga, variables relacionadas con la carga del IIP en la superficie de cada CPE modificado (**Tabla 9**).

En resumen, en el proceso de carga electrodo modificado fue sumergido durante cierto tiempo en un buffer de carga con el pH adecuado para asegurar la presencia de cada especie metálica. Posteriormente, se realizó la electrodeposición del metal en la superficie del respectivo CPE-IIP para después oxidarlo mediante DPASV, y se registró la lap obtenida para cada metal de acuerdo con las evaluaciones realizadas como se muestra a continuación.

4.6.1 Evaluación de la velocidad de agitación

La rapidez con la que llega el analito a la superficie del electrodo para ser retenido por las cavidades de reconocimiento selectivo se evaluó mediante la velocidad de agitación en intervalos de 100 rpm.

En las **Figuras 26a)** y **26c)**, se observa que la lap asociada a Pb(II) y As(III) aumenta de forma proporcional a la agitación (excepto en el caso del Hg(II) de la **Figura 26b)** donde fue casi constante hasta 400 rpm), sin embargo, a velocidades mayores a la máxima observado en cada caso, la convección tan fuerte genera una disminución de la intensidad de corriente ya que no se permite la adecuada interacción entre el IIP y el metal provocando que las cavidades disponibles en la superficie del electrodo no puedan retener adecuadamente al analito.

En consecuencia, las velocidades que maximizan la lap corresponden a 400 rpm para la determinación de Pb(II), 200 rpm para Hg(II) y 100 rpm para As(III); y se establecen como las óptimas para mediciones futuras.

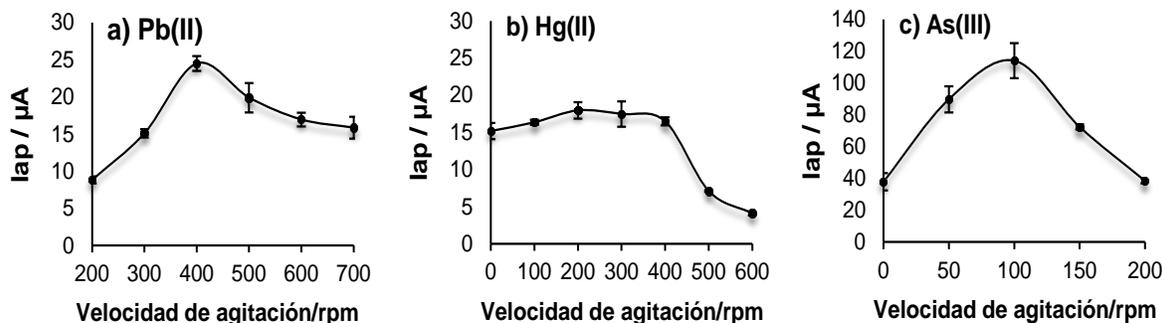


Figura 26 Relación de lap respecto a la agitación: a) Pb(II), b) Hg(II) y c) As(III).

Condiciones de análisis de Pb(II): CPE-IIP (20% de IIP), Pb(II) 10 μ M en buffer de acetatos 0.10 M pH 5.00 por 10 min; electrodeposición, -1.0 V por 40 s. Condiciones de análisis de Hg(II): CPE-IIP(10% de IIP), 50 μ M Hg(II) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 3.00, por 10 min; electrodeposición, -0.7 V por 40 s. Condiciones de análisis de As(III): CPE-IIP (20% de IIP), As(III) 50 nM en buffer de fosfatos 0.10 M pH 11.00, por 10 min; electrodeposición, -0.6 V por 60 s; DPASV para todos los metales: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

4.6.2 Estudio del pH del buffer.

La evaluación del pH de trabajo en el proceso de carga en cada metodología se realizó considerando las especies metálicas predominantes bajo las condiciones de análisis. En este sentido, la determinación de Pb(II) realizó en un buffer de carga Britton Robinson con pH de 2.00 a 6.00; la determinación de Hg(II) se evaluó en pH's de 2.00 a 4.50; mientras que el As(III) fue determinado empleando valores de pH de 10.00 a 12.00.

En la **Figura 27** se presenta la variación de la lap respecto a cada pH evaluado. La baja intensidad de corriente para pH's inferiores al máximo observado en cada gráfica se puede atribuir a la protonación de diversas partes del IIP (como el nitrógeno y azufre de los monómeros) que disminuyen la capacidad del metal para ocupar las cavidades de reconocimiento, y por lo tanto, debilita la interacción monómero-analito.

En las soluciones con valores de pH superiores al máximo observado en la **Figura 27**, se propició la formación de hidroxocomplejos del metal, lo que provocó una notable disminución de la señal analítica.

Se demuestra que los valores de pH 5.00, pH 4.00 y pH 11.00 maximizan la señal de Pb(II), Hg(II) y As(III) respectivamente, por lo tanto, se consideran para los siguientes experimentos, estableciendo el uso de buffer de acetatos para la determinación de Pb(II) y Hg(II) y fosfatos para As(III).

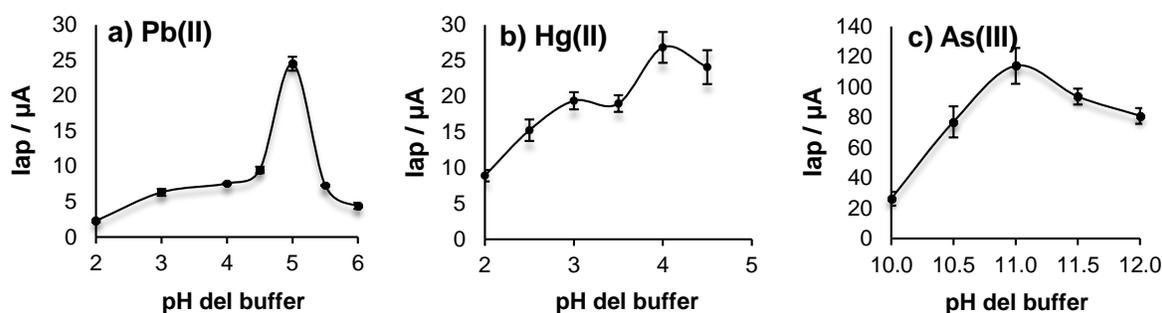


Figura 27 Relación de lap respecto al pH evaluado: a) Pb(II), b) Hg(II) y c) As(III);

Condiciones de análisis de Pb(II): CPE-IIP (20% de IIP), 10 μM de Pb(II) en buffer de acetatos 0.10 M por 10 min con agitación a 400 rpm; electrodeposición, -1.0 V por 40 s. Condiciones de análisis de Hg(II): CPE-IIP(10% de IIP), 50 μM Hg(II) en buffer de fosfatos 0.10 M, por 10 min con agitación a 200 rpm; electrodeposición, -0.7 V por 40 s. Condiciones de análisis de As(III): CPE-IIP (20% de IIP), 50 nM de As(III) en buffer de fosfatos 0.10 M, por 10 min con agitación a 100 rpm; electrodeposición, -0.6 V por 60 s; DPASV para todos los metales: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

Adicionalmente, a través de los diagramas de Pourbaix (**Figura 28**, considerando el uso de un electrodo estándar de hidrógeno), se confirmó que las especies presentes bajo cada condición de trabajo (pH y potencial de reducción) corresponden a las especies catiónicas de Pb(II) y Hg(II), y la especie aniónica de As(III).

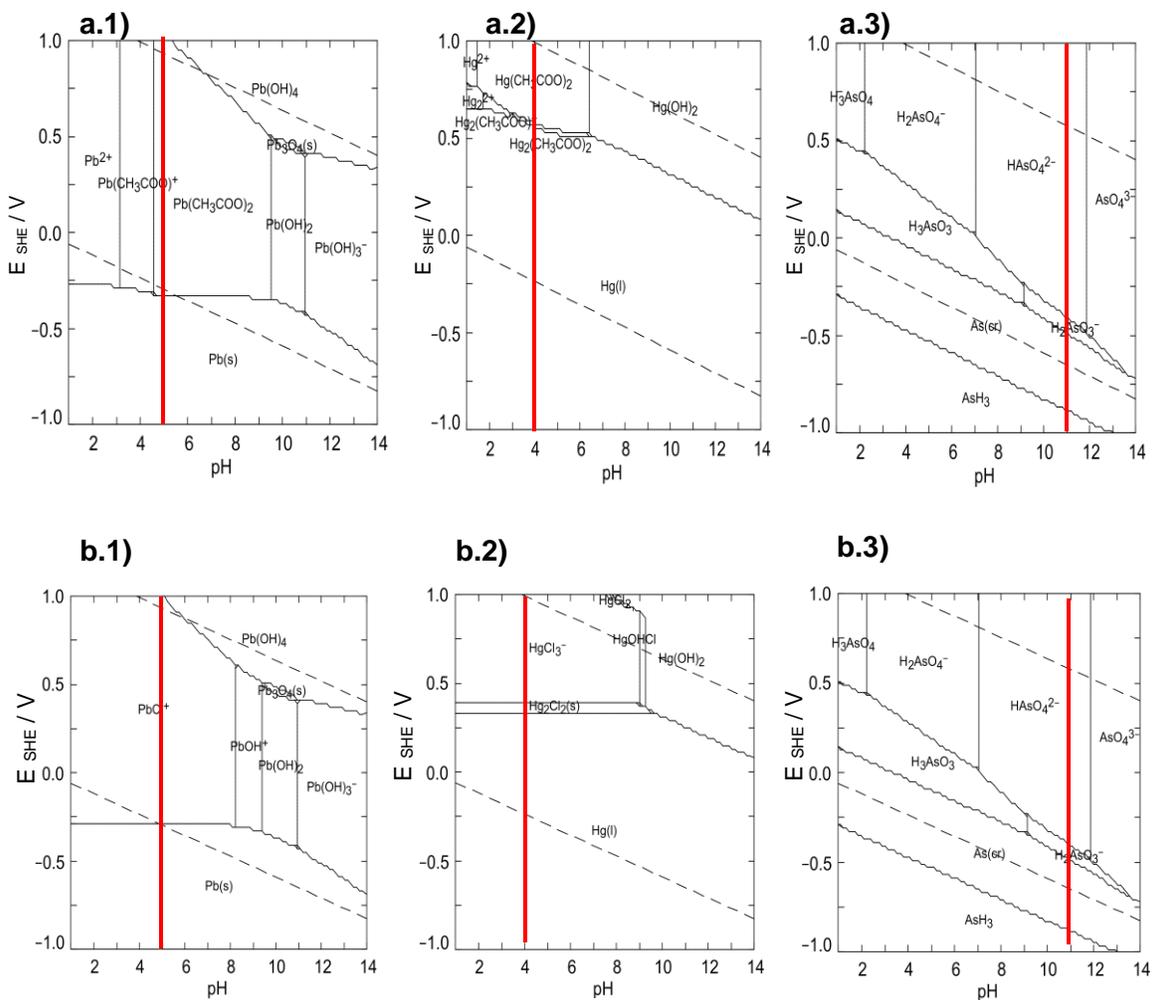


Figura 28 Diagramas de Pourbaix de las especies de Pb(II), Hg(II) y As(III), a) En HCl como electrolito soporte en la celda electroquímica, y b) En el buffer del proceso de carga.

4.6.3 Efecto de la concentración del buffer en la determinación de Pb(II)

Se evaluó la concentración del buffer de acetatos pH 5 empleado en el proceso de carga previo a la determinación electroquímica de Pb(II), para descubrir su grado de influencia sobre la lap, los resultados se muestran en la **Figura 29**.

Los resultados obtenidos muestran una intensidad máxima de lap al emplear la concentración 0.10 M. Al incrementar la concentración podría existir una competencia entre los acetatos y el IIP para complejarse con el Pb(II) de la solución debido a la gran afinidad

de los iones acetato por el ion metálico, lo que provoca la disminución de la lap. Se establece entonces 0.10 M como la concentración óptima de acetatos que maximiza la señal analítica de Pb(II) y para las mediciones de los otros metales de interés de este trabajo.

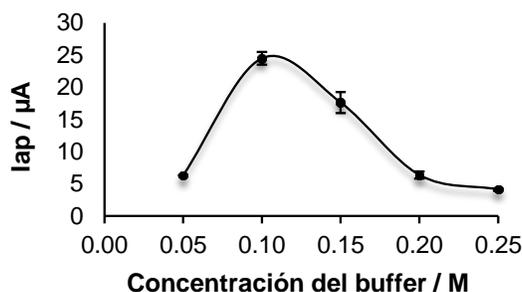


Figura 29 lap obtenida respecto a la concentración del buffer de acetatos pH 5.00.

Condiciones de análisis de Pb(II): CPE-IIP (20% de IIP), 10 µM de Pb(II) en buffer de acetatos pH 5.00 por 10 min con agitación a 400 rpm ; electrodeposición, -1.0 V por 40 s; DPASV: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

4.6.4 Evaluación del tiempo de carga

Se optimizó el tiempo que debe permanecer el CPE-IIP en la solución que contiene al metal de forma que se retenga la mayor cantidad de este y se maximice la lap obtenida en la DPASV. El CPE modificado con Pb(II)-IIP fue sumergido de 1 a 14 minutos en el buffer de acetatos pH 5.00, mientras que el tiempo de carga en el buffer de acetatos pH 4.00 del electrodo modificado con Hg(II)-IIP se evaluó de 0 a 25 minutos; finalmente la evaluación del tiempo de carga del CPE modificado con As(III)-IIP se realizó de 0 a 20 minutos.

Las **Figuras 30a), b) y c)**, muestran la relación de lap obtenida con cada CPE-IIP respecto al tiempo de carga evaluado. Se observa que en todos los casos al incrementar el tiempo de carga hay un aumento gradual de lap debido a que no todas las cavidades del IIP han sido ocupadas por el metal. Posteriormente se presenta un máximo de corriente

alrededor de 25 μA con 10 minutos de carga para Pb(II), una lap de 20 μA para Hg(II) y 125 μA para As(III) durante 15 minutos de carga para ambos.

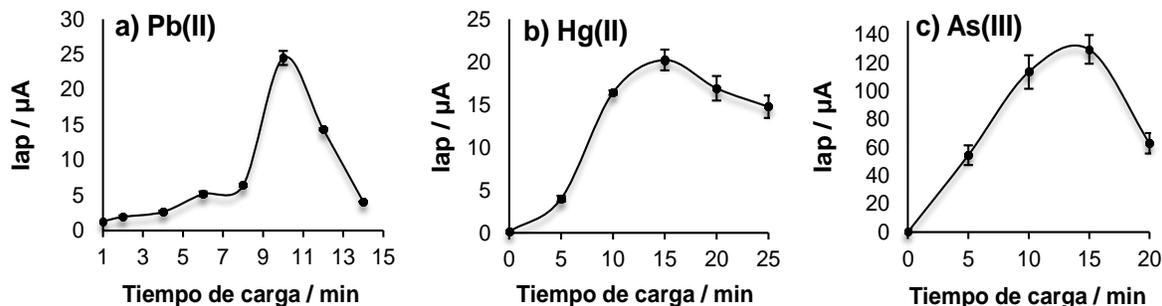


Figura 30 Relación de lap respecto al tiempo de carga para a) Pb(II), b) Hg(II) y c) As(III).

Condiciones de análisis de Pb(II): CPE-IIP (20% de IIP), 10 μM de Pb(II) en buffer de acetatos 0.10 M pH 5.00 con agitación a 400 rpm; electrodeposición, -1.0 V por 40 s. Condiciones de análisis de Hg(II): CPE-IIP(10% de IIP), 50 μM Hg(II) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 4.00, con agitación a 200 rpm; electrodeposición, -0.7 V por 40 s. Condiciones de análisis de As(III): CPE-IIP (20% de IIP), 50 nM de As(III) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 11.00, con agitación a 100 rpm; electrodeposición, -0.6 V por 60 s; DPASV para todos los metales: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

Sin embargo, a tiempos mayores se observa una disminución de la lap para todos los metales ya que probablemente el complejo Metal-IIP en la superficie del electrodo es removido debido a las continuas fuerzas convectivas; obteniendo como resultado una notable disminución de la señal asociada a cada metal. De esta forma, el tiempo de carga que maximiza la lap corresponde a 10 minutos para Pb(II) y 15 minutos para Hg(II) y As(III), por lo que se establecen como los óptimos para las mediciones futuras.

4.7 Evaluación univariable de las condiciones electrodeposición.

Se optimizaron de forma univariable los primeros parámetros de la técnica DPASV correspondientes al potencial y tiempo de reducción sobre la superficie del CPE-IIP, posterior al proceso de carga de iones metálicos.

4.7.1 Potencial de deposición

Se realizaron diversas voltamperometrías de redisolución evaluando potenciales de deposición de -0.90 V a -1.30 V para el CPE-IIP con-Pb(II), de -0.70 a -1.30 con el electrodo modificado con Hg-IIP y de -0.40 a -0.80 V para la determinación de As(III), en todos los casos con intervalos de 0.10 V. Las lap obtenidas en cada determinación se muestran en la **Figura 31**.

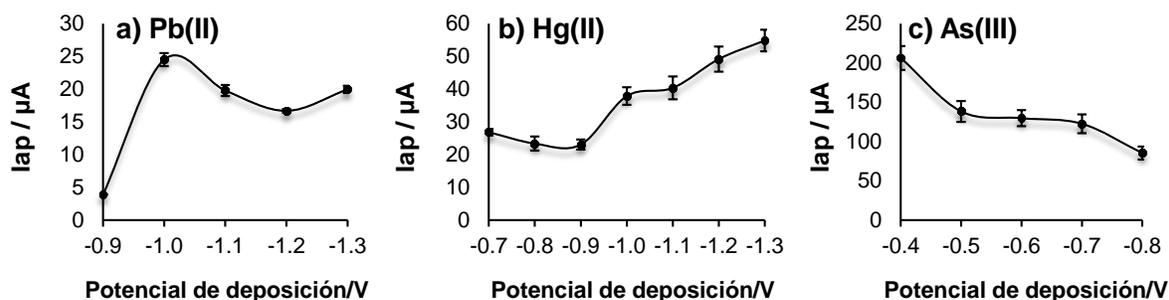


Figura 31 Relación de lap respecto al potencial de electrodeposición: a) Pb(II), b) Hg(II) y c) As(III).

Condiciones de análisis de Pb(II): CPE-IIP (20% IIP), 10 μM de Pb(II) en buffer de acetatos 0.10 M pH 5.00 por 10 min, agitación a 400 rpm ; deposición, 40 s. Condiciones de análisis de Hg(II): CPE-IIP(10% IIP), 50 μM Hg(II) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 4.00, por 15 min, agitación a 200 rpm; deposición, 40 s. Condiciones de análisis de As(III): CPE-IIP (20% IIP), 50 nM de As(III) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 11.00, por 15 min, agitación a 100 rpm; deposición, 60 s; DPASV para todos los metales: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

En las **Figuras 31a) y 31b)** se observa un incremento de la intensidad de corriente al disminuir el potencial catódico de deposición hasta llegar a un máximo de corriente; esto ocurre debido a que la aplicación de un sobrepotencial catódico provoca la rápida reducción del metal; sin embargo, al realizar la reducción a potenciales menores a -1.10 V para Pb(II) y -1.20 V para Hg(II), se observó la formación de pequeñas burbujas sobre la superficie del electrodo, relacionadas con la formación de H_2 perteneciente al agua de la solución. Debido a que estas burbujas podrían disminuir la precisión de los experimentos, se establece -1.10 V como el potencial de deposición de trabajo óptimo para la determinación de Pb(II) y -1.20

V para Hg(II), ya que maximizan la lap obtenida en cada metodología. Respecto al As(III), la **Figura 31c)** muestra una disminución de la lap al disminuir el potencial de deposición hasta -0.80 V; esto sucede debido a la formación de arsina observándose como pequeñas burbujas sobre la superficie del CPE-IIP. Por lo tanto, se establece -0.40 V como el potencial óptimo para las determinaciones futuras de As(III) empleando el CPE-IIP modificado con As-IIP.

4.7.2 Tiempo de deposición

Una vez encontrado el potencial de deposición óptimo, se evaluó el tiempo de deposición bajo las mismas condiciones de carga que en el estudio del potencial. En la **Figura 32**, se observa la variación de la lap al incrementar el tiempo de depósito electroquímico, obteniendo un máximo al mantener el potencial de deposición durante 40 s para Pb(II) y 60 s para Hg(II) y As(III).

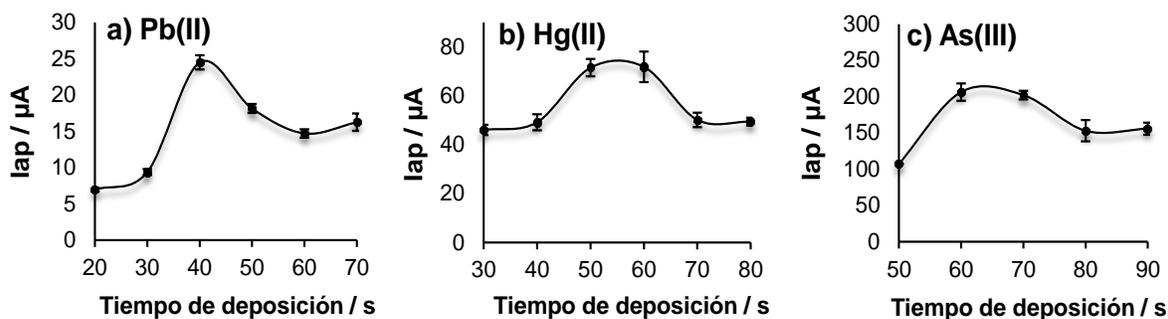


Figura 32 Relación de lap respecto al tiempo de electrodeposición: a) Pb(II), b) Hg(II) y c) As(III).

Condiciones de análisis de Pb(II): CPE-IIP (20% de IIP), 10 µM de Pb(II) en buffer de acetatos 0.10 M pH 5.00 por 10 min con agitación a 400 rpm ; potencial de deposición, -1.1 V. Condiciones de análisis de Hg(II): CPE-IIP(10% de IIP), 50 µM Hg(II) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 4.00, por 15 min con agitación a 200 rpm; potencial de deposición, -1.2 V. Condiciones de análisis de As(III): CPE-IIP (20% de IIP), 50 nM de As(III) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 11.00, por 15 min con agitación a 100 rpm; potencial de deposición, -0.4 V; DPASV para todos los metales: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

Posteriormente, se presenta una disminución con la aplicación de tiempos mayores, debido probablemente a problemas con la adhesión de las especies con estado de oxidación (0) en la superficie del electrodo provocando que estas se desprendan de la superficie de este. Considerando lo anterior, se establece como el tiempo de deposición óptimo de 40 s para Pb(II) y 60 s para Hg(II) y As(III) para los experimentos subsecuentes.

4.7.3 Efecto del electrolito soporte en la determinación de As(III).

Finalmente, se realizó la optimización de la concentración de HCl en el sistema electroquímico de redisolución como se muestra en la **Figura 33**. Debido a que la reducción de As(III) es favorecida en medios fuertemente ácidos, la concentración que proporciona la mayor intensidad de corriente anódica asociada al arsénico corresponde a 3.00 M, por lo que se establece como la concentración óptima del electrolito soporte.

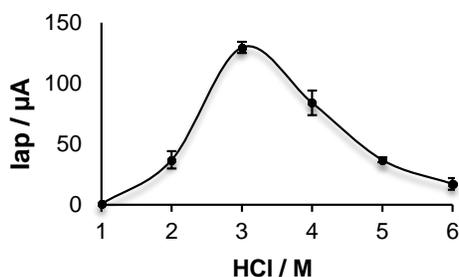


Figura 33 Relación de Iap de As(III) respecto a la concentración de HCl

Condiciones de análisis de As(III): CPE-IIP (20% IIP), As(III) 50 nM en buffer de fosfatos 0.10 M, 15 min, agitación a 100 rpm; electrodeposición, -0.4 V por 60 s; DPASV: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.01 V; amplitud de potencial, 0.1 V, ancho de pulso, 0.01 s; duración de pulso, 0.1 s; n=3, %RSD<10%.

4.8 Optimización de la DPASV con el CPE-Hg(II) mediante Box-Behnken.

Se realizó el análisis de Hg(II) empleando el electrodo modificado con Hg(II)-IIP mediante DPASV, llevando a cabo los 27 experimentos para la optimización de 4 variables a través del diseño Box-Behnken. Los resultados experimentales en términos de Iap se muestra en la **Tabla 20**, respecto a los niveles de cada variable.

Tabla 20 lap experimental obtenida mediante el diseño experimental BBD para la determinación electroquímica de Hg(II) a través de DPV.

No.	(A) Paso de potencial/V	(B) Amplitud de potencial/V	(C) Ancho de pulso/s	(D) Duración de pulso/s	lap experimental / μ A
14	0.0102	0.1500	0.0054	0.1000	150.90
1	0.0054	0.0500	0.0102	0.1000	61.20
3	0.0054	0.1500	0.0102	0.1000	79.10
22	0.0102	0.1500	0.0102	0.0500	60.08
15	0.0102	0.0500	0.0150	0.1000	58.70
6	0.0102	0.1000	0.0150	0.0500	86.60
20	0.0150	0.1000	0.0150	0.1000	61.90
27	0.0102	0.1000	0.0102	0.1000	78.20
7	0.0102	0.1000	0.0054	0.1500	154.00
9	0.0054	0.1000	0.0102	0.0500	76.60
24	0.0102	0.1500	0.0102	0.1500	68.10
11	0.0054	0.1000	0.0102	0.1500	59.10
5	0.0102	0.1000	0.0054	0.0500	102.00
23	0.0102	0.0500	0.0102	0.1500	67.60
18	0.0150	0.1000	0.0054	0.1000	99.00
21	0.0102	0.0500	0.0102	0.0500	72.40
12	0.0150	0.1000	0.0102	0.1500	51.00
4	0.0150	0.1500	0.0102	0.1000	68.50
17	0.0054	0.1000	0.0054	0.1000	102.00
16	0.0102	0.1500	0.0150	0.1000	65.60
13	0.0102	0.0500	0.0054	0.1000	115.00
19	0.0054	0.1000	0.0150	0.1000	68.20
26	0.0102	0.1000	0.0102	0.1000	70.00
10	0.0150	0.1000	0.0102	0.0500	80.60
25	0.0102	0.1000	0.0102	0.1000	74.80
8	0.0102	0.1000	0.0150	0.1500	67.09
2	0.0150	0.0500	0.0102	0.1000	83.40

Utilizando el software Minitab® y el análisis de varianza (ANOVA), la relación entre la variable de respuesta lap y los parámetros evaluados de la DPV resultó satisfactoria al considerar una función de respuesta basada en el modelo polinomial cuadrático de la **Ecuación 8**, con un R² de 85 % aceptable estadísticamente de acuerdo con el análisis t de student para coeficientes de correlación descrito en el **Anexo 7.1**.

$$\begin{aligned} \text{lap Hg(II)} = & 74.34 - 0.14 A + 2.83 B - 26.22 C - 0.96 D \\ & - 7.43 A^*A + 0.06 B^*B + 22.59 C^*C - 0.63 D^*D - 8.22 \\ & A^*B - 0.80 A^*C - 3.06 A^*D - 7.23 B^*C + 3.22 B^*D - \\ & 17.88 C^*D \end{aligned}$$

Ecuación 8 Ecuación de superficie de la optimización de DPASV para Hg(II).

Función de respuesta mediante el diseño Box-Behnken

En la prueba de bondad de ajuste (relacionada con el error puro) se obtuvo un valor de $p=0.06$. Considerando que valores $p>0.05$, implican un efecto no significativo, se concluye que se cuenta con un buen ajuste de los datos experimentales con el modelo predicho y una buena correlación entre los valores experimentales y predichos.

La función de respuesta obtenida se visualiza mejor mediante los gráficos tridimensionales de superficie de respuesta de la **Figura 34**, graficados considerando dos factores y la variable respuesta lap, mientras que las otras variables se mantuvieron constantes en su nivel medio, obteniendo seis gráficos (**Figuras 34 a, b, c, d, e y f**), donde se observa el efecto de las variables dependientes y los efectos de interacción entre la lap y las variables experimentales, que solo se pueden encontrar a través del diseño experimental y el análisis estadístico, siendo en este caso la variable de amplitud de pulso (C) la que proporciona el mayor efecto sobre la función de respuesta de la **Ecuación 8**. Adicionalmente, a través de todas las combinaciones de las variables se puede sugerir la lap máxima predicha.

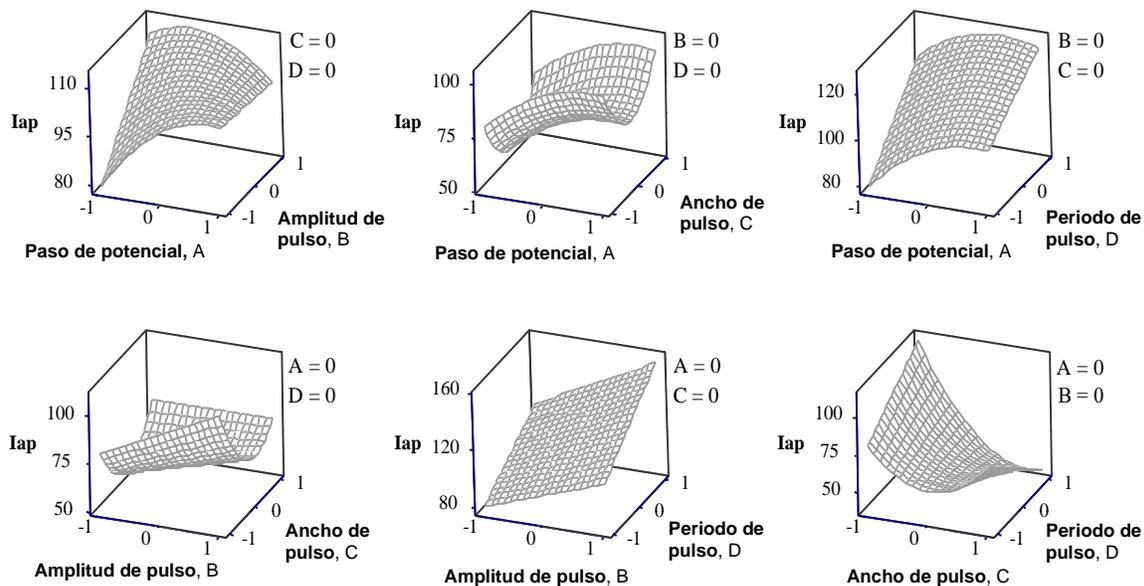


Figura 34 Gráficos tridimensionales de superficie de respuesta obtenidos a partir de la optimización de variables de DPV para el análisis de Hg(II).

La optimización predice una intensidad de I_{ap} de 156 μA considerando valores de 0.11 V de paso de potencial, 0.15 s de amplitud, 0.005 V de ancho de pulso y 0.15 s de duración de pulso.

En el análisis confirmatorio por triplicado en las condiciones optimizadas, se obtuvo una I_{ap} de 144.00 μA con un $\%RSD < 10\%$, claramente cercana a la respuesta predicha (156 μA) por el diseño y estadísticamente aceptable de acuerdo con el estadístico t de student descrito en el **Anexo 7.2**, lo que confirma el buen ajuste del modelo.

De acuerdo con la **Figura 34**, el efecto de la interacción entre las variables DPV demostró que los bajos pasos de potencial y ancho de pulso, combinado con una alta duración de pulso y amplitud, proporcionan una I_{ap} más intensa, sin ruido instrumental, con un pico anódico y línea base bien definidos.

4.9 Optimización de la DPASV con el CPE-As(III) mediante el Diseño de Taguchi

Los resultados obtenidos del análisis de As(III) bajo las combinaciones de los parámetros de la DPV propuestos por el diseño de Taguchi se muestran en la **Tabla 21**.

Tabla 21 lap experimental obtenida mediante el diseño experimental de Taguchi para la determinación electroquímica de As(III) a través de DPV.

No.	(A) Paso de potencial/V	(B) Amplitud de potencial/V	(C) Ancho de pulso/s	(D) Duración de pulso/s	lap experimental/ μA
1	0.0054	0.05	0.0054	0.05	110.30
2	0.0054	0.10	0.0096	0.10	157.25
3	0.0054	0.15	0.0150	0.15	172.90
4	0.0096	0.05	0.0096	0.15	55.30
5	0.0096	0.10	0.0150	0.05	124.70
6	0.0096	0.15	0.0054	0.10	197.70
7	0.0150	0.05	0.0150	0.10	82.20
8	0.0150	0.10	0.0054	0.15	188.90
9	0.0150	0.15	0.0096	0.05	202.70

De acuerdo con el diseño de experimentos y la gráfica de interacciones se determina que la combinación óptima que maximiza la lap de As(III) corresponde a un paso de potencial de 0.015 V, amplitud de 0.15 V, ancho del pulso se 0.0054 s y una duración de potencial de 0.10 s, con la que se espera una lap predicha de 195.68 μA .

El análisis bajo las condiciones optimizadas proporciona una intensidad de lap de 220.00 μA , demostrando la capacidad de predicción del diseño utilizado para la optimización de los parámetros de la DPV empleando el electrodo modificado con As(III)-IIP, debido a que las respuesta predicha y experimental son estadísticamente cercanas de acuerdo con el cálculo del estadístico t de student, del **Anexo 7.2**.

4.10 Caracterización analítica

Las metodologías electroquímicas optimizadas para determinar Pb(II), Hg(II) y As(III) utilizando electrodos modificados fueron caracterizadas a través de la construcción de curvas de calibración para obtener los parámetros analíticos y asegurar que los métodos desarrollados son adecuados para la determinación de trazas de iones metálicos en términos de exactitud, precisión y selectividad.

4.10.1 Parámetros analíticos de la determinación de Pb(II).

Se construyó una curva de calibración a través del análisis de seis concentraciones estándar de Pb(II) en 20 mL de buffer de acetatos pH 5.00, los voltamperogramas correspondientes al análisis se muestran en la **Figura 35** con un inserto que representa la linealidad del método en el intervalo de 3.30 mg L⁻¹ (10 µM) a 33.00 mg L⁻¹ (100 µM) con una sensibilidad analítica de 2.10 µA µM y un coeficiente R² de 0.9995. Del adecuado análisis estadístico de los datos de la curva de calibración, se obtuvo un límite de detección de 0.99 mg L⁻¹ (3.01 µM) y de cuantificación de 3.30 mg L⁻¹ (10 µM) de calculado mediante las **Ecuaciones 2 y 3**.

La precisión fue evaluada con una concentración de 10 µM de Pb(II), en términos de repetibilidad obteniendo un %RSD de 5.60% y de precisión intermedia (utilizando 3 electrodos diferentes, n=5 cada uno) con %RSD de 6.60%.

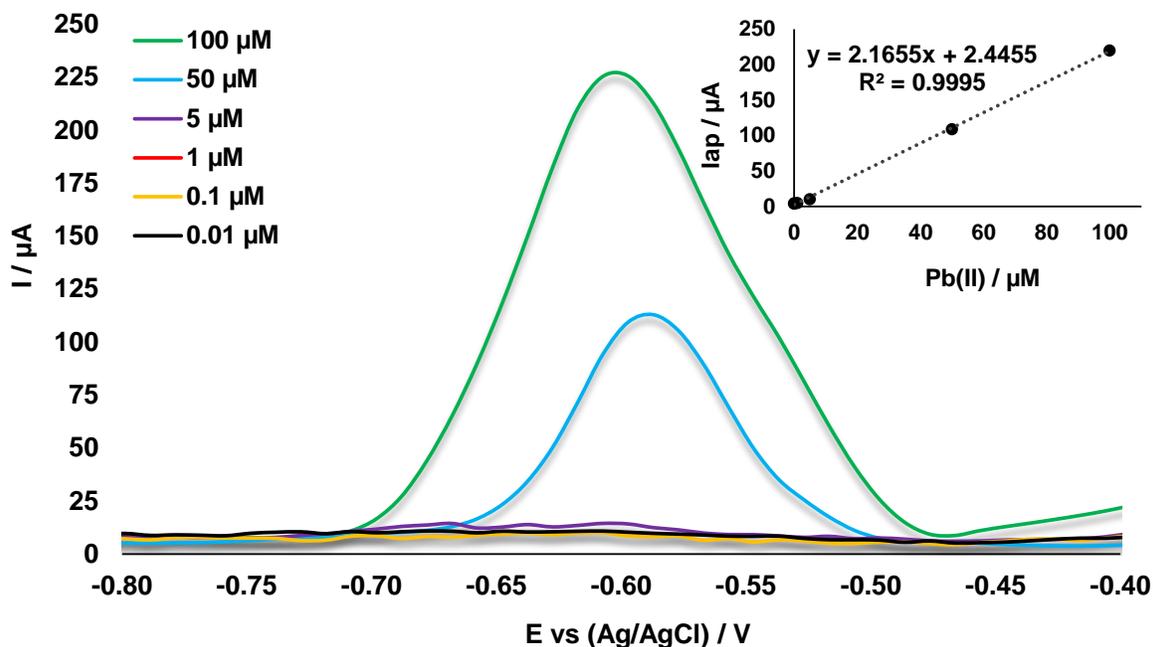


Figura 35 DPASV de diferentes concentraciones de Pb(II); (Inserto: curva de calibración de Pb(II) con $n=3$ y $\%RSD < 10\%$).

Condiciones de análisis de Pb(II): CPE-IIP (20% de IIP), $10 \mu M$ de Pb(II) en buffer de acetatos $0.10 M$ pH 5.00 por 10 min con agitación a 400 rpm ; electrodeposición, $-1.10 V$ por 40 s DPASV: equilibrio, 20 s; paso de potencial, $0.01 V$; amplitud de potencial, $0.10 V$, ancho de pulso, $0.01 s$; duración de pulso, $0.10 s$; $n=3$, $\%RSD < 10\%$.

4.10.2 Parámetros analíticos de la determinación de Hg(II).

Se obtuvieron los voltamperogramas de la **Figura 36** que representan las diferentes concentraciones evaluadas de Hg(II) bajo la metodología optimizada. La determinación de Hg(II) presentó linealidad en el intervalo de 0.14 mg L^{-1} ($0.46 \mu M$) a 32.50 mg L^{-1} ($100 \mu M$) con una sensibilidad analítica de $3.15 \mu A \mu M$, un coeficiente R^2 de 0.9998, límite de detección de 0.044 mg L^{-1} ($0.13 \mu M$) y límite de cuantificación de 0.14 mg L^{-1} ($0.46 \mu M$). La precisión fue evaluada con una concentración de Hg(II) de 1.00 mg L^{-1} ($1 \mu M$) y 10.00 mg L^{-1} ($10 \mu M$) en términos de repetibilidad y precisión intermedia (utilizando 3 electrodos diferentes, $n=5$ cada uno), obteniendo $\%RSD$ de 2.80% y 5.40%, respectivamente.

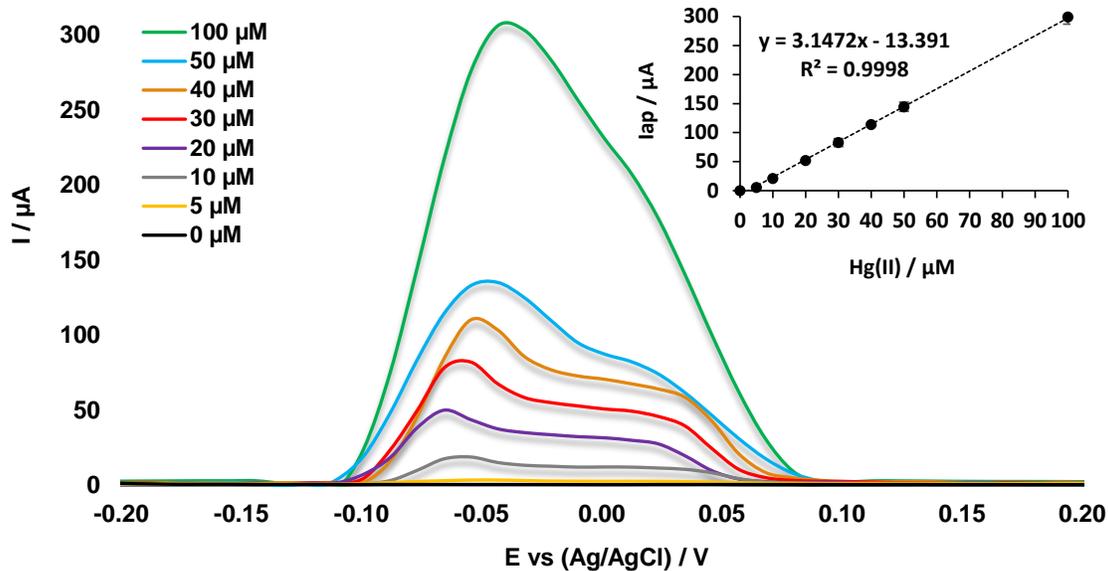


Figura 36 DPASV de diferentes concentraciones de Hg(II); (Inserto: curva de calibración de Hg(II) con $n=3$ y $\%RSD < 10\%$).

Condiciones de análisis de Hg(II): CPE-IIP(10% de IIP), 50 μM Hg(II) en buffer de fosfatos 0.10 M pH 4.00, 15 min con agitación a 200 rpm; electrodeposición, -1.20 V por 50 s. DPASV: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.11 V; amplitud de potencial, 0.15 V, ancho de pulso, 0.005 s; duración de pulso, 0.15 s; $n=3$, $\%RSD < 10\%$.

4.10.3 Parámetros analíticos de la determinación de As(III).

Mediante el análisis estadístico de la curva de calibración (voltamperogramas de la **Figura 37**) se obtuvieron dos zonas con tendencia lineal de la determinación de As(III) que se muestran en la **Figura 38**: a bajas concentraciones dentro de un intervalo de 0.026 mg L⁻¹ (0.35 nM) a 0.075 mg L⁻¹ (1 nM) con una sensibilidad analítica de 82.061 μA nM⁻¹, coeficiente R² de 0.9981, un límite de detección de 0.007 mg L⁻¹ (1 nM) y un límite de cuantificación de 0.026 mg L⁻¹ (0.35 nM); mientras que a altas concentraciones se presentó un intervalo lineal de 17.00 mg L⁻¹ (220 nM) a 52.00 mg L⁻¹ (700 nM) con una sensibilidad de 0.3895 μA nM⁻¹ con coeficiente R² de 0.9965. La precisión fue evaluada con una concentración de As(III) de 50 nM en términos de repetibilidad y precisión intermedia (utilizando 3 electrodos diferentes, $n=5$ para cada uno), obteniendo porcentajes de $\%RSD < 10\%$ en ambos casos.

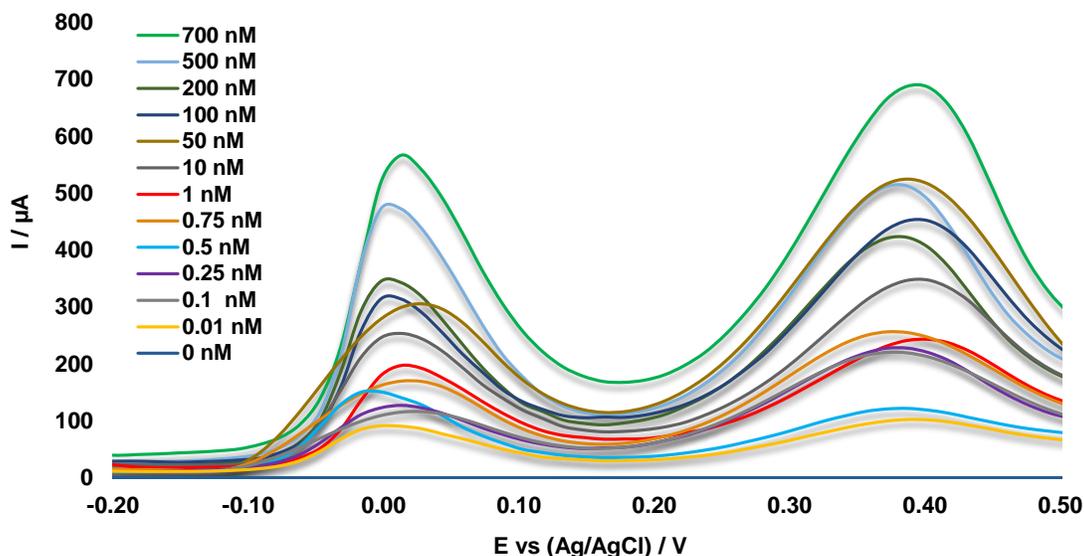


Figura 37 DPASV de distintas concentraciones de As(III) (pico anódico a 0.00 V)

Condiciones de análisis de As(III): CPE-IIP (20% IIP), As(III) 50 nM en buffer de fosfatos 0.10 M, 15 min, agitación a 100 rpm; electrodeposición, -0.40 V por 60 s; DPASV: equilibrio, 20 s; paso de potencial, 0.015 V; amplitud de potencial, 0.15 V, ancho de pulso, 0.0054 s; duración de pulso, 0.10 s; n=3, %RSD<10%.

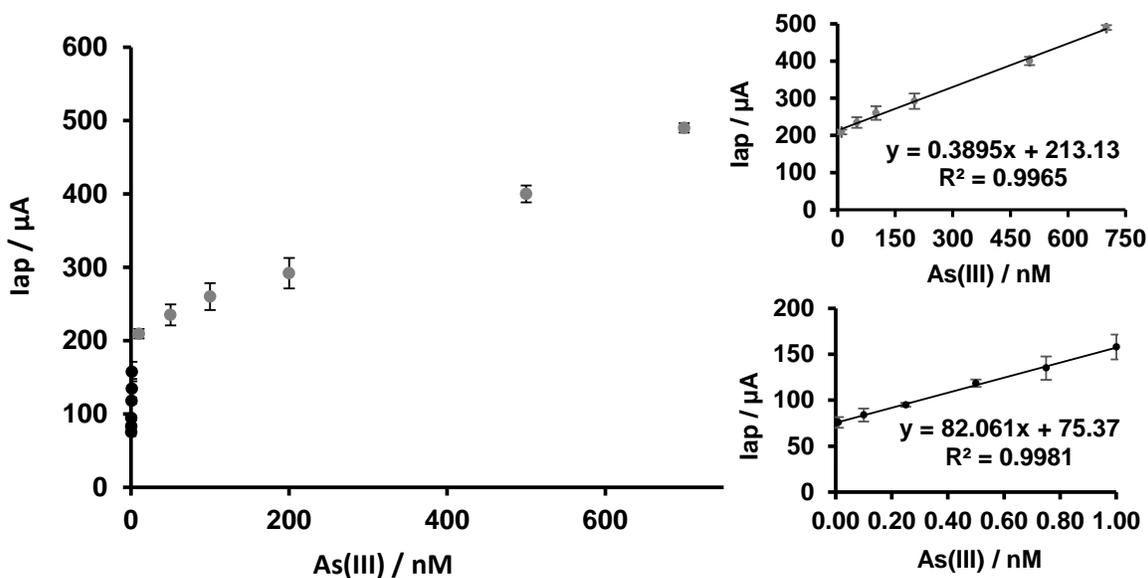


Figura 38 Intervalos lineal de la curva de calibración de As(III) de la señal de oxidación alrededor de 0.00 V; a) Curva de calibración completa, b) Linealidad a bajas concentraciones y c) Linealidad a altas concentraciones; n=3; %RSD<10%,

4.11 Pruebas de selectividad

Para determinar el efecto de los iones metálicos que pueden interferir en la medición de la intensidad de corriente respecto al metal de interés, se evaluó el comportamiento del porcentaje de recuperación (**Ecuación 5**) de Pb(II), Hg(II) y As(III), sin adición de interferentes y con la adición individual diversos niveles de Cd(II), Fe(II), Hg(II), Cu(II) y As(III) de acuerdo con su valor de MPL en agua potable (MPL/10, MPL/100, MPL, MPL*10 y MPL*100), y los resultados se muestra en las **Figura 39, 40 y 41**, y se resumen en la **Tabla 22**. Las barras de color negro representan el porcentaje de recuperación del analito de interés sin interferencias, mientras que el resto de las barras representa la recuperación del analito en presencia de los diferentes niveles de interferencias.

En general, las recuperaciones obtenidas con los tres CPE-IIPs fueron cercanas al 100%, demostrando que las cavidades de reconocimiento sobre la superficie del CPE-IIP son capaces de retener selectivamente al metal de interés en presencia de diversos interferentes, incluso del mismo o diferente número de oxidación. Sin embargo, en la metodología del Pb(II), cuando se agregó 100 veces la concentración de Hg(II) y Cu(II) respecto a su MPL, se presentó una notablemente disminución de la lap hasta un 70%, como se muestra en la **Figura 39**. Esto se puede atribuir a la competencia entre las altas concentraciones de interferentes (del mismo o más grande radio atómico) y el analito, por ocupar las cavidades de reconocimiento selectivo. Respecto al análisis de Hg(II), la **Figura 40** muestra que al evaluar una mezcla de 100 veces por encima el límite máximo permitido para todos los interferentes juntos, aunque no se presentaron picos adicionales al relacionado con la oxidación de Hg (0), la lap disminuyó hasta un 20 %. El notable decremento de lap asociada a Hg(II) se debe a la interacción del material con la gran cantidad de interferentes en la solución, sin embargo, es imposible encontrar en el medio ambiente una solución que contenga una concentración de los interferentes evaluados en la mezcla extremadamente fuera de sus MPL's.

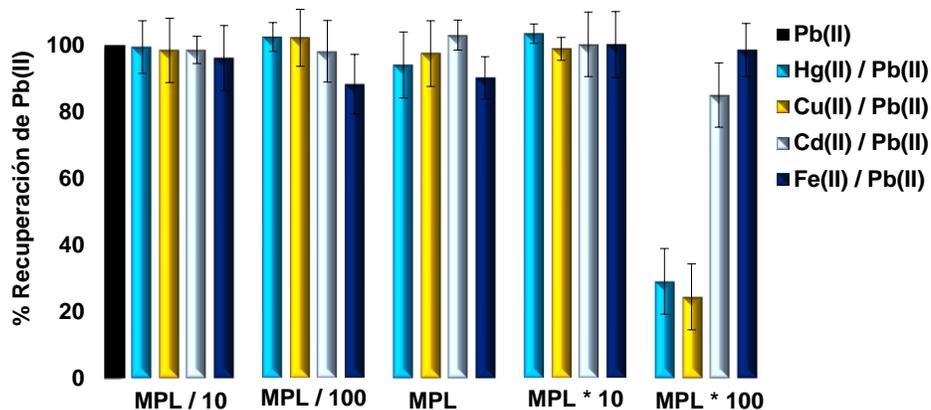


Figura 39 Porcentajes de recuperación de 50 µM Pb(II) en presencia de diversos interferentes, n=3, %RSD<10%.

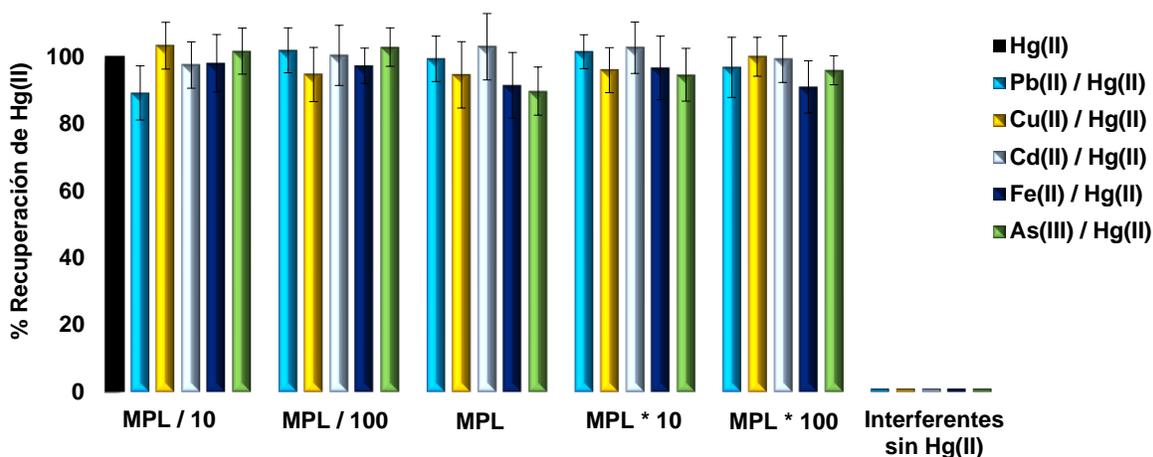


Figura 40 Porcentajes de recuperación de 50 µM Hg(II) en presencia de diversos interferentes a diferentes concentraciones, n=3, %RSD<10%.

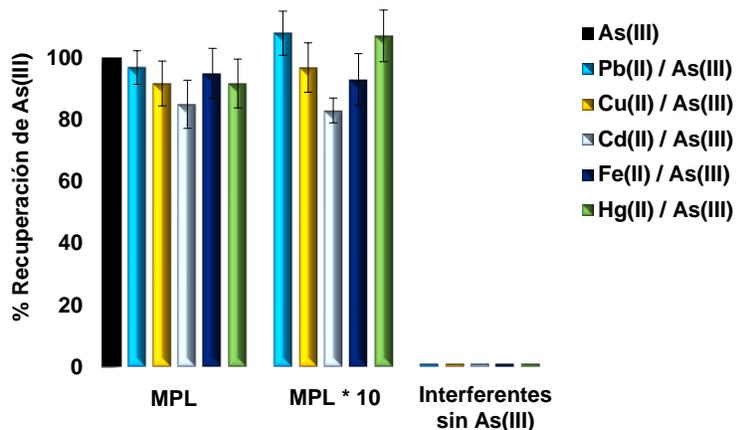


Figura 41 Porcentajes de recuperación de 50 nM As(III) en presencia de diversos interferentes a diferentes concentraciones, n=3, %RSD<10%.

La determinación de 50 nM de As(III) en presencia de diversos interferentes se realizó únicamente en dos concentraciones correspondientes al MPL y al MPL*10 (MPL de cada interferente), debido a la formación de hidroxocomplejos de los interferentes en el buffer de carga de fosfatos pH 11. Como se muestra en la **Figura 41** y **Tabla 22**, se obtuvieron recuperaciones de As(III) cercanas al 100%.

Tabla 22 Porcentajes de recuperación obtenidos en la prueba de selectividad para cada Pb(II), Hg(II) y As(III).

Metal	Interferente		% Recuperación de 50 µM de Pb(II)	% Recuperación de 50 µM de Hg(II)	% Recuperación de 50 nM de As(III)
	Nivel	Concentración			
Pb(II)	MPL/100	4.53x10 ⁻¹⁰ M	---	89.15 ± 7.90	Hidroxocomplejos
	MPL/10	4.53x10 ⁻⁰⁹ M	---	101.90 ± 6.69	Hidroxocomplejos
	MPL	4.53x10 ⁻⁰⁸ M	---	99.37 ± 6.78	96.89 ± 8.10
	MPL*10	4.53x10 ⁻⁰⁷ M	---	101.49 ± 5.08	108.00 ± 8.40
	MPL*100	4.53x10 ⁻⁰⁶ M	---	96.81 ± 9.01	Hidroxocomplejos
Hg(II)	MPL/100	6.16x10 ⁻¹¹ M	99.47 ± 7.91	---	Hidroxocomplejos
	MPL/10	6.16x10 ⁻¹⁰ M	102.49 ± 4.34	---	Hidroxocomplejos
	MPL	6.16x10 ⁻⁰⁹ M	94.08 ± 8.90	---	91.75 ± 7.91
	MPL*10	6.16x10 ⁻⁰⁸ M	103.48 ± 2.91	---	107.16 ± 8.36
	MPL*100	6.16x10 ⁻⁰⁷ M	28.99 ± 9.80	---	Hidroxocomplejos
As(III)	MPL/100	5.05x10 ⁻¹⁰ M	No realizado	101.66 ± 6.88	---
	MPL/10	5.05x10 ⁻⁰⁹ M	No realizado	102.84 ± 5.75	---
	MPL	5.05x10 ⁻⁰⁸ M	No realizado	89.69 ± 7.18	---
	MPL*10	5.05x10 ⁻⁰⁷ M	No realizado	94.60 ± 7.89	---
	MPL*100	5.05x10 ⁻⁰⁶ M	No realizado	95.96 ± 4.33	---
Cu(II)	MPL/100	6.93x10 ⁻⁰⁸ M	99.45 ± 9.66	103.26 ± 6.97	Hidroxocomplejos
	MPL/10	6.93x10 ⁻⁰⁷ M	102.23 ± 8.59	94.67 ± 8.10	Hidroxocomplejos
	MPL	6.93x10 ⁻⁰⁶ M	97.50 ± 9.90	94.55 ± 9.10	91.76 ± 7.26
	MPL*10	6.93x10 ⁻⁰⁵ M	98.91 ± 3.45	95.99 ± 6.71	96.89 ± 8.00
	MPL*100	6.93x10 ⁻⁰⁴ M	24.32 ± 9.70	99.99 ± 5.82	Hidroxocomplejos
Cd(II)	MPL/100	2.11x10 ⁻¹⁰ M	98.61 ± 4.09	97.52 ± 6.92	Hidroxocomplejos
	MPL/10	2.11x10 ⁻⁰⁹ M	98.15 ± 9.26	100.37 ± 9.00	Hidroxocomplejos
	MPL	2.11x10 ⁻⁰⁸ M	103.05 ± 4.51	102.97 ± 9.70	85.00 ± 7.80
	MPL*10	2.11x10 ⁻⁰⁷ M	100.26 ± 9.70	102.68 ± 7.67	83.00 ± 4.00
	MPL*100	2.11x10 ⁻⁰⁶ M	85.03 ± 9.69	99.25 ± 6.94	Hidroxocomplejos
Fe(II)	MPL/100	1.24x10 ⁻⁰⁸ M	96.20 ± 9.73	98.00 ± 8.57	Hidroxocomplejos
	MPL/10	1.24x10 ⁻⁰⁷ M	88.25 ± 9.00	97.28 ± 5.24	Hidroxocomplejos
	MPL	1.24x10 ⁻⁰⁶ M	90.23 ± 6.31	91.43 ± 9.79	95.00 ± 8.10
	MPL*10	1.24x10 ⁻⁰⁵ M	100.20 ± 9.09	96.60 ± 9.49	93.00 ± 8.40
	MPL*100	1.24x10 ⁻⁰⁴ M	98.55 ± 8.00	90.94 ± 7.82	Hidroxocomplejos

4.12 Determinación de metales en agua mediante DPASV empleando CPE-IIPs.

Se llevó a cabo la determinación de metales en diversas muestras reales de agua utilizando cada CPE-IIP y la metodología propuesta optimizada en esta investigación. Las muestras fueron analizadas, con y sin pretratamiento de digestión ácida mediante DPASV. Ninguna de las muestras presentó picos de oxidación que puedan ser asociados a alguno de los metales de interés. Por otro lado, las mismas muestras se doparon con cierta concentración del ion metálico, los resultados se muestran en la **Tabla 23**.

Tabla 23 Determinación de metales en diversas muestras reales con los electrodos modificados con IIPs; n=3.

Metal	Muestra	Conc. añadida	CON DIGESTIÓN ÁCIDA		SIN DIGESTIÓN ÁCIDA	
			Conc. obtenida	% Rec.	Conc. obtenida	% Rec.
Pb(II)	Agua comercial	0 μ M	0 μ M	0	No realizado	No realizado
		50 μ M	(49.70 \pm 0.60) μ M	(99.40 \pm 1.30)	No realizado	No realizado
	Presa	0 μ M	0 μ M	0	No realizado	No realizado
		50 μ M	(49.20 \pm 1.40) μ M	(98.8 \pm 2.9)	No realizado	No realizado
	Cascada	0 μ M	0 μ M	0	No realizado	No realizado
		50 μ M	(51.20 \pm 1.90) μ M	(102.5 \pm 3.60)	No realizado	No realizado
Hg(II)	Agua comercial	0 μ M	0 μ M	0	0 μ M	0
		50 μ M	(50.40 \pm 7.60) μ M	(100 \pm 7.50)	(49.10 \pm 4.40) μ M	(98.30 \pm 4.90)
	Presa 1	0 μ M	0 μ M	0	0 μ M	0
		50 μ M	(50.40 \pm 6.40) μ M	(100 \pm 6.40)	(50.30 \pm 4.00) μ M	(100 \pm 4.80)
	Presa 2	0 μ M	0 μ M	0	0 μ M	0
		50 μ M	(49.40 \pm 5.30) μ M	(98.70 \pm 5.40)	(49.40 \pm 6.30) μ M	(98.90 \pm 6.40)
As(III)	Agua comercial	0 nM	0 nM	0	0 nM	0
		50 nM	(48.50 \pm 1.90) nM	(96.89 \pm 1.80)	(49.70 \pm 3.70) nM	(99.46 \pm 3.60)
	Grifo	0 nM	0 nM	0	0 nM	0
		50 nM	(48.20 \pm 5.40) nM	(96.40 \pm 5.40)	(50.50 \pm 2.00) nM	(101 \pm 2.90)
	Presa	0 nM	0 nM	0	0 nM	0
		50 nM	(49.50 \pm 6.00) nM	(98.90 \pm 6.00)	(53.80 \pm 7.60) nM	(107.20 \pm 7.60)

Conc. : Concentración, **%Rec**: porcentaje de recuperación.

Los porcentajes de recuperación obtenidos y su correspondiente desviación estándar indican que cada CPE-IIP tiene gran capacidad para determinar iones metálicos con exactitud, precisión y selectividad en muestras reales incluso sin pretratamiento de digestión ácida; demostrando que el uso de los IIPs enriquece la composición de un CPE y mejora sus características hacia la determinación altamente selectividad de metales pesados en muestras de agua.

5.0 Conclusiones

Los IIPs sintetizados químicamente y optimizados en esta investigación representan el primer material de reconocimiento selectivo que utiliza pirrol como monómero funcional para un Hg(II)-IIP y la combinación de 2-metil tiofeno-MAA para obtener un As(III)-IIP.

La optimización de cada IIP demostró que se debilita la interacción monómero-plantilla con un exceso de estos componentes en la síntesis, mientras que una cantidad limitada de entrecruzante propicia poca o nula formación de la matriz polimérica y por lo tanto pobre estabilidad de las cavidades, reflejándose como una disminución en la señal asociada al metal.

La presencia y ausencia de algunas bandas en la caracterización infrarroja de los polímeros obtenidos confirmó el éxito de la síntesis así como la capacidad del IIP para retener al metal respecto al NIP.

Se comprobó que el uso de un IIP altamente entrecruzado como un nuevo agente modificador en el CPE, proporciona gran estabilidad a la matriz polimérica y una capacidad superior para retener al analito de interés en comparación con el CPE y CPE-NIP evaluado mediante la lap obtenida con la técnica DPASV, debido a las propiedades únicas del IIP que permitieron la eliminación de la plantilla pero bajo las condiciones adecuadas, también permitieron coordinarse con el analito nuevamente en forma, tamaño e interacciones con las cavidades de reconocimiento.

La mezcla composite de IIP/grafito en cada CPE-IIP que maximiza I_{pa} mediante DPASV fue de 20%/80% para Pb(II), 10%/90% para Hg(II), 20%/80% para As(III), esto debido a una mayor cantidad de cavidades de IIP en la superficie del CPE-IIP capaces de retener al ion metálico.

La optimización univariable del proceso de carga y del sistema electroquímico permitió encontrar la combinación de la velocidad de agitación, tiempo de carga, pH del medio y condiciones de deposición electroquímica, que maximizan la señal de cada metal con su respectivo electrodo sin presentar problemas de resistencia, efectos de convección negativos y formación de H_2 o de arsina.

La aplicación de diseños experimentales como Taguchi y Box-Behnken para la optimización de DPV permitió evaluar el efecto de interacción entre las variables críticas de la técnica voltamperométrica sobre la respuesta del electrodo.

La caracterización analítica de cada metodología mostró parámetros analíticos satisfactorios que sugieren que los métodos electroquímicos desarrollados son adecuados para el uso propuesto, debido a los bajos límites de detección, la alta sensibilidad y el amplio intervalo lineal obtenidos con los CPE-IIPs comparado con otras propuestas. En la **Tabla 24**, se presenta un resumen de las metodologías optimizadas y resultados obtenidos, así como la comparación respecto al límite máximo permitido de cada metal.

Las tres metodologías electroquímicas desarrolladas representan una alternativa económica, competitiva, novedosa, rápida y altamente selectiva para determinar trazas de tres de los metales más tóxicos en el medio ambiente, Pb(II), Hg(II) y As(III), en muestras de agua sin la necesidad de un procedimiento de preconcentración o tratamiento de digestión ácida previo al análisis, esto convierte a los IIPs en materiales altamente viables para la determinación oportuna de trazas de iones metálicos, en virtud de su gran capacidad para reconocer al analito selectivamente en diversas muestras debido a su principio de impresión molecular con el que son sintetizados.

Tabla 24 Resumen y comparación de resultados obtenidos respecto al MPL de cada metal.

Resultados obtenidos		Pb(II)	Hg(II)	As(III)
IIP óptimo	Plantilla	0.50 mmol	0.50 mmol	0.50 mmol
	Monómero (s)	0.00 mmol MAA y 4.00 mmol 4-VP	10 mmol Py	1.00 mmol 2-MT y 5 mmol MAA
	Entrecruzante	40 mmol	30 mmol	50 mmol
	Iniciador	5 mmol	50 mmol	50 mmol
	Porógeno	20 mL	20 mL	20 mL
	Relación molar	1:8:80	1:20:60	1:12:100
Comparación de respuesta experimental	CPE-IIP	87.00% ± 8.70%	18.20 µA ± 1.40 µA	113.50 µA ± 2.50 µA
	CPE-NIP	21.70% ± 0.30%	1.50 µA ± 0.10 µA	28.32 µA ± 0.50 µA
Proceso de carga óptimo	% IIP	20%	10%	20%
	Tiempo	10 min	15 min	15
	Agitación	400 rpm	200 rpm	100 rpm
	Buffer de carga	Acetatos 0.1 M pH 5.00	Acetatos 0.1 M pH 4.00	Fosfatos 0.1 M pH 11.00
Electro-deposición óptima	Potencial	-1.10 V	-1.20 V	-0.40V
	Tiempo	40 s	50 s	60 s
	Electrolito soporte	HCl 0.10 M	HCl 0.10 M	HCl 3.00 M
DPV	Paso de potencial	0.01 V	0.11 V	0.015 V
	Amplitud de potencial	0.10 V	0.15 V	0.15 V
	Ancho de pulso	0.01 s	0.0050 s	0.0054 s
	Duración de pulso	0.10 s	0.15 s	0.10 s
Parámetros analíticos	Intervalo lineal	(3.30 a 33) mg L ⁻¹	(0.14 a 32.50) mg L ⁻¹	(0.026 a 0.075) mg L ⁻¹ (17.00 a 700) mg L ⁻¹
	R ²	0.9995	0.9998	0.9981 0.9965
	Sensibilidad analítica	2.14 µA µM ⁻¹	3.15 µA µM ⁻¹	82.06 µA nM ⁻¹ 0.3895 µA nM ⁻¹
	LOD	0.99 mg L ⁻¹	0.044 mg L ⁻¹	0.007 mg L ⁻¹
	LOQ	3.30 mg L ⁻¹	0.14 mg L ⁻¹	0.026 mg L ⁻¹
	MPL en agua potable	0.015 mg L ⁻¹	0.002 mg L ⁻¹	0.010 mg L ⁻¹

6.0 Perspectivas.

La tecnología de impresión molecular con interacciones de coordinación monómero-plantilla demostró ser una estrategia versátil para crear nuevos receptores poliméricos potencialmente útiles para la determinación de metales con alta selectividad.

La investigación desarrollada en este trabajo representa un gran precedente para futuras investigaciones ya que la modificación de electrodos es un procedimiento sencillo, de bajo costo, y su uso con técnicas como DPASV da como resultado metodologías amigables con el medio ambiente, con excelentes parámetros analíticos comparables con metodologías convencionales para la cuantificación de iones metálicos tóxicos. Por lo tanto, el análisis de muestras de diversos alimentos, plantas, cosméticos y aguas residuales podría ser considerado como perspectiva relacionada con este proyecto, implementando metodologías de tratamiento de muestras con la menor cantidad de tiempo y recursos.

La determinación de Pb(II) y Hg(II) en concentraciones cercanas a sus límites máximos permitidos, podría lograrse a través de la implementación de procedimientos de preconcentración o mediante la incorporación de ligantes en la síntesis de IIP, de tal forma que incrementen las interacciones con la plantilla, la cantidad de cavidades y por lo tanto, se obtenga una disminución del límite de detección de las metodologías.

La exploración de diversos monómeros, porógenos (disolvente), y tiempos de síntesis de IIPs, también representa una gran área de oportunidad para continuar aportando materiales y metodologías innovadoras altamente eficientes para la determinación de metales pesados tóxicos.

7.0 Anexo A Evaluaciones realizadas mediante estadísticos t de student.

7.1 Evaluación de los valores de R² de optimización.

La evaluación de los coeficientes de correlación de los datos experimentales de cada diseño de experimentos multivariable implementado en este trabajo y resumidos en la **Tabla A.1**, se realizó a través del siguiente estadístico t de student.

$$|t| = \frac{|R| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-R^2}}$$

Donde R², corresponde al coeficiente de correlación de los datos, y n el número de experimentos realizados.

Tabla A.1 Evaluación de los valores de R² obtenidos de las optimizaciones realizadas.

Optimización realizada	Diseño empleado	n	R ²	t calculado	t _{tablas} , con grados de libertad n-2	Criterio de aceptación de R ² t calculado > t _{tablas}
Síntesis de Pb-IIP	Simplex centroide	10	0.7300	4.65	2.31	4.65 > 2.31 Se acepta el valor de R ²
Síntesis de As-IIP	Simplex centroide	10	0.9800	19.79	2.31	19.79 > 2.31 Se acepta el valor de R ²
DPASV para Hg (II)	Box Behnken	27	0.8500	11.90	2.06	11.90 > 2.31 Se acepta el valor de R ²

Debido a que en todos los casos el valor de t_{calculado} es mayor que el t_{tablas}, se comprueba que existe una correlación significativa entre los datos experimentales y el modelo del diseño de experimentos, y por lo tanto un buen ajuste entre estos.

7.2 Evaluación de las respuestas predichas y experimentales.

A través del estadístico t de student para la comparación de una media experimental con un valor conocido (μ), se realizó la evaluación de las respuestas predichas respecto a las respuestas experimentales obtenidas en los diseños de experimentos multivariados implementados en este trabajo y resumidos en la **Tabla A.2**.

$$|t| = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{n}}{s}$$

Donde \bar{x} , n y s, corresponden a las media, número de repeticiones (n=3) y desviación estándar de la respuesta experimental; μ corresponde a la respuesta predicha.

Tabla A.2 Comparación estadística de las respuestas predichas y experimentales obtenidas en las optimizaciones realizadas.

Optimización realizada	Diseño empleado	Resp. Exp	Resp. pred.	s	t calculado	Criterio de aceptación: t calculado < t tablas*
Síntesis de Pb-IIP	Simplex centroide	87.00	88.00	8.70	0.20	0.20 < 4.30 Si cumple
Síntesis de As-IIP	Simplex centroide	18.20	17.00	1.40	1.48	1.48 < 4.30 Si cumple
Síntesis de Hg(II)	Univariable	113.50	106.15	2.50	5.09	5.09 < 4.30 No cumple
DPASV para Hg(II)	Box Behnken	144.00	156.00	9.01	2.30	2.30 < 4.30 Si cumple
DPASV para As(III)	Taguchi	220.00	195.68	10.00	4.21	4.21 < 4.30 Si cumple

*t tablas=4.30, con grados de libertad n-1; 3-1=2

De acuerdo con los resultados obtenidos, se comprueba la eficiencia del diseño en la determinación de la combinación de las variables que maximiza la respuesta experimental.

8.0 Referencias.

- [1] M. S. Sankhla, M. Kumari, M. Nandan, R. Kumar, P. Agrawal, Heavy metals contamination in water and their hazardous effect on human health-a review, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 5 (2016) 759, doi: 10.20546/ijcmas.2016.510.082.
- [2] A. García-Miranda, P. Carrington, S. J. Rowley-Neale, C. E. Banks, Recent advances in portable heavy metal electrochemical sensing platforms, *Environ. Sci. Water Res. Technol.*, 6 (2020) 2676, doi: 10.1039/D0EW00407C.
- [3] X. Yu, C. Liu, Y. Guo, T. Den, Speciation analysis of trace arsenic, mercury, selenium, and antimony in environmental and biological samples based on hyphenated techniques, *Molecules.*, 24 (2019) 926, doi:10.3390/molecules24050926.
- [6] A. L. Suherman, E. E. L. Tanner, R.G. Compton, recent developments in inorganic Hg²⁺ detection by voltammetry, *Trends Anal. Chem.*, 94 (2017) 161, doi: 10.1016/j.trac.2017.07.020.
- [7] S. P. Kounaves, Chapter 37, *Voltammetric Techniques, Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.*, (1997), 709.
- [8] L. N. Suvarapu, S. Baek, Recent developments in the speciation and determination of mercury using various analytical techniques, *J. Anal. Methods Chem.*, 2015 (2015) 372459, doi: 10.1155/2015/372459.
- [9] P. Richter, M. I. Toral, B. Abbott, Anodic stripping voltammetric determination of mercury in water by using a new electrochemical flow-through cell, *Electroanalysis.*, 14 (2002) 1288, doi: 10.1002/1521-4109(200210)14:18<1288:AID-ELAN1288>3.0.CO;2-5.
- [10] B. Bansod, T. Kumar, R. Thakur, S. Rana, I. Singh, A review on various electrochemical techniques for heavy metal ions detection with different sensing platforms, *Biosens. Bioelectron.*, 94 (2017) 443, doi: 10.1016/j.bios.2017.03.031.
- [11] K. Xu , C. Pérez-Ràfols, M. Cuartero, G. A. Crespo, Electrochemical detection of trace silver, *Electrochim. Acta.*, 374 (2021) 137929, doi: 10.1016/j.electacta.2021.137929.

[12] G. Cepriá, S. Hamida, F. Laborda, J. R. Castillo, Electroanalytical determination of arsenic (III) and total arsenic in 1 M HCl using a carbonaceous electrode without a reducing agent, *Anal. Lett.*, 42 (2009) 1971, doi: 10.1080/00032710903082713.

[13] G. March, T. D. Nguyen, B. Piro, Modified electrodes used for electrochemical detection of metal ions in environmental analysis, *Biosens.*, 5 (2015) 241, doi:10.3390/bios5020241.

[14] S. J. Shahtaheri, F. Faridbod, M. Khadem, Highly selective voltammetric sensor based on molecularly imprinted polymer and carbon nanotubes to determine the dicloran pesticide in biological and environmental samples, *Proc. Technol.*, 27 (2017) 96, doi: 10.1016/j.protcy.2017.04.041.

[15] X. Liu, X. Wang, F. Tan, H. Zhao, X. Quan, J. Chen, L. Li, An electrochemically enhanced solid-phase microextraction approach based on molecularly imprinted polypyrrole/multi-walled carbon nanotubes composite coating for selective extraction of fluoroquinolones in aqueous samples, *Anal. Chim. Acta.*, 727 (2012) 26, doi: 10.1016/j.aca.2012.03.054

[16] A. Ambrosi, C. K. Chua, A. Bonanni, M. Pumera, Electrochemistry of graphene and related materials, *Chem. Rev.*, 114 (2014) 7150, doi: 10.1021/cr500023c.

[17] M. R. Letsoalo, A. A. Ambushe, M. A. Mamo, Novel chemoresistive sensor for sensitive detection of Pb²⁺ ions using an interdigital gold electrode fabricated with a reduced graphene oxide-based ion-imprinted polymer, *ACS Omega.*, 6 (2021) 31528, doi: 10.1021/acsomega.1c03955.

[18] A. Giacomino, A. R. Redda, S. Squadrone, M. Rizzi, M. C. Abete, C. La Gioia, R. Toniolo, O. Abollino, M. Malandrino, Anodic stripping voltammetry with gold electrodes as an alternative method for the routine determination of mercury in fish, Comparison with spectroscopic approaches, *Food Chem.*, 221 (2017) 737, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.111.

[19] D. Hernández-Ramírez, L. H. Mendoza-Huizar, C. A. Galán-Vidal, G. Y. Aguilar-Lira, G. A. Álvarez-Romero, Review-trends on the development of non-enzymatic electrochemical

sensors modified with metal-oxide nanostructures for the quantification of uric acid, *J. Electrochem. Soc.*, 168 (2021) 057522, doi: 10.1149/1945-7111/abf8d5.

[20] E. Roy, S. Patra, R. Madhuri, P. K. Sharma, Development of an imprinted polymeric sensor with dual sensing property for trace level estimation of zinc and arginine, *Mater. Sci. Eng. C.*, 49 (2015) 25, doi: 10.1016/j.msec.2014.12.066.

[21] L. A. De Barros, L. A. Pereira, R. Custódio, S. Rath, A novel computational approach for development of highly selective fenitrothion imprinted polymer: theoretical predictions and experimental validations, *J. Braz. Chem. Soc.*, 4 (2014) 619, doi: 10.5935/0103-5053.20140009.

[22] M. G. F. Stevens, B.S. Batlokwa, Multi-templated Pb-Zn-Hg ion imprinted polymer for the selective and simultaneous removal of toxic metallic ions from wastewater, *Int. J. Chem.*, 2 (2017) 2, doi: 10.5539/ijc.v9n2p10.

[23] A. Baghel, M. Boopathi, B. Singh, P. Pandey, T. H. Mahato, P. K. Gutch, K. Sekhar, Synthesis and characterization of metal ion imprinted nano-porous polymer for the selective recognition of copper, *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007) 3326, doi: 10.1016/j.bios.2007.01.016.

[24] L. E. Rebolledo-Perales, G. A. Álvarez Romero, I. Ibarra, C. A. Galán-Vidal, J. F. Flores-Aguilar, I. Pérez-Silva, Quantitative analysis of Pb(II) based on differential pulse anodic stripping voltammetry and IIP-carbon paste electrodes, *J. Electrochem. Soc.*, 169 (2022) 057504, doi: 10.1149/1945-7111/ac6a17.

[25] D. Türkmen, M. Ö. Türkmen, S. Akgönüllü, A. Denizli, Development of ion-imprinted based magnetic nanoparticles for selective removal of arsenic (III) and arsenic (V) from wastewater, *Sep. Sci. Technol.*, 57 (2021) 990, doi:10.1080/01496395.2021.1956972.

[26] C. J. Wyatt, C. Fimbres, L. Romo, R. O. Méndez, M. Grijalva, Incidence of heavy metal contamination in water supplies in northern Mexico, *Environ. Res.*, 76 (1998) 114, doi: 10.1006/enrs.1997.3795.

[27] A. K. L. Vicencio, L. C. Yañez, I. R. Soto, Mercury pollution assessment of mining wastes and soils from former silver amalgamation area in north-central Mexico, *Rev. Int. Contam. Ambien.*, 33 (2017) 655, doi: 10.20937/RICA.2017.33.04.09.

[28] R. A. Wuana, F. E. Okieimen, Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks, and best available strategies for remediation, *ISRN Ecology.*, 402647 (2011) doi.org/10.5402/2011/402647.

[29] R. K. Sharma, M. Agrawal, Biological effects of heavy metals: an overview, *J Environ Biol.*, 26(2) (2005) 301, PMID: 16334259.

[30] V. Oyareme, S. E. Akpogheneta, B. N. Iloba, and F. Ogidiagba, Occurrence and Concentration of Heavy Metals in Garden Egg, Tomatoes, Cucumber and Watermelon from Two Major Markets in Edo State, Nigeria, *Food and Public Health.*, 10(3) (2020) 63 doi: 10.5923/j.fph.20201003.01

[31] P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, and D. J. Sutton, Heavy metal toxicity and the environment, *Molecular, clinical and environmental toxicology: volume 3: environmental toxicology.*, 101 (2012) 133, doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6.

[32] J. H. Duffus, " Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report), *Pure and applied chemistry.*, 74(5) (2002) 793, doi: 10.1351/pac200274050793.

[33] R. A. Ahmed, A. M. Fekry, Preparation and characterization of a nanoparticles modified chitosan sensor and its application for the determination of heavy metals from different aqueous media, *International Journal of Electrochemical Science.*, 8(5) (2013) 6692, Corpus ID: 224814474.

[34] S. S. Siwal, H. Kaur, R. Deng, Q. Zhang, A review on electrochemical techniques for metal recovery from waste resources, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry.*, 39 (2023) 100722, doi: 10.1016/j.cogsc.2022.100722.

[35] S. Sawan, R. Maalouf, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault, Metal and metal oxide nanoparticles in the voltammetric detection of heavy metals: A review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.*, 131 (2020) 116014, doi: 10.1016/j.trac.2020.116014.

[36] R. K. Mahajan, T. P. S. Walia, B. S. Lark, and Sumanjit, Analysis of physical and chemical parameters of bottled drinking water, *International Journal of Environmental Health Research.*, 16(2) (2006) 89, doi: 10.1080/09603120500538184.

[37] Y. Zhao, H. Luan, B. Yang, Z. Li, M. Song, B. Li, X. Tang, Adsorption of Pb, Cu and Cd from Water on Coal Fly Ash-Red Mud Modified Composite Material: Characterization and Mechanism, *Water.*, 15(4) (2023) 767, doi: 10.3390/w15040767.

[38] P. Sharma, R. S. Dubey, Lead toxicity in plants, *Brazilian journal of plant physiology.*, 17 (2005) 35, doi: 10.1590/S1677-04202005000100004.

[39] I. Baranowska-Bosiacka, J. Korbecki, M. Marchlewicz, Mammals and Birds as Bioindicators of Trace Element Contaminations in Terrestrial Environments, Springer., chapter 16 (2019) 563, doi:10.1007/978-3-030-00121-6-16.

[40] L. Huang, W. Huang, R. Shen, Q. Shuai, Chitosan/thiol functionalized metal-organic framework composite for the Simultaneous determination of lead and cadmium ions in food samples, *Food Chemistry.*, 330 (2020) 127212, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127212.

[41] R. Levin, C. L. Z. Vieira, M. H. Rosenbaum, K. Bischoff, D. C. Mordarski, M. J. Brown, The urban lead (Pb) burden in humans, animals, and the natural environment, *Environmental research.*, 193, (2021) 110377.

[42] N. Zhu, X. Liu, K. Peng, H. Cao, M. Yuan, T. Ye, X. Wu, F. Yin, J. Yu, L. Hao, F. Xu, A Novel Aptamer-Imprinted Polymer-Based Electrochemical Biosensor for the Detection of Lead in Aquatic Products, *Molecules.*, 28 (2023) 196, doi: 10.3390/molecules28010196.

[43] M. Ahamed, S. Verma, A. Kumar, M. K. J. Siddiqui, Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children, *Sci Total Environ.*, 346(1-3), (2005) 48F, doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.12.019.

[44]. R. Meng, Q. Zhu, T. Long, X. He, Z. Luo, R. Gu, W. Wang, P. Xiang, The innovative and accurate detection of heavy metals in foods: A critical review on electrochemical sensors, *Food Control.*, 150 (2023) 109743, doi: 10.1016/j.foodcont.2023.109743.

[45] X. Wu, S. J. Cobbina, G. Mao, H. Xu, Z. Zhang, L. Yang, A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment, *Environ Sci Pollut Res Int.*, 23(9) (2016) 8244, doi: 10.1007/s11356-016-6333-x.

[46] S. Martin, W. Griswold, Human health effects of heavy metals, *Environmental Science and Technology briefs for citizens.*, 15 (2009) 1.

[47] R. K. Gautam, S. K. Sharma, S. Mahiya, M. C. Chattopadhyaya, Chapter 1: Contamination of heavy metals in aquatic media: transport, toxicity and technologies for remediation, (2014) doi:10.1039/9781782620174-00001.

[48] K. Khosravi-Darani, Y. Rehman, I. A. Katsoyiannis, E. Kokkinos, A. I. Zouboulis. Arsenic Exposure via Contaminated Water and Food Sources, *Water.*, 14(12) (2022) 1884, doi: 10.3390/w14121884.

[49] Y. Qin, Y. Cui, L. Lei, Y. Gao, Z. Zhou, Y. Li, X. Shi, An electrochemical process comparison of As(III) in simulated groundwater at low voltage in mixed and divided electrolytic cells, *Water.*, 12(4) (2020) 1126, doi: 10.3390/w12041126.

[50] B. V. Tangahu, S. R. Sheikh Abdullah, H. Basri, M. Idris, N. Anuar, M. Mukhlisin, A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation, *International journal of chemical engineering.*, (2011) 939161, doi: 10.1155/2011/939161.

[51] P. A. O'Day, Chemistry and mineralogy of arsenic, *Elements.*, 2(2) (2006) 77, doi:10.2113/gselements.2.2.77.

[52] S. Sharma, A. Bhattacharya, Drinking water contamination and treatment techniques, *Appl Water Sci.*, 7 (2017) 1043, doi: 10.1007/s13201-016-0455-7.

[53] A. Basile, S. Sorbo, B. Conte, R. C. Cobianchi, F. Trinchella, C. Capasso, V. Carginale, Toxicity, accumulation, and removal of heavy metals by three aquatic macrophytes, *Int. J. Phytoremediation.*, 14(4) (2012) 374, doi: 10.1080/15226514.2011.620653.

[54] D. Ayodhya, Recent progress on detection of bivalent, trivalent, and hexavalent toxic heavy metal ions in water using metallic nanoparticles: A review, *Results in Chemistry.*, (2023) 100874, doi: 10.1016/j.rechem.2023.100874.

[55] D. F. Katowah, M. M. Rahman, M. A. Hussein, T. R. Sobahi, M. A. Gabal, M. M. Alam, A. M. Asiri, Ternary nanocomposite based poly(pyrrole-co-O-toluidine), cobalt ferrite and decorated chitosan as a selective Co^{2+} cationic sensor, *Composites Part B.*, 175(15) (2019) 107175, doi:10.1016/j.compositesb.2019.107175.

[56] S. Wu, K. Li, X. Dai, Z. Zhang, F. Ding, S. Li, An ultrasensitive electrochemical platform based on imprinted chitosan/gold nanoparticles/graphene nanocomposite for sensing cadmium(II) ions, *Microchemical Journal.*, 155, (2020) 104710, doi:10.1016/j.microc.2020.104710.

[57] P. Sanchayanukun, S. Muncharoen, Chitosan coated magnetite nanoparticle as a working electrode for determination of Cr(VI) using square wave adsorptive cathodic stripping voltammetry, *Talanta.*, 217(1) (2020) 121027, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121027.

[58] E. Akkaya, E. Öztürk Er, N. A. Kasa, G. Çetin, O. T. Komeslic, S. Bakirdere, Hydride generation-flame atomic absorption spectrometric quantification of trace lead after the extraction by fatty acid functionalized Fe_3O_4 nanoparticles assisted dispersive solid-phase extraction: a sensitive, precise and accurate analytical method, *J. Anal. At. Spectrum.*, 35 (2020) 961, doi: 10.1039/d0ja00025f.

[59] B. P. Jackson, T. Punshon, Recent advances in the measurement of arsenic, cadmium, and mercury in rice and other foods, *Curr. Envir. Health Rpt.*, 2 (2015) 15, doi: 10.1007/s40572-014-0035-7.

[60] K. Julshamn, A. Maage, H. S. Norli, K. H Grobecker, L. Jorhem, P. Fecher, Determination of arsenic, cadmium, mercury, and lead by inductively coupled plasma/mass

spectrometry in foods after pressure digestion: nmkl1 Interlaboratory Study, *J. AOAC Int.*, 90 (2007) 844, doi: 10.1093/jaoac/90.3.844.

[61] L. Jing-Xi, S. Cheng-Jun, Z. Li, J. Feng-Hua, Y. Xiao-Fei, C. Jun-Hui, and W. Xiao-Ru, Determination of lead species in algae by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Chin J Anal Chem.*, 44(11) (2016) 1659, doi: 10.1016/S1872-2040(16)60970-2.

[62] Y. Chen, L. Huang, W. Wu, Y. Ruan, Z. Wu, Z. Xue, and F. Fu, Speciation analysis of lead in marine animals by using capillary electrophoresis couple online with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Electrophoresis.*, 35(9) (2014) 1346, doi: 10.1002/elps.201300410.

[63] Q. Hu, G. Yang, J. Yin, Y. Yao, Determination of trace lead, cadmium and mercury by on-line column enrichment followed by RP-HPLC as metal-tetra-(4-bromophenyl)-porphyrin chelates, *Talanta.*, 57 (2002) 751, doi: 10.1016/S0039-9140(02)00096-6.

[64] H. S. Amoli, A. Porgam, Z. B. Sadr, F. Mohanazadeh, Analysis of metal ions in crude oil by reversed-phase high performance liquid chromatography using short column, *J. Chrom. A.*, 1118 (2006) 82, doi: 10.1016/j.chroma.2006.04.068.

[65] K. Julshamn, A. Maage, H. S. Norli, K. H Grobecker, L. Jorhem, P. Fecher, D. Dowell, Determination of arsenic, cadmium, mercury, and lead in foods by pressure digestion and inductively coupled plasma/ mass spectrometry: first action 2013.06, *J. AOAC Int.*, 96 (2013) 1101, doi: 10.5740/jaoacint.

[66] J. Griboff, D. A. Wunderlin, M. V. Monferran, Metals, As and Se determination by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in edible fish collected from three eutrophic reservoirs. Their consumption represents a risk for human health, *Microchem. J.*, 130 (2017) 236, doi: 10.1016/j.microc.2016.09.013.

[67] F. L. Migliorini, R. C. Sanfelice, A. Pavinatto, J. Steffens, C. Steffens, D. S. Correa, Voltammetric cadmium (II) sensor based on a fluorine doped tin oxide electrode modified

with polyamide 6/chitosan electrospun nanofibers and gold nanoparticles, *Microchimica Acta.*, 184 (2017) 1077, doi: 10.1007/s00604-017-2082-x.

[68] B. Bansod, T. Kumar, R. Thakur, S. Rana, I. Singh, A review on various electrochemical techniques for heavy metal ions detection with different sensing platforms, *Biosensors and Bioelectronics.*, 94 (2017) 443, doi: 10.1016/j.bios.2017.03.031.

[69] M. B. Gumpu, S. Sethuraman, U. M. Krishnan, J. B. B. Rayappan, A review on detection of heavy metal ions in water-an electrochemical approach, *Sensors, and actuators B: chemical.*, 213 (2015) 515, doi: 10.1016/j.snb.2015.02.122.

[70] S. Li, C. Zhang, S. Wang, Q. Liu, H. Feng, X. Ma, J. Guo, Electrochemical microfluidics techniques for heavy metal ion detection, *Analyst.*, 143(18) (2018) 4230, doi: 10.1039/C8AN01067F.

[71] M. A. Pellitero, A. Shaver, N. Arroyo-Currás, Critical review-Approaches for the electrochemical interrogation of DNA-based sensors: A critical review, *Journal of The Electrochemical Society.*, 167(3) (2019) 037529, doi: 10.1149/2.0292003JES.

[72] N. Aristov, A. Habekost, Cyclic Voltammetry - A Versatile Electrochemical Method Investigating Electron Transfer Processes, *World Journal of Chemical Education*, 3(5) (2015) 115, doi: 10.12691/wjce-3-5-2.

[73] N. Elgrishi, K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, J. L. Dempsey, A practical beginner's guide to cyclic voltammetry, *Journal of chemical education.*, 95(2) (2018) 197, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.

[74] R. A. Osteryoung, J. Osteryoung, Electroanalytical-pulse voltammetry methods of analysis, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.*, A302 (2016) 315.

[75] J. G. Osteryoung, M. M. Schreiner, Recent Advances in Pulse Voltammetry, *CRC Critical, Reviews in Analytical Chemistry.*, 19(1) (2015) S1, doi: 10.1080/15476510.1988.10401465.

-
- [76] Y. Wang, E. Laborda, M. C. Henstridge, F. Martinez-Ortiz, A. Molina, R. G. Compton, The use of differential pulse voltammetry to discriminate between the Butler-Volmer and the simple Marcus–Hush models for heterogeneous electron transfer: The electro-reduction of europium (III) in aqueous solution, *Journal of Electroanalytical Chemistry.*, 668 (2012) 7, doi: 10.1016/j.jelechem.2011.12.023.
- [77] O. A. Farghaly, R. A. Hameed, A. A. H. Abu-Nawwas, Analytical application using modern electrochemical techniques, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 9(1) (2014) 3287, ISSN: 1452-3981.
- [78] X. Huang, Y. Zhu, E. Kianfar, Nano biosensors: properties, applications, and electrochemical techniques, *Journal of Materials Research and Technology.*, 12 (2021) 1649, doi: 10.1016/j.jmrt.2021.03.048.
- [79] F. Scholz, *Electroanalytical methods: Chapter II.2, Pulse Voltammetry*, Berlin Springer, 1 (2010), doi: 10.1007/978-3-642-02915-8_5.
- [80] A. J. Borrill, N. E. Reily, J. V. Macpherson, Addressing the practicalities of anodic stripping voltammetry for heavy metal detection: a tutorial review, *Analyst.*, 144(23) (2019) 6834, doi: 10.1039/C9AN01437C.
- [81] V. Mirceski, R. Gulaboski, R, Recent achievements in square-wave voltammetry (a review), *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering.*, 33(1) (2014) 1, ISSN 1857.
- [82] V. Mirceski, S. Sławomira Skrzypek, L. Stojanov, Square-wave voltammetry, *ChemTexts*, 4(17) (2018), doi: 10.1007/s40828-018-0073-0.
- [83] A. Shrivastava, J. Sharma, V. Soni, Various electroanalytical methods for the determination of uranium in different matrices, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University.*, 51(1) (2013) 113, doi: 10.1016/j.bfopcu.2012.09.003.

[84] P. C. Vereștiuc, O. M. Tucaliuc, I. G. Breabăn, I. Crețescu, G. Nemțoi, Differential pulse anodic stripping voltammetry for mercury determination, *Acta Chemica Iasi.*, 23(1) (2015) 13, doi: 10.1515/achi-2015-0002.

[85] D. S. Rajawat, N. Kumar, S. P. Satsangee, Trace determination of cadmium in water using anodic stripping voltammetry at a carbon paste electrode modified with coconut shell powder, *Journal of Analytical Science and Technology.*, 5(19) (2014) 1, doi: 10.1186/s40543-014-0019-0.

[86] C. Macías-Socha, M. García-Colmenares, P. Chaparro, Determinación electroquímica de plomo y cadmio en aguas superficiales, *Luna Azul.*, 44 (2017) 27, doi: 10.17151/luaz.2017.44.3.

[87] M. A. El Mhammedi, M. Achak, M. Bakasse, A. Chtaini, Electroanalytical method for determination of lead (II) in orange and apple using kaolin modified platinum electrode, *Chemosphere.*, 76 (2009) 1130, doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.04.017.

[88] A. Mourya, B. Mazumdar, K. Sinha, Application of CeO₂-MWCNTs nanocomposite for heavy metal ion detection in aqueous solutions by electrochemical technique, *Cleaner Materials.*, 2(15) (2021) 100021, doi: 10.1016/j.clema.2021.100021.

[89] J. H. Hwang, P. Pathak, X. Wang, K. L. Rodriguez, J. Park, H. J. Cho, W. H. Lee, A novel Fe-Chitosan-coated carbon electrode sensor for in situ As(III) detection in mining wastewater and soil leachate, *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 294(1) (2019) 89, doi: 10.1016/j.snb.2019.05.044.

[90] X. Lu, X. Dong, K. Zhang, Y. Zhang, An ultrasensitive electrochemical mercury(II) ion biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles, *Anal. Methods.*, 4(10) (2012) 3326, doi: 10.1039/c2ay25634g.

[91] C. I. Fort, L. C. Cotet, A. Vulpoi, G. L. Turdean, V. Danciu, L. Baia, I. C. Popescu, Bismuth doped carbon xerogel nanocomposite incorporated in chitosan matrix for ultrasensitive voltammetric detection of Pb(II) and Cd(II), *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 220 (2015) 712, doi: 10.1016/j.snb.2015.05.124.

[92] L. Zhu, L. Xu, B. Huang, N. Jia, L. Tan, S. Yao, Simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) using square wave anodic stripping voltammetry at a gold nanoparticle-graphene-cysteine composite modified bismuth film electrode, *Electrochimica Acta.*, 115(1) (2014) 471, doi: 10.1016/j.electacta.2013.10.209.

[93] S. Dutta, G. Strack, P. Kurup, Gold nanostar-based voltammetric sensor for chromium (VI), *Microchimica Acta.*, 186734 (2019) 1, doi: 10.1007/s00604-019-3847-1.

[94] E. Tesfaye, B. S. Chandravanshi, N. Negash, M. Tessema, A new modified carbon paste electrode using N1-hydroxy-N1, N2-diphenylbenzamidine for the square wave anodic stripping voltammetric determination of Pb(II) in environmental samples, *Sensing and Bio-Sensing Research.*, 38 (2022) 100520, doi: 10.1016/j.sbsr.2022.100520.

[95] O. Ifiguis, A. Moutcine, C. Laghlimi, Y. Ziat, R. Bouhdadi, A. Chtaini, M. Mbarki, Biopolymer-Modified Carbon Paste Electrode for the Electrochemical Detection of Pb(II) in Water, *Journal of Analytical Methods in Chemistry.*, 5348246 (2022), doi: 10.1155/2022/5348246.

[96] S. Peshoria, A. K. Narula, One-pot synthesis of porphyrin@ polypyrrole hybrid and its application as an electrochemical sensor, *Materials Science and Engineering: B.*, 229 (2014) 53, doi: 10.1016/j.mseb.2017.12.023.

[97] A. Sala, H. Brisset, A. Margailan, J. U. Mullot, C. Branger, Electrochemical sensors modified with ion-imprinted polymers for metal ion detection, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.*, 148 (2022) 116536, doi: 10.1016/j.trac.2022.116536.

[98] S. Rahman, B. Bozal-Palabiyik, D. N. Unal, C. Erkmen, M. Siddiq, A. Shah, B. Uslu, Molecularly imprinted polymers (MIPs) combined with nanomaterials as electrochemical sensing applications for environmental pollutant, *Trends in Environmental Analytical Chemistry.*, 36 (2022) e00176, doi: 10.1016/j.teac.2022.e00176.

[99] M. C. Moreno-Bondi, E. Benito-Peña, T. D. Moya-Cavas, J. U. Ruiz, Molecularly Imprinted Polymer-Based Biomimetic Sensors for Food Analysis, *Encyclopedia of Sensors and Biosensors.*, 4 (2023) 568, doi: 10.1016/B978-0-12-822548-6.00105-9.

[100] T. Alizadeh, M. Akhoundian, An ultra-sensitive and highly selective impedimetric sensor for vitamin D measurement based on a novel imprinted polymer synthesized utilizing template-derived functional monomer, *Analytica Chimica Acta.*, 1223 (2022) 340206, doi.org/10.1016/j.aca.2022.340206.

[101] V. Ayerdurai, M. Cieplak, W. Kutner, Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for food contaminants determination, *Trends in Analytical Chemistry.*, 158 (2023) 116830, doi: 10.1016/j.trac.2022.116830.

[102] B. Keitel, A. D. Batista, B. Mizaikoff, B. Fresco-Cala, Molecularly Imprinted Polymer Sensors for Environmental Analysis, *Encyclopedia of Sensors and Biosensors.*, 4 (2023) 851, doi:10.1016/B978-0-12-822548-6.00158-8.

[103] H. Chi, G. Liu, Carbon nanomaterial-based molecularly imprinted polymer sensors for detection of hazardous substances in food: recent progress and future trends, *Food Chemistry.*, 420 (2023) 136100, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136100.

[104] F. Shakerian, K. H. Kim, E. Kwon, J. E. Szulejko, P. Kumar, S. Dadfarnia, A. M. H. Shabani, Advanced polymeric materials: Synthesis and analytical application of ion imprinted polymers as selective sorbents for solid phase extraction of metal ions, *TrAC Trends in Analytical Chemistry.*, 83 (2016) 55, doi: 10.1016/j.trac.2016.08.001.

[105] M. R. Hojatpanah, A. Khanmohammadi, H. Khoshsafar, A. Hajian, H. Bagheri, Construction and application of a novel electrochemical sensor for trace determination of uranium based on ion-imprinted polymers modified glassy carbon electrode, *Chemosphere.*, 292 (2022) 133435, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133435.

[106] L. E. Rebolledo-Perales, I. Ibarra, M. F. Guzmán, G. Islas, G. A. A, A novel ion-imprinted polymer based on pyrrole as functional monomer for the voltammetric determination of Hg(II) in water samples, *Electrochimica Acta.*, 434 (2022) 141258, doi: 10.1016/j.electacta.2022.141258.

[107] D. Lakshmi, P. S. Sharma, B. B. Prasad, Imprinted polymer-modified hanging mercury drop electrode for differential pulse cathodic stripping voltammetric analysis of creatine, *Biosensors and Bioelectronics.*, 22(12) (2007) 3302, doi: 10.1016/j.bios.2006.12.011.

[108] P. Kumar, K. H. Kim, V. Bansal, T. Lazarides, N. Kumar, Progress in the sensing techniques for heavy metal ions using nanomaterials, *Journal of industrial and engineering chemistry.*, 54 (2017) 30, doi: 10.1016/j.jiec.2017.06.010.

[109] D. K. Singh, S. Mishra, Synthesis, and characterization of Hg(II)-ion-imprinted polymer: kinetic and isotherm studies, *Desalination.*, 257 (2010) 177, doi:10.1016/j.desal.2010.02.026.

[110] M. Zhang, Z. Zhang, Y. Liu, X. Yang, L. Luo, J. Chen, S. Yao, Preparation of core-shell magnetic ion-imprinted polymer for selective extraction of Pb(II) from environmental samples, *Chemical Engineering Journal.*, 178 (2011) 443, doi: 0.1016/j.cej.2011.10.035.

[111] T. Alizadeh, S. Amjadi, Preparation of nano sized Pb²⁺ imprinted polymer and its application as the chemical interface of an electrochemical sensor for toxic lead determination in different real samples, *J. Haz. Mat.*, 190 (2011) 451, doi:10.1016/j.jhazmat.2011.03.067.

[112] S. Xu, L. Chen, J. Li, Y. Guan, H. Lu, Novel Hg²⁺-imprinted polymers based on thymine-Hg²⁺-thymine interaction for highly selective preconcentration of Hg²⁺ in water samples, *Journal of hazardous materials.*, 237 (2012) 347, doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.08.058.

[113] N. F. C. Lah, A. L. Ahmad, S. C. Low, N. F. Shoparwe, The role of porogen-polymer complexation in atrazine imprinted polymer to work as an electrochemical sensor in water, *Journal of Environmental Chemical Engineering.*, 7(6) (2019) 103500, doi: 10.1016/j.jece.2019.103500.

[114] H. Kamyab, S. Chellappan, O. Tavakkoli, M. Mesbah, J. K. Bhutto, T. Khademi, A. A. Alijohani, A review on carbon-based molecularly-imprinted polymers (MIP) for detection of hazardous pollutants in aqueous solutions, *Chemosphere.*, 308 (2022) 136471, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136471.

[115] M. Cejner, R. Dobrowolski, Ion-imprinted polymers: synthesis, characterization and applications, *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, section AA-Chemica.*, 70(2) (2016) 67, doi: 10.1515/umcschem-2015-0017.

[116] B. E. Soledad-Rodríguez, Innovaciones tecnológicas en la industria. Una propuesta para el análisis de contaminantes ambientales con Polímeros de Impronta Molecular, *Rev. Tekhné.*, 21(2) (2018), 019.

[117] N. Behnia, M. Asgari, A. Feizbakhsh, Sub-nanomolar detection of zinc on the ion-imprinted polymer modified glassy carbon electrode, *Journal of Environmental Chemical Engineering.*, 3(1) (2015) 271, doi: 10.1016/j.jece.2014.11.008.

[118] M. Sebastian, B. Mathew, Ion imprinting approach for the fabrication of an electrochemical sensor and sorbent for lead ions in real samples using modified multiwalled carbon nanotubes, *J Mater Sci.*, 53 (2018), 3557, doi: 10.1007/s10853-017-1787-x.

[119] Z. Dahaghin, P. A. Kilmartin, H. Z. Mousavi, Novel ion imprinted polymer electrochemical sensor for the selective detection of lead (II), *Food chemistry.*, 303 (2020) 125374, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125374.

[120] W. Ma, Q. Chang, J. Zhao, B. Ye, Novel electrochemical sensing platform based on ion imprinted polymer with nanoporous gold for ultrasensitive and selective determination of As^{3+} , *Microchim. Acta.*, 571 (2020) 187, doi: 10.1007/s00604-020-04552-9.

[121] G. Fadillah, E. N. Inayatssholeha, N. A. Mukarom, B. S. Rattyanda, W. P. Wicaksono, I. Fatimah, T. A. Saleh, Ion imprinted-carbon paste electrode as electrochemical sensor for ultra-trace recognizing speciation of mercury, *Results in Chemistry.*, 4 (2022) 100489, doi: 10.1016/j.rechem.2022.100489.

[122] R. Mesa, S. Khan, M. D. P. T. Sotomayor, G. Picasso, Using Carbon Paste Electrode Modified with Ion Imprinted Polymer and MWCNT for Electrochemical Quantification of Methyl mercury in Natural Water Samples, *Biosensors.*, 12 (2022) 376, doi: 10.3390/bios12060376.

[123] L. Zhang, D. Li, S. Li, J. Li, X. Ma, M. Wang, High-sensitivity copper (II) sensor based on a protein/ion-imprinted polymer cooperative recognition strategy, *Microchemical Journal.*, 185 (2023) 108285, doi: 10.1016/j.microc.2022.108285.

[124] F. Yin, Y. Mo, X. Liu, H. Yang, D. Zhou, H. Cao, F. Xu, An ultra-sensitive and selective electrochemical sensor based on GOCS composite and ion imprinted polymer for the rapid detection of Cd²⁺ in food samples, *Food Chemistry.*, 410 (2023) 135293, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.135293.

[125] M. Costa, S. Di Masi, A. Garcia-Cruz, S. A. Piletsky, C. Malitesta, Disposable electrochemical sensor based on ion imprinted polymeric receptor for Cd(II) ion monitoring in waters, *Sensors, and Actuators B: Chemical.*, 383 (2023) 133559, doi: 10.1016/j.snb.2023.133559.

[126] A. W. Bott, Practical problems in voltammetry: 4. Preparation of working electrodes, *Current Separations.*, 16 (1997) 79.

[127] I. Švancara, K. Vytrás, K. Kalcher, A. Walcarius, J. Wang, Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis, *Electroanalysis.*, 21 (2009) 7, doi: 10.1002/elan.200804340.

[128] A. M. Jessick, T. B. Moorman, J. R. Coats, Optimization of analytical methods to improve detection of erythromycin from water and sediment, *Journal of Environmental Science and Health, Part B.*, 46(8) (2011) 735, doi: 10.1080/03601234.2011.603974.

[129] A. C. Kogawa, H. R. N. Salgado, Analytical methods need optimization to get innovative and continuous processes for future pharmaceuticals, *Scholars Academic Journal of Pharmacy.*, 5(6) (2016) 240, doi: 10.21276/sajp.2016.5.6.3.

[130] S. S. L. Da Costa, A. C. L. Pereira, E. A. Passos, J. D. P. H. Alves, C. A. B. Garcia, R. G. O. Araujo, Multivariate optimization of an analytical method for the analysis of dog and cat foods by ICP OES, *Talanta.*, 108 (2013) 157, doi: 10.1016/j.talanta.2013.03.002.

[131] R. K. Ahmed, E. M. Saad, H. M. Fahmy, R. M. El Nashar, Multivariate experimental design: towards more reliable electrochemical detection, *Current Opinion in Electrochemistry.*, 31 (2022) 10088, doi: 10.1016/j.coelec.2021.100880.

[132] U. M. F. Cerqueira, M. A. Bezerra, S. L. C. Ferreira, R. de Jesus Araújo, B. N. da Silva, C. G. Novaes, Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis-a review, *Food Chemistry.*, 364 (2021) 130429, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130429.

[133] M. A. Bezerra, Q. O. dos Santos, A. G. Santos, C. G. Novaes, S. L. C. Ferreira, V. S. de Souza, Simplex optimization: a tutorial approach and recent applications in analytical chemistry, *Microchemical Journal.*, 124 (2016) 45, doi: 10.1016/j.microc.2015.07.023.

[134] E. G. Fernández, M. Fernández, I. Pérez, Y. Morón, V. García, I. Perdomo, N. Pérez, Diseños de experimentos en tecnología y control de los medicamentos, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.*, 39(2) (2008) 28, doi: ISSN: 1870-0195.

[135] E. Yacuzzi, F. Martín, H. M. Quiñones, M. J. Popovsky, El diseño experimental y los métodos de Taguchi: Conceptos y aplicaciones en la industria farmacéutica, *Serie Documentos de Trabajo*, 258, (2004), Universidad del Centro de Estudios Macroeconómicos de Argentina (UCEMA), Buenos Aires.

[136] A. Y. Goren, Y. K. Recepoğlu, A. Khataee, Language of response surface methodology as an experimental strategy for electrochemical wastewater treatment process optimization, *Artificial Intelligence and Data Science in Environmental Sensing.*, 4 (2022) 57, doi: 10.1016/B978-0-323-90508-4.00009-5.

[137] S. L. Ferreira, A. O. Caires, T. D. S. Borges, A. M. Lima, L. O. Silva, W. N. L. Dos Santos, Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs, *Microchemical Journal.*, 131 (2017) 163, doi: 10.1016/j.microc.2016.12.004.

[138] S. L. C. Ferreira, R. E. Bruns, E. G. P. Da Silva, W. N. L. Dos Santos, C. M. Quintella, J. M. David, B. B. Neto, Statistical designs, and response surface techniques for the

optimization of chromatographic systems, *Journal of chromatography A.*, 1158(1-2) (2007) 2, doi: 10.1016/j.chroma.2007.03.051.

[139] M. Gorbounov, J. Taylor, B. Petrovic, S. M. Soltani, To DoE or not to DoE? A technical review on & roadmap for optimization of carbonaceous adsorbents and adsorption processes, *South African Journal of Chemical Engineering.*, 41(1) (2022) 111, doi: 10.1016/j.sajce.2022.06.001.

[140] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, L. A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta.*, 76(5) (2008) 965, doi: 10.1016/j.talanta.2008.05.019.

[141] G. Salamanca, L. M. R. Méndez, M. Osorio, N. R. Arias, Diseño experimental de mezclas como herramienta para la optimización de cremolácteos de mango, *Revista colombiana de investigaciones agroindustriales.*, 2(1) (2015) 16, ISSN-e 2422-4456.

[142] M. A. Bezerra, V. A. Lemos, C. G. Novaes, R. M. De Jesus, R. M., Souza Filho, H. R., Araújo, S. A., & Alves, J. P. S, Application of mixture design in analytical chemistry, *Microchemical Journal.*, 152 (2020) 104336, doi: 10.1016/j.microc.2019.104336.

[143] B. Dejaegher, Y. Vander-Heyden, Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.*, 56(2) (2011) 141, doi: 0.1016/j.jpba.2011.04.023.

[144] C. Hawko, N. Hucher, S. Crunaire, C. Leger, N. Locoge, M. Verrielle, G. Savary, How the experimental design associated with objectivized sensory analysis can be used to predict odor quality of gaseous mixtures?., *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.*, 235 (2023) 104780, doi: 10.1016/j.chemolab.2023.104780.

[145] H. P. Alves, A. J. Araújo, R. M. Andrade, R. A. Junior, H. S. Ferreira, W. Acchar, L. F. A. Campos, D. A. Macedo, Processing of mullite-glass ceramics using simplex-centroid design: densification process dominated by liquid-phase sintering, *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio.*, 61(2) (2022) 160, doi: 10.1016/j.bsecv.2020.09.002.

[146] EPA Environmental Methods Forum (EMF) method validation workgroup, Guidelines on validation of non-regulatory chemical and radiochemical methods., (2022), EPA/600/B-22/001.

[147] B. Magnusson, U. Örnemark (eds.), Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2nd ed., (2014), ISBN 978-91-87461-59-0

[148] A. Chauhan, B. Mittu, P. Chauhan, Analytical Method Development and Validation: A Concise Review, Anal Bioanal Tech., 6(1) (2015) 1000233, doi: 10.4172/2155-9872.1000233.

[149] A. G. González, M. A. Herrador, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, Trends in Analytical Chemistry., 26(3) (2007), doi: 10.1016/j.trac.2007.01.009.

[150] P. Ravisankar, S. Gowthami, G. Devlala-Rao, A review on analytical method development, Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology., 2(3) (2014) 1183, ISSN: 2320 - 3471.

[151] F. Raposo, C. Ibelli-Bianco, Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines, TrAC Trends in Analytical Chemistry., 129 (2020) 115913, doi: 10.1016/j.trac.2020.115913.

[152] K. Nichani, S. Uhlig, M. Stoyke, S. Kemmlein, F. Ulberth, I. Haase, M. Doring, S. G Walch, P. Gowik, Essential terminology and considerations for validation of non-targeted methods, Food Chemistry., X17 (2023) 100538, doi: 10.1016/j.fochx.2022.100538.

[153] A. R. Nájera, M. R. Moya-Hernández, R. Gomez-Balderas, A. Rojas-Hernández, M. Romero-Romo, Introduction to Validation of Analytical Methods: Potentiometric Determination of CO₂, Journal of Chemical Education., 94(9) (2017) 1303., doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00252.

[154] L. A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), *Pure and applied chemistry.*, 67(10) (1995) 1699.

[155] W. Z. Heinz, S. Costel, Validation of Analytical Methods Using a Regression Procedure, *Anal. Chem.*, 70(7) (1998) 1277, doi: 10.1021/ac970926y.

[156] T. Tyner, J. Francis, Validation of Analytical Methods Part 1, Introduction and Definitions, *ACS Reagent Chemicals.*, Part 1 (2006), doi: 10.1021/acsreagents.1004.

[157] E. Rozet, E. Ziemons, R. D. Marini, B. Boulanger, P. Hubert, Quality by design compliant analytical method validation, *Analytical Chemistry.*, 84(1) (2012) 106, doi: 10.1021/ac202664s.

[158] J. Peris-Vicente, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An overview, *Analytical separation science.*, 5 (2015) 1757, doi: 10.1002/9783527678129.assep064.

[159] H. Wätzig, Validation of analytical methods using capillary electrophoresis, *Separation Science and Technology.*, 9(10) (2008) 225, doi: 10.1016/S0149-6395(07)00010-4.

[160] J. F. Flores-Aguilar, G. Islas, J. A. Rodríguez, M. E. Paez-Hernandez, C. A. Galán-Vidal, I. S. Ibarra, Selective Pb(II)-Imprinted Polymer for Solid Phase Extraction in the Trace Determination of Lead in Infant Formula by Capillary Electrophoresis, *J. Mex. Chem. Soc.*, 66 (2022) 2, doi: 10.29356/jmcs.v66i2.1694.