



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Área Académica de Química

**“Desarrollo de una metodología electroanalítica
basada en un polímero molecularmente impreso para
la determinación de cloranfenicol a nivel traza”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

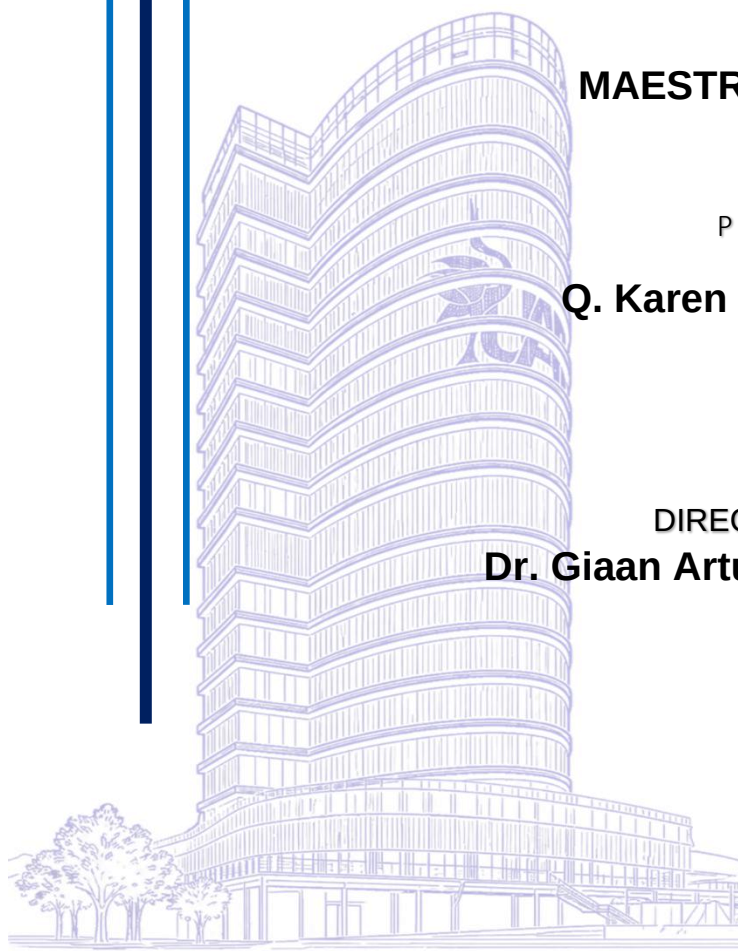
MAESTRA EN QUÍMICA

PRESENTA

Q. Karen Olguín Contreras

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Giaan Arturo Álvarez Romero





Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Basic Sciences
Área Académica de Química

Número de control: ICBI-AAQ/1691/2026
Asunto: Autorización de impresión

Dra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente

El Comité Tutorial de la Tesis de Maestría titulada "Desarrollo de una metodología electroanalítica basada en un polímero molecularmente impreso para la determinación de cloranfenicol a nivel traza", realizada por la sustentante Karen Olguín Contreras con número de cuenta 344695 perteneciente al programa de Maestría en Química, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a 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 20 de agosto de 2026.

El Comité Tutorial

Dr. Giaan Arturo Álvarez Romero
Director de Tesis

Dr. Israel Samul Ibarra Ortega

Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

Dr. Daniel Hernández Ramírez

"Amor, Orden y Progreso"



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. 40088, 40087
aaq_icbi@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio 2 del Área Académica de Química del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), bajo la dirección del Dr. Giaan Arturo Álvarez Romero. Asimismo, contó con apoyo económico otorgado por el Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) en el marco de la Convocatoria Estudios de Posgrado 2024-2, correspondiente al programa de Maestría en Química.

Congresos



Los resultados de este trabajo fueron presentados en congresos nacionales entre los que destacan:

- **XL Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Electroquímica**, organizado por la Sociedad Mexicana de Electroquímica (SMEQ), celebrado en la Universidad Autónoma Metropolitana del 22 al 26 de septiembre de 2025, con el trabajo titulado: "Determinación a nivel traza de cloranfenicol mediante una metodología electroquímica secuencial basada en un electrodo de pasta de carbón vítreo modificado con polímeros molecularmente impresos", en modalidad oral.
- **XXXVII Congreso Nacional de Química Analítica**, organizado por la Asociación Mexicana de Química Analítica (AMQA), celebrado en la Universidad Autónoma de Tlaxcala del 22 al 26 de septiembre de 2025, con el trabajo titulado: "Desarrollo de una metodología electroanalítica basada en polímeros molecularmente impresos para la determinación a nivel traza de cloranfenicol", en modalidad oral.
- **2nd International Symposium on Advanced Materials**, organizado por la Universidad Autónoma Metropolitana, celebrado de manera virtual del 25 al 27 de febrero de 2026, con el trabajo titulado: "Desarrollo de una metodología electroanalítica basada en polímeros molecularmente impresos para la determinación a nivel traza de cloranfenicol", en modalidad oral.
- **XXXVIII Congreso Nacional de Química Analítica**, organizado por la Asociación Mexicana de Química Analítica (AMQA), celebrado en la Universidad Autónoma del Estado de Querétaro del 29 de junio al 3 de julio de 2026, con el trabajo titulado: "Cuantificación de cloranfenicol en aguas mediante voltamperometría de redisolución adsorbtiva basada en polímeros molecularmente impresos", en modalidad oral.

Agradecimientos personales



A mis padres, Adolfo Francisco Olguín Pérez y Blanca Estela Contreras Monroy, gracias por siempre estar para mí, por sus consejos, su amor y el apoyo incondicional que me han brindado en cada etapa de mi vida. Sin ustedes no sería quien soy el día de hoy.

A mi hermana, Karyme Olguín Contreras, por su amor, sus consejos y su apoyo emocional de siempre. Gracias, familia, por todo. Los amo hoy y siempre.

A mi abuelita, Eleuteria Pérez González, por su amor, cariño y cuidados. Dúrame toda la vida. A mi abuelito Jonás Olguín Calva, te amo y mando un abrazo hasta cielo.

A mi asesor, Dr. Giaan Arturo Álvarez Romero, por compartir conmigo su conocimiento, por su confianza y por su paciencia. Gracias por cada asesoría, cada plática, cada risa y, sobre todo, por responder siempre a todas mis dudas y preguntas.

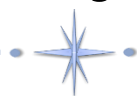
A los doctores Israel, Daniel, Carlos y Julián, por compartir su conocimiento, brindarme asesorías y consejos, y apoyarme durante la realización y conclusión de este proyecto. A las doctoras Irmita, María Elena, Gris, Luz, Miriam, por cada consejo, cada clase y cada momento de convivencia en el laboratorio.

A los amigos que hice en el laboratorio: Valeria, Hernán, Dra. Tanese, Alondra, Yare y David, gracias por su apoyo y por todos los momentos que compartimos juntos. Me llevo amigos para toda la vida. Los quiero mucho.

A Carlos Eduardo, por su apoyo, su amor, sus consejos y por todo lo que vivimos juntos. Tanto de los buenos como de los malos momentos me llevo grandes aprendizajes. Te amo.

Finalmente, a todos, de corazón, gracias. Concluyo esta etapa de la maestría llena de conocimientos, aprendizajes y, sobre todo, de amistades sinceras que siempre llevaré conmigo.

Resumen general



El cloranfenicol (CAP) es un antibiótico de amplio espectro empleado en el tratamiento de infecciones bacterianas graves. Sin embargo, su uso incontrolado e indiscriminado ha favorecido su presencia en cuerpos de agua, por lo que ha sido considerado un contaminante emergente. La presencia de este antibiótico en los ecosistemas puede generar efectos adversos tanto en el ambiente como en la salud humana, por lo que resulta necesario desarrollar metodologías analíticas sensibles y confiables para su determinación. En el presente trabajo se describe el desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación de CAP basada en un polímero molecularmente impreso (MIP). El MIP fue sintetizado mediante una reacción de precipitación por radicales libres, empleando ácido metacrílico (MAA) y pirrol como monómeros funcionales. Las interacciones entre la molécula plantilla de CAP y ambos monómeros fueron evaluadas mediante un estudio teórico-computacional basado en la teoría del funcional de la densidad mediante el método DFTB. El comportamiento electroquímico de CAP fue evaluado mediante voltamperometría cíclica (CV), observándose un pico catódico a -0.64 V y un pico anódico alrededor de 0.47 V, asociados con los procesos de reducción y oxidación del grupo nitro presente en la molécula. A partir de este comportamiento se estableció una metodología indirecta para la determinación de CAP mediante voltamperometría de redisolución adsorbtiva (AdSV) y técnicas electroquímicas sucesivas. Posteriormente, se construyó una curva de calibración empleando diferentes concentraciones estándar de CAP, obteniéndose dos intervalos lineales. Para uno de estos intervalos se obtuvieron valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) de 72.57 y 219.90 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Asimismo, se analizaron muestras reales provenientes de diversas fuentes de agua, obteniéndose porcentajes de recuperación cercanos al 100 %. Finalmente, se evaluó el efecto de la matriz sobre la sensibilidad mediante curvas de adición estándar para cada muestra analizada. Los resultados obtenidos permitieron demostrar la aplicabilidad de la metodología electroanalítica desarrollada para la determinación de CAP en muestras de agua.

Contenido general



Capítulo 1: Antecedentes generales.....	24
1.1 Contaminantes emergentes	24
1.2 Productos farmacéuticos	25
1.3 Cloranfenicol.....	26
1.3.1 Estructura química y propiedades fisicoquímicas	26
1.3.2 Estabilidad y persistencia en el medio ambiente	27
1.3.3 Farmacología y efectos sobre la salud humana	28
1.4 Técnicas analíticas convencionales para la determinación de CAP	29
1.5 Técnicas electroquímicas reportadas para la determinación de CAP.....	31
1.6 Polímeros molecularmente impresos (MIP)	35
1.7 Sensores electroquímicos modificados con MIP para la determinación de CAP en diferentes matrices.....	37
1.8 Estudio teórico; Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)	39
Capítulo 2: Objetivos y justificación	42
2.1 Objetivo general.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
2.3 Justificación	43
Capítulo 3: Estudio teórico-computacional del reconocimiento molecular entre CAP y monómeros funcionales (MAA y pirrol)	47
3.1 Metodología.....	47
3.1.1 Estudio teórico de moléculas individuales.....	47

3.1.2. Búsqueda conformacional de los sistemas binarios	47
3.1.3. Hamiltoniano y parámetros electrónicos.....	47
3.1.4 Protocolo de dinámica molecular	48
3.2. Resultados y discusión	49
3.2.1 Optimización y estudio teórico de las moléculas individuales.....	49
3.2.3 Búsqueda conformacional de los sistemas CAP–monómero.....	55
3.2.4 Re optimización DFT y energías de interacción de los complejos CAP–monómero	58
3.2.5 Estructura del complejo CAP–MAA y enlaces de hidrógeno.....	59
3.2.6 Estructura del complejo CAP–Pirrol y enlaces de hidrógeno.....	60
3.2.7. Análisis comparativo e interpretación general	61
3.2.8. Análisis de interacciones no covalentes (NCI).....	63
3.2.9. Comparación NCI entre sistemas.....	65
3.3 Conclusiones	66
Capítulo 4: Parte experimental; Determinación electroquímica de CAP empleando un GCPE modificado con MIP (pirrol-MAA) por AdSV en cuerpos de agua.	69
4.1 Metodología.....	69
4.1.1 Materiales y Reactivos	69
4.1.2 Equipos	70
4.1.3 Sistema Electroquímico	70
4.1.4 Síntesis de MIP y NIP.....	70
4.1.5 Preparación de los sensores electroquímicos: GCPE, GCPE/NIP y GCPE/MIP y activación electroquímica.....	73
4.1.6 Caracterización electroquímica del sensor GCPE/MIP	74

4.1.7 Determinación directa de CAP	76
4.1.8 Determinación indirecta de CAP	76
4.1.9 Optimización de la síntesis de MIP	77
4.1.10 Caracterización del material óptimo MIP y NIP	78
4.1.11 Optimización de parámetros críticos dentro de la metodología	79
4.1.12 Curva de calibración y obtención de parámetros analíticos	84
4.1.13 Estudio de reproducibilidad y repetibilidad	85
4.1.14 Análisis de muestras reales y efecto matriz	86
4.1.15 Exactitud: Obtención del porcentaje de recuperación	87
4.2 Resultados	88
4.2.1 Comparación del comportamiento electroquímico de un electrodo de pasta de carbono (CPE) y carbón vítreo (GCPE)	88
4.2.2 Evaluación del comportamiento electroquímico mediante CV del CAP.	89
4.2.3 Modificación del GCPE con MIP	90
4.2.4 Primera estrategia: Determinación directa de CAP empleando la Ventana Catódica	90
4.2.5 Segunda estrategia: Determinación indirecta de CAP utilizando la ventana anódica	92
4.2.6 Activación del sensor electroquímico GCPE/MIP y empleando CV	93
4.2.7 Optimización en la síntesis de MIP empleando Simplex Centroide	96
4.2.8 Caracterización del NIP y MIP óptimo	99
4.2.9 Optimización de parámetro críticos dentro de la metodología propuesta	109
4.2.10 Optimización de las técnicas electroquímicas sucesivas	115
4.2.11 Curva de calibración y obtención de parámetros analíticos	119

4.2.12 Pruebas de reproducibilidad y repetibilidad	120
4.2.13 Análisis de muestras reales y efecto matriz.....	121
4.3. Conclusiones	123
5. Anexos	124
6. Bibliografía	130

Índice de figuras



Figura 1	Estructura química del CAP.	27
Figura 2	Voltamperograma cíclico del estudio electroquímico del CAP obtenido de Chuanuwatanakul et al., 2008.	33
Figura 3	Esquema del reconocimiento molecular en MIP.	36
Figura 4	Reactivos más utilizados (monómeros, disolventes y entrecruzante) en la síntesis de MIP.	37
Figura 5	Estructura molecular optimizada y enumerada del CAP a nivel B3LYP/6-31G(d,p).	49
Figura 6	Representación de los orbitales HOMO (izquierda), LUMO (centro) y mapa de potencial electrostático de Mulliken (derecha) del CAP.	51
Figura 7	Estructura molecular optimizada y enumerada del MAA a nivel B3LYP/6-31G(d,p).	51
Figura 8	Representación de los orbitales HOMO (izquierda), LUMO (centro) y mapa de potencial electrostático de Mulliken (derecha) del MAA.	53
Figura 9	Estructura molecular optimizada del pirrol a nivel B3LYP/6-31G(d,p) y numeración de átomos empleada en el análisis geométrico.	53
Figura 10	Representación de los orbitales HOMO (izquierda), LUMO (centro) y mapa de potencial electrostático (derecha) del pirrol.	54
Figura 11	Evolución temporal de la energía total (panel superior) y la temperatura instantánea (panel inferior) del sistema CAP–MAA durante la simulación de dinámica molecular DFTB-SCC.	56
Figura 12	Evolución temporal de la energía total (panel superior) y la temperatura instantánea (panel inferior) del sistema CAP–Pirrol durante la simulación de dinámica molecular DFTB-SCC.	57
Figura 13	Geometría optimizada del complejo CAP–MAA a nivel ω B97X-D/def2-TZVP. Se indican las distancias de los dos enlaces de hidrógeno intermoleculares identificados: N–H $\cdots$ O = 1.95 Å y O–H $\cdots$ O = 1.77 Å (líneas punteadas). Código de colores: marrón = C, rojo = O, azul claro = N, verde = Cl, blanco = H.	60
Figura 14	Geometría optimizada del complejo CAP–Pirrol a nivel ω B97X-D/def2-TZVP. Se indican las distancias de los dos enlaces de hidrógeno intermoleculares: O–H $\cdots$ N = 1.91 Å y N–H $\cdots$ π = 2.03 Å (líneas punteadas). Código de colores: marrón = C, rojo = O, azul claro = N, verde = Cl, blanco = H.	61

Figura 15	Análisis NCI del complejo CAP–MAA. Izquierda: gráfica RDG vs $\text{sign}(\lambda_2)\rho$; los picos con $\text{RDG} \rightarrow 0$ en $\text{sign}(\lambda_2)\rho < 0$ corresponden a los enlaces de hidrógeno intermoleculares. Derecha: isosuperficies NCI ($\text{RDG} = 0.50$ u.a.) que muestran las regiones de interacción no covalente (verde = interacciones de dispersión/vdW).	64
Figura 16	Análisis NCI del complejo CAP–Pirrol. Izquierda: gráfica RDG vs $\text{sign}(\lambda_2)\rho$; los picos con $\text{RDG} \rightarrow 0$ reflejan las interacciones no covalentes intermoleculares. Derecha: isosuperficies NCI ($\text{RDG} = 0.50$ u.a.) que muestran las regiones de interacción (verde = dispersión/vdW, distribución consistente con la interacción $\text{O}-\text{H}\cdots\text{N}$ y $\text{N}-\text{H}\cdots\pi$).	65
Figura 17	Etapas en la destilación del pirrol empleando un sistema de micro destilación en un baño de aceite a 60°C . Adición del pirrol (izquierda), burbujeó y eliminación de oxígeno (centro), destilación del reactivo (derecha).	71
Figura 18	Etapas principales en la síntesis de MIP. Etapa de a) pre-polimerización; b) etapa de polimerización; c) etapa de lavados primarios; d) etapa de lavados secundarios.	72
Figura 19	Preparación de un GCPE modificado con MIP. (a) mezcla del carbón vítreo y el MIP; (b) incorporación del agente aglutinante y homogenización; (c) empaquetamiento de la mezcla en el cuerpo del electrodo; y (d) inserción del contacto eléctrico.	73
Figura 20	Etapa de carga en Voltamperometría de redisolución adsortiva.	75
Figura 21	Etapa de redisolución en Voltamperometría de redisolución adsortiva.	75
Figura 22	Metodología electroquímica en la determinación directa de CAP mediante DPV.	76
Figura 23	Metodología electroquímica en la determinación indirecta de CAP empleando técnicas electroquímicas sucesivas; cronoamperometría en sentido de reducción (izquierda) y DPV en sentido de oxidación (derecha).	77
Figura 24	Resumen de los parámetros a optimizar dentro de la metodología por AdSV para la determinación indirecta de CAP.	79
Figura 25	Valores de pK_a reportado para los monómeros pirrol y MAA y CAP.	81
Figura 26	Estudio de repetibilidad (izquierda) y estudio de reproducibilidad (derecha).	86
Figura 27	Pretratamiento para las muestras de agua.	87

Figura 28	CV de un CPE en 10.0mM de buffer fosfatos (pH 7). Velocidad de barrido 100 mV s ⁻¹ en tres segmentos de 0.00 V a 1.00 V, segundo segmento de 1.00 V a -1.00 V y tercer segmento de -1.00 V a 1.00V.	88
Figura 29	CV de un GCPE en 10.0 mM de buffer fosfatos (pH 7). Velocidad de barrido 100 mV s ⁻¹ en tres segmentos de 0.00 V a -1.00 V, segundo segmento de -1.00 V a 1.00 V y tercer segmento de 1.00 V a 0.00 V.	89
Figura 30	CV de un GCPE en una solución de CAP 1.00 mM (0.1 M de buffer fosfatos pH 7). Velocidad de barrido 100 mV s ⁻¹ en tres segmentos de 0.00 V a -1.00 V, segundo segmento de -1.00 V a 1.00 V y tercer segmento de 1.00 V a 0.00 V. b) mecanismo de reducción del CAP. c) mecanismo de oxidación del derivado de hidroxilamina.	90
Figura 31	a) DPV de un GCPE en una solución de CAP (1 mM) directo buffer fosfatos 0.1M a pH 7; b) DPV de GCPE/MIP empleando AdSV a pH 7 (etapa de carga y redisolución) ; 20 min agitación a 60 rpm; c) DPV de GCPE/MIP empleando AdSV a pH 7 (etapa de carga y redisolución) ; 40 min agitación a 60 rpm d) DPV de GCPE/MIP empleando AdSV a pH 7 (etapa de carga), pH 4 (etapa de redisolución) ; 20 min agitación a 60 rpm; e) DPV de GCPE/MIP empleando AdSV a pH 4 (etapa de carga) pH 7 (redisolución) ; 20 min agitación a 60 rpm. En un segmento de 0.00 V a -1.20 V.	91
Figura 32	Técnicas electroquímicas sucesivas empleadas en la determinación indirecta de CAP (1.00 mM en un buffer fosfatos pH 7) con un GCPE/MIP por AdSV, 20 min de tiempo de carga a 60 rpm. a) Cronoamperograma (en sentido de reducción) a un sobrepotencial de -800 mV P; b) DPV (en sentido anódico), paso de potencial 4.00 mV; amplitud de potencial, 50.0 mV; ancho de pulso, 200 ms; duración de pulso, 50.0 ms. En un segmento de 0.20 V a -0.20 V.	92
Figura 33	CVs para la activación del sensor electroquímico GCPE (8 ciclos) en una solución buffer fosfatos 10.0 mM a pH=7. Velocidad de barrido 100 mV s ⁻¹ (desde -1.50 a 1.60 V s ⁻¹).	93
Figura 34	DPVs de un GCPE modificado con MIP activado electroquímicamente y sin activar, obtenidos en buffer de fosfatos a pH 7, después de 20 min de agitación a 60 rpm en una solución de CAP 1.00 mM, empleando una velocidad de barrido de 100 mV s ⁻¹ en sentido de oxidación.	94
Figura 35	Diagramas de Nyquist del electrodo GCPE/MIP activado y sin activar, obtenidos en K ₃ [Fe(CN) ₆] 1.0 mM en KCl 0.1 M.	95

Figura 36	Gráficos tridimensionales de superficie de respuesta (izquierda) y gráfico de contornos (derecha) obtenidos mediante la ecuación de superficie de respuesta para un diseño Simplex Centroide.	99
Figura 37	Espectro de FTIR para el pirrol.	100
Figura 38	Espectro de FTIR para el MAA.	100
Figura 39	Espectro de FTIR para el EGDMA.	101
Figura 40	Espectros FTIR de MIP y NIP óptimo.	103
Figura 41	a) SEM obtenido para para NIP óptimo utilizando como monómeros; MAA y pirrol. b) SEM obtenido para para MIP óptimo utilizando como monómeros: MAA y pirrol.	104
Figura 42	Isotermas BET de adsorción y desorción para a) NIP y b) MIP.	105
Figura 43	Curvas termogravimétricas para NIP y MIP con una rampa de temperatura desde 25°C a 600°C.	106
Figura 44	Síntesis de NIP (izquierda) y MIP (derecha) mostrando el grado de oxidación.	107
Figura 45	DPVs obtenidos mediante técnicas electroquímicas sucesivas para un GCPE modificado al 10.00 % con NIP y 10.00 % con MIP a una concentración de 1 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6 por 10 minutos a 60 rpm.	109
Figura 46	Intensidades de corriente anódica (i_a) obtenidas para proporciones de MIP desde 0, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00 y 25.00 % presente en el GCPE empleando AdSV en la determinación indirecta de CAP. Condiciones experimentales: 0.05 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6, velocidad de agitación 60 rpm, tiempo de carga 5 min, pH de carga 6.	110
Figura 47	DPVs obtenidos en la optimización del pH en la etapa de carga (3,4,5,6 y 7) para la AdSV en la determinación de CAP utilizando un GCPE modificado con MIP Condiciones experimentales: 0.05 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6, 10 % de MIP en GCPE, velocidad de agitación 60 rpm, tiempo de carga 5 min. El inserto muestra la intensidad de corriente anódica obtenida para cada valor de pH evaluado.	111
Figura 48	DPVs obtenidos en la optimización del pH en la etapa de redisolución (3,4,5,6 y 7) para la AdSV en la determinación de CAP utilizando un GCPE modificado con MIP Condiciones experimentales: 0.05 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6, pH de carga 6,10 tabla de MIP en GCPE, velocidad de agitación 60 rpm, tiempo de carga 5 min.	112

Figura 49	Relación del pH con el potencial en la etapa de redisolución para la determinación de CAP.	113
Figura 50	Mecanismo de reducción y oxidación del grupo nitro presente en la molécula de CAP.	113
Figura 51	Intensidades de corriente anódica (i_a) obtenidas para tiempos de carga desde 3, 5, 10, 15 y 20 minutos en AdSV para la determinación indirecta de CAP. Condiciones experimentales: 0.05 mM de CAP, pH de carga 6, 10 % de MIP en GCPE, velocidad de agitación 60 rpm, sobrepotencial de cronoamperometría: -750.0mV.	114
Figura 52	Intensidades de corriente anódica (i_a) obtenidas para velocidades de agitación desde 50, 100, 200, 300 y 400 rpm en AdSV para la determinación indirecta de CAP. Condiciones experimentales: 0.05 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6, pH de carga 6, tiempo de carga 10 min, 20 % de MIP en GCPE.	115
Figura 53	Intensidades de corriente anódica (i_a) obtenidas a distintos valores de sobrepotenciales en cronoamperometría desde -700, -730, -750, -780, -800 y -850 mV empleando AdSV para la determinación de CAP. Condiciones experimentales: 0.05 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6, pH de carga 6, velocidad de agitación 200 rpm tiempo de carga 10 min, 20 % de MIP en GCPE.	116
Figura 54	Gráfico de efectos principales para las variables: amplitud, ancho, paso y periodo.	118
Figura 55	Curva de calibración empleando diferentes estándares de CAP empleando la metodología propuesta en la determinación indirecta de CAP. Condiciones experimentales: pH de redisolución 6, pH de carga 6, velocidad de agitación 200 rpm, tiempo de carga 10 min, 20 % de MIP en GCPE, sobrepotencial en cronoamperometría -780 mV.	119
Figura 1A	Señales de excitación de voltaje contra tiempo utilizadas en voltamperometría.	124
Figura 2A	Tipos de corriente dentro de un voltamperograma.	125
Figura 3A	Señal de excitación para DPV y sus principales componentes (izquierda); voltamperograma de una DPV (derecha).	127
Figura 4A	Esquema típico de una celda electroquímica utilizada en voltamperometría.	128
Figura 5A	Representación gráfica de los elementos de un sensor electroquímico.	129

Índice de tablas



Tabla 1	Clases de compuestos emergentes.	24
Tabla 2	Propiedades fisicoquímicas del CAP. Tomada de (Nie <i>et al.</i> , 2014).	27
Tabla 3	Técnicas convencionales reportadas en la determinación de CAP en diferentes matrices.	30
Tabla 4	Trabajos reportados para la determinación electroquímica de CAP empleando sensores y biosensores modificados para diversas muestras.	34
Tabla 5	Trabajos reportados para la determinación electroquímica de CAP empleando sensores modificados con MIP.	38
Tabla 6	Parámetros geométricos del CAP: distancias y ángulos de enlace.	49
Tabla 7	Parámetros geométricos del MAA: distancias y ángulos de enlace.	52
Tabla 8	Parámetros geométricos del pirrol: distancias y ángulos de enlace.	54
Tabla 9	Energías totales (u.a.) y energías de interacción (BE) de los complejos CAP–MAA y CAP–Pirrol a nivel ω B97X-D/def2-TZVP.	59
Tabla 10	Comparación de los parámetros de interacción de los complejos CAP–AM y CAP–Pirrol a nivel ω B97X-D/def2-TZVP.	61
Tabla 11	Variables codificadas para un diseño de mezclas Simplex Centroide.	77
Tabla 12	Niveles altos y bajos en para las variables: Plantilla:monómeros:entrecruzante.	78
Tabla 13	Factores y niveles empleando en el diseño Taguchi L9 (3^3).	83
Tabla 14	Matriz codificada para un diseño L9 (3^3).	83
Tabla 15	Matriz decodificada para el diseño Simplex Centroide en la optimización de MIP.	96
Tabla 16	ANOVA del diseño Simplex Centroide en la optimización de MIP.	97
Tabla 17	Longitudes de onda para las bandas características de pirrol.	100
Tabla 18	Longitudes de onda para las bandas características de MAA.	100
Tabla 19	Longitudes de onda para las bandas características de EGDMA.	101
Tabla 20	Parámetros BET obtenidos para NIP y MIP.	105

Tabla 21	Matriz decodificada para el diseño Taguchi L9 (3^3) en la optimización de DPV.	117
Tabla 22	Análisis de Varianza para el diseño Taguchi L9 (3^3).	117
Tabla 23	Parámetros analíticos para el primer y segundo intervalo lineal.	120
Tabla 24	Sensibilidad y porcentajes de recuperación obtenidas para las muestras reales.	121

Índice de ecuaciones

Ecuación 1	Reacción de reducción y oxidación de CAP.	32
Ecuación 2	Gradiente reducido de la densidad electrónica.	63
Ecuación 3	Ecuación de Nerst.	82
Ecuación 4	Ecuación de recta en la determinación de CAP.	84
Ecuación 5	Ecuación descrita para el límite de detección (LOD).	84
Ecuación 6	Ecuación descrita para el límite de cuantificación (LOQ).	85
Ecuación 7	Ecuación descrita para el porcentaje de recuperación.	88
Ecuación 8	Ecuación de superficie de respuesta para el diseño Simplex Centroide.	98
Ecuación 9	Ecuación descrita para la prueba t de Student.	99
Ecuación 10	Ecuación de Nerst dependiente del pH.	113

Abreviaturas, acrónimos y símbolos



% R	Porcentaje de recuperación
% RSD (<i>siglas en inglés</i>)	Porcentaje de desviación estándar
$\nabla\rho$	Gradiente de la densidad electrónica
°C	Grados centígrados
A	Amperes
Å	Ángstrom
AdSV (<i>siglas en inglés</i>)	Voltamperometría de redisolución adsortiva
BE (<i>siglas en inglés</i>)	Energía de interacción
BET (<i>siglas en inglés</i>)	Análisis Brunauer-Emmett-Teller
BS (<i>siglas en inglés</i>)	Biosensores
CAP	Cloranfenicol
CE (<i>siglas en inglés</i>)	Electrodo auxiliar
CV (<i>siglas en inglés</i>)	Voltamperometría cíclica
def2-TZVP	Conjunto de funciones base de triple zeta con funciones de polarización
DFT (<i>siglas en inglés</i>)	Teoría del funcional de la densidad
DFTB (<i>siglas en inglés</i>)	Teoría del funcional de la densidad de enlace fuerte
DFTB-SCC (<i>siglas en inglés</i>)	Teoría del funcional de la densidad de enlace fuerte con corrección de autoconsistencia de carga
DPV (<i>siglas en inglés</i>)	Voltamperometría diferencial de pulsos
E	Potencial
EDS (<i>siglas en inglés</i>)	Espectroscopía de dispersión de rayos X
EGDMA (<i>siglas en inglés</i>)	Dimetacrilato de etilenglicol
fs	Femtosegundo
GCE (<i>siglas en inglés</i>)	Electrodo de carbón vítreo
GCPE (<i>siglas en inglés</i>)	Electrodos de pasta de carbón vítreo
GL	Grados de libertad
HOMO (<i>siglas en inglés</i>)	Orbital molecular ocupado de más alta energía
i	Intensidad de corriente
K	Kelvin

L	Litros
LOD (<i>(siglas en inglés)</i>)	Límite de detección
LOQ (<i>(siglas en inglés)</i>)	Límite de cuantificación
LSV (<i>(siglas en inglés)</i>)	Voltamperometría de barrido lineal
LUMO (<i>(siglas en inglés)</i>)	Orbital molecular desocupado de más baja energía
M	Molar
m	Numero de protones
MAA (<i>(siglas en inglés)</i>)	Ácido metacrílico
MEP (<i>(siglas en inglés)</i>)	Mapas de potencial electrostático molecular
MIP (<i>(siglas en inglés)</i>)	Polímero molecularmente impreso
n	Numero de electrones
NBO (<i>(siglas en inglés)</i>)	Orbitales naturales de enlace
NCI	Análisis de interacciones no covalentes
NES (<i>(siglas en inglés)</i>)	Sensor no enzimático
ng	Nanogramos
NPs	Nanopartículas
NPV (<i>(siglas en inglés)</i>)	Voltamperometría normal de pulso
o-PD	O-fenilendiamina
ps	Picosegundo
r	Coeficiente de correlación
r²	Coeficiente de determinación
RDG (<i>(siglas en inglés)</i>)	Gradiente de densidad reducido
RE (<i>(siglas en inglés)</i>)	Electrodo de referencia
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
s(ρ)	Gradiente reducido de la densidad electrónica
SCC (<i>(siglas en inglés)</i>)	Autoconsistencia de carga
SCF (<i>(siglas en inglés)</i>)	Energía de interacción electrónica
SEM (<i>(siglas en inglés)</i>)	Microscopia electrónica de barrido
SWV (<i>(siglas en inglés)</i>)	Voltamperometría de onda cuadrada
t	Tiempo
TGA (<i>(siglas en inglés)</i>)	Análisis termogravimétrico
u.a.	Unidades atómicas
V	Volts
WE (<i>(siglas en inglés)</i>)	Electrodo de trabajo

ZPE (*siglas en inglés*)

ΔG

ΔH

λ_2

ν

ρ

ω B97X-D

Energía con corrección de punto cero
vibracional

Energía de Gibbs

Entalpia

Segundo autovalor del tensor Hessiano de
la densidad electrónica

Vibración de estiramiento

Densidad electrónica

Funcional híbrido de rango separado con
corrección de dispersión

Introducción



Los contaminantes emergentes comprenden sustancias químicas cuya presencia en el medio ambiente no es monitoreada de manera rutinaria pero que presentan el potencial de incorporarse al medio ambiente (Gil Garzón *et al.*, 2012). La exposición prolongada a bajos niveles de estos contaminantes puede tener efectos adversos aún no comprendidos, dado que muchos de ellos no han sido suficientemente evaluados por falta de técnicas adecuadas para su identificación (Boxall *et al.*, 2004). Dentro de los contaminantes emergentes, los fármacos y particularmente los antibióticos han despertado especial interés y preocupación en los últimos años, debido a su potencial impacto en la salud humana (Richardson *et al.*, 2007).

El cloranfenicol (CAP) es un antibiótico de amplio espectro empleado en el tratamiento de infecciones bacterianas graves, como la fiebre tifoidea y el cólera, sin embargo, su uso excesivo e incontrolado en áreas como la ganadería, hospitales y actividades humanas en general, ha provocado su presencia y persistencia en cuerpos de agua (Gruhzit *et al.*, 1949).

Reportes indican que la exposición con dicha sustancia puede provocar efectos adversos a la salud que van desde supresión de la médula ósea, síndrome del bebé gris, anemia aplásica y resistencia bacteriana (Nguyen *et al.*, 2022). Esta última problemática representa uno de las principales problemáticas a nivel mundial, ya que dificulta el tratamiento de infecciones y plantea serios problemas de salud pública (Naghavi *et al.*, 2024).

Como resultado, surge la necesidad de desarrollar métodos analíticos o electroquímicos para la determinación de CAP en cuerpos de agua (lagos, ríos, etc.). Reportes recientes indican la presencia de CAP en cuerpos de agua en concentraciones que varían entre ng L^{-1} y $\mu\text{g L}^{-1}$ (Nguyen *et al.*, 2022).

Con base a lo anterior, la literatura describe métodos de análisis en la determinación de CAP, incluyendo métodos instrumentales clásicos como cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS) (Patyra y Kwiatek, 2020), cromatografía de gases (CG) (Shen *et al.*, 2009), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Scortichini *et al.*, 2005) y otros (Chen

et al., 2009). Aunque estos métodos han demostrado ser precisos y exactos en la determinación del CAP, llegan a ser costosos y tardados. En este sentido, una alternativa la ofrecen los métodos basados en detección electroquímica, ya que han demostrado ser tan eficientes como los métodos aceptados oficialmente, pero con análisis menos costosos, sensibles y más rápidos (Karimian *et al.*, 2019).

Los métodos electroquímicos son ampliamente utilizados en química analítica debido a que ofrecen ventajas como bajo costo, alta sensibilidad y tiempos de análisis reducidos. Se han desarrollado diversos métodos para la determinación de CAP, como la voltamperometría con microelectrodos de fibra de carbono activados electroquímicamente (Agüí *et al.*, 2002), electrodos de carbono vítreo modificados con película compuesta de nanotubos de carbono de pared simple, nanopartículas de oro y líquido iónico (Alizadeh, 2009) y electrodos de diamante dopado con boro (Alizadeh y Akhoundian, 2010). Sin embargo, la selectividad sigue siendo uno de los principales desafíos para los sensores electroquímicos desarrollados.

Como una alternativa a esta problemática, en la actualidad se ha descrito la aplicación de polímeros molecularmente impresos (MIP) en la modificación de sensores electroquímicos. Los MIP son materiales tridimensionales diseñados para reconocer selectivamente un compuesto específico o una clase de compuestos, lo que mejora significativamente la sensibilidad y selectividad de los sensores electroquímicos al minimizar interferencias y facilitar la detección precisa de analitos (Crapnell *et al.*, 2020).

La síntesis de estos materiales se basa en la formación de un complejo monómero-plantilla, utilizando monómeros funcionales y un analito objetivo (plantilla). Posteriormente, mediante el uso de un agente entrecruzante, se genera una red tridimensional alrededor de dicho complejo. Tras la etapa de polimerización, la plantilla es eliminada mediante procesos de lavado, dejando sitios de reconocimiento específicos que presentan afinidad estructural y química hacia el analito objetivo (de León-Martínez *et al.*, 2018).

El CAP ha sido ampliamente estudiado como analito objetivo en la preparación de MIPs. La mayoría de los reportes se enfocan en el uso de monómeros funcionales derivados de

grupos carboxilos, como el ácido metacrílico (MAA) (Alizadeh et al., 2012) o la arginina (Lai et al., 2023), los cuales forman complejos estables con la plantilla a través de interacciones de puente de hidrógeno. Asimismo, se ha reportado el empleo de monómeros aromáticos, como la anilina (Wu, Zhang, Jia, Wu, *et al.*, 2025) y la *o*-fenilendiamina (*o*-PD) (Geng *et al.*, 2022), cuyos anillos aromáticos favorecen principalmente interacciones de tipo π - π con el analito, contribuyendo a mejorar el proceso de reconocimiento molecular y la selectividad del polímero.

Una molécula de interés debido a su similitud estructural y química hacia los monómeros aromáticos anteriormente mencionados es el pirrol. Sin embargo, no se han reportado estudios que exploren la aplicación de éste, en la síntesis de MIP para la determinación de CAP. El uso de pirrol en electroquímica está destinado exclusivamente a la síntesis electroquímica de polipirrol, el cual, es uno de los polímeros conductores más utilizados debido a su alta actividad catalítica sobre la señal electroquímica (Zhou y Heinze, 1999). Consecuencia de los enlaces conjugados a lo largo de la cadena molecular del polímero y su elevada rigidez estructural (Maksymiuk, 2006), en comparación con los polímeros conductores a base de anilina, los cuales presentan una estructura más flexible.

A partir de lo anterior mencionado, el uso del pirrol como monómero funcional en la síntesis de MIP ofrece ventajas adicionales para la formación de sitios selectivos hacia el CAP, ya que, además de las interacciones por puentes de hidrógeno, e interacciones π - π . La rigidez y planaridad del pirrol al polimerizarse incrementa la estabilidad en la formación del complejo “monómero-plantilla”.

De acuerdo con lo anterior, en este proyecto, se plantea desarrollar una metodología electroanalítica basada en Voltamperometría de redisolución adsorbtiva (AdSV) para la determinación electroquímica de CAP en cuerpos de agua utilizando electrodos de pasta de carbón vítreo modificados con polímeros molecularmente impresos (GCPE/MIP) empleando como monómeros funcionales en MAA y pirrol.



CAPÍTULO

I



Antecedentes generales



Capítulo 1: Antecedentes generales

1.1 Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes se definen como compuestos que actualmente no están cubiertos por las normativas vigentes sobre la calidad del agua, que no se han estudiado previamente y que se consideran amenazas potenciales para los ecosistemas y la salud y seguridad humanas (Rayan, 2023). Su diversidad química es amplia: abarca desde productos farmacéuticos, drogas de abuso, productos de cuidado personal (PCP), esteroides y hormonas, tensioactivos, compuestos perfluorados (PFC), retardantes de llama, aditivos y agentes industriales, y aditivos para la gasolina, así como sus productos de transformación (PT) (Tabla 1). Además, la literatura científica reciente ha ampliado esta clasificación integrando de manera formal a los nanomateriales, al compuesto 1,4-dioxano y a los subproductos químicos de la desinfección de piscinas (Richardson et al., 2007).

Tabla 1. Clases de compuestos emergentes.

Compuesto	Ejemplos
Drogas de abuso	Anfetamina, cocaína, tetrahidrocannabinol
Retardantes de llama	Cloroalcanos C10–C13, hexabromociclododecano, éteres de difenilo polibromados, tetrabromobisfenol A, tris(2-cloroetil) fosfato
Aditivos para gasolina	Dialquil éteres éter metil-terc-butílico
Aditivos y agentes industriales	Agentes quelantes (EDTA), sulfonatos aromáticos
Productos de cuidado personal	Benzofenona; N, N-dietiltoluidina; metilbencilideno, nitro,
Fragancias, repelentes de insectos, jabones, antimicrobianos, protectores solares	Almizcles policíclicos y macrocíclicos; triclosán
Productos farmacéuticos	Acetaminofén, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, diazepam
Analgésicos y antiinflamatorios, antimicrobianos para uso humano y veterinario, antiepilépticos, reguladores de lípidos en sangre y fármacos psiquiátricos, antitumorales, fármacos cardiovasculares	Carbamazepina, benzafibrato, iopromida, iopamidol
Esteroides y hormonas	Dietilestilbestrol, estradiol, estriol, estrona
Tensioactivos y metabolitos de tensioactivos	Etoxilatos de alquilfenol, alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol), carboxilatos de alquilfenol
Nuevas clases	Nanomateriales 1,4-dioxano Subproductos de la desinfección de piscinas

Tabla modificada de (Farré et al., 2008).

El ingreso y la consecuente dispersión de compuestos inorgánicos y, principalmente, orgánicos en el medio ambiente están ligados directamente a su uso y gestión de residuos, abarcando desde efluentes domésticos e industriales hasta la excreción de medicamentos. Dado este origen ligado a la actividad humana, las plantas de tratamiento de aguas residuales experimentan dificultades para procesarlos, haciendo imperativo el estudio de su destino en estas plantas. Si bien existen mecanismos de degradación biológica, química y fotoquímica que facilitan su eliminación, las transformaciones sufridas dependen del medio físico (aguas superficiales, subterráneas, sedimentos o plantas de tratamiento). Como consecuencia, se producen derivados que con frecuencia alteran el perfil ecotoxicológico original (Boxall *et al.*, 2004).

1.2 Productos farmacéuticos

Entre los contaminantes emergentes, uno de los grupos más estudiados en las últimas décadas ha sido los productos farmacéuticos (Rayan, 2023). A diferencia de los contaminantes industriales, que generalmente están sujetos a regulación en el punto de descarga, los productos farmacéuticos son biológicamente activos y persistentes en el medio ambiente, incluso a bajas concentraciones. Esto significa que suelen ingresar al medio ambiente a través de la excreción después de que una persona usa el medicamento, la eliminación intencional de medicamentos no utilizados y el tratamiento de aguas residuales o descargas de hospitales y plantas de fabricación de productos farmacéuticos (Kurnianto *et al.*, 2026). Lo que distingue a los productos farmacéuticos es su aparente diversidad química, potencia biológica y persistencia en el medio ambiente.

Estudios recientes han observado una variedad de principios activos farmacéuticos en medios y sistemas ambientales, incluyendo aguas superficiales, aguas subterráneas, suelos agrícolas e incluso en cadenas alimentarias (Ayala Cabana *et al.*, 2024).

Los analgésicos de venta libre, antibióticos, agentes anticancerígenos, las hormonas y medicamentos psiquiátricos se han detectado de forma recurrente en los programas de monitoreo realizados en todo el mundo (Gil Garzón *et al.*, 2012).

Cuantitativamente, los productos farmacéuticos se miden a menudo en concentraciones de nanogramos a microgramos (ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), y su liberación repetida genera una situación de exposición crónica, especialmente en ecosistemas de agua dulce, a un escenario de exposición a bajas dosis (Nafade *et al.*, 2019).

1.3 Cloranfenicol

El cloranfenicol (CAP) es un antibiótico fenólico de amplio espectro, utilizado clínicamente desde 1949 en medicina humana y veterinaria. Este antibiótico fue desarrollado a partir de especies del género bacteriano *Streptomyces*, en particular *Streptomyces venezuelae* (Gruhzit *et al.*, 1949). Fue uno de los primeros antibióticos sintéticos que se descubrieron y se utilizó ampliamente debido a su efectividad contra una variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas, así como algunas bacterias anaerobias y otros patógenos (Paris y Dumler, 2016).

Su capacidad para tratar infecciones graves, como la fiebre tifoidea y el cólera, lo hizo un recurso valioso en la medicina. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios graves, su uso ha disminuido (daño a la médula ósea, incluida la anemia aplásica) en los seres humanos, suele reservarse para el tratamiento de infecciones graves y potencialmente mortales.

El CAP ha sido etiquetado como un contaminante emergente debido a su presencia creciente en el medio ambiente, particularmente en cuerpos de agua, lo que plantea un riesgo para el ecosistema y la salud humana (Oong y Tadi, 2026).

1.3.1 Estructura química y propiedades fisicoquímicas

El CAP es un polvo cristalino fino de color blanco a blanco grisáceo o blanco amarillento soluble en solventes polares como cloroformo y etanol, su estructura química se ilustra en la Figura 1, presenta un anillo de paranitrobenceno que está conectado a un grupo propanodiol, el cual, a su vez, está unido a una cadena lateral de dicloracetamida (Sathya *et al.*, 2020a).

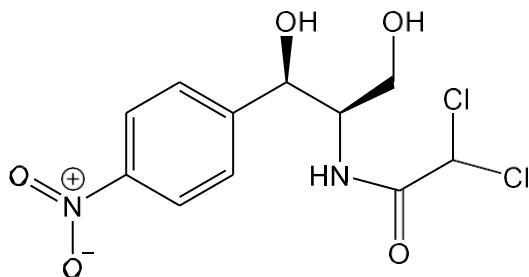


Figura 1 Estructura química del CAP.

Algunas propiedades fisicoquímicas del CAP se muestran en la Tabla 2 (Nie *et al.*, 2014).

Tabla 2.Propiedades fisicoquímicas del CAP.

Propiedades fisicoquímicas					Valor
Formula					C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅
Peso molecular					323.13 g mol ⁻¹
Log K _{ow}					1.14
Solubilidad					En agua 2.50 mg mL ⁻¹ a 25.00 °C
Punto de fusión					150.0-151.5°C
Recuento	de	donantes	de	enlaces	3
hidrogeno					
Recuento	de	aceptores	de	enlaces	5
hidrogeno					
Recuento de centros quirales					1
Carga formal					0

Tabla modificada de (Nie *et al.*, 2014).

Químicamente, se comporta como un ácido muy débil. Para que el CAP pierda un protón y se convierta en un ion con carga negativa, necesitarías un entorno extremadamente básico (alcalino), sin embargo, antes de perder un protón ocurre la degradación de la molécula (Higuchi *et al.*, 1954b).

El CAP se mantiene estable en un intervalo de pH de 2 a 7, alcanzando su punto de estabilidad máxima en 5.5. Fuera de este intervalo la molécula es susceptible a dos vías de degradación: la hidrólisis de amida o la ruptura del enlace carbono-cloro alrededor de pH 7 (Shih, 1971).

1.3.2 Estabilidad y persistencia en el medio ambiente

En humanos, la eliminación del CAP ocurre fundamentalmente mediante biotransformación, excretándose hasta el 90.00 % de la dosis administrada en orina como conjugado de glucurónido de CAP. Sin embargo, en el medio ambiente, este metabolito es

susceptible de ser desconjugado por la acción bacteriana, lo que da lugar a la regeneración del compuesto (Halling-Sørensen *et al.*, 1998).

El CAP muestra estabilidad química en ciertas condiciones ambientales, como en soluciones con pH neutro o ácido, a temperaturas moderadas o bajas, y en ausencia de luz solar directa. Esta estabilidad relativa le permite persistir en entornos naturales comunes, donde su degradación es lenta, lo que influye directamente en su clasificación como contaminante emergente. Aunque el CAP se descompone en condiciones extremas, como en ambientes con pH muy alto o bajo exposición solar intensa, en la mayoría de los ecosistemas permanece sin cambios durante largos períodos (Cheng *et al.*, 2020).

Esta persistencia es problemática, ya que los sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales no logran eliminarlo por completo, facilitando su acumulación en suelos y cuerpos de agua (Lin *et al.*, 2022).

Se ha reportado la presencia de CAP en diferentes cuerpos de agua como: ríos, lagos, presas y mares desde concentraciones de ng L^{-1} hasta $\mu\text{g L}^{-1}$ (Nguyen *et al.*, 2022). A pesar de sus bajas concentraciones, el CAP tiene el potencial de generar resistencia antimicrobiana en bacterias, lo que constituye una amenaza significativa para la salud pública. Además, su toxicidad afecta a los organismos acuáticos y terrestres expuestos a este antibiótico evitando su crecimiento y desarrollo a lo largo del tiempo, lo que refuerza su consideración como contaminante emergente, debido a su impacto ambiental y en los sistemas biológicos.

1.3.3 Farmacología y efectos sobre la salud humana

El CAP se administra por vía oral e intravenosa y se distribuye ampliamente en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales, alcanzando altas concentraciones en el hígado y los riñones. Este antibiótico inhibe tanto la síntesis de proteínas en bacterias como en células del mamífero (Nguyen *et al.*, 2022).

El CAP, puede provocar varios efectos adversos sobre la salud. Uno de los efectos más graves es la depresión de la médula ósea, que puede resultar en anemia, leucopenia y trombocitopenia. La anemia, es caracterizada por una disminución en el número de glóbulos

rojos, lo que puede llevar a una fatiga y debilidad. La leucopenia, o reducción de glóbulos blancos, aumenta la susceptibilidad a infecciones, mientras que la trombocitopenia, o disminución de plaquetas, incrementa el riesgo de sangrado y moretones. En casos más severos, el CAP puede causar anemia aplásica, una condición grave en la que la médula ósea no produce suficientes células sanguíneas (Papich, 2013).

En recién nacidos y lactantes, el CAP puede inducir el síndrome del neonato gris, una afección peligrosa que se manifiesta con una coloración grisácea de la piel, colapso cardiovascular y problemas respiratorios, debido a la incapacidad del hígado inmaduro para metabolizar el medicamento adecuadamente, lo que puede llevar a la muerte del recién nacido.

Se ha informado de un "síndrome gris" similar en adultos que recibieron una sobredosis accidental del fármaco. Se ha observado dermatitis de contacto alérgica en un paciente que utilizó una crema tópica que contenía CAP. También se ha informado de neuritis óptica y escotoma con pérdida de visión. El CAP se ha relacionado con el labio hendido. Se han observado anomalías cromosómicas en linfocitos humanos tratados con CAP in vitro (Fang *et al.*, s.f.).

1.4 Técnicas analíticas convencionales para la determinación de CAP

En vista de lo anterior, la determinación y monitoreo de CAP en cuerpos de agua y alimentos de origen animal es de suma importancia. En años recientes se ha reportado el uso de metodologías analíticas para la cuantificación de CAP en una amplia variedad de matrices, incluyendo tejidos animales, huevos, miel, leche y cuerpos de agua. Especialmente por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Liu *et al.*, 2013), cromatografía de gases (GC) (Shen *et al.*, 2009), cromatografía líquida (LC) (Patyra y Kwiatek, 2020) basadas en la distinta afinidad de los analitos por la fase móvil y la fase estacionaria, lo que permite su separación, identificación y cuantificación. Asimismo, se ha empleado y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Scortichini *et al.*, 2005) que se basa en la

interacción específica entre un anticuerpo y el analito de interés, seguida de una reacción enzimática que permite su detección y cuantificación.

En la Tabla 3 se presenta un resumen de las principales metodologías analíticas reportadas para la determinación de CAP.

Tabla 3. Técnicas convencionales reportadas en la determinación de CAP en diferentes matrices.

Tipo de muestra	Técnica analítica	LOD	Porcentaje de recuperación (%)	Referencia
Músculo, huevos, miel y leche	ELISA	-músculo 0.02 $\mu\text{g kg}^{-1}$ -huevos $8.00 \times 10^{-3} \mu\text{g kg}^{-1}$ -miel 0.06 $\mu\text{g kg}^{-1}$ -leche 0.22 $\mu\text{g kg}^{-1}$	-músculo 78.20-88.00 -huevos 78.20-89.70 -miel 96.20-103.00 -leche 96.20-107.50	(Scortichini <i>et al.</i> , 2005)
Músculo de pollo	LC-ESI-MS/MS	0.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	95.10- 107.30	(Zhang <i>et al.</i> , 2008)
Alimento para animales	LC-MS-ESI	100.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$	79.30- 101.40	(Patyra y Kwiatek, 2020)
Músculo porcino	GC-NCI/MS	0.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	78.50 -105.50	(Shen <i>et al.</i> , 2009)
Miel	HPLC-VWD	0.60 g kg^{-1}	89.50 -93.60	(Chen <i>et al.</i> , 2009)
Miel	LC-MS/MS	0.07 $\mu\text{g kg}^{-1}$	98.70-102.00	(Forti <i>et al.</i> , 2005)
Orina	LC-MS/MS	2440.00 $\mu\text{g L}^{-1}$	49.00-79.00	(Tuerk <i>et al.</i> , 2006)
Agua de río y aguas residuales	HPLC	0.08 $\mu\text{g L}^{-1}$	80.00-111.00	(Peng <i>et al.</i> , 2008)
Aguas superficiales y aguas residuales	HPLC	4.00 $\mu\text{g L}^{-1}$	96.00-108.00	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
Agua potable	UHPLC-EIS-MS/MS	$2.00 \times 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$	93.20-95.70	(Li <i>et al.</i> , 2018)

Abreviaturas: ELISA= ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas; LC= cromatografía líquida; ESI=ionización por electrospray; MS=espectrometría de masas; GC=cromatografía de gases; NCI= ionización química negativa; VWD=detector de longitud de onda variable.

Estos métodos analíticos para la detección de CAP, aunque ofrecen diversas ventajas, también presentan algunas desventajas. Por ejemplo, las técnicas de inmunoensayo destacan por su simplicidad, rapidez y facilidad de uso, aunque pueden presentar reacciones

cruzadas que ocasionan resultados falsos positivos, afectando la confiabilidad del análisis. Por otra parte, las técnicas de separación, como HPLC, ofrecen una elevada sensibilidad y selectividad; no obstante, requieren instrumentación costosa, personal especializado y un elevado consumo de solventes orgánicos, lo que incrementa los costos operativos y genera un impacto ambiental considerable (Nesic *et al.*, 2017).

Debido a estas limitaciones, existe un interés creciente en el desarrollo de metodologías analíticas alternativas que sean más rápidas, sensibles, selectivas, económicas y amigables con el medio ambiente. En este contexto, las técnicas electroquímicas han surgido como una opción prometedora, ya que permiten la determinación de analitos a bajos niveles de concentración mediante instrumentación de menor costo, tiempos de análisis cortos y un reducido consumo de reactivos y solventes (Karimian *et al.*, 2019).

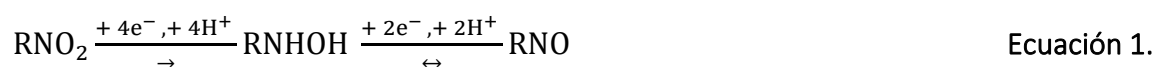
Por otra parte, la información reportada en la literatura sobre la determinación de CAP en muestras de agua es aún limitada, a pesar de que este antibiótico ha sido detectado en diferentes cuerpos de agua como consecuencia de descargas provenientes de actividades agrícolas, pecuarias, farmacéuticas y hospitalarias. La escasez de métodos analíticos dirigidos a esta matriz evidencia la necesidad de desarrollar estrategias de detección que permitan el monitoreo sensible y confiable de CAP en el ambiente.

1.5 Técnicas electroquímicas reportadas para la determinación de CAP

Las técnicas electroquímicas se basan en la determinación de propiedades eléctricas de analitos en disolución cuando forman parte de una celda electroquímica (Karimian *et al.*, 2019). Estudian la transformación de la energía eléctrica a química y viceversa; investigando procesos fisicoquímicos de oxido-reducción que ocurren en la interfase entre un conductor químico y un conductor iónico (Crespi, 2020). En los procesos electroquímicos, se controla una variable eléctrica y se monitorean los cambios en las demás, lo que describe los fenómenos químicos que ocurren en la superficie del electrodo (Bagockij, 2006).

En la determinación electroquímica de analitos, las técnicas más utilizadas por su sencillez de operación, rapidez y sensibilidad son las voltamperometrías (sección 5.1 anexos), en especial la voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) (Venton y DiScenza, 2020) y de onda cuadrada (SWV) (sección 5.2 de anexos), las cuales se basan en la medición de una corriente eléctrica en función a un potencial aplicado sobre un electrodo de trabajo sumergido en una solución electrolítica que contiene una especie electroactiva (Huang *et al.*, 2021). Estas características han favorecido su aplicación en el desarrollo de sensores electroquímicos para la determinación de CAP, los cuales, de acuerdo con el elemento de reconocimiento empleado, se clasifican en biosensores (BS) y sensores no enzimáticos (NES) (sección 5.5 anexos).

Dado que el grupo nitro presente en la molécula de CAP (Figura 1) actúa como centro redox activo, el uso de sensores electroquímicos son particularmente útiles para su análisis. Los primeros estudios sobre el comportamiento electroquímico del CAP fueron realizados por Tocher y Edwards, quienes, mediante CV, demostraron la formación de especies intermediarias durante los procesos de oxidación y reducción de este antibiótico (Ecuación 1) (Tocher y Edwards, 1989).



En 2008, S. Chuanuwatanakul y colaboradores (Chuanuwatanakul *et al.*, 2008) estudiaron las propiedades electroquímicas del CAP utilizando CV en un electrodo de película delgada de diamante dopado con boro. En la Figura 2 se muestra el voltamperograma obtenido, en el cual el potencial se barrió durante dos ciclos en un intervalo de -1.20 a 1.20 V. Durante el primer barrido se observaron dos picos, uno catódico a -0.85 V y otro anódico a 0,44 V, ambos frente a Ag/AgCl. En el segundo barrido se observó un nuevo pico catódico a -0.39 V frente a Ag/AgCl. Estos resultados confirmaron la presencia de especies intermediarias en las reacciones de oxidación y reducción del CAP. El primer pico catódico (-0.85 V) corresponde a una reducción irreversible del grupo nitro al derivado de hidroxilamina. El pico anódico (0.44) surge de la oxidación del derivado de hidroxilamina a un derivado nitroso

durante el barrido inverso. Posteriormente, el segundo pico catódico (-0.39 V) se atribuye a la reducción reversible del compuesto nitroso nuevamente al derivado de hidroxilamina.

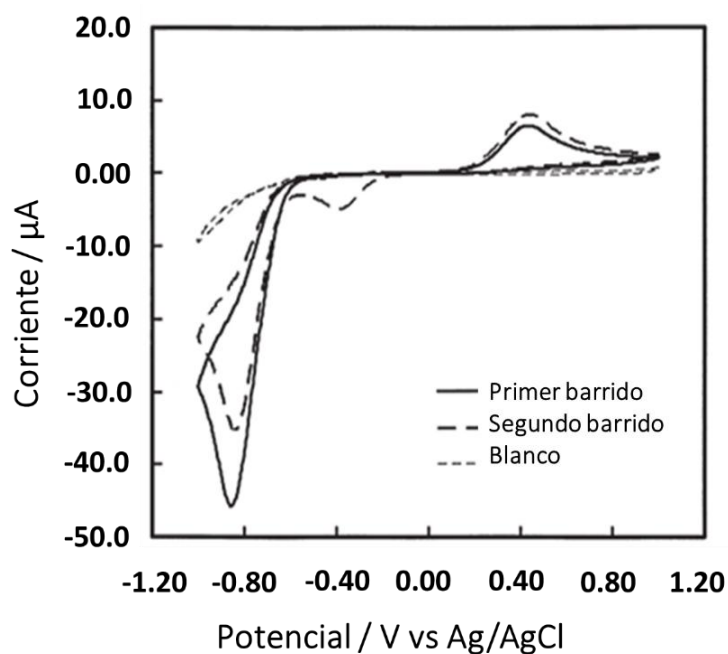


Figura 2 Voltamperograma cíclico del estudio electroquímico del CAP obtenido de Chuanuwatanakul et al., 2008.

En la Tabla 4 se presenta un resumen de algunos NES y BS reportados para la determinación de CAP en diferentes matrices. En la mayoría de los métodos descritos, la cuantificación del analito se basa en la reducción electroquímica del grupo nitro presente en la molécula de CAP, aprovechando la actividad redox característica de este grupo funcional.

Tabla 4. Trabajos reportados para la determinación electroquímica de CAP empleando sensores y biosensores modificados para diversas muestras.

Tipo de muestra	Técnica electroquímica	Tipo de sensor	Sensor electroquímico (modificante/electrodo)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referencia
Leche	SWV	NES	CFME	15.00	(Agüí <i>et al.</i> , 2002)
Leche	LSV	NES	SWCNTs-AuNPs-IL/ GCE	1.62	(Xiao <i>et al.</i> , 2007)
Orina	LSV	NES	Fe/ NC-Nafion/GCE	10.02	(Baikeli <i>et al.</i> , 2020)
Leche y miel	CV	BS	AuNPs/GO/GCE	81.00	(Karthik <i>et al.</i> , 2016)
Miel	DPV	BS	Apt/dsDNA/AuE	6.60×10^{-2}	(L. Yan <i>et al.</i> , 2012)
Leche	LSV	BS	Apt/rGO/AgNPs/GCE	0.65	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
Pescado	SWV	BS	Apt/MGP/GCE	3.00×10^{-4}	(Z. Yan <i>et al.</i> , 2015)
Agua de río y presa	CV	NES	DUT-4/pTSA/GCE	12.60	(Rafi <i>et al.</i> , 2024)

Abreviaturas: NES=sensor no enzimático; BS=biosensor; SWV=voltamperometría de onda cuadrada; LSV=voltamperometría lineal CFME= microelectrodos cilíndricos de fibra de carbono; GCE= electrodo de carbono vítreo; SWCNTs= nanotubos de carbono de pared simple; AuNPs=nanopartículas de oro; IL=liquido iónico; Fe/NC-Nafion=película compuesta de carbono dopado con nitrógeno y hierro, fijada con Nafion; MIP=polímero molecularmente impreso; CPE= electrodo de pasta de carbono; DPV=voltamperometría diferencial de pulsos; Apt=aptasensor; dsDNA= ADN de doble cadena; AuE=electrodo de oro; rGO =óxido de grafeno reducido; MGP=nanopartículas magnéticas de oro;DUT-4= estructura orgánica de aluminio; pTSA=ácido poli(para-tolueno sulfónico).

Los NES desarrollados para la determinación de CAP han demostrado una elevada sensibilidad, alcanzando LOD del orden de partes por millón (ppm) y partes por billón (ppb). Sin embargo, su principal limitación radica en la selectividad. Debido a que las muestras reales, como alimentos o matrices ambientales, contienen una gran variedad de compuestos químicos que pueden interferir en la determinación precisa de CAP afectando la respuesta analítica (Bruckschlegel *et al.*, 2025).

Por otra parte, los BS incorporan un elemento de reconocimiento biológico, generalmente una enzima, que les confiere una alta selectividad hacia el analito de interés. Gracias a esta interacción específica, estos dispositivos pueden alcanzar límites de detección del orden de partes por trillón (ppt), además de ofrecer una excelente sensibilidad (Mehrotra, 2016). Sin embargo, su aplicación presenta algunas desventajas importantes, entre ellas el elevado costo de fabricación, la complejidad de su preparación y la limitada estabilidad de las enzimas, las cuales pueden perder actividad ante variaciones de temperatura, pH, fuerza

iónica o condiciones de almacenamiento, reduciendo así la vida útil del sensor (Sin *et al.*, 2014). En consecuencia, ambos tipos de sensores presentan ventajas y limitaciones.

Ante este panorama, surge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias que permitan mejorar el desempeño de los sensores electroquímicos, particularmente su selectividad, sin incrementar significativamente los costos de fabricación. En este contexto, los biosensores electroquímicos de cuarta generación, incorporan materiales de reconocimiento sintéticos altamente selectivos, como los polímeros de impresión molecular (MIP), como modificadores del electrodo (Li *et al.*, 2024)

Estos materiales son capaces de reconocer específicamente al analito mediante cavidades complementarias en forma, tamaño y grupos funcionales, emulando el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos, pero con una mayor estabilidad química y térmica, menor costo de producción y una vida útil más prolongada (Andersson *et al.*, 1984). Por ello, los sensores basados en MIP representan una alternativa prometedora para el desarrollo de dispositivos electroquímicos con alta sensibilidad y selectividad para la determinación de CAP.

1.6 Polímeros molecularmente impresos (MIP)

Los polímeros de impresión molecular (MIP) son materiales sintéticos tridimensionales con cavidades específicas para retener de manera selectiva a una molécula de interés (denominada plantilla) por medio de adsorción a nivel molecular. Los MIP son polímeros que reconocen de manera altamente específica a un compuesto o familia de compuestos. Gracias a esta propiedad, los MIP pueden ser utilizados como sistemas de extracción o reconocimiento en la modificación de electrodos de trabajo, lo que mejora la selectividad y sensibilidad de sensores electroquímicos al reducir interferencias y optimizar la detección de analitos (Crapnell *et al.*, 2020).

Los MIP se sintetizan en presencia de una molécula plantilla, lo que permite que el polímero adquiera una estructura específica en términos de forma, disposición, orientación y enlaces,

facilitando el fenómeno conocido como 'reconocimiento molecular (Figura 3). Este proceso reproduce el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos, como el antígeno-anticuerpo, formando un complejo de llave-cerradura entre el polímero y la plantilla (R. Gao *et al.*, 2026).

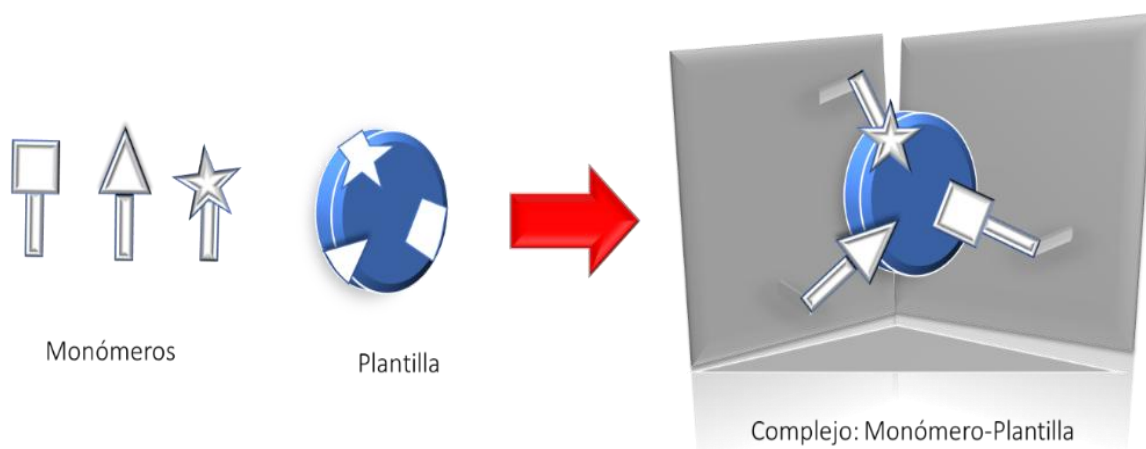


Figura 3 Esquema del reconocimiento molecular en MIP.

En términos generales, la técnica de impresión molecular se basa en la preparación, en presencia del monómero adecuado, de un polímero altamente entrecruzado alrededor de un analito (componente de interés analítico de una muestra) que se separa de la matriz plantilla. Están conformados por (de León-Martínez *et al.*, 2018):

- a) **Plantilla:** Es la molécula que se desea extraer o analizar selectivamente, por ejemplo, fármacos, aminoácidos, carbohidratos, proteínas, hormonas, plaguicidas, antibióticos, entre otros.
- b) **Monómero funcional:** Compuesto que formará el polímero, unidad por unidad. La selección del monómero se realizará en función de las características y grupos químicos funcionales de la plantilla, con el que debe formar un complejo estable
- c) **Entrecruzante:** Elemento responsable de generar la estructura tridimensional del polímero y de proporcionarle la estabilidad mecánica y rigidez.
- d) **Iniciador:** Es el responsable de iniciar el proceso de polimerización por radicales libres. Se emplean diferentes iniciadores; en función del método de iniciación empleado, éstos pueden ser por exposición a radiación ultravioleta o calor.
- e) **Porógeno:** Además de actuar como el medio de reacción, favorece la formación de

poros en el MIP. Debe cumplir con ciertas características: los demás compuestos que intervienen en la polimerización deben ser solubles en él y tener baja polaridad, para reducir las interferencias durante la formación del complejo de polimerización.

En la Figura 4 se muestran los componentes (monómeros, entrecruzante, iniciador y porógenos) más usados en la síntesis de MIP.

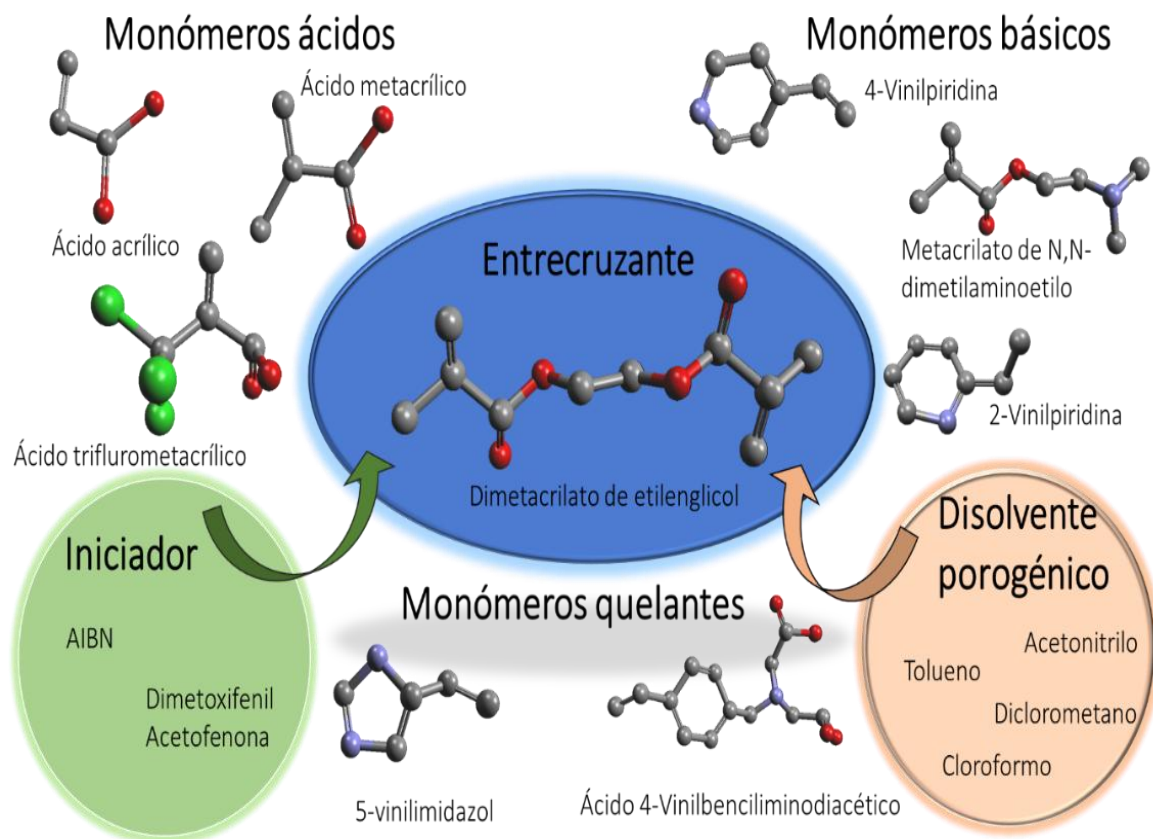


Figura 4 Reactivos más utilizados (monómeros, disolventes y entrecruzante) en la síntesis de MIP.

1.7 Sensores electroquímicos modificados con MIP para la determinación de CAP en diferentes matrices.

En la tabla 5 se muestran algunos sensores electroquímicos modificados con MIP reportados en la determinación de CAP.

Tabla 5 Trabajos reportados para la determinación electroquímica de CAP empleando sensores modificados con MIP.

Tipo de muestra	Técnica electroquímica	Sensor electroquímico (modificante/electrodo)	Monómero funcional	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referencia
Leche	SWV	MIP/CPE	Ácido metacrílico	0.65	(Alizadeh <i>et al.</i> , 2012)
Leche	-----	MIP/CS-MWCNTs/GCE	o-fenilendiamina (o-PD)	3.30×10^{-2}	(Geng <i>et al.</i> , 2022)
Leche	SWV	MIP/PANI/RGO/GCE	Anilina	0.32	(Wu, Zhang, Jia, Wu, <i>et al.</i> , 2025)
Miel	DPV	Arg-MIP/GCE	Arginina	4.39×10^{-5}	(Lai <i>et al.</i> , 2023)
Leche y huevo	SWV	MIP/PAN/AuNPs-RGO-CS/GCE	Anilina	2.03×10^{-2}	(Wu, Zhang, Jia, Mao, <i>et al.</i> , 2025)

Abreviaturas: SWV=voltamperometría de onda cuadrada; MIP=polímero molecularmente impreso; CPE= electrodo de pasta de carbono; PANI=nanocompuesto de barras de polianilina; RGO= óxido de grafeno reducido; DPV= voltamperometría diferencial de pulsos; Arg=Arginina; AuNPs= nanopartículas de oro; CS= quitosano; MWCNTs= nanotubos de carbono de pared múltiple.

Los sensores electroquímicos modificados con MIP, han demostrado ser alternativas prometedoras para la determinación sensible y selectiva de CAP en diversas matrices. Sin embargo, hasta la fecha son escasos los estudios que reportan el uso de sensores electroquímicos modificados con MIPs para la determinación de CAP en cuerpos de agua. Está limitada información evidencia un área de oportunidad para el desarrollo de nuevos sensores que permitan el monitoreo de este contaminante en matrices ambientales.

Entre los monómeros funcionales más utilizados para la síntesis de MIP dirigidos al reconocimiento de CAP destacan el ácido metacrílico (MAA) (Alizadeh *et al.*, 2012) y la arginina (Lai *et al.*, 2023), debido a su capacidad para establecer interacciones mediante puentes de hidrógeno con la molécula plantilla. Asimismo, se ha reportado el empleo de monómeros aromáticos, como la anilina (Wu, Zhang, Jia, Wu, *et al.*, 2025) y la o-fenilendiamina (o-PD) (Geng *et al.*, 2022), cuyos anillos aromáticos favorecen interacciones de tipo π - π con el analito, contribuyendo a mejorar el proceso de reconocimiento molecular y la selectividad del polímero.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se propone la utilización de dos monómeros funcionales durante la síntesis del MIP: MAA, ampliamente reportado para la impresión molecular de CAP, y pirrol, como un monómero funcional novedoso. Se plantea

que la combinación de ambos monómeros favorezca la formación de múltiples interacciones con la molécula plantilla, incluyendo puentes de hidrógeno proporcionados principalmente por el MAA e interacciones π - π derivadas del sistema aromático del pirrol.

1.8 Estudio teórico; Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)

La comprensión de las interacciones moleculares entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales constituye un aspecto fundamental para el diseño de MIP, ya que estas interacciones determinan la formación de sitios de reconocimiento específicos y, por consiguiente, la selectividad del material obtenido. Para el estudio de dichas interacciones, una de las herramientas computacionales más utilizadas es la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) (Nagy, 1998).

La DFT es un método de química computacional basado en la mecánica cuántica que permite estudiar la estructura electrónica y las propiedades fisicoquímicas de moléculas y materiales (Nagy, 1998). A diferencia de otros métodos que describen el sistema mediante la función de onda, la DFT utiliza la densidad electrónica como variable fundamental, lo que permite obtener resultados con una elevada precisión y un costo computacional relativamente bajo. Estas características han favorecido su amplia aplicación en el estudio de interacciones moleculares, la predicción de la estabilidad de complejos supramoleculares y el diseño racional de nuevos materiales (Guan *et al.*, 2025).

En el campo de los MIP, la DFT se emplea para analizar las interacciones que se establecen entre la molécula plantilla y los monómeros funcionales durante la etapa de prepolimerización. Mediante esta metodología es posible optimizar la geometría de los complejos monómero–plantilla, identificar la orientación espacial más estable y estimar la intensidad de las interacciones responsables del reconocimiento molecular.

Además, la DFT proporciona información detallada sobre las propiedades electrónicas de los sistemas moleculares mediante el cálculo de la energía de interacción, parámetro que permite evaluar la estabilidad de los complejos formados entre la plantilla y el monómero

funcional. Asimismo, posibilita el análisis de la distribución de la densidad electrónica a través de los mapas de potencial electrostático molecular (MEP), los cuales identifican las regiones con mayor probabilidad de establecer enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas y otras interacciones no covalentes. De igual manera, el estudio de los orbitales moleculares de frontera (*HOM*, Orbital molecular ocupado de mayor energía y *LUMO*, orbital molecular desocupado de menor energía) proporciona información acerca de la reactividad química (Fukui *et al.*, 1952) y la capacidad de transferencia electrónica de las especies involucradas, mientras que parámetros termodinámicos, como la energía libre de Gibbs (ΔG) (Bader, 2003), permiten evaluar la espontaneidad en la formación de los complejos moleculares (Liu *et al.*, 2017).



CAPÍTULO

II





Objetivos y justificación



Capítulo 2: Objetivos y justificación

2.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología electroanalítica basada en Voltamperometría de redisolución adsorbtiva (AdSV) utilizando electrodos de pasta de carbón vítreo modificados con polímeros molecularmente impresos (GCPE/MIP) empleando pirrol y ácido metacrílico (MAA) como monómeros funcionales en la determinación de cloranfenicol (CAP) en muestras de agua.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar un estudio teórico-computacional mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT) para evaluar las interacciones entre la molécula plantilla de CAP y los monómeros funcionales MAA y pirrol, con el propósito de sustentar la selección de los componentes empleados en la síntesis del MIP.
- Caracterizar el material polimérico óptimo mediante espectroscopía infrarroja (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis de área superficial específica (BET), análisis termogravimétrico (TGA) y técnicas electroquímicas con el propósito de determinar sus propiedades estructurales, morfológicas y fisicoquímicas.
- Optimizar los parámetros críticos de la metodología electroquímica, incluyendo el pH, la velocidad de agitación, el tiempo de preconcentración, el sobrepotencial aplicado durante la cronoamperometría y la intensidad de corriente empleada en la voltamperometría diferencial de pulsos (DPV), con el fin de maximizar la respuesta electroquímica para la determinación de CAP.
- Construir una curva de calibración utilizando la metodología electroquímica optimizada para la determinación a diferentes concentraciones de CAP, con el propósito de establecer las figuras de mérito analíticas, tales como la sensibilidad, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ).

- Aplicar la metodología electroquímica desarrollada para la determinación de CAP en muestras de agua de pozo, lago, manantial, río y presa, mediante la evaluación de los porcentajes de recuperación, con el propósito de evaluar la exactitud del método.

2.3 Justificación

El CAP es un antibiótico eficaz contra diversas infecciones bacterianas; sin embargo, su uso inadecuado puede generar efectos adversos tanto en la salud humana como en el medio ambiente (Rayan, 2023). Debido a su toxicidad y a su potencial contribución al desarrollo de resistencia bacteriana, la presencia de este compuesto en cuerpos de agua constituye una preocupación para la salud pública y los ecosistemas (Lin *et al.*, 2022). Por ello, es necesario disponer de metodologías analíticas que permitan su detección de manera rápida, sensible y selectiva.

En este contexto, el presente proyecto propone desarrollar una metodología electroanalítica basada en polímeros molecularmente impresos (MIP) para la determinación de CAP en cuerpos de agua. El empleo de MIPs como elemento de reconocimiento permite favorecer la interacción selectiva con la molécula de interés, mientras que la detección electroquímica ofrece ventajas como rapidez de análisis, bajo costo, precisión y sensibilidad (Alizadeh y Akhoundian, 2010). De esta manera, la metodología propuesta representa una alternativa potencialmente accesible frente a técnicas convencionales de análisis, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Patyra y Kwiatek, 2020) y los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Patyra y Kwiatek, 2020).

Desde el punto de vista social, el desarrollo de una metodología para la detección de CAP en agua puede contribuir al monitoreo de este contaminante y, con ello, a la identificación de posibles fuentes de exposición. Esto resulta relevante debido a los efectos tóxicos asociados con la exposición al CAP, entre los que destaca la supresión de la médula ósea, anemia aplásica, síndrome del bebé gris en mujeres embarazadas y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos (Nguyen *et al.*, 2022).

Asimismo, este proyecto aborda una problemática ambiental relacionada con la presencia de contaminantes emergentes en cuerpos de agua. La disponibilidad de una metodología electroanalítica selectiva para la determinación de CAP puede facilitar su monitoreo en matrices acuosas. En este sentido, el desarrollo de sensores basados en MIPs representa una estrategia de interés dentro de la electroquímica analítica para la detección de contaminantes de relevancia ambiental y sanitaria.



CAPÍTULO III



*Estudio teórico-computacional del reconocimiento molecular
entre CAP y monómeros funcionales (MAA y pirrol)*



Resumen



Se presenta un estudio teórico-computacional integral del cloranfenicol (CAP) y su interacción con dos monómeros funcionales de relevancia para el diseño de polímeros: el ácido metacrílico (MAA) y el pirrol. Las geometrías moleculares fueron optimizadas a nivel ω B97X-D/def2-TZVP en Gaussian 16. La búsqueda conformacional de los complejos binarios CAP–MAA y CAP–Pirrol se realizó mediante dinámica molecular DFTB-SCC (Teoría del funcional de la densidad de enlace fuerte con corrección de autoconsistencia de carga) utilizando el termostato de Nosé-Hoover (300–400 K, ~ 201 ps). Las conformaciones de mínima energía fueron reoptimizadas al mismo nivel de teoría, obteniéndose energías de interacción de $-14.30 \text{ kcal mol}^{-1}$ (ΔH , CAP–MAA) y $-11.83 \text{ kcal mol}^{-1}$ (ΔH , CAP–Pirrol), estabilizadas por dos enlaces de hidrógeno intermoleculares en cada complejo. Las isosuperficies NCI (análisis de interacciones no covalentes) y las gráficas RDG (gradiente de densidad reducido) vs $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ confirman la naturaleza y fortaleza de las interacciones.

Capítulo 3: Estudio teórico-computacional del reconocimiento molecular entre CAP y monómeros funcionales (MAA y pirrol)

3.1 Metodología

3.1.1 Estudio teórico de moléculas individuales

Las geometrías de todas las moléculas fueron optimizadas a nivel de teoría DFT utilizando el funcional de rango separado ω B97X-D en conjunto con la base def2-TZVP, implementados en el paquete de software Gaussian 16. El análisis de reactividad química, incluyendo la función de Fukui y los índices de reactividad global y local, fue realizado con el software Multiwfn, mientras que la visualización de las isosuperficies y mapas de densidad electrónica se llevó a cabo con el programa VMD.

3.1.2. Búsqueda conformacional de los sistemas binarios

Con el fin de determinar las conformaciones de menor energía y las principales interacciones moleculares entre el CAP y cada uno de los monómeros (MAA y pirrol), se realizaron simulaciones de dinámica molecular mediante el método de la Teoría del DFTB-SCC, implementado en el programa DFTB+.

3.1.3. Hamiltoniano y parámetros electrónicos

El Hamiltoniano electrónico se construyó con el método DFTB de tercer orden completo (ThirdOrderFull), que incluye términos de tercer orden en la expansión de la energía en función de las fluctuaciones de carga, mejorando la descripción de sistemas con heteroátomos (Becke, 1993). La autoconsistencia de carga (SCC) se resolvió con una tolerancia de 1.00×10^{-5} y un máximo de 100 iteraciones por paso. La distribución electrónica de los electrones en los niveles de energía se describió mediante la función de Fermi a 400 K, consistente con la temperatura máxima de exploración conformacional. El momento angular máximo considerado para cada elemento fue: H (s), C (p), N (p), O (p) y Cl (p).

Los archivos de parámetros de Slater-Koster se cargaron en formato Type2FileNames para todos los pares de elementos presentes en los sistemas (C, O, N, Cl, H). Las derivadas de Hubbard empleadas fueron: H = -0.1857, C = -0.1492, N = -0.1535, O = -0.1575 y Cl = -0.0697 u.a (unidad atómica). La corrección H5 se aplicó para mejorar la descripción de los enlaces de hidrógeno, de particular relevancia para las interacciones entre el CAP y los monómeros estudiados. Asimismo, se incorporó la corrección de dispersión DFT-D3 con amortiguamiento de cero (ZeroDamping), empleando los parámetros $s_6 = 1.00$, $s_8 = 0.49$, $sr_6 = 1.25$ y $\alpha_6 = 29.6$, incluyendo la repulsión H-H (HHRepulsion), con el objeto de describir adecuadamente las interacciones de Van Der Waals de largo alcance, críticas en el reconocimiento molecular entre sistemas orgánicos.

3.1.4 Protocolo de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular se llevaron a cabo con el integrador de Velocity-Verlet con un paso de tiempo de 1.0 fs. El control de temperatura se realizó mediante el termostato de Nosé-Hoover con una constante de acoplamiento de 1000 cm⁻¹. El protocolo de temperatura adoptado consistió en un perfil dinámico diseñado para explorar ampliamente el espacio conformacional de los complejos: (1) equilibrio inicial a 300 K (1 paso), (2) calentamiento gradual de 300 K a 400 K durante 40.0 ps (40,000 pasos), (3) exploración conformacional a 400 K durante 120 ps (120,000 pasos), (4) enfriamiento gradual de 400 K a 300 K durante 30.0 ps (30,000 pasos) y (5) equilibrio final a 300 K durante 10.0 ps (10,000 pasos). El tiempo de simulación total fue de aproximadamente 201 ps por sistema. Las coordenadas y velocidades se guardaron cada 0.25 ps (250 pasos) para el análisis posterior de las trayectorias.

La estrategia de calentamiento a 400 K tiene como propósito superar las barreras energéticas conformacionales, permitiendo una exploración más exhaustiva del espacio de fase del complejo. Las conformaciones de mínima energía obtenidas a lo largo de la trayectoria fueron posteriormente sometidas a optimización de geometría a nivel DFT para caracterizar con mayor precisión las interacciones entre el CAP y los monómeros.

C12-O13	1.21	1.22
C9-O10	1.42	1.42
Ángulos de enlace (°)		
C7-O17-H32	108.00	109.43
C8-N11-C12	122.70	122.34
C8-N11-H30	115.90	119.74
N11-C8-C7	109.10	110.40
C7-C8-C9	114.00	111.39
O17-C7-C6	108.00	108.53
O10-C9-C8	107.40	111.71
O13-C12-N11	125.00	125.19
Cl15-C14-Cl16	112.00	110.89
Cl15-C14-H31	106.10	107.18
C1-C6-C5	119.40	118.99
O19-N18-O20	124.80	124.69

3.2.1.1.2. Análisis electrónico: orbitales moleculares y potencial electrostático.

La Figura 6 muestra los orbitales HOMO y LUMO, así como el mapa de potencial electrostático (cargas de Mulliken) del CAP. El análisis de las cargas de Mulliken reveló que los átomos con mayor densidad electrónica corresponden a los oxígenos de los grupos hidroxilo y carbonilo, así como a los átomos de cloro. Por el contrario, el átomo de nitrógeno del grupo nitro (NO₂) presenta el carácter electropositivo más pronunciado de la molécula, seguido por los hidrógenos enlazados a los grupos hidroxilo y el carbono C12 del grupo carbonilo.

La mayor contribución del orbital HOMO se localiza en los oxígenos O10 y O17 de los grupos hidroxilo y en el oxígeno O13 del grupo carbonilo, seguidos por los carbonos del anillo aromático y el átomo Cl16, identificando estas regiones como los principales sitios donadores de densidad electrónica (sitios reactivos frente a ataques electrofílicos). La mayor contribución del orbital LUMO se ubica en el nitrógeno del grupo nitro (NO₂) y en los carbonos C3 y C6 del anillo aromático, señalando estas zonas como los principales sitios aceptores de densidad electrónica (sitios reactivos frente a ataques nucleofílicos). Ambos resultados son consistentes con los valores de las cargas de Mulliken.

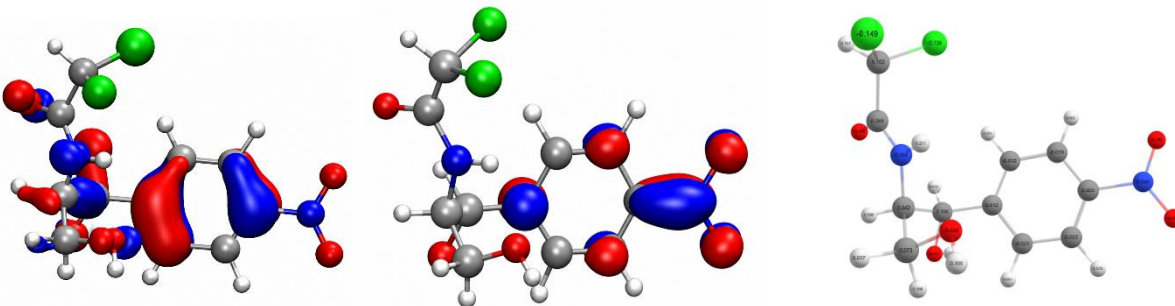


Figura 6 Representación de los orbitales HOMO (izquierda), LUMO (centro) y mapa de potencial electrostático de Mulliken (derecha) del CAP.

3.2.1.2 Ácido metacrílico

El ácido metacrílico (MAA) es un monómero vinílico de gran importancia industrial empleado principalmente en la síntesis de polímeros acrílicos. Su estructura incluye un doble enlace C=C conjugado con un grupo carboxílico (–COOH), lo que le confiere una marcada reactividad química. La Figura 7 muestra la geometría optimizada y la numeración de átomos empleada en el análisis.

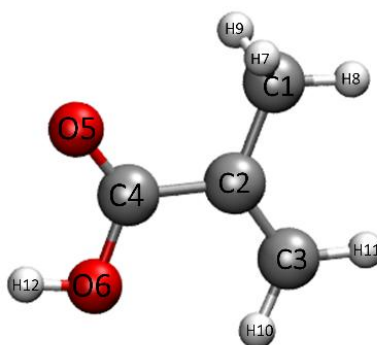


Figura 7 Estructura molecular optimizada y enumerada del MAA a nivel B3LYP/6-31G(d,p).

3.2.1.2.1 Parámetros geométricos

Los parámetros geométricos calculados para el MAA presentan una buena concordancia con los valores experimentales reportados (Herbers *et al.*, 2019). Las distancias de enlace C=O y C–OH del grupo carboxílico, así como la del doble enlace C=C, son consistentes con los valores típicos para estos grupos funcionales (Tabla 7). Los parámetros sin valor de referencia en la literatura corresponden a enlaces cuya longitud no fue reportada en el estudio citado.

Tabla 7. Parámetros geométricos del MAA: distancias y ángulos de enlace.

Enlace	Literatura	Este trabajo
Distancias de enlace (Å)	(Herbers <i>et al.</i> , 2019)	
O5–C4	1.20	1.20
H12–O6	—	0.97
O6–C4	—	1.36
C4–C2	1.49	1.50
C2–C3	1.34	1.33
C3–H10	—	1.08
C3–H11	—	1.08
C2–C1	1.50	1.51
C1–H9	—	1.09
C1–H8	—	1.09
C1–H7	—	1.09
Ángulos de enlace (°)		
O5–C4–C2	126.27	125.56
O6–C4–C2	111.84	112.94
C1–C2–C3	123.99	122.93
C1–C2–C4	119.15	120.63

3.2.1.2.2. Análisis electrónico: orbitales moleculares y potencial electrostático

La Figura 8 presenta los orbitales HOMO y LUMO, y el mapa de potencial electrostático del MAA. El análisis de las cargas de Mulliken muestra que los oxígenos del grupo carboxílico son los centros con mayor densidad electrónica, siendo el oxígeno carbonílico (O5) el que presenta la carga negativa más pronunciada. Los hidrógenos, en particular el del grupo hidroxilo (H12), exhiben la mayor carga positiva, lo que es consistente con el carácter ácido del compuesto.

El orbital LUMO se concentra principalmente en el doble enlace C=C y en el grupo carbonilo, reflejando la conjugación electrónica entre ambos grupos funcionales. El orbital HOMO, por su parte, presenta su mayor contribución en los oxígenos del grupo carboxílico y en el sistema π del doble enlace C=C, identificando estas regiones como los principales sitios donadores de densidad electrónica.

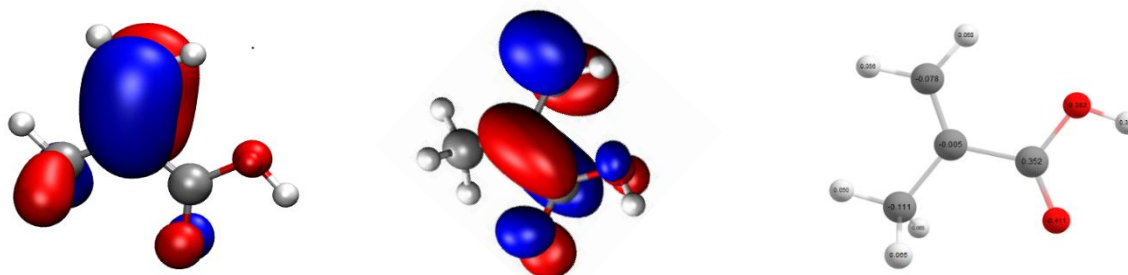


Figura 8 Representación de los orbitales HOMO (izquierda), LUMO (centro) y mapa de potencial electrostático de Mulliken (derecha) del MAA.

3.2.1.3. Pirrol

El pirrol es un heterociclo aromático de cinco miembros que contiene un átomo de nitrógeno. Su aromaticidad, resultante de la deslocalización de seis electrones π (incluyendo el par solitario del nitrógeno), le confiere propiedades electrónicas distintivas. La Figura 9 muestra la estructura molecular optimizada y la numeración de átomos.

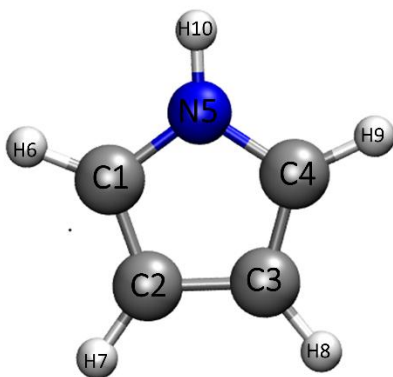


Figura 9 Estructura molecular optimizada del pirrol a nivel B3LYP/6-31G(d,p) y numeración de átomos empleada en el análisis geométrico.

3.2.1.3.1. Parámetros geométricos

Los parámetros geométricos calculados para el pirrol muestran una excelente concordancia con los valores experimentales reportados en la literatura (Tabla 8) (Ruocco *et al.*, 2009). Las longitudes de enlace C–C y C–N del anillo son consistentes con un sistema aromático deslocalizado, con valores intermedios entre los esperados para enlaces simples y dobles, confirmando la naturaleza aromática del anillo.

Tabla 8 Parámetros geométricos del pirrol: distancias y ángulos de enlace.

Enlace	Literatura	Este trabajo
Distancias de enlace (Å)	(Ruocco <i>et al.</i> , 2009)	
C1–C2	1.37	1.37
C2–C3	1.41	1.42
N5–C1	1.36	1.37
C1–H6	1.09	1.08
C2–H7	1.09	1.08
N5–H10	1.01	1.00
Ángulos de enlace (°)		
C1–N5–C4	110.00	109.83
C2–C1–N5	108.00	107.68
C1–C2–C3	107.00	107.41

3.2.1.3.2. Análisis electrónico: orbitales moleculares y potencial electrostático

La Figura 10 muestra los orbitales HOMO y LUMO, y el mapa de potencial electrostático del pirrol. El orbital HOMO presenta su mayor contribución distribuida sobre todo el sistema π del anillo, con una participación significativa del par electrónico del nitrógeno. Esto es coherente con el alto carácter nucleofílico del pirrol en reacciones de sustitución electrofílica aromática, donde el ataque ocurre preferentemente en las posiciones α (C1 y C4).

La distribución del orbital LUMO indica que los sitios aceptores de densidad electrónica se localizan principalmente en los carbonos α y β del anillo, lo que es consistente con la naturaleza rica de electrones del sistema aromático debido al aporte del par solitario del nitrógeno al sistema π .

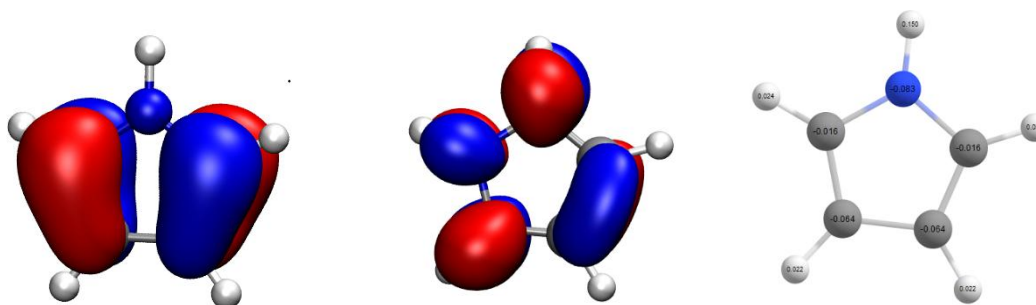


Figura 10 Representación de los orbitales HOMO (izquierda), LUMO (centro) y mapa de potencial electrostático (derecha) del pirrol.

3.2.3 Búsqueda conformacional de los sistemas CAP–monómero

A partir de las simulaciones de dinámica molecular DFTB realizadas para los complejos CAP–MAA y CAP–pirrol, se analizó la evolución temporal de la energía total y la temperatura a lo largo de la trayectoria, con el objetivo de identificar las conformaciones de mínima energía de cada sistema.

3.2.3.1. Sistema CAP–MAA

La Figura 11 muestra la evolución de la energía total (panel superior) y la temperatura instantánea (panel inferior) del sistema CAP–MAA a lo largo de los ~201 ps de simulación. La energía total oscila en el intervalo de –66.44 a –66.52 H, lo que refleja la exploración térmica del espacio conformacional a lo largo del perfil de temperatura programado.

Se identificaron dos mínimos energéticos de interés: el mínimo global de la trayectoria completa, con una energía de –66.52 H alcanzada a 8.00 ps durante la fase de calentamiento inicial, y el mínimo de los últimos 20 ps de simulación, con una energía de –66.52 H obtenida a 193.0 ps durante la fase de equilibrio final a 300 K. Este último resulta particularmente relevante desde el punto de vista conformacional, ya que corresponde a una estructura explorada a temperatura equilibrada y representa una conformación termodinámicamente accesible del complejo a 300 K.

El perfil de temperatura (panel inferior de la Figura 11) confirma el correcto funcionamiento del termostato de Nosé-Hoover: la temperatura instantánea oscila en torno a 400 K durante la fase de exploración y desciende progresivamente hacia 300 K en la fase final, con fluctuaciones características de un ensemble canónico (NVT). Las excursiones de temperatura observadas por encima de 400 K (llegando puntualmente hasta ~560 K) son inherentes a la dinámica de Nosé-Hoover y favorecen que el sistema supere barreras conformacionales, permitiendo una exploración más exhaustiva del espacio de fase.

Las conformaciones de mínima energía identificadas en la trayectoria fueron extraídas para su posterior optimización de geometría a nivel DFT, con el fin de caracterizar con mayor precisión las interacciones intermoleculares entre el CAP y el MAA.

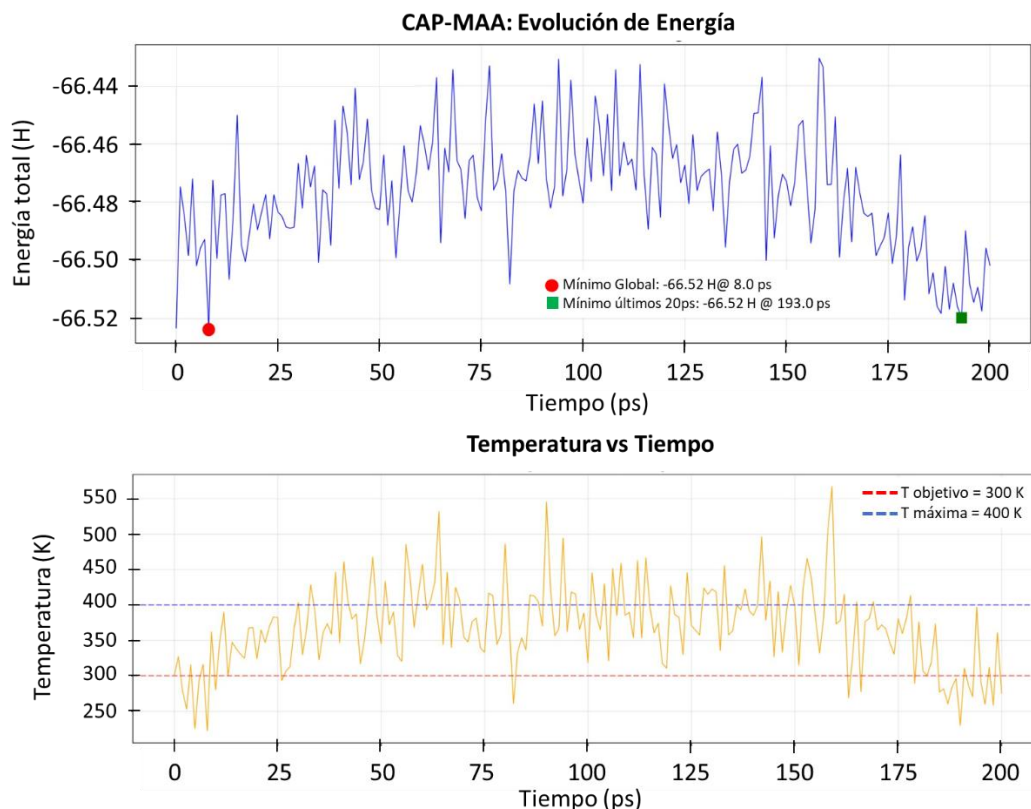


Figura 11 Evolución temporal de la energía total (panel superior) y la temperatura instantánea (panel inferior) del sistema CAP-MAA durante la simulación de dinámica molecular DFTB-SCC.

3.2.3.2. Sistema CAP-Pirrol

La Figura 12 presenta la evolución de la energía total y la temperatura instantánea del sistema CAP-Pirrol a lo largo de los ~201 ps de simulación. La energía total se sitúa en un rango de -61.84 a -61.91 H, aproximadamente 4.6 H por encima del sistema CAP-MAA, diferencia esperada dado el menor número de átomos y electrones del pirrol en comparación con el MAA.

Para este sistema se identificaron dos mínimos de interés: el mínimo global de -61.906381 H registrado a 0.0 ps, correspondiente a la geometría inicial del complejo, y el mínimo de los últimos 20 ps de trayectoria de -61.887221 H obtenido al final de la simulación (200.0 ps), durante la fase de equilibrio a 300 K. La ubicación del mínimo global al inicio de la trayectoria sugiere que la geometría de partida del complejo CAP-Pirrol ya representa una conformación de baja energía, y que la exploración térmica a 400 K permitió al sistema acceder a regiones del espacio conformacional de mayor energía antes de reequilibrarse.

El perfil de temperatura del sistema CAP–Pirrol (panel inferior de la Figura 12) muestra un comportamiento diferente al del sistema CAP–MAA: las fluctuaciones se mantienen mayoritariamente por debajo de 400 K, oscilando en torno a 300 K durante prácticamente toda la trayectoria, con excursiones máximas puntuales de ~ 420 K. Esto indica que el sistema CAP–Pirrol presenta una dinámica conformacional más moderada, con barreras energéticas más accesibles a la temperatura de exploración. La menor amplitud de las fluctuaciones de energía (~ 0.07 H frente a ~ 0.08 H en CAP–MAA) es también consistente con un paisaje de energía potencial más suave para este complejo.

Al igual que para el sistema CAP–MAA, las conformaciones de mínima energía identificadas serán sometidas a optimización de geometría a nivel DFT para el análisis detallado de las interacciones moleculares entre el CAP y el pirrol.

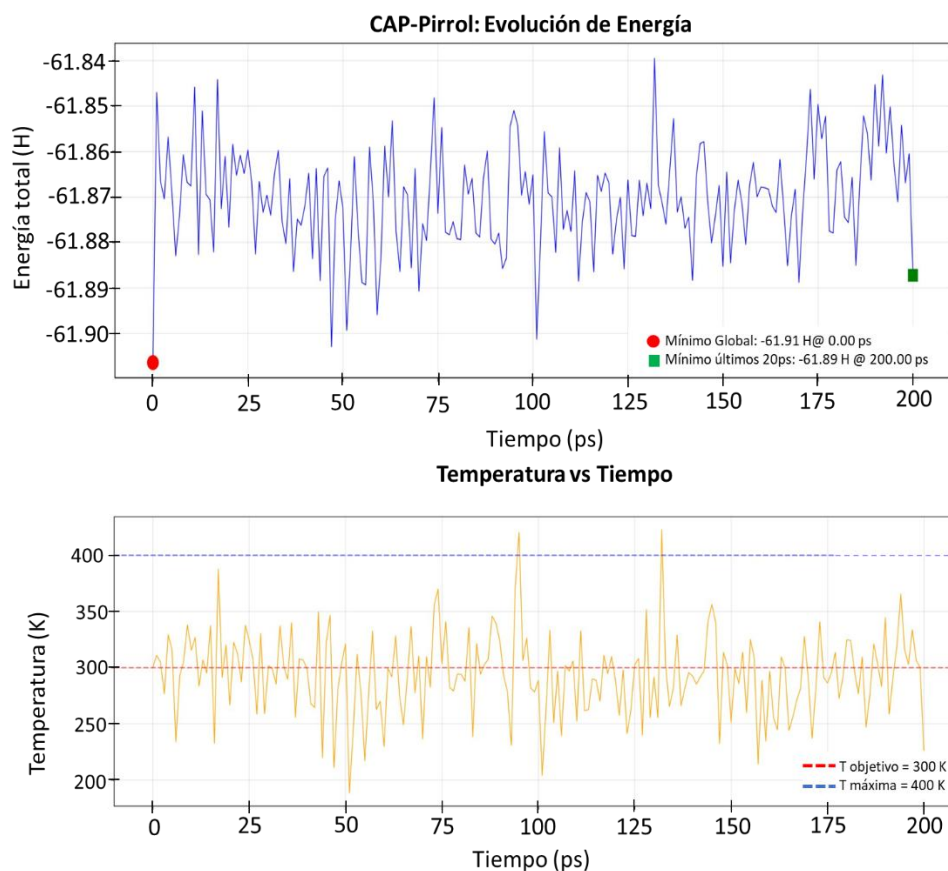


Figura 12 Evolución temporal de la energía total (panel superior) y la temperatura instantánea (panel inferior) del sistema CAP–Pirrol durante la simulación de dinámica molecular DFTB-SCC.

3.2.4 Re optimización DFT y energías de interacción de los complejos CAP–monómero

3.2.4.1. Nivel de teoría y protocolo de cálculo

Las conformaciones de mínima energía identificadas mediante la búsqueda conformacional DFTB-SCC fueron reoptimizadas a un nivel de teoría más alto empleando el funcional de densidad de rango separado ω B97X-D, que incorpora correcciones de dispersión empírica de largo alcance, con el conjunto de base triple-zeta def2-TZVP, implementado en Gaussian 16 (Michael J. Frisch, 2016). La optimización se realizó con criterios estrictos de convergencia (Opt=Tight, CalcFC) y una cuadrícula de integración de alta precisión (Int=UltraFine), garantizando la correcta caracterización de las interacciones no covalentes, particularmente los enlaces de hidrógeno intermoleculares. El cálculo de frecuencias analíticas se realizó al mismo nivel de teoría para confirmar que las estructuras optimizadas corresponden a mínimos verdaderos en la superficie de energía potencial (ausencia de frecuencias imaginarias) y para obtener las correcciones termoquímicas a 298.15 K.

La energía de interacción (BE) entre el CAP y cada monómero se calculó como la diferencia entre la energía del complejo y la suma de las energías de los monómeros en su geometría optimizada aislada: $BE = E(CAP-M) - E(CAP) - E(M)$. Las energías de interacción se reportan a cuatro niveles: (1) energía electrónica sin corrección (SCF), (2) energía con corrección de punto cero vibracional (ZPE), (3) entalpía a 298.15 K (ΔH) y (4) energía libre de Gibbs a 298.15 K (ΔG). Adicionalmente, se realizará un análisis de orbitales naturales de enlace (NBO) para caracterizar las transferencias de carga y las interacciones de segundo orden entre los fragmentos moleculares.

3.2.4.2 Energías de interacción

La Tabla 9 resume las energías totales de los sistemas individuales y de los complejos, así como las energías de interacción calculadas al nivel ω B97X-D/def2-TZVP. Ambos complejos presentan energías de interacción negativas a nivel electrónico y entálpico, confirmando que la formación de los complejos CAP–MAA y CAP–Pirrol es energéticamente favorable.

Tabla 9 Energías totales (u.a.) y energías de interacción (BE) de los complejos CAP–MAA y CAP–Pirrol a nivel ω B97X-D/def2-TZVP.

	CAP	Monómero	Complejo	BE (u.a.)	BE (Kcal mol ⁻¹)
Sistema CAP–MAA					
E (SCF)	-1832.42	-306.51	-2138.95	-2.59×10^{-2}	-16.31
E + ZPE	-1832.16	-306.41	-2138.59	-2.18×10^{-2}	-13.71
Entalpía (H)	-1832.16	-306.40	-2138.59	-2.28×10^{-2}	-14.30
Energía libre (G)	-1832.23	-306.44	-2138.68	-8.30×10^{-4}	-0.52
Sistema CAP–Pirrol					
E (SCF)	-1832.42	-210.18	-2042.62	-2.22×10^{-2}	-13.88
E + ZPE	-1832.16	-210.09	-2042.27	-1.79×10^{-2}	-11.23
Entalpía (H)	-1832.16	-210.09	-2042.27	-1.88×10^{-2}	-11.83
Energía libre (G)	-1832.23	-210.12	-2042.35	$+5.30 \times 10^{-4}$	+0.33

Todas las energías en unidades atómicas (Hartree). $BE = E(\text{complejo}) - E(\text{CAP}) - E(\text{monómero})$.

3.2.5 Estructura del complejo CAP–MAA y enlaces de hidrógeno

La Figura 13 muestra la geometría optimizada del complejo CAP–MAA a nivel ω B97X-D/def2-TZVP. El análisis estructural revela la formación de dos enlaces de hidrógeno intermoleculares que estabilizan el complejo. El primero, con una distancia $H\cdots O$ de 1.95 Å, involucra al grupo amino (N–H) del CAP como donador y al oxígeno carbonílico (C=O) del MAA como aceptor. El segundo enlace de hidrógeno, más corto y por tanto más fuerte, presenta una distancia $H\cdots O$ de 1.77 Å y se establece entre el grupo hidroxilo (O–H) del CAP como donador y el oxígeno del grupo carboxílico del MAA como aceptor. De acuerdo con la clasificación de Jeffrey (1997), ambas interacciones corresponden a enlaces de hidrógeno de fuerza moderada (1.50–2.20 Å), siendo el enlace $O-H\cdots O$ el de mayor contribución a la estabilidad del complejo, consistente con el mayor carácter donador del grupo hidroxilo respecto al amino.

La presencia de estos dos puntos de anclaje intermolecular explica la energía de interacción entálpica de $-14.30 \text{ kcal mol}^{-1}$ calculada para el sistema CAP–MAA, y proporciona una base estructural clara para el reconocimiento molecular del CAP por parte del MAA en el contexto de un polímero de huella molecular.

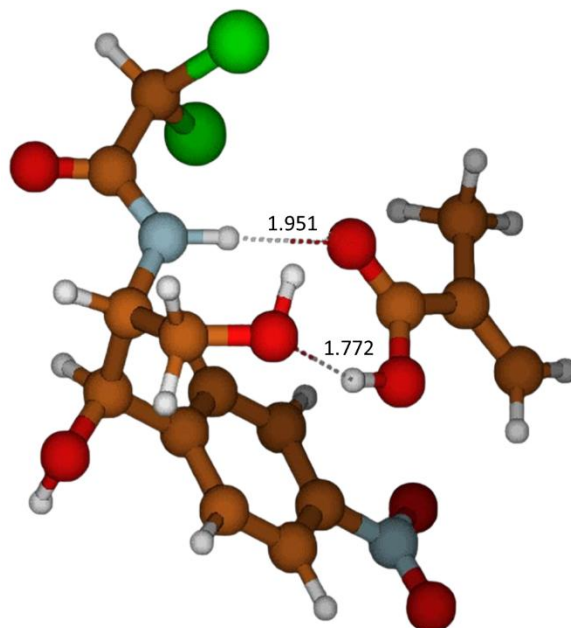


Figura 13 Geometría optimizada del complejo CAP–MAA a nivel ω B97X-D/def2-TZVP. Se indican las distancias de los dos enlaces de hidrógeno intermoleculares identificados: $N-H\cdots O = 1.95 \text{ \AA}$ y $O-H\cdots O = 1.77 \text{ \AA}$ (líneas punteadas). Código de colores: marrón = C, rojo = O, azul claro = N, verde = Cl, blanco = H.

3.2.6 Estructura del complejo CAP–Pirrol y enlaces de hidrógeno

La Figura 14 muestra la geometría optimizada del complejo CAP–Pirrol a nivel ω B97X-D/def2-TZVP. Al igual que en el sistema CAP–MAA, se identifican dos enlaces de hidrógeno intermoleculares que estabilizan el complejo. El primer enlace, con una distancia $H\cdots O$ de $1.91 \text{ \AA}$, corresponde a la interacción entre el grupo hidroxilo ($O-H$) del CAP como donador y el nitrógeno del pirrol como aceptor ($O-H\cdots N$). El segundo enlace de hidrógeno, con una distancia $H\cdots N$ de $2.03 \text{ \AA}$, involucra al grupo amino ($N-H$) del CAP como donador y al sistema π del anillo de pirrol como aceptor, consistente con el tipo de interacción $N-H\cdots\pi$ descrito para este tipo de sistemas. Ambas distancias se encuentran dentro del rango de enlaces de hidrógeno de fuerza moderada ($1.50\text{--}2.20 \text{ \AA}$) según la clasificación de Jeffrey (1997) (Jeffrey, 1997).

Comparando los dos complejos, el enlace $O-H\cdots N$ del sistema CAP–Pirrol ($1.91 \text{ \AA}$) es de longitud similar al enlace $N-H\cdots O$ del CAP–MAA ($1.95 \text{ \AA}$), mientras que el segundo enlace del CAP–Pirrol ($2.03 \text{ \AA}$) es considerablemente más largo que el enlace $O-H\cdots O$ del CAP–MAA ($1.77 \text{ \AA}$). Esta diferencia en la fortaleza del segundo enlace de hidrógeno es consistente con

la menor energía de interacción entálpica del CAP–Pirrol ($-11.83 \text{ kcal mol}^{-1}$) respecto al CAP–MAA ($-14.30 \text{ kcal mol}^{-1}$), y refleja la menor capacidad aceptora del sistema π del pirrol en comparación con el oxígeno del grupo carboxílico del MAA.

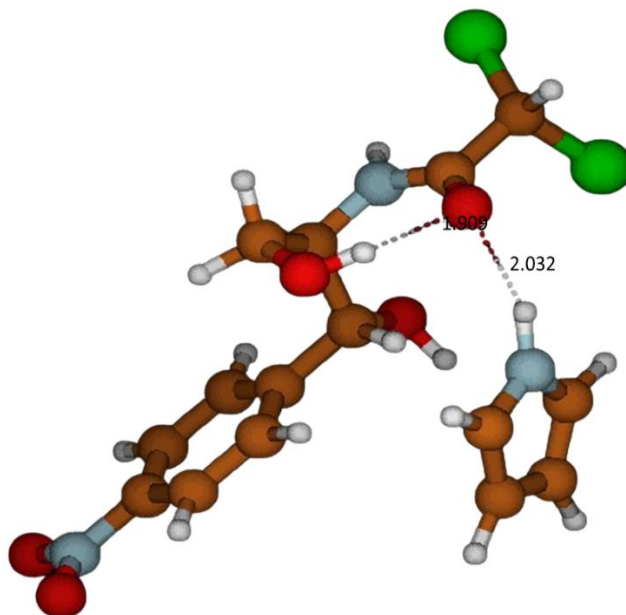


Figura 14 Geometría optimizada del complejo CAP–Pirrol a nivel ω B97X-D/def2-TZVP. Se indican las distancias de los dos enlaces de hidrógeno intermoleculares: O–H...N = 1.91 Å y N–H... π = 2.03 Å (líneas punteadas). Código de colores: marrón = C, rojo = O, azul claro = N, verde = Cl, blanco = H.

3.2.7. Análisis comparativo e interpretación general

El análisis conjunto de las geometrías optimizadas y las energías de interacción de los complejos CAP–MAA y CAP–Pirrol permite establecer una comparación sistemática de la capacidad de reconocimiento molecular de ambos monómeros frente al CAP (Tabla 10).

Tabla 10 Comparación de los parámetros de interacción de los complejos CAP–AM y CAP–Pirrol a nivel ω B97X-D/def2-TZVP.

Parámetro	CAP–MAA	CAP–Pirrol
BE (SCF) (kcal mol^{-1})	-16.31	-13.88
BE (ZPE) (kcal mol^{-1})	-13.71	-11.23
ΔH (kcal mol^{-1})	-14.30	-11.83
ΔG (kcal mol^{-1})	-0.52	+0.33
Enlace H ₁ (Å)	N–H...O = 1.95	O–H...N = 1.91
Enlace H ₂ (Å)	O–H...O = 1.77	N–H... π = 2.03
Nº enlaces de H	2.00	2.00
Int. máx. IR (km mol^{-1})	758.16	423.18

BE: binding energy; ΔH y ΔG a 298.15 K. Int. máx. IR: intensidad máxima del espectro IR teórico.

Los resultados muestran que ambos complejos presentan energías de interacción negativas, tanto a nivel electrónico como entálpico, lo que confirma que la asociación entre el CAP y cada uno de los monómeros es energéticamente favorable. En el caso del complejo CAP–MAA, la energía de interacción electrónica (SCF) fue de $-16.31 \text{ kcal mol}^{-1}$ y la entalpía de interacción de $-14.30 \text{ kcal mol}^{-1}$, mientras que para el complejo CAP–Pirrol se obtuvieron valores de -13.88 y $-11.83 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente. Aunque el complejo con MAA presenta una estabilización ligeramente mayor, ambas magnitudes son características de complejos no covalentes suficientemente estables para favorecer la formación de asociaciones prepolimerización (Johnson *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista estructural, ambos complejos se estabilizan mediante dos enlaces de hidrógeno. En el complejo CAP–MAA participan interacciones $\text{N-H}\cdots\text{O}$ y $\text{O-H}\cdots\text{O}$, mientras que en el complejo CAP–Pirrol se identifican los contactos $\text{O-H}\cdots\text{N}$ y $\text{N-H}\cdots\pi$. Estas diferencias evidencian que cada monómero reconoce regiones distintas de la molécula de CAP y emplea mecanismos de interacción complementarios. En particular, el grupo carboxílico del MAA actúa como un aceptor eficiente de enlaces de hidrógeno, mientras que el pirrol aporta tanto enlaces de hidrógeno como interacciones asociadas a su sistema π , ampliando las posibilidades de reconocimiento molecular del analito.

En cuanto a la ΔG , los valores obtenidos ($\Delta G = -0.52 \text{ kcal mol}^{-1}$ para CAP–MAA y $\Delta G = +0.33 \text{ kcal mol}^{-1}$ para CAP–Pirrol) son cercanos a cero, lo cual es característico de complejos no covalentes en fase gaseosa. La ligera diferencia entre ambos sistemas se debe a que, al formarse el complejo, las moléculas pierden parte de su libertad de movimiento, lo que disminuye parcialmente la estabilidad favorecida por las interacciones intermoleculares. Durante la síntesis de un MIP, los monómeros y la molécula plantilla quedan organizados dentro de la red polimérica, reduciendo este efecto. Por ello, ΔH constituye un parámetro más representativo para evaluar la afinidad entre el monómero funcional y el CAP.

En conjunto, los resultados indican que tanto el MAA como el pirrol presentan una afinidad favorable hacia el CAP y son capaces de formar complejos de preorganización estables mediante interacciones no covalentes. Aunque el MAA exhibe una estabilización

energética ligeramente mayor, el pirrol aporta un patrón de interacción diferente que puede complementar el reconocimiento molecular del analito. Esta complementariedad constituye un fundamento teórico para el empleo conjunto de ambos monómeros durante la síntesis del polímero molecularmente impreso, con el objetivo de generar cavidades de reconocimiento que integren múltiples tipos de interacción y, potencialmente, mejoren la afinidad, selectividad y desempeño analítico del material.

3.2.8. Análisis de interacciones no covalentes (NCI)

Con el fin de caracterizar de manera visual y cualitativa la naturaleza de las interacciones no covalentes en los complejos CAP–MAA y CAP–Pirrol, se realizó el análisis NCI (Johnson *et al.*, 2010), implementado en el programa Multiwfn ((Lu y Chen, 2012), a partir de los archivos de función de onda formateados (.fchk) obtenidos en los cálculos ω B97X-D/def2-TZVP. El método NCI se basa en el gradiente reducido de la densidad electrónica (RDG) (Ecuación 2).

$$s(\rho) = RDG = 1/(2(3\pi^2)^{1/3}) |\nabla\rho| / \rho^{4/3} \quad \text{Ecuación 2}$$

La representación gráfica del RDG en función de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ donde λ_2 es el segundo valor propio del tensor Hessiano de la densidad permite identificar y clasificar las interacciones no covalentes: valores negativos de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ indican interacciones atractivas (enlaces de hidrógeno), valores cercanos a cero corresponden a interacciones de Van Der Waals, y valores positivos indican repulsión estérica. Las isosuperficies del RDG coloreadas por $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ permiten la visualización espacial de estas interacciones sobre la geometría molecular.

3.2.8.1. Sistema CAP–MAA

La Figura 15 muestra la gráfica RDG vs $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ del complejo CAP–MAA. Se observan dos picos bien definidos con $RDG \rightarrow 0$ en la región de $\text{sign}(\lambda_2)\rho \approx -0.010$ a -0.020 u.a., correspondientes a las dos interacciones atractivas de tipo enlace de hidrógeno identificadas en la geometría optimizada ($\text{O} \cdots \text{H} \cdots \text{O} = 1.77 \text{ \AA}$ y $\text{N} \cdots \text{H} \cdots \text{O} = 1.95 \text{ \AA}$). La posición de ambos picos en la región negativa del eje X confirma su naturaleza atractiva, mientras que su densidad relativamente alta ($\text{sign}(\lambda_2)\rho$ entre -0.01 y -0.02) es característica de enlaces de hidrógeno

de fuerza moderada. La nube de puntos densa en torno a $\text{sign}(\lambda_2)\rho \approx 0$ y $\text{RDG} > 0.8$ corresponde a regiones de no-interacción de las moléculas individuales, mientras que la dispersión en la región positiva ($\text{sign}(\lambda_2)\rho > +0.01$) refleja la repulsión estérica en los centros de los anillos.

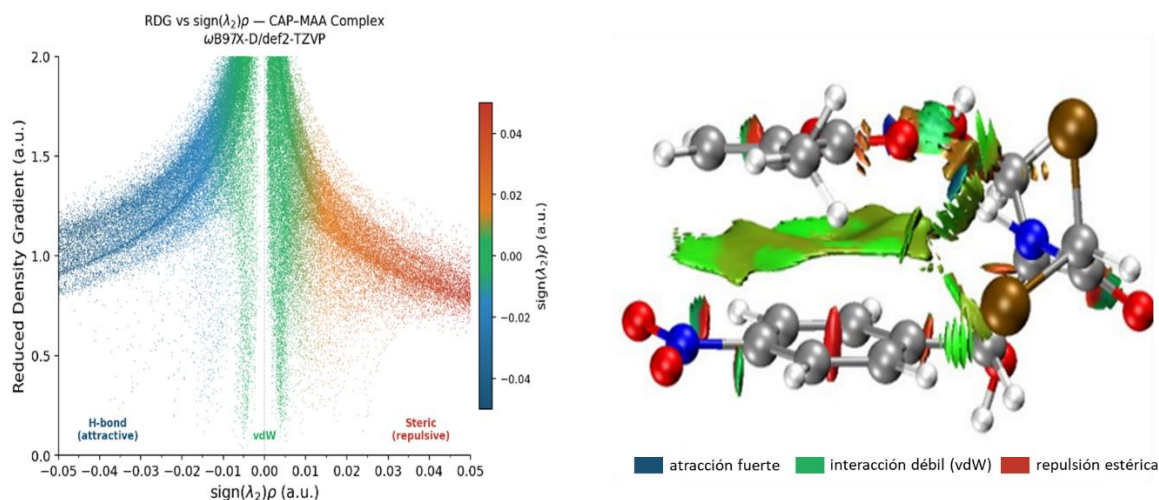


Figura 15 Análisis NCI del complejo CAP–MAA. Izquierda: gráfica RDG vs $\text{sign}(\lambda_2)\rho$; los picos con $\text{RDG} \rightarrow 0$ en $\text{sign}(\lambda_2)\rho < 0$ corresponden a los enlaces de hidrógeno intermoleculares. Derecha: isosuperficies NCI ($\text{RDG} = 0.50$ u.a.) que muestran las regiones de interacción no covalente (verde = interacciones de dispersión/vdW).

3.2.8.2. Sistema CAP–Pirrol

La Figura 16 presenta el análisis NCI del complejo CAP–Pirrol. La gráfica RDG vs $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ muestra un perfil cualitativamente similar al del sistema CAP–MAA, con picos en la región negativa de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ que evidencian la presencia de interacciones atractivas. Sin embargo, se aprecian diferencias notables: los picos del CAP–Pirrol aparecen a valores de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ ligeramente menos negativos ($\approx -8.00 \times 10^{-3}$ a -1.50×10^{-2} u.a.) respecto a los del CAP–MAA, lo que es consistente con interacciones algo más débiles en promedio, en acuerdo con la menor entalpía de interacción de este sistema (-11.83 vs. -14.30 kcal mol $^{-1}$). La presencia del enlace $\text{N-H} \cdots \pi$ ($d = 2.03$ Å), de naturaleza mixta entre enlace de hidrógeno y interacción π , se manifiesta como un pico a valores de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ próximos a cero, intermedio entre los enlaces de hidrógeno convencionales y las interacciones de van der Waals.

Las isosuperficies NCI del CAP–Pirrol muestran regiones de interacción distribuidas entre el grupo amino del CAP y el anillo de pirrol, así como zonas de contacto dispersivo a lo largo de la interfaz molecular, coherentes con la geometría del complejo optimizado.

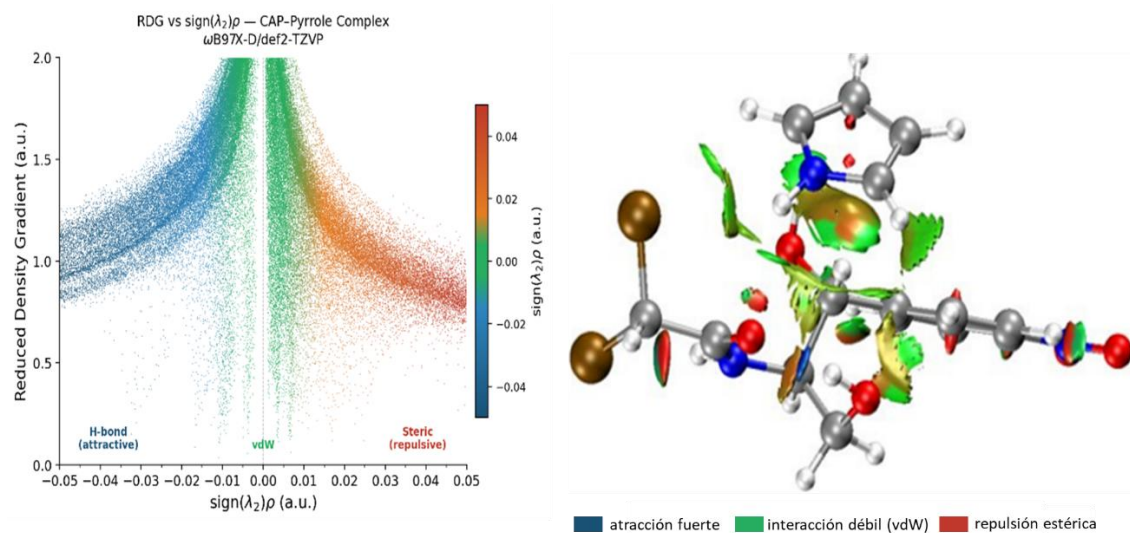


Figura 16 Análisis NCI del complejo CAP–Pirrol. Izquierda: gráfica RDG vs $\text{sign}(\lambda_2)\rho$; los picos con $\text{RDG} \rightarrow 0$ reflejan las interacciones no covalentes intermoleculares. Derecha: isosuperficies NCI ($\text{RDG} = 0.50$ u.a.) que muestran las regiones de interacción (verde = dispersión/vdW, distribución consistente con la interacción $\text{O–H}\cdots\text{N}$ y $\text{N–H}\cdots\pi$).

3.2.9. Comparación NCI entre sistemas

La comparación de los análisis NCI de ambos complejos revela que el sistema CAP–MAA presenta interacciones intermoleculares más fuertes y mejor definidas, evidenciadas por picos más pronunciados a valores más negativos de $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ en la gráfica RDG. Esto es plenamente consistente con los resultados energéticos ($\Delta H = -14.30$ vs. -11.83 kcal mol⁻¹) y geométricos (distancias de enlace de hidrógeno más cortas en el CAP–MAA). En ambos sistemas, la presencia de regiones verdes difusas en las isosuperficies indica que, además de los enlaces de hidrógeno directos, existen contribuciones de interacciones de dispersión de Van Der Waals que estabilizan adicionalmente los complejos. Estas interacciones dispersivas, correctamente descritas por el funcional $\omega\text{B97X-D}$, explican en parte porque la diferencia en entalpía entre ambos sistemas (-2.47 kcal mol⁻¹) es menor de lo que cabría esperar considerando únicamente las distancias de los enlaces de hidrógeno.

3.3 Conclusiones

Se realizó el estudio teórico a nivel B3LYP/6-31G(d,p) del CAP, el MAA y el pirrol. En los tres casos, los parámetros geométricos calculados mostraron una buena concordancia con los valores experimentales reportados en la literatura, lo que valida el nivel de teoría empleado.

El análisis de las cargas de Mulliken y de los orbitales moleculares de frontera permitió identificar de manera clara los sitios de mayor reactividad en cada molécula. En el CAP, las regiones donadoras se concentran en los grupos oxigenados y en el sistema π aromático, mientras que el grupo nitro constituye el principal sitio aceptor. En el MAA, la conjugación entre el grupo carboxílico y el doble enlace C=C determina la reactividad de la molécula. En el pirrol, la deslocalización del par electrónico del nitrógeno hacia el sistema π aromático explica su elevado carácter nucleofílico.

La búsqueda conformacional mediante dinámica molecular DFTB-SCC (~201 ps por sistema) permitió identificar las conformaciones de mínima energía de los complejos CAP–MAA y CAP–Pirrol. Su posterior reoptimización al nivel ω B97X-D/def2-TZVP en Gaussian 16 confirmó la estabilidad de ambos complejos y permitió cuantificar sus energías de interacción. El complejo CAP–MAA presenta una mayor afinidad con una entalpía de interacción de $-14.30 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($\Delta G = -0.52 \text{ kcal mol}^{-1}$), mientras que el complejo CAP–Pirrol muestra una entalpía de $-11.83 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($\Delta G = +0.33 \text{ kcal mol}^{-1}$). A pesar de que el complejo CAP-MAA presenta una mayor estabilidad entálpica, los resultados sugieren que ambos monómeros exhiben interacciones no covalentes significativas que los hacen candidatos adecuados para la síntesis de MIP.



CAPÍTULO IV



*Parte experimental; Determinación electroquímica de CAP
empleando un GCPE modificado con MIP (pirrol-MAA) por
AdSV en cuerpos de agua.*



Resumen

En el presente capítulo se describe el desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación indirecta de CAP en muestras de cuerpos de agua mediante un electrodo de pasta de carbón vítreo (GCPE) modificado con un polímero molecularmente impreso (MIP).

El polímero molecularmente impreso fue sintetizado, optimizado y caracterizado mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (SEM) acoplada a espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS), análisis de distribución de tamaño de partícula por difracción láser (LDPSA), análisis de área superficial específica (BET) y análisis termogravimétrico (TGA), con el propósito de determinar sus propiedades estructurales, morfológicas y fisicoquímicas. Posteriormente, el MIP se empleó para modificar el GCPE y desarrollar una metodología basada en voltamperometría de redisolución adsorbtiva (AdSV) mediante el uso de técnicas electroquímicas sucesivas. La estrategia analítica consistió en una reducción electroquímica del grupo nitro del CAP mediante cronoamperometría, seguida de una voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) en sentido anódico para registrar la señal de oxidación del derivado hidroxilamina generado. Con el fin de maximizar la respuesta electroquímica, se optimizaron parámetros experimentales como el pH, la velocidad de agitación, el tiempo de preconcentración, el sobrepotencial aplicado durante la cronoamperometría y la intensidad de corriente empleada en la DPV.

Finalmente, se construyó una curva de calibración empleando soluciones estándar de CAP, obteniéndose dos intervalos lineales. Para uno de estos intervalos se obtuvieron valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) de 72.57 y 219.90 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. La aplicabilidad y funcionalidad del sensor electroquímico se evaluaron en muestras de agua de pozo, lago, presa, manantial y río obteniéndose porcentajes de recuperación cercanos al 100%. Asimismo, el efecto matriz se evaluó para cada una de las muestras mediante curvas de adición patrón y la comparación de las sensibilidades analíticas.

Capítulo 4: Parte experimental; Determinación electroquímica de CAP empleando un GCPE modificado con MIP (pirrol-MAA) por AdSV en cuerpos de agua.

4.1 Metodología

4.1.1 Materiales y Reactivos

En este estudio se emplearon reactivos químicos comerciales de grado analítico, adquiridos de Sigma-Aldrich. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente, empleando agua desionizada con una resistividad de $18.20 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$.

Los reactivos empleados en la síntesis de MIP, mediante una reacción de polimerización por radicales libres, fueron:

- **Plantilla:** Cloranfenicol (CAP, $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$, 98.00 %).
- **Monómeros funcionales:** Ácido metacrílico (MAA, 99.00 %) y pirrol ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$, 98.00 %). El pirrol debe ser destilado en atmósfera inerte de nitrógeno antes de cada polimerización para asegurar la presencia del monómero.
- **Entrecruzante:** Dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA, 98.00 %).
- **Iniciador:** Persulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\geq 98.00 \%$).
- **Porógeno:** Metanol (CH_3OH , $\geq 99.90 \%$).

El sensor electroquímico empleado en este trabajo consta de un electrodo de pasta de carbón vítreo modificado con MIP (GCPE/MIP). Para la elaboración de los GCPE/MIP se empleó polvo de carbón vítreo ($2\text{-}12 \text{ } \mu\text{m}$, 99.95 %) y aceite de parafina como aglutinante.

El electrolito soporte a utilizar consta de un buffer fosfatos pH 6, para el cual se emplearon como reactivos analíticos las sales fosfato monobásico de potasio (H_2KPO_4 , $\geq 99.90 \%$) y fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4 , 99.60 %). Para ajustar el pH de las soluciones se empleó hidróxido de sodio 1M (NaOH , 99.00 %). En los estudios de impedancia electroquímica se empleó como molécula sonda el ferricianuro de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 98.50%).

4.1.2 Equipos

Las técnicas electroquímicas como cronoamperometrías y voltamperometrías, se realizaron empleando un potenciostato/galvanostato marca BASI de USA modelo Épsilon. En los estudios de Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) se empleó un potenciostato Metrohm PGASTAT302N y el software Nova. Los ajustes de pH se realizaron con un potenciómetro marca Seven Multi y un electrodo de vidrio.

Los análisis mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se realizaron utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer System 2000 FTIR en un intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} en pastilla de KBr (bromuro de potasio). La caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se llevó a cabo con un equipo JEOL JSM-820. Asimismo, el análisis Brunauer-Emmett-Teller (BET) se realizó empleando un equipo ASAP 2020 con atmósfera de N_2 .

Para el análisis termogravimétrico (TGA), se utilizó un analizador TGA 200, equipado con el software Universal V4.7A. El análisis se realizó bajo una atmósfera de N_2 , empleando un intervalo de temperatura de 25 a 600 °C.

4.1.3 Sistema Electroquímico

Los experimentos electroquímicos se realizaron en una celda de vidrio (capacidad de 10 mL) para tres electrodos: un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia, una barra de grafito de alta pureza como electrodo auxiliar y un electrodo de pasta de carbón vítreo modificado con MIP como electrodo de trabajo.

4.1.4 Síntesis de MIP y NIP

Los MIP se sintetizaron mediante una reacción de polimerización por radicales libres, siguiendo la técnica descrita por Alizadeh y colaboradores (Alizadeh, 2009), con algunas modificaciones. Para los primeros estudios se utilizó una relación molar de 1.0:4.0:20 (reportada en bibliografía) (Kalogiouri *et al.*, 2025) correspondiente a 1.0 mmol de plantilla, 4.0 mmol de monómeros (2.0 mmol de MAA y 2.0 mmol de pirrol) y 20 mmol de entrecruzante. Los monómeros utilizados en la síntesis de MIP fueron pirrol y MAA. Cada

uno de estos monómeros presenta mecanismos de interacción diferentes con la plantilla de acuerdo con el estudio teórico presentado en el capítulo 3.

Antes de emplear el pirrol como monómero funcional en la síntesis de MIP se realizó una destilación del reactivo, con el fin de eliminar impurezas. Para esto, 1 mL del pirrol se adiciona a un matraz balón de fondo plano, posteriormente se burbujeó con nitrógeno de alta pureza durante un tiempo de 10 minutos. Finalmente, se da inicio a la destilación del reactivo empleando un sistema de microfiltración en un baño de aceite a 60°C durante un tiempo de 30 minutos (Figura 17).

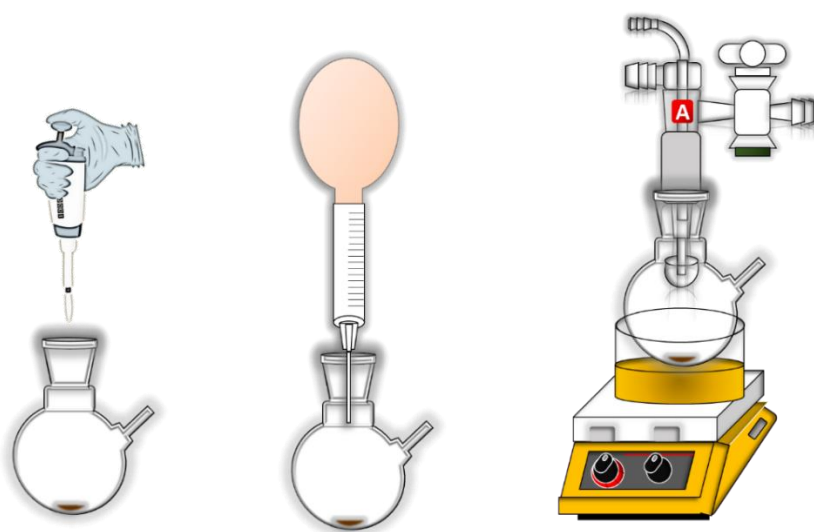


Figura 17 Etapas en la destilación del pirrol empleando un sistema de micro destilación en un baño de aceite a 60°C. Adición del pirrol (izquierda), burbujeó y eliminación de oxígeno (centro), destilación del reactivo (derecha).

Posterior a la destilación del pirrol, damos inicio a la síntesis de MIP, la cual involucra tres principales etapas ilustradas en la Figura 18. La primera de ellas conocida como pre-polymerización. Para ello, en un matraz balón de fondo plano se agregan 25 mL de metanol, junto con la plantilla y los correspondientes monómeros funcionales (pirrol y MAA), manteniendo una agitación constante durante un período de 2 horas. Lo anterior con el fin de promover la interacción entre la plantilla y monómeros para la formación de un pre-complejo.

En la siguiente etapa, conocida como polimerización, se añade el entrecruzante (EGDMA), el iniciador $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ y nitrógeno de alta pureza durante 10 minutos para eliminar el oxígeno

presente en el matraz de reacción. La reacción de polimerización se llevará a cabo en un baño de aceite a una temperatura 60°C con agitación constante y en ausencia de luz durante 16 horas. En esta etapa da comienzo la formación de la red tridimensional alrededor del complejo “plantilla-monómeros”, a través de la generación de radicales libres originados por la ruptura de los grupos vinilo presentes en el entrecruzante, promovida por la acción del iniciador como agente oxidante fuerte. Asimismo, la temperatura, la atmósfera de nitrógeno y la ausencia de luz desempeñan un papel fundamental en el control del proceso de polimerización y en la formación de los radicales libres. Transcurrido el tiempo de reacción, se pasa a la última etapa, la cual involucra lavados primarios y secundarios.

Los lavados primarios son realizados para eliminar los reactantes en exceso. Para ello, la mezcla de reacción se centrifuga en repetidas ocasiones (mínimo 5 veces) a 4000 rpm durante 5 minutos, realizando los lavados con etanol. Luego, el sólido resultante se seca en una estufa a 60°C durante 2 horas. Posteriormente, se inician los lavados secundarios para eliminar la plantilla y obtener finalmente los sitios selectivos hacia CAP, lo anterior, utilizando un equipo Soxhlet, con lavados de metanol, durante 24 horas.

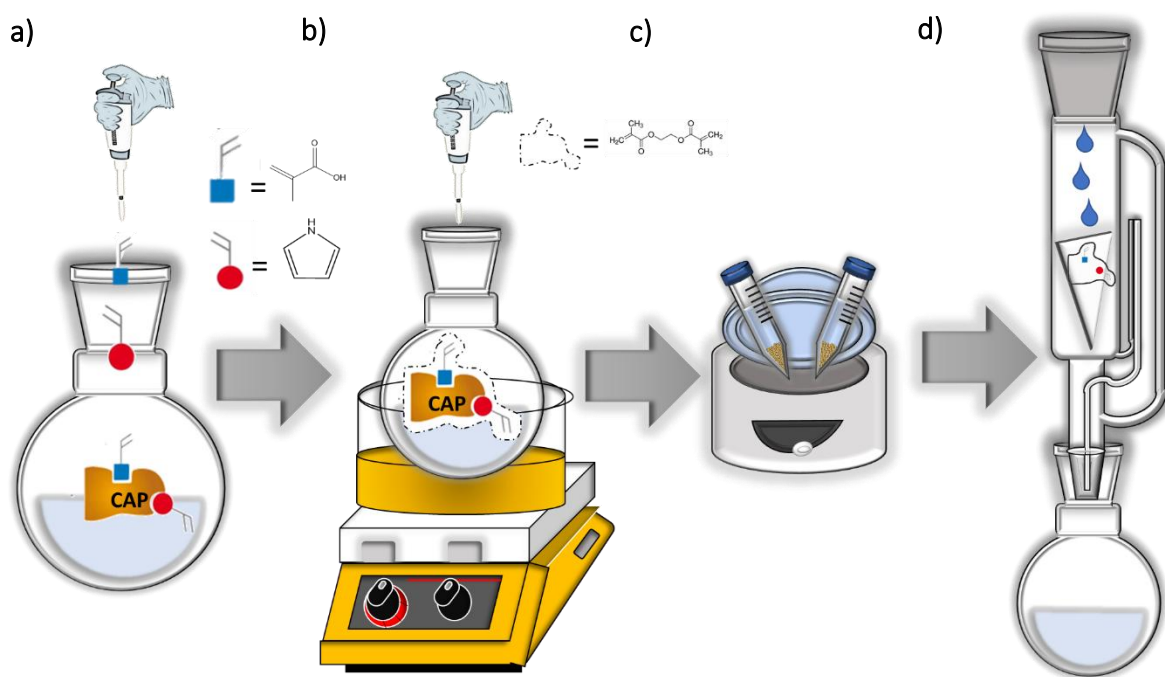


Figura 18 Etapas principales en la síntesis de MIP. Etapa de a) pre-polimerización; b) etapa de polimerización; c) etapa de lavados primarios; d) etapa de lavados secundarios.

Con fines comparativos, de igual manera se sintetizó el polímero no impreso mejor conocido como NIP, el cual sigue la misma metodología sin agregar a la plantilla.

4.1.5 Preparación de los sensores electroquímicos: GCPE, GCPE/NIP y GCPE/MIP y activación electroquímica.

Las mediciones electroquímicas del presente trabajo se realizaron empleando como electrodo de trabajo, electrodos de pasta de carbón vítreo modificados con MIP (GCPE/MIP), NIP (GCPE/NIP) y con fines comparativos un GCPE sin modificar.

En la Figura 19 se ilustra la preparación del GCPE /MIP. En la primera etapa, el polvo de carbón vítreo se mezcla manualmente con el MIP durante 15 min. Posteriormente se añaden tres gotas de aceite de parafina como aglutinante hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, la pasta de carbón vítreo modificada se empaquetó en un tubo de plástico (jeringa para insulina) y, finalmente, se insertó un contacto de cobre en uno de los extremos para su conexión con el potencióstato.

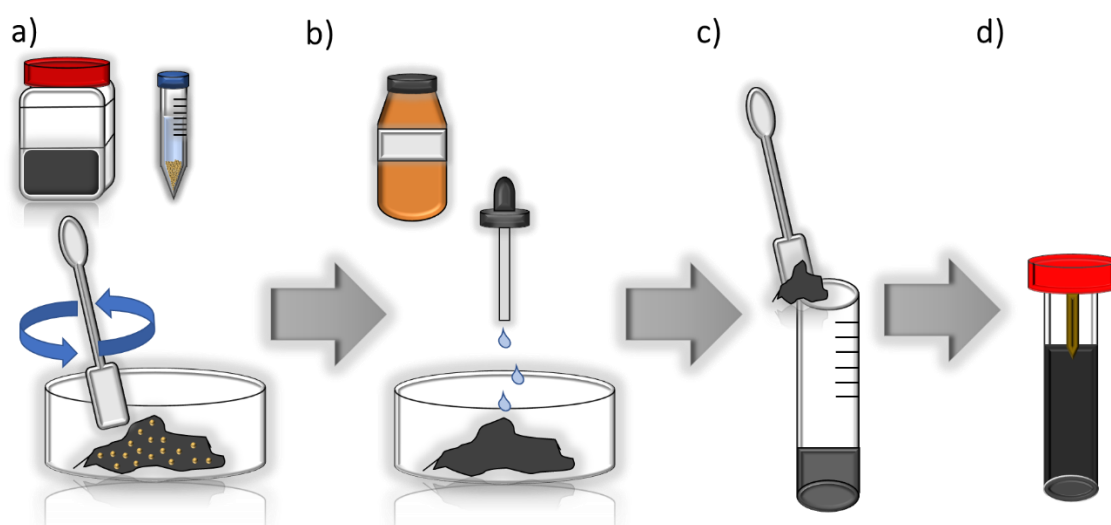


Figura 19 Preparación de un GCPE modificado con MIP. (a) mezcla del carbón vítreo y el MIP; (b) incorporación del agente aglutinante y homogenización; (c) empaquetamiento de la mezcla en el cuerpo del electrodo; y (d) inserción del contacto eléctrico.

El electrodo de pasta de carbono vítreo sin modificar se preparó de manera similar sin incluir al MIP. Al emplear carbón vítreo como material conductor en la preparación del sensor

electroquímico, fue necesaria la activación de este, esto con el fin de aumentar los sitios activos disponibles sobre la superficie del electrodo. La activación electroquímica se realizó mediante barridos de potencial en las direcciones anódica y catódica, empleando CV en un buffer de fosfatos a pH 7.0, dentro de una ventana de potencial de 1.50 a -1.50 V, con un total de 8 ciclos.

4.1.6 Caracterización electroquímica del sensor GCPE/MIP

4.1.6.1 Comparación del comportamiento electroquímico entre un CPE y un GCPE

Se evaluó el comportamiento electroquímico entre un electrodo de pasta de carbón convencional de grafito y un electrodo de pasta de carbón vítreo mediante CV, esto con el fin de seleccionar el sensor electroquímico a utilizar en la determinación de CAP. Para ello, se realizaron barridos de potencial empleando una ventana de estudio desde -1.50V a 1.50 V a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} .

El sensor electroquímico por elegir en la determinación de CAP será aquel que presente la señal electroquímica con menor corriente capacitiva, una línea base estable y ausencia de señales atribuibles a interferentes durante el estudio voltamperométrico.

4.1.6.2 Caracterización electroquímica de CAP empleando CV

La caracterización electroquímica del CAP se realizó mediante CV utilizando un GCPE sin modificar en una solución de CAP 1.00 mM. Para ello, se empleó una ventana de trabajo desde -1.50V a 1.50V realizando barridos de potencial en un total de tres segmentos, iniciando con un barrido en dirección catódica de 0.00 V a -1.50V, seguido de un barrido en dirección anódica desde -1.50V a 1.50V y finalmente un realizar un tercer barrido desde 1.50 V a 0.00 V, para regresar al potencial de inicio.

4.1.6.3 Técnica de cuantificación: Voltamperometría de redisolución adsorbtiva (AdSV)

Tomando en cuenta la capacidad de adsorción y retención del MIP hacia el CAP y con la finalidad de explotar dicha característica se empleó como técnica de cuantificación la AdSV la cual involucra dos principales etapas:

1) Etapa de carga

En esta primera etapa, el sensor electroquímico GCPE /MIP se pone en contacto con una solución de CAP a una concentración conocida, controlando tanto el tiempo de carga como la velocidad de agitación (Figura 20). En esta etapa se promueve y maximiza la interacción entre el MIP y el CAP, para realizar una preconcentración en la superficie del sensor.

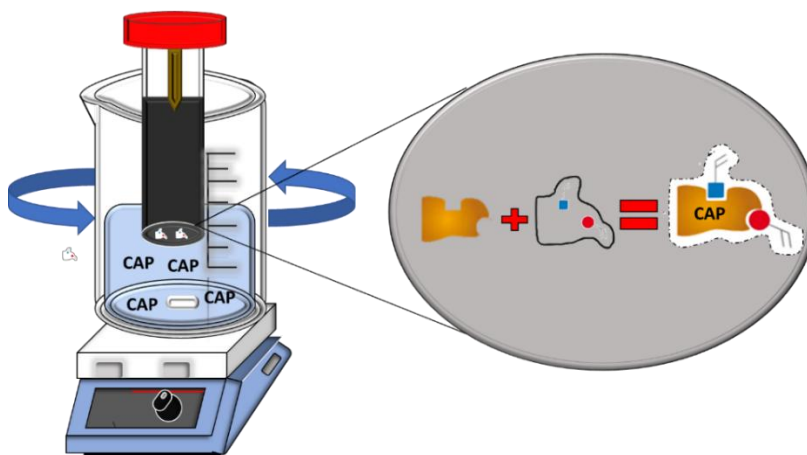


Figura 20 Etapa de carga en Voltamperometría de redisolución adsortiva).

2) Etapa de Redisolución

Posteriormente, el sensor electroquímico GCPE/MIP previamente cargado se introduce en la celda electroquímica, junto con el electrodo de referencia (Ag/AgCl) y el electrodo auxiliar (una barra de grafito de alta pureza), empleando como medio un buffer fosfatos pH 7 y llevar a cabo la determinación electroquímica de CAP (Figura 21).

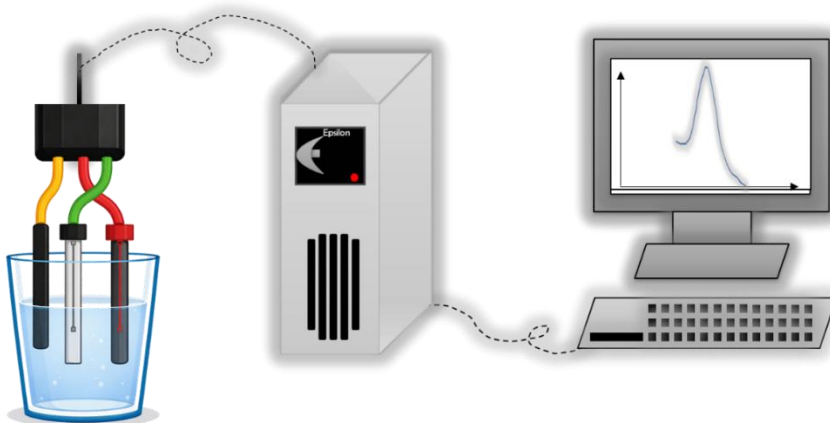


Figura 21 Etapa de redisolución en Voltamperometría de redisolución adsortiva.

4.1.7 Determinación directa de CAP

Con base en la bibliografía, se planteó como primera estrategia la determinación directa de CAP (Alizadeh *et al.*, 2012), siguiendo el pico de reducción en la ventana catódica, asociado a la reducción del grupo nitro presente en la molécula de CAP (Figura 22). Para ello, se empleó AdSV (sección 4.1.6.3) utilizando un GCPE/MIP, y la detección se realizó mediante voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) en sentido de reducción.

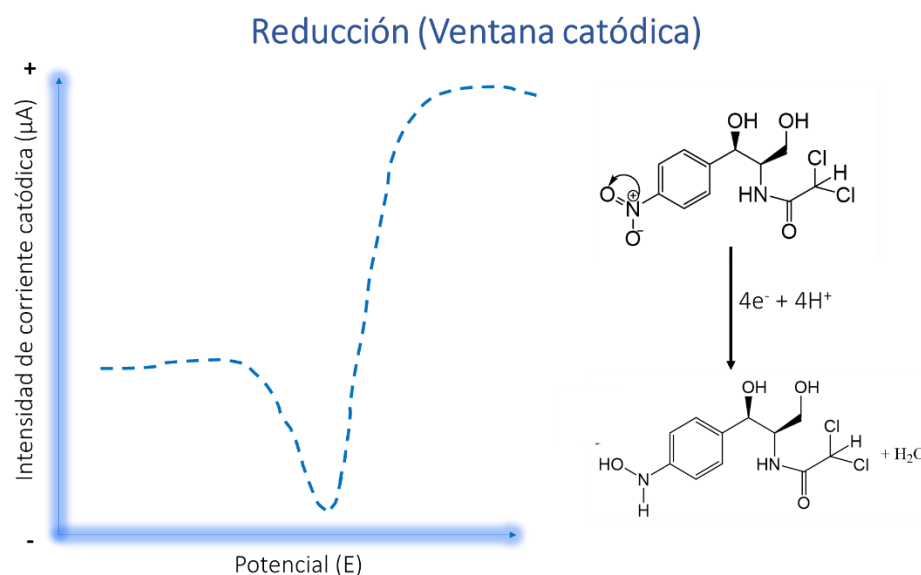


Figura 22 Metodología electroquímica en la determinación directa de CAP mediante DPV.

4.1.8 Determinación indirecta de CAP

Como segunda estrategia, se planteó la determinación indirecta de CAP, siguiendo el pico observado en la ventana anódica, asociado a la oxidación del derivado de hidroxilamina (producto generado en la etapa de reducción del CAP) hacia un grupo nitroso (Figura 23).

Para lograr la determinación indirecta de CAP utilizando el sensor GCPE/MIP mediante AdSV, se implementaron técnicas electroquímicas sucesivas. En la primera etapa, se empleó una técnica cronoamperométrica en sentido de reducción para inducir la reducción del CAP. Posteriormente, mediante un barrido de potencial utilizando DPV, se obtuvo la señal anódica correspondiente a la oxidación del derivado de hidroxilamina.

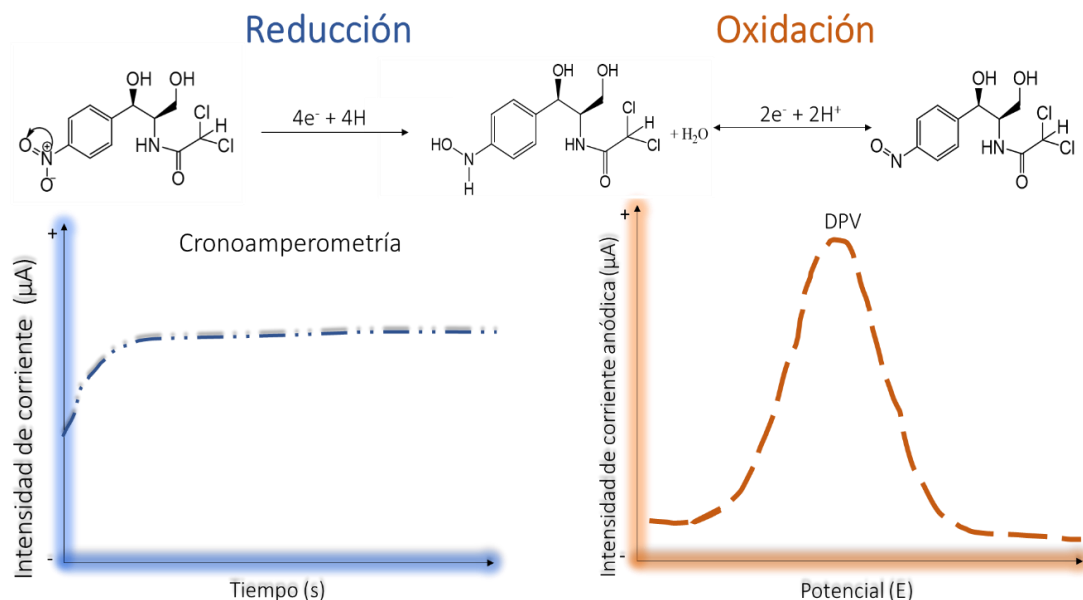


Figura 23 Metodología electroquímica en la determinación indirecta de CAP empleando técnicas electroquímicas sucesivas; cronoamperometría en sentido de reducción (izquierda) y DPV en sentido de oxidación (derecha).

4.1.9 Optimización de la síntesis de MIP

La optimización en la síntesis del MIP se realizó empleando un diseño de experimentos clasificado como diseño de mezclas, específicamente un Simplex Centroide (Scheffé, 1963), considerando tres variables de entrada: cantidad de plantilla, monómeros (Pirrol y MAA) y entrecruzante. La selección de estas tres variables se fundamenta en la relación plantilla-monómeros durante la formación del precomplejo, así como en el papel del entrecruzante en la generación de la red tridimensional del polímero. En la Tabla 11 se muestra una matriz codificada los 10 experimentos establecidos por un Diseño Simplex Centroide para tres variables de entrada.

Tabla 11 Variables codificadas para un diseño de mezclas Simplex Centroide.

No.	A (plantilla)	B (monómeros)	C (Entrecruzante)
1	1.00	0.00	0.00
2	0.00	1.00	0.00
3	0.00	0.00	1.00
4	0.50	0.50	0.00
5	0.50	0.00	0.50
6	0.00	0.50	0.50
7	0.33	0.33	0.33
8	0.67	0.17	0.17

9	0.17	0.67	0.17
10	0.17	0.17	0.67

En la Tabla 12 se muestran los niveles altos y bajos empleados para cada variable (plantilla, monómeros y entrecruzante) empleados en el diseño, los cuales fueron elegidos con base a lo reportado a bibliografía (Y. Gao *et al.*, 2021). Para los 10 experimentos se trabajó con ambos monómeros (pirrol y MAA) variando los porcentajes de cada uno desde un 20.00 % a 80.00 %.

Tabla 12 Niveles altos y bajos en para las variables: *Plantilla:monómeros:entrecruzante*.

	A	B	C
Nivel	Plantilla (mmol)	Monómero (mmol)	Entrecruzante (mmol)
0	0.5	4.8:1.2	20
1	1.5	0.8:3.2	50

Una vez sintetizados los diez MIP conforme al diseño, cada uno se empleó para la preparación de un GCPE/MIP, el cual fue utilizado en la metodología propuesta para la determinación indirecta de CAP. La variable de respuesta considerada fue la intensidad de corriente anódica (i_a). Para cada experimento se realizaron tres réplicas ($n = 3$). Las condiciones experimentales empleadas fueron: concentración de CAP de 1 mM, tiempo de carga de 10 min y velocidad de agitación de 60 rpm.

4.1.10 Caracterización del material óptimo MIP y NIP

Una vez optimizadas las condiciones de síntesis para la obtención del MIP y NIP, ambos materiales fueron caracterizados química y morfológicamente mediante técnicas instrumentales, incluyendo FTIR, SEM, BET y análisis termogravimétrico. Posteriormente, ambos materiales NIP y MIP óptimos fueron empleados para preparar electrodos GCPE/MIP y GCPE/NIP, esto con el fin de realizar la caracterización electroquímica de ambos sensores empleando como EIS y voltamperometría de redisolución adsorbtiva (AdSV) con el uso de técnicas electroquímicas sucesivas.

4.1.11 Optimización de parámetros críticos dentro de la metodología

Teniendo planteada la metodología para la determinación de CAP, se realizó una optimización univariable del sensor electroquímico GCPE/MIP y parámetros críticos dentro de la AdSV empleando una concentración de CAP de 0.05 mM durante todo el proceso. Para todas las optimizaciones se buscó aquellos valores y parámetros que incrementaran la i_a en la determinación del CAP. En la Figura 24 se resumen los parámetros a optimizar, así como el valor estándar y el intervalo de estudio para cada uno.

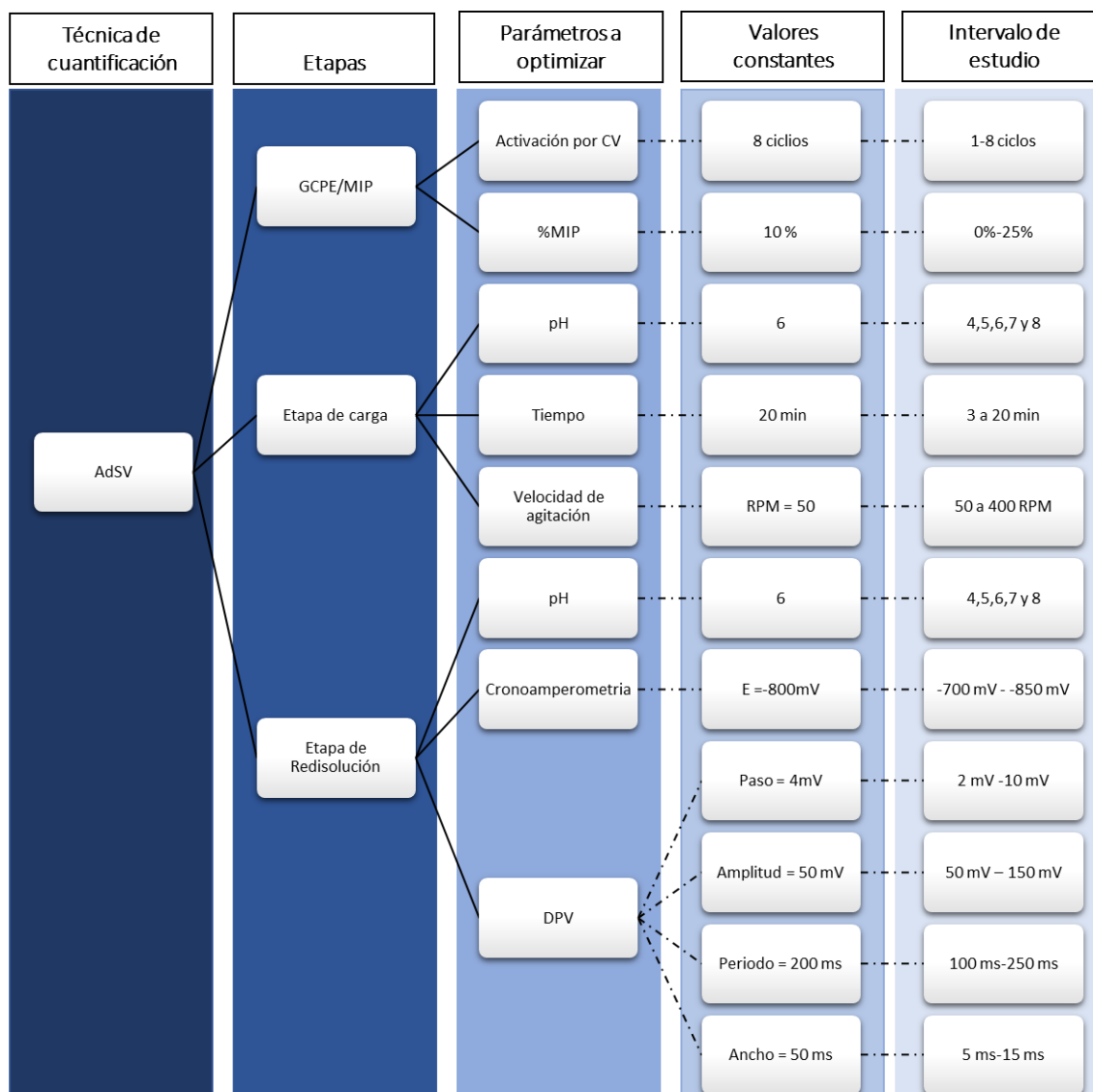


Figura 24 Resumen de los parámetros a optimizar dentro de la metodología por AdSV para la determinación indirecta de CAP.

4.1.11.1 Optimización del sensor electroquímico GCPE/MIP

La optimización del sensor electroquímico GCPE/MIP consistió en una optimización univariable considerando dos factores; número de ciclos realizados en la activación electroquímica por CV y porcentaje de MIP presente en la mezcla composite. Las condiciones, así como los niveles para cada factor se describen a continuación.

4.1.11.1.1 Optimización en la activación del sensor electroquímico

La activación electroquímica se llevó a cabo con el propósito de incrementar la cantidad de sitios activos sobre la superficie del sensor electroquímico GCPE /MIP. Para optimizar este proceso, se evaluó la i_a en función del número de ciclos aplicados mediante CV, considerando un intervalo de 1 a 8 ciclos.

4.1.11.1.2 Optimización del porcentaje de MIP presente en el GCPE

Se evaluó el efecto de la cantidad del MIP sobre la señal de respuesta en la superficie del electrodo, variando los porcentajes en la pasta composite. Para esto se consideró una masa total de mezcla composite (MIP más polvo de carbón vitreo) de 0.40 y 0.012 g de aglutinante. Los porcentajes MIP probados fueron 0.00, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00 y 25.00 %.

4.1.11.2 Optimización de la técnica de cuantificación: Voltamperometría de redisolución adsorbtiva.

Una vez optimizado el sensor electroquímico GCPE/MIP, se realizó la optimización de la técnica de cuantificación mediante AdSV, la cual, como se mencionó en la sección 4.1.6.3, comprende dos etapas fundamentales: la etapa de carga y la etapa de redisolución.

Cada una de estas etapas presenta parámetros específicos que requieren optimización. En la etapa de carga se evaluaron tres variables: pH, tiempo de carga y velocidad de agitación. Dichos parámetros fueron optimizados mediante una metodología univariable.

Por su parte, en la etapa de redisolución se estudió inicialmente el efecto del pH empleando el mismo Intervalo de estudio que en la etapa de carga. Asimismo, se evaluaron y optimizaron las técnicas electroquímicas sucesivas empleadas: la cronoamperometría (en

sentido de reducción) y la DPV (en sentido de oxidación), donde esta última fue optimizada empleando un diseño de experimentos. Las condiciones, así como los niveles para cada factor se describen a continuación.

4.1.11.3 Optimización del pH de trabajo en la etapa de carga y de redisolución

La optimización del pH en la etapa de carga se realizó con base a los valores de pKa reportados para ambos monómeros funciones, así como el intervalo de estabilidad para el CAP (Figura 25). De acuerdo a bibliografía la molécula de CAP es estable en un intervalo de 2 a 7 en la escala de pH, alcanzado su estabilidad máxima en pH 5.50 (Tran *et al.*, 2019) . Ya que, fuera de este intervalo el grupo amida presente en la molécula sufre una hidrólisis ácida o básica según sea el caso, ocasionando la degradación del CAP (Higuchi *et al.*, 1954a).

Con base en la información anterior, se empleó un intervalo de pH de estudio desde 3 a 7 en la escala de pH.

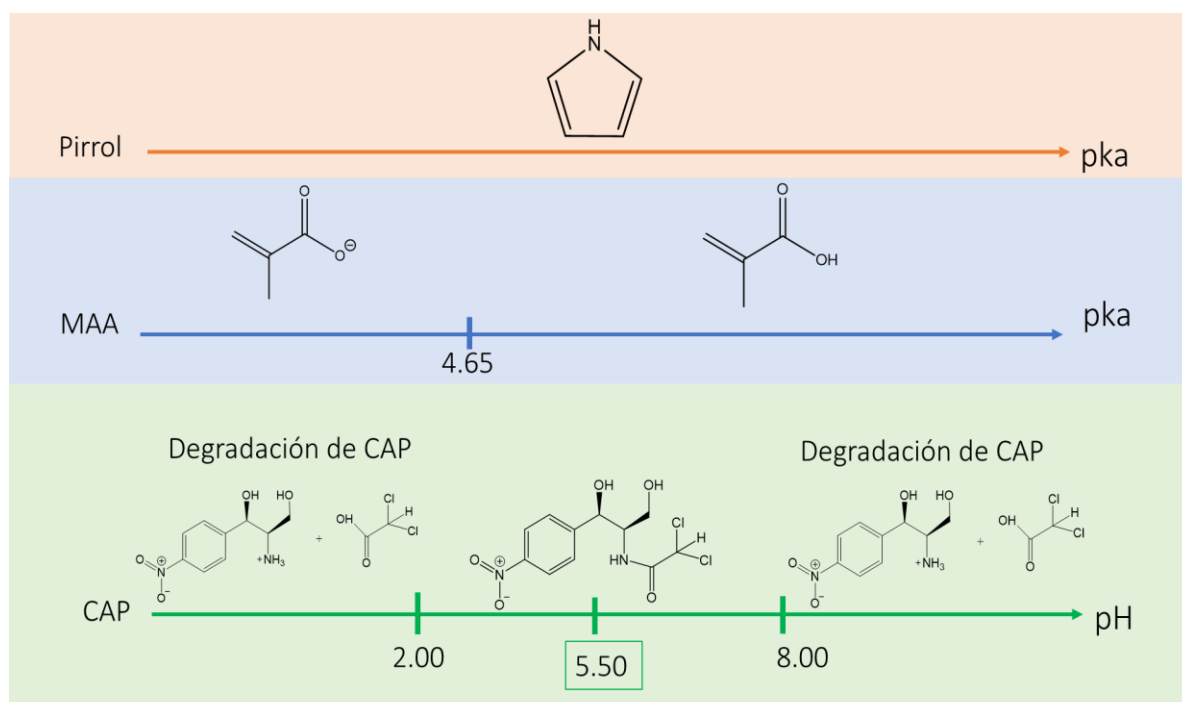


Figura 25 Valores de pKa reportado para los monómeros pirrol y MAA y CAP.

Posteriormente, utilizando el mismo intervalo de estudio, se optimizó el pH de trabajo para la etapa de redisolución en la determinación indirecta de CAP, tomando como variable

de salida la i_a . Asimismo, se evaluó el efecto del pH sobre el valor de potencial (E°) de acuerdo a la ecuación de Nerst (Ecuación 3) (Vidal-Iglesias *et al.*, 2012).

$$E = E^0 - \frac{59.20 \text{ m}}{n} pH$$

Ecuación 3

4.1.11.4 Optimización del tiempo de carga

El tiempo de carga fue evaluado en función del periodo durante el cual el electrodo permaneció en contacto con una solución de CAP a una concentración de 5×10^{-5} M. Lo anterior tuvo como objetivo promover y mejora la interacción entre el MIP presente en el sensor electroquímico y el CAP en solución.

La optimización se realizó mediante un análisis univariable, evaluando los tiempos de carga de 5, 10, 15 y 20 minutos.

4.1.11.5 Optimización de la velocidad de agitación

Una vez optimizado el tiempo de contacto entre el sensor GCPE /MIP y CAP, se evaluó el efecto de la velocidad de agitación sobre la señal de respuesta. Este parámetro se encuentra directamente relacionado con el proceso de convección inducido en el proceso, favoreciendo el transporte de CAP desde la solución hasta la superficie del GCPE/MIP.

Con el propósito de determinar las condiciones óptimas, se evaluaron velocidades de agitación en un intervalo de 50 a 400 revoluciones por minuto (rpm), empleando incrementos de 50 rpm.

4.1.11.6 Optimización de las Técnicas Electroquímicas Sucesivas

Posterior a la optimización de la etapa de carga, se realizó la optimización de la etapa de redisolución, la cual involucra la determinación de CAP empleando técnicas electroquímicas sucesivas.

Las técnicas electroquímicas empleadas en la determinación indirecta de CAP son: Cronoamperometría (en sentido catódico) y DPV (en sentido anódico), ambas técnicas fueron optimizadas como se describe a continuación:

4.1.11.6.1 Cronoamperometría

La optimización de la cronoamperometría se realizó de forma univariable probando distintos valores de sobrepotencial desde -700, -730, -750, -780, -800 y -850 mV en relación del potencial de reducción observado para CAP (-650 mV). Tomando como variable a mejorar la intensidad de corriente anódica.

4.1.11.6.2 Voltamperometría diferencial de pulsos (DPV)

La optimización de DPV se realizó utilizando un diseño de experimentos específicamente un Taguchi L9 (3³) (Gutiérrez Pulido, H, 2012) con cuatro variables de entrada: paso de potencial, amplitud de potencial, ancho de pulso y periodo, cada una con tres niveles como se ilustra en la Tabla 13.

Tabla 13 Factores y niveles empleando en el diseño Taguchi L9 (3³).

Factor		Nivel		
		1	2	3
1	Amplitud de potencial (mV)	50.0	100	150
2	Ancho de pulso (ms)	5.00	10.0	15.0
3	Duración de pulsos (ms)	100	175	250
4	Paso de potencial (mV)	2.00	6.00	10.0

En la Tabla 14 se presenta la matriz experimental codificada correspondiente al diseño Taguchi L9 (3³), conformada por un total de 9 experimentos, empleando como variable de salida la intensidad de corriente anódica. El conjunto de datos fue analizado empleando el software Minitab 18.

Tabla 14 Matriz codificada para un diseño L9 (3³).

No. de experimentos	Amplitud (mV)	Ancho de pulso (ms)	Paso (mV)	Periodo (ms)
1	1.00	1.00	1.00	1.00
2	1.00	2.00	2.00	2.00
3	1.00	3.00	3.00	3.00
4	2.00	1.00	2.00	3.00

5	2.00	2.00	3.00	1.00
6	2.00	3.00	1.00	2.00
7.00	3.00	1.00	3.00	2.00
8.00	3.00	2.00	1.00	3.00
9.00	3.00	3.00	2.00	1.00

4.1.12 Curva de calibración y obtención de parámetros analíticos

Una vez optimizada la metodología electroanalítica en la determinación indirecta de CAP, se construyó una curva de calibración empleando soluciones estándar con concentraciones crecientes en el intervalo de 1.00×10^{-4} a 0.1 mM.

La curva de calibración se utilizó para la obtención de parámetros analíticos, tales como sensibilidad analítica, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) de acuerdo con los criterios establecidos por la IUPAC (Olivieri *et al.*, 2006).

La sensibilidad analítica se determinó mediante el método de mínimos cuadrados aplicado a la curva de calibración (Bharti Mittu y Chauhan, 2015), obteniéndose la ecuación de la recta descrita como (Ecuación 4):

$$\Delta i (\mu A) = [m (\mu A \mu g^{-1} L) * [CAP](\mu g L^{-1})] + b \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde **m** corresponde a la pendiente de la recta y representa la sensibilidad del método analítico, mientras que **b** es la ordenada al origen.

El LOD, definido como la concentración mínima de analito que puede ser detectada de manera confiable por el método analítico, se determinó con la Ecuación 5 (Olivieri *et al.*, 2006)

Ecuación 5.

$$LOD = \frac{(3.33 * S_{x/y})}{S}$$

Donde $S_{x/y}$ es el error típico de la curva y **S** es la sensibilidad del método electroquímico (pendiente).

Por otra parte, el LOQ, definido como la concentración mínima de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud por el método analítico, se determinó con la Ecuación 6 (Olivieri *et al.*, 2006).

$$LOQ = \frac{(10 * S_{X/Y})}{S}$$

Ecuación 6

4.1.13 Estudio de reproducibilidad y repetibilidad

Con la finalidad de evaluar la variabilidad asociada tanto a la síntesis del MIP como a la preparación de los GCPE/MIP, se realizó un estudio de reproducibilidad y repetibilidad (Figura 26) calculando el porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) para cada estudio.

El estudio de repetibilidad consistió en la preparación de un GCPE/MIP bajo las condiciones óptimas previamente establecidas, seguido de la realización de cinco mediciones consecutivas mediante la metodología propuesta para la determinación indirecta de CAP, empleando una concentración de 0.05mM. Posteriormente, se calculó el % RSD para el conjunto de datos, el cual de acuerdo con literatura (Olivieri *et al.*, 2006) debe ser inferior al 10.00 % para indicar precisión en la preparación y respuesta del sensor.

Por otro lado, el estudio de reproducibilidad consistió en la preparación independiente de tres GCPE, cada uno modificado con MIP óptimo de tres distintas síntesis. Para cada GCPE /MIP se realizaron 5 mediciones empleando la metodología establecida en la determinación indirecta de CAP. Finalmente, se calculó el % RSD considerando el conjunto total de resultados obtenidos, con el fin de evaluar la variación entre la síntesis y la fabricación entre sensores.

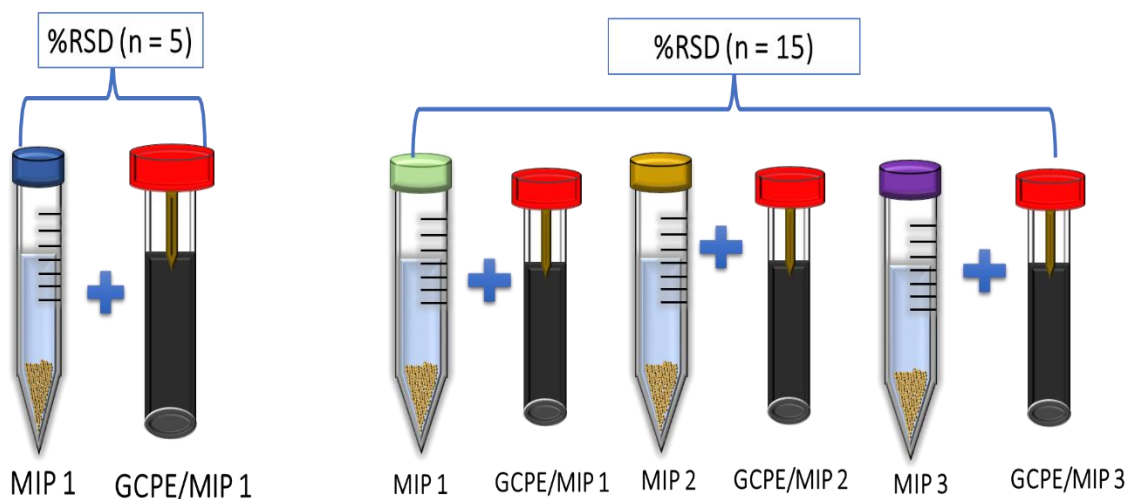


Figura 26 Estudio de repetibilidad (izquierda) y estudio de reproducibilidad (derecha).

4.1.14 Análisis de muestras reales y efecto matriz

Una vez concluido el estudio de reproducibilidad, se realizó el análisis de muestras reales empleando agua de distintos cuerpos de hídricos. Se analizaron muestras de agua de pozo, lago, manantial, río y presa.

4.1.14.1 Tratamiento de la muestra

Previo al análisis, fue necesario realizar un pretratamiento de las muestras. Este consistió en una filtración al vacío empleando una membrana de 0.45 μm , con la finalidad de eliminar sólidos suspendidos y residuos presentes en la matriz. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de la muestra filtrada y se llevó a un aforo de 10 mL con buffer fosfatos pH 6, para su posterior análisis (Figura 27).

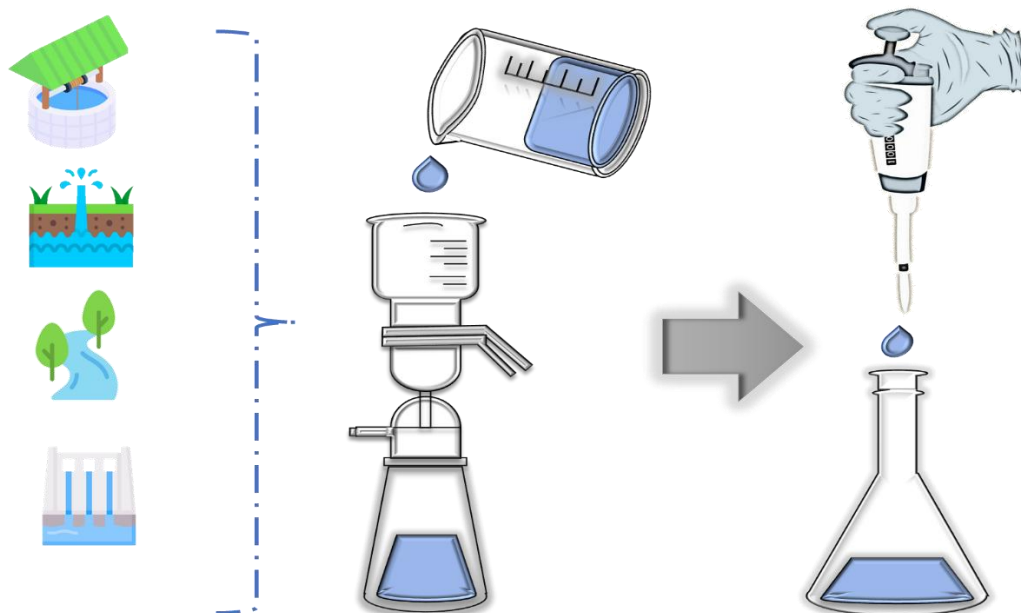


Figura 27 Pretratamiento para las muestras de agua.

4.1.14.2 Análisis de efecto matriz mediante curva de adición patrón

El efecto matriz se evaluó para cada muestra mediante la comparación de la sensibilidad analítica (pendiente de la recta), obtenida a partir de la curva de calibración frente a la pendiente correspondiente a una curva de adición patrón elaborada para cada muestra.

La curva de adición patrón se construyó mediante la incorporación sucesiva de cinco estándares de concentración creciente en presencia de la muestra, registrando la respuesta analítica en cada adición. De esta manera, fue posible determinar la influencia de la matriz sobre la cuantificación del analito (Pahlevan *et al.*, 2025).

4.1.15 Exactitud: Obtención del porcentaje de recuperación

Una vez analizadas las muestras, se procedió al dopaje de cada una con CAP, aplicando el mismo tratamiento de muestra previamente descrito, hasta obtener una concentración final de $460 \mu\text{g L}^{-1}$. Posteriormente, las muestras fortificadas fueron analizadas bajo las mismas condiciones experimentales.

Para cada muestra se calculó el porcentaje de recuperación (% R)(«Validation and Verification Guidelines for Analytical Methods», 2017), empleando la Ecuación 7:

$$\% R = \frac{\text{Cantidad real}}{\text{Cantidad teorica}} * 100$$

Ecuación 7

Este parámetro permitió evaluar la exactitud del método propuesto en matrices reales.

4.2 Resultados

4.2.1 Comparación del comportamiento electroquímico de un electrodo de pasta de carbono (CPE) y carbón vítreo (GCPE)

Se evaluó el comportamiento electroquímico de dos electrodos basados en carbono mediante CV. El primer electrodo utilizado fue CPE convencional de grafito, que presentó picos en la ventana catódica (-0.80 V) asociados a la reducción de los grupos funcionales presentes en el grafito debido a la síntesis del material (Figura 28). Los potenciales observados para estos picos se encontraban cercanos al potencial de reducción del CAP reportado en la bibliografía (-0.66 V) (Tocher y Edwards, 1989).

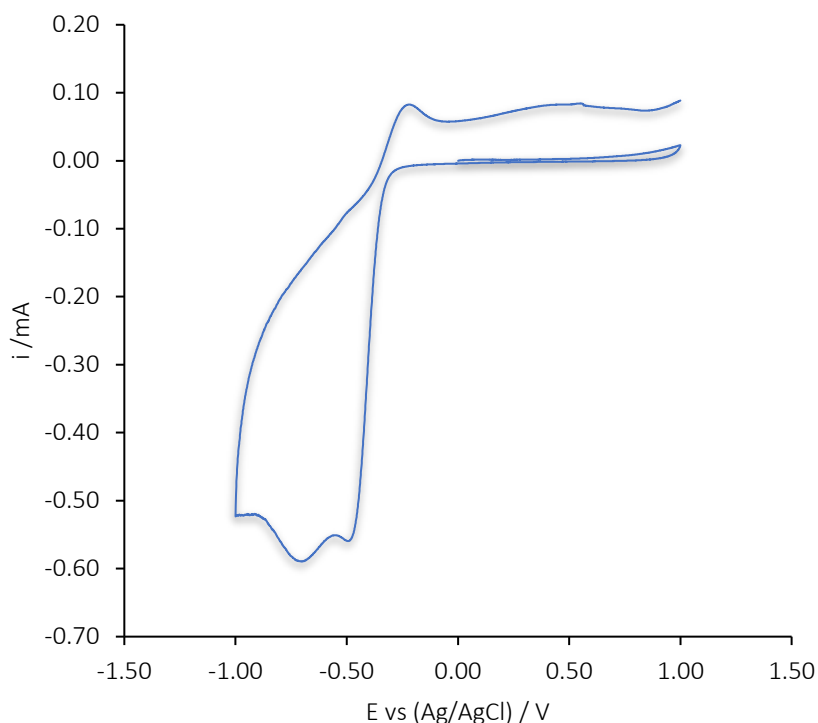


Figura 28 CV de un CPE en 10.0 mM de buffer fosfatos (pH 7). Velocidad de barrido 100 mV s⁻¹ en tres segmentos de 0.00 V a 1.00 V, segundo segmento de 1.00 V a -1.00 V y tercer segmento de -1.00 V a 1.00V.

En un segundo análisis, se utilizó un electrodo de pasta de carbono vítreo (GCPE), el cual presentó una menor corriente capacitiva y una línea base más estable, sin señales electroquímicas atribuibles a procesos interferentes que pudieran afectar la determinación de CAP. Este comportamiento favoreció su uso como electrodo de trabajo en la detección del CAP (Figura 29).

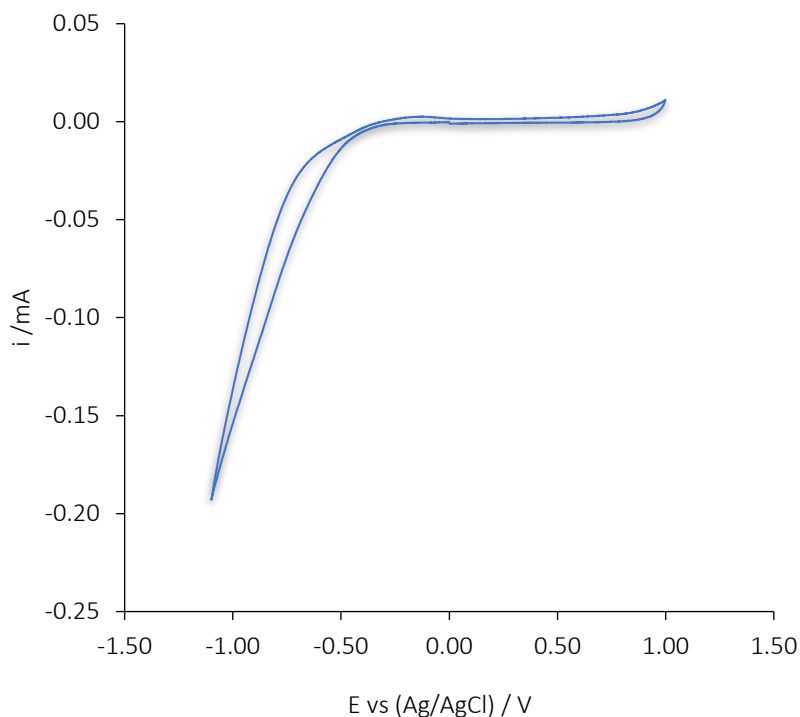


Figura 29 CV de un GCPE en 10.0 mM de buffer fosfatos (pH 7). Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} en tres segmentos de 0.00 V a -1.00 V, segundo segmento de -1.00 V a 1.00 V y tercer segmento de 1.00 V a 0.00 V.

4.2.2 Evaluación del comportamiento electroquímico mediante CV del CAP.

Se evaluó el comportamiento electroquímico del sensor GCPE en una solución de CAP 1.00 mM (buffer fosfatos pH 7), empleando CV (barrido en dirección catódica). En la Figura 30a se muestra el voltamperograma cíclico obtenido para el GCPE en presencia de CAP, mostrándose en la ventana catódica un pico de reducción alrededor de -0.64V, el cual se asocia directamente a la reducción del grupo nitro presente en la molécula del CAP a un derivado de hidroxilamina (Figura 30b), posteriormente al invertir el barrido en sentido

anódico se aprecia un pico de oxidación en 0.47 V, asociado a la oxidación del derivado de hidroxilamina a un grupo nitroso (Figura 30c) (Chuanuwatanakul *et al.*, 2008).

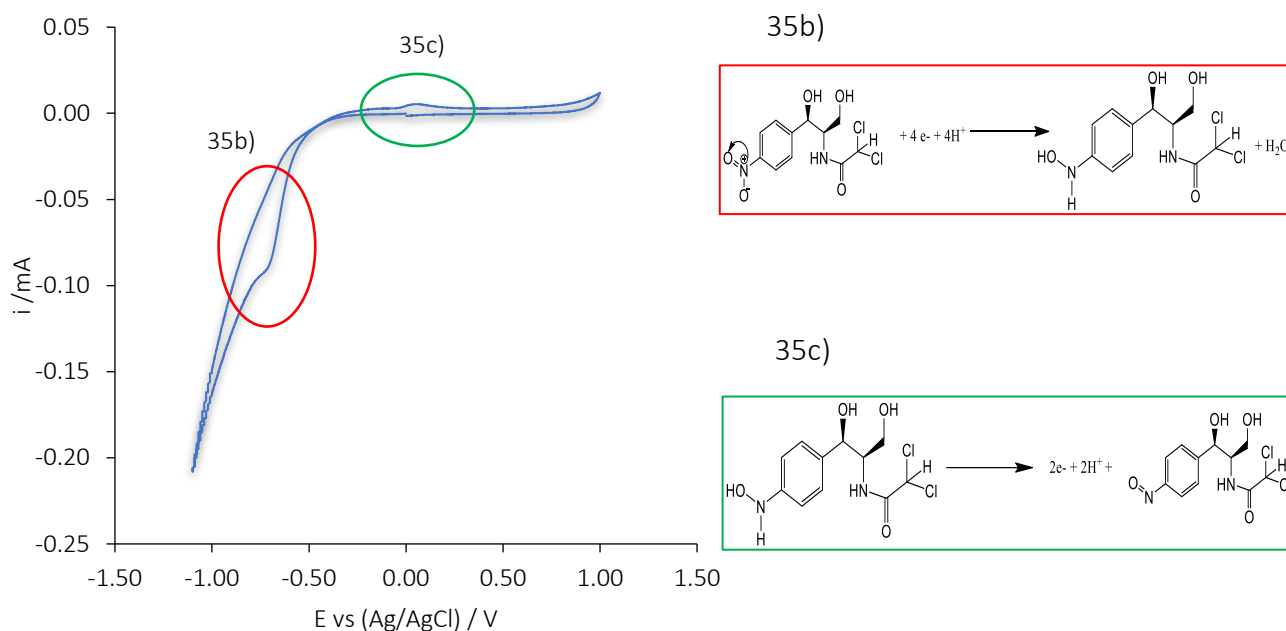


Figura 30 a) CV de un GCPE en una solución de CAP 1.00 mM (0.1 M de buffer fosfatos pH 7). Velocidad de barrido 100 mV s⁻¹ en tres segmentos de 0.00 V a -1.00 V, segundo segmento de -1.00 V a 1.00 V y tercer segmento de 1.00 V a 0.00 V. b) mecanismo de reducción del CAP. c) mecanismo de oxidación del derivado de hidroxilamina.

4.2.3 Modificación del GCPE con MIP

El sensor electroquímico GCPE se modificó inicialmente con un 10.00 % del MIP (MAA y pirrol) empleando una relación plantilla: monómeros: entrecruzante de 1.0: 4.0: 20 mmol respectivamente.

El estudio del comportamiento electroquímico del sensor GCPE/MIP en presencia y ausencia de CAP 1.00 mM (buffer fosfatos pH 7), fue evaluado mediante AdSV empleando como condiciones iniciales; 20 minutos, 300 rpm y pH 7.

4.2.4 Primera estrategia: Determinación directa de CAP empleando la Ventana Catódica.

Con base en la bibliografía, se planteó como primera estrategia la determinación directa de CAP, siguiendo el pico de reducción en la ventana catódica, asociado a la reducción del grupo nitro presente en la molécula de CAP. Para ello, se empleó como técnica de detección

la DPV (en sentido de reducción). No obstante, al contrastar el comportamiento del electrodo convencional frente al sensor modificado con MIP (GCPE/MIP), se observan limitaciones críticas en la definición de la señal.

En la Figura 31a se muestra el voltamperograma obtenido para un GCPE empleando una solución directa de CAP 1.00 mM (buffer fosfatos pH 7), observándose un pico catódico alrededor de -0.64 V, asociando a la reducción del CAP.

Posteriormente, en los voltamperogramas correspondientes a las Figuras 31b a 31e, se empleó el sensor GCPE/MIP mediante Voltamperometría de redisolución adsoritiva, variando los tiempos de carga y valores de pH. Sin embargo, a pesar de modificar diversos parámetros operativos para AdSV empleando GCPE/MIP, no fue posible apreciar ni definir el pico de reducción de CAP.

Esta limitación se atribuye directamente a la presencia de un segundo proceso electroquímico superpuesto, relacionado con la reducción de oxígeno disuelto, el cual interfiere con la señal característica del CAP. En consecuencia, esta interferencia impide el uso de la DPV en sentido catódico como método de cuantificación directa.

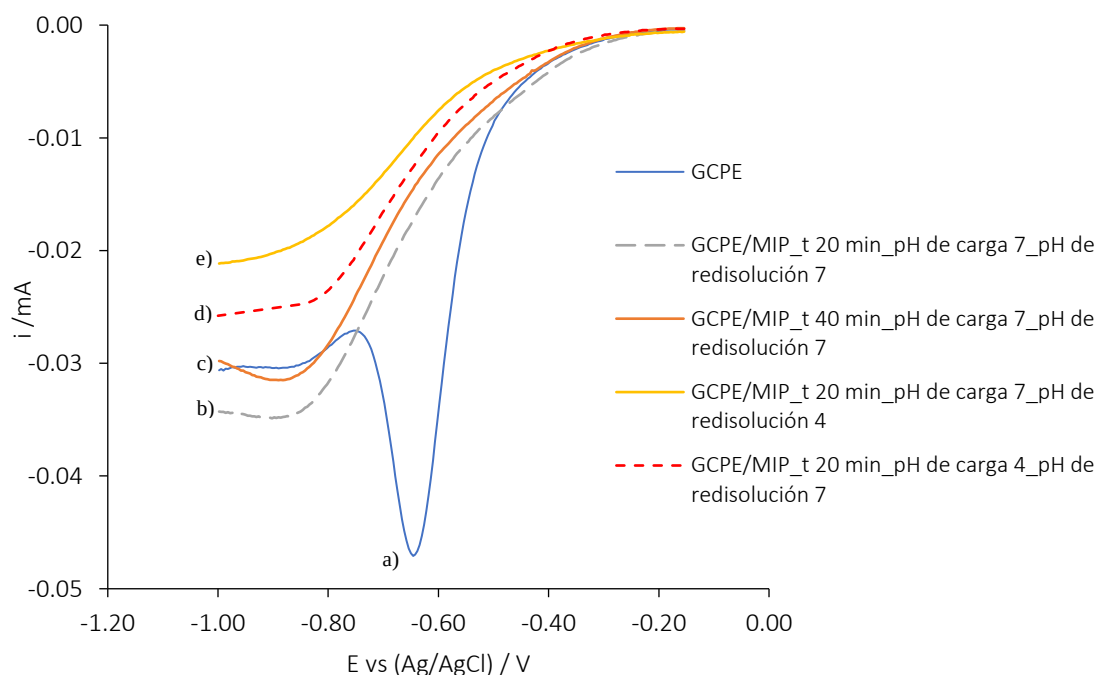


Figura 31 a) DPV de un GCPE en una solución de CAP (1 mM) directo buffer fosfatos 0.1M a pH 7; b) DPV de GCPE/MIP empleando AdSV a pH 7 (etapa de carga y redisolución) ; 20 min agitación a 60 rpm; c) DPV de GCPE/MIP empleando AdSV

a pH 7 (etapa de carga y redisolución) ; 40 min agitación a 60 rpm d) DPV de GCPE/MIP empleando AdSV a pH 7 (etapa de carga), pH 4 (etapa de redisolución) ; 20 min agitación a 60 rpm; e) DPV de GCPE/MIP empleando AdSV a pH 4 (etapa de carga) pH 7 (redisolución) ; 20 min agitación a 60 rpm. En un segmento de 0.00 V a -1.20 V.

4.2.5 Segunda estrategia: Determinación indirecta de CAP utilizando la ventana anódica

Como segunda estrategia, se planteó la determinación indirecta de CAP, siguiendo el pico observado en la ventana anódica, asociado a la oxidación del derivado de hidroxilamina (producto generado en la etapa de reducción del CAP hacia un grupo nitroso).

Para lograr la determinación indirecta de CAP utilizando el sensor GCPE/MIP mediante AdSV, se implementaron técnicas electroquímicas sucesivas. En la primera etapa, se empleó una técnica cronoamperométrica en sentido de reducción para inducir la reducción del CAP. Posteriormente, mediante un barrido de potencial utilizando DPV, se obtuvo la señal anódica correspondiente a la oxidación del derivado de hidroxilamina.

En la Figura 32 se muestra el uso de técnicas electroquímicas sucesivas, para la Figura 32a se observa el cronoamperograma (en sentido de reducción) a un sobrepotencial de -800 mV y posterior en la Figura 32b se observa el voltamperograma diferencial de pulsos (en sentido de oxidación), mostrándose la señal electroquímica a seguir en la cuantificación del CAP.

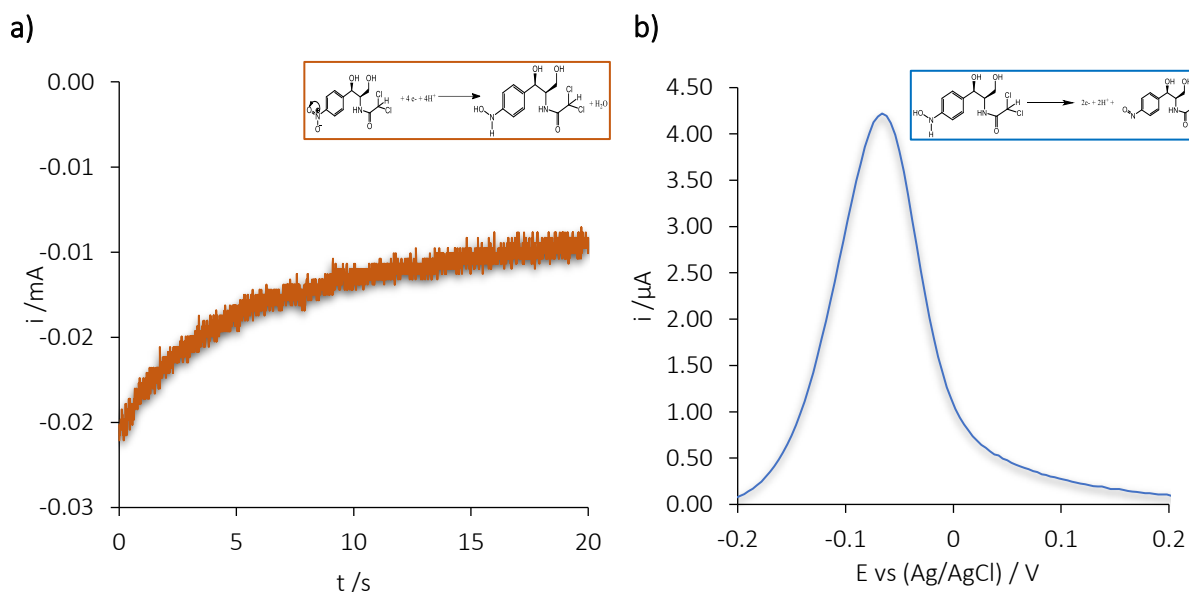


Figura 32 Técnicas electroquímicas sucesivas empleadas en la determinación indirecta de CAP (1.00 mM en un buffer fosfatos pH 7) con un GCPE/MIP por AdSV, 20 min de tiempo de carga a 60 rpm. a) Cronoamperograma (en sentido de reducción) a un sobrepotencial de -800 mV P; b) DPV (en sentido anódico), paso de potencial 4.00 mV; amplitud de potencial, 50.0 mV; ancho de pulso, 200 ms; duración de pulso, 50.0 ms. En un segmento de 0.20 V a -0.20 V.

4.2.6 Activación del sensor electroquímico GCPE/MIP y empleando CV

La activación del sensor electroquímico GCPE/MIP se realizó con el objetivo de maximizar los sitios activos disponibles sobre la superficie del sensor electroquímico, favoreciendo la transferencia de carga y, en consecuencia, mejora la respuesta electroquímica y la sensibilidad en la determinación de CAP.

Para ello, empleando una solución tampón fosfato a pH 7, se realizaron barridos de potencial por voltamperometría cíclica, efectuando un total de 8 ciclos (Figura 33).

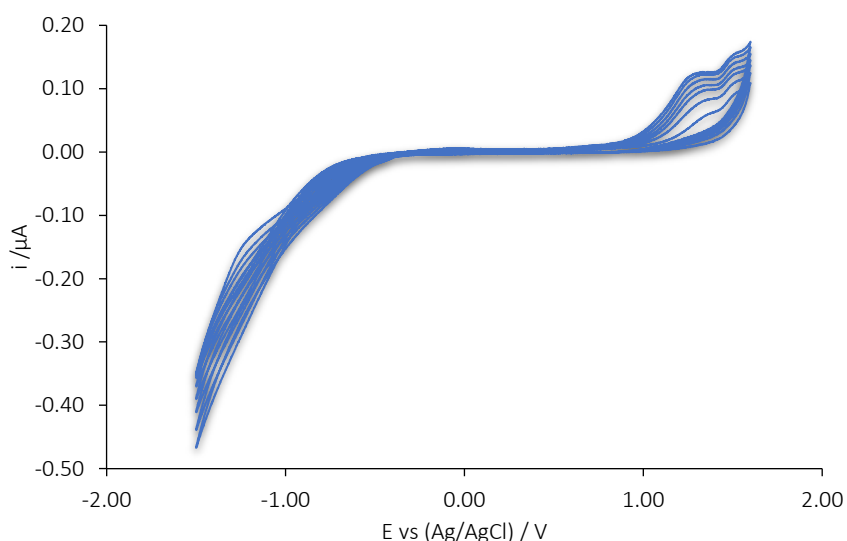


Figura 33 CVs para la activación del sensor electroquímico GCPE (8 ciclos) en una solución buffer fosfatos 10.0 mM a pH=7. Velocidad de barrido 100 mV s^{-1} (desde -1.50 a 1.50 V s^{-1}).

Con la metodología propuesta, basada en el uso de técnicas electroquímicas secuenciales, se evaluó la influencia de la activación del sensor GCPE/MIP sobre la señal electroquímica para la determinación indirecta de CAP.

En la Figura 34 se muestran los voltamperogramas obtenidos para el sensor GCPE/MIP por AdSV y el uso de técnicas electroquímicas sucesivas antes y después de la activación.

Los resultados demostraron que, el sensor electroquímico GCPE/MIP activado presentó una intensidad de corriente anódica mayor que el sensor GCPE/MIP sin la activación. Esto sugiere que, al activar la superficie, se reduce la resistencia a la transferencia de electrones, incrementando así la sensibilidad y la definición de los picos electroquímicos.

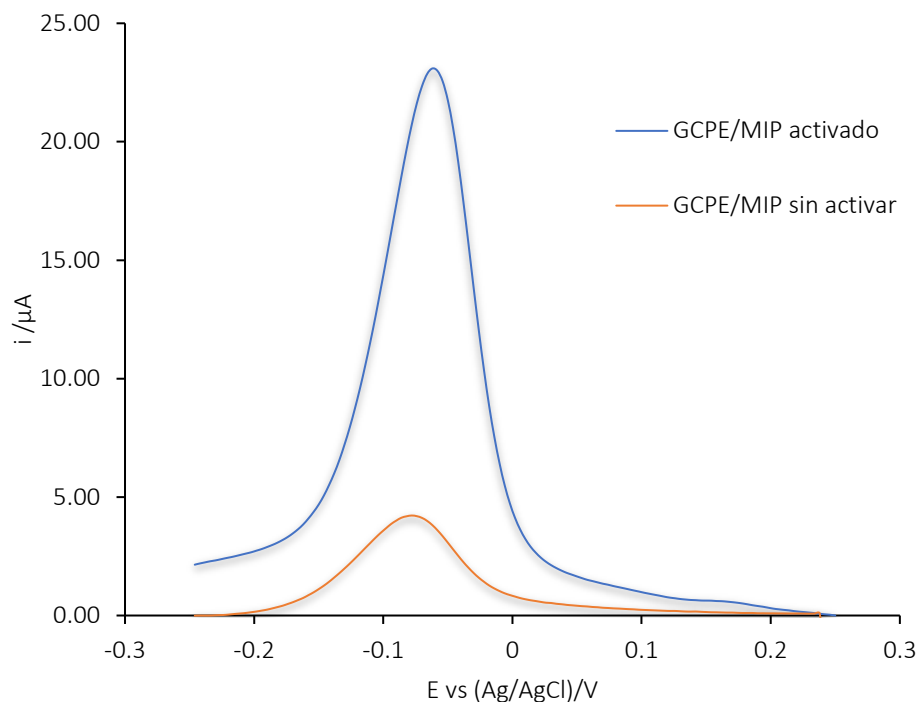


Figura 34 DPVs de un GCPE modificado con MIP activado electroquímicamente y sin activar, obtenidos en buffer de fosfatos a pH 7, después de 20 min de agitación a 60 rpm en una solución de CAP 1.00 mM, empleando una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} en sentido de oxidación.

Posteriormente, el sensor electroquímico activado y sin activar fue evaluado mediante EIS, obteniéndose los diagramas de Nyquist correspondientes a cada condición. Las mediciones se realizaron empleando como molécula sonda el $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a una concentración de 1.0 mM en KCl 0.1 M.

Los diagramas de Nyquist obtenidos se presentan en la Figura 35. El electrodo GCPE/MIP activado presentó un semicírculo de menor diámetro en comparación con el GCPE/MIP sin activar, lo que indica una menor resistencia a la transferencia de carga en la superficie del electrodo activado. Este comportamiento sugiere que el proceso de activación favorece la transferencia electrónica sobre la superficie del electrodo.

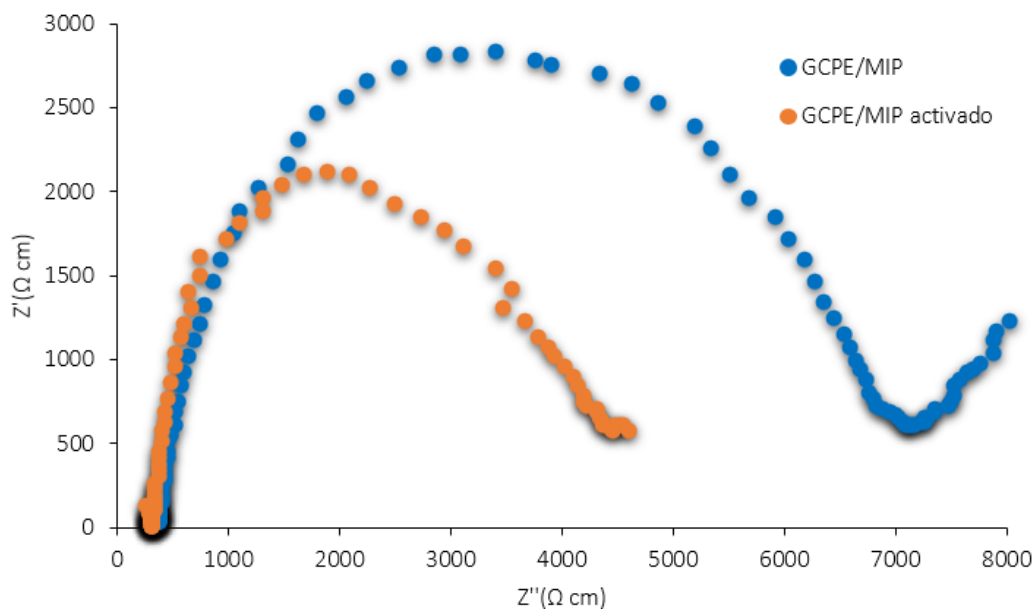


Figura 35. Diagramas de Nyquist del electrodo GCPE/MIP activado y sin activar, obtenidos en $K_3[Fe(CN)_6]$ 1.0 mM en KCl 0.1 M.

Con base a lo anterior, la metodología establecida para la determinación indirecta de CAP consistió finalmente en tres etapas principales:

Técnica de cuantificación: Voltamperometría de redisolución adsorptiva (AdSV)

- 1) **Activación electroquímica:** Se realizan barridos de potencial empleando CV en un buffer fosfatos pH 7 con un total de 8 ciclos.
- 2) **Etapas de carga:** Se pone en contacto el sensor GCPE/MIP en una solución de CAP a una concentración conocida durante un tiempo y velocidad establecidas. Esto para promover la interacción entre MIP y CAP y realizar una preconcentración sobre la superficie del electrodo.
- 3) **Etapas de redisolución:** Posteriormente, el sensor electroquímico cargado, se sumerge en un medio blanco (Buffer fosfatos pH=6), junto con el electrodo de referencia (Ag/AgCl) y auxiliar (barra de grafito) para iniciar la determinación de CAP empleando las técnicas electroquímicas sucesivas.

4.2.7 Optimización en la síntesis de MIP empleando Simplex Centroide

Mediante un diseño Simplex Centroide, se realizó la optimización de tres variables críticas en la síntesis del MIP (cantidad de plantilla, monómeros funcionales y entrecruzante). Para cada experimento se varió el porcentaje en la mezcla de pirrol y MAA desde un 20.00 a un 80.00 %. Una vez sintetizados los diez MIP, cada uno se empleó para la preparación de un GCPE/MIP, el cual fue utilizado en la metodología propuesta para la determinación indirecta de CAP. La variable de respuesta considerada fue la i_a . Las condiciones experimentales empleadas fueron: CAP de 1 mM, tiempo de carga de 10 min y velocidad de agitación de 60 rpm.

En la Tabla 15 se muestra la matriz decodificada obtenida en el Diseño Simplex Centroide, así como los valores de i_a para cada experimento, obteniendo en todos los casos % RSD inferiores al 10.00 %.

Tabla 15 Matriz decodificada para el diseño Simplex Centroide en la optimización de MIP.

No.	Plantilla	Monómeros	Entrecruzante	Relación molar	I (μ A)	Rendimiento (%)	% RSD
1	1.50	4.80:1.20	20.00	1:4:13	115.18	69.56	4.04
2	0.50	0.80:3.20	20.00	1:8:40	17.13	64.74	3.76
3	0.50	4.80:1.20	50.00	1:12:100	55.43	61.56	9.99
4	1.00	2.50:2.50	20.00	1:5:20	32.52	43.11	8.07
5	1.00	4.80:1.20	38.00	1:6:38	33.73	41.15	6.34
6	0.50	2.50:2.50	38.00	1:10:76	69.86	60.54	2.07
7	0.83	3.20:2.13	32.00	1:6:38	98.56	50.29	8.33
8	1.17	3.97:1.70	26.00	1:5:22	86.87	72.60	2.35
9	0.67	1.87:2.80	26.00	1:7:39	66.63	71.32	7.48
10	0.67	3.97:1.70	44.00	1:8:66	53.60	69.73	5.69

De acuerdo a lo observado en el diseño Simplex Centroide, cuando se utilizaron proporciones de entrecruzante cinco veces mayor a la cantidad de plantilla, se observó una disminución en la intensidad de corriente anódica, sugiriendo la formación de microporos en la síntesis del polímero, lo cual, dificultaría la interacción entre el analito y los monómeros

funcionales. Por otra parte, se observó que aquellos experimentos con una proporción de pirrol al 80.00 % y MAA al 20.00 %, mostraron un aumento en la intensidad de corriente anódica, lo cual, se explica por las interacciones tipo $\pi - \pi$ que se da entre el pirrol y la plantilla CAP.

La evaluación de los datos obtenidos mediante el diseño experimental se realizó utilizando el software Minitab, el cual permitió realizar el análisis estadístico de los resultados mediante la tabla de análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 16). En esta tabla se observa que el valor de p asociado a la regresión es menor que 0.05, lo que indica que el modelo es estadísticamente significativo con un nivel de confianza arriba del 95 %. Este resultado demuestra que existe una relación estadísticamente significativa entre las proporciones de los componentes evaluados (plantilla, monómeros funcionales y agente entrecruzante) y la respuesta experimental.

Tabla 16 ANOVA del diseño Simplex Centroide en la optimización de MIP.

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	6.0	8229.31	8229.30	1371.60	9.75	0.044
Cuadrático	3.0	3269.28	3673.40	1224.50	8.70	0.054
A*B	1.0	62.67	682.30	682.30	4.85	0.115
A*C	1.0	753.15	1918.80	1918.80	13.64	0.034
B*C	1.0	2453.45	688.10	688.10	4.89	0.114
Cúbico especial	1.0	2183.03	2183.00	2183.00	15.51	0.029
A*B*C	1.0	2183.03	2183.00	2183.00	15.51	0.029
Error residual	3.0	422.15	422.10	140.7		
Total	9.0	8651.46				

Asimismo, el análisis de varianza mostró que los datos experimentales se ajustan adecuadamente a un modelo cúbico especial, ya que este presentó un valor de p de 0.029, indicando que dicho modelo describe de manera significativa el comportamiento de la respuesta dentro de la región experimental evaluada. Además, se obtuvieron valores del

coeficiente de correlación (r) y del coeficiente de determinación (r^2) de 88.35 % y 95.12 %, respectivamente. Estos resultados evidencian una alta correlación entre los valores experimentales y los predichos por el modelo, así como una adecuada capacidad explicativa, ya que el 88.35 % de la variabilidad de la respuesta es explicado por las variables incluidas en el diseño experimental.

La ecuación de superficie de respuesta obtenida a partir del modelo cúbico especial se presenta en la Ecuación 8. En ella se consideran las tres variables de entrada: plantilla (A), monómeros (B) y entrecruzante (C). Los coeficientes de regresión estimados permiten evaluar la contribución de cada componente y de sus interacciones sobre la respuesta, expresada como la intensidad de corriente (i , μA).

$$i (\mu\text{A}) = 117.0A + 19.0B + 50.20C - 127.1(A * B) - 213.2(A * C) + 127.6(B * C) + 1499(A * B * C)$$

Ecuación 8

De acuerdo con los coeficientes del modelo, la mezcla A*B*C presenta la mayor contribución a la respuesta i , indicando que la respuesta del sistema está fuertemente influenciada por los tres componentes. Esto evidencia que la composición óptima del MIP no depende únicamente de la cantidad de cada componente por separado, sino del equilibrio entre las proporciones de la plantilla, los monómeros y el agente entrecruzante, lo que justifica el empleo de un diseño de mezclas tipo Simplex-Centroide para identificar la formulación que maximiza la respuesta electroquímica.

Posteriormente, a partir de la ecuación de superficie obtenida por el modelo, se generaron la gráfica de superficie y el diagrama de contorno, mostrados en la Figura 36. Ambos gráficos mostraron una respuesta máxima para los niveles 1A, 0B y 0C, correspondientes a 1.5 mmol de plantilla, 4.8 mmol de pirrol, 1.2 mmol de MAA y 20 mmol de entrecruzante, con una respuesta teórica de 115.34 μA .

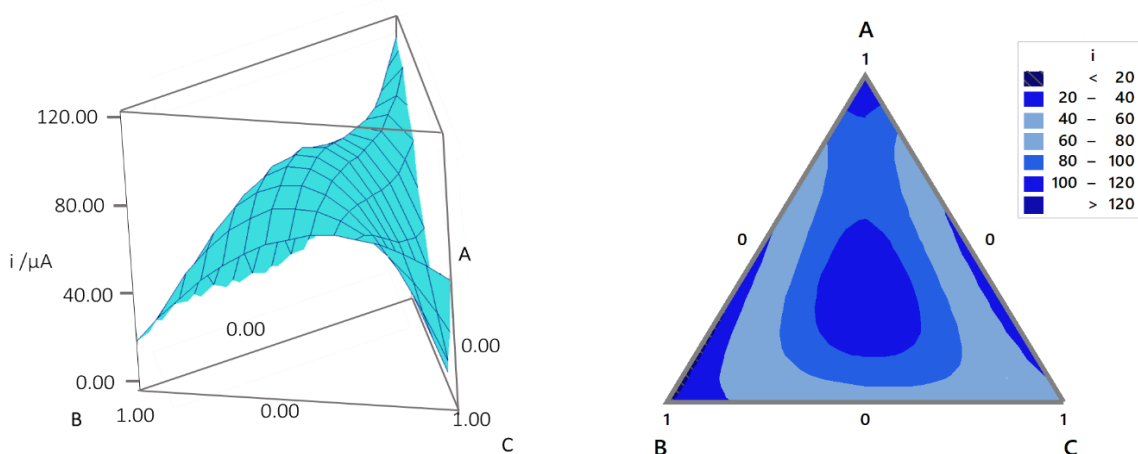


Figura 36 Gráfico tridimensional de superficie de respuesta (izquierda) y gráfico de contornos (derecha) obtenidos mediante la ecuación de superficie de respuesta para un diseño Simplex Centroide.

Finalmente, la respuesta teórica predicha por el modelo (115.34 μA) y la respuesta experimental (115.18 μA , $S_x=0.93$, $n=3$) se compararon mediante una prueba t de Student (Ecuación 9).

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\mu - x|}{s_x} \sqrt{n} \quad \text{Ecuación 9}$$

Para un nivel de confianza del 95 %, un valor crítico de $t_{\text{crit}}=4.30$, se obtuvo un valor de $t_{\text{exp}}=0.298$. Debido a que $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$, se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta teórica y la respuesta experimental obtenida.

4.2.8 Caracterización del NIP y MIP óptimo

4.2.8.1 Caracterización química: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Inicialmente se obtuvieron los espectros de FTIR correspondientes a ambos monómeros funcionales (pirrol y MAA), así como el entrecruzante, con la finalidad de identificar las bandas características para cada reactivo involucrado en la síntesis y posteriormente compararlos con los espectros del MIP.

En la Figura 37 se muestra el espectro FTIR correspondiente al pirrol. Se observa una banda intensa alrededor de 3382 cm^{-1} , atribuida al estiramiento del enlace N-H. Posteriormente, en la región cercana a 1671 cm^{-1} , se identifica la señal asociada al

estiramiento del enlace C=C del anillo aromático. Finalmente, a una longitud de onda de 1045 cm^{-1} , se aprecia una banda correspondiente al estiramiento del enlace C-N (Ibrahim *et al.*, 2013). La Tabla 17 presenta una comparación entre las longitudes de onda de las bandas características del pirrol reportadas en la literatura y las obtenidas en este trabajo.

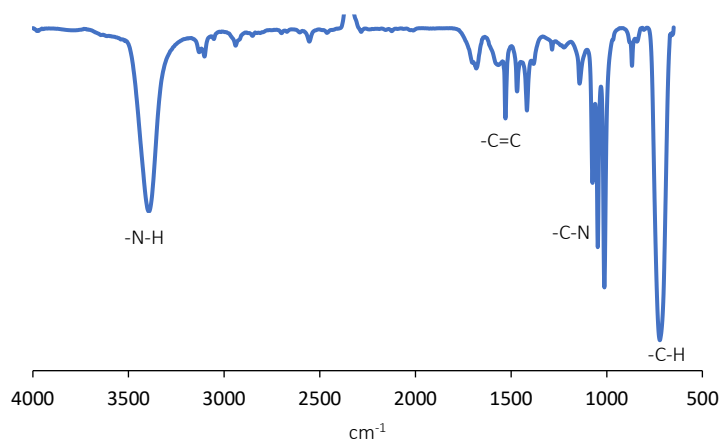


Figura 37 Espectro de FTIR para el pirrol.

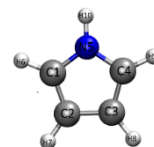


Tabla 17 Longitudes de onda para las bandas características de pirrol.

Radical	Literatura (cm^{-1})	Este trabajo (cm^{-1})
N-H	3500-3300	3382
C=C	1700-1500	1671
C-N	1200-1025	1045
C-H	860-680	710

Para el espectro relacionado al MAA (Figura 38) se aprecia una banda ancha alrededor de 3040 cm^{-1} atribuida al enlace O-H. Posteriormente, en 1705 cm^{-1} una banda intensa relacionada al doble enlace C=O. Finalmente se observa la señal para el enlace C=C alrededor de 1623 cm^{-1} (Gupta y Shivakumar, 2012). La Tabla 18 presenta una comparación entre las longitudes de onda de las bandas características del MAA reportadas en la literatura y las obtenidas en este trabajo.

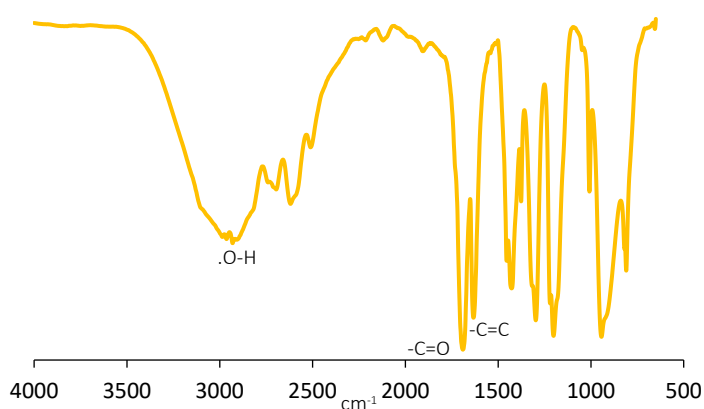


Figura 38 Espectro de FTIR para el MAA.

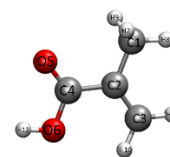


Tabla 18 Longitudes de onda para las bandas características de MAA.

Radical	Literatura (cm^{-1})	Este trabajo (cm^{-1})
-OH	3352	3040
-C=O	1727-1738	1705
C=C	1636	1623

Finalmente, en la Figura 39 se muestra el espectro IR correspondiente al agente entrecruzante (EGDMA), en donde las dos señales de relevancia para esta molécula se asocian al enlace C=O mostrada alrededor 1729 cm^{-1} y la señal C=C presente a 1600 cm^{-1} correspondientes al grupo vinilo (Bajpai y Jhariya, 2015). La Tabla 19 presenta una comparación entre las longitudes de onda de las bandas características del EGDMA reportadas en la literatura y las obtenidas en este trabajo.

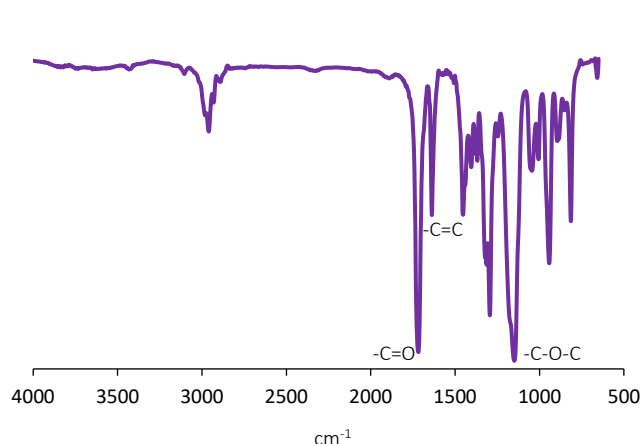


Figura 39 Espectro de FTIR para el EGDMA.

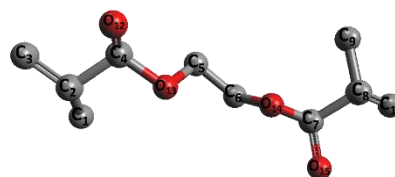


Tabla 19 Longitudes de onda para las bandas características de EGDMA.

Radical	Literatura (cm^{-1})	Este trabajo (cm^{-1})
-C=O	1730-1725	1729
-C=C	1546	1600
-C-O-C	1147	1144

Una vez realizada la caracterización química mediante FTIR de ambos monómeros funcionales, y del agente entrecruzante, se llevó a cabo la caracterización de los polímeros MIP y NIP óptimos, con la finalidad de comparar las bandas observadas para los dos monómeros funcionales con aquellas presentes en los polímeros obtenidos.

La Figura 40 muestra los espectros de FTIR correspondientes al NIP y MIP. En ambos materiales se identificaron las bandas características asociadas con los grupos funcionales de los monómeros empleados, pirrol y MAA. En comparación con los monómeros libres, se observaron desplazamientos de algunas bandas, acompañados de una disminución en su intensidad. Estas modificaciones se atribuyen a cambios en el entorno químico de los grupos funcionales como consecuencia de su incorporación a la red polimérica. Por otro lado, al comparar ambos materiales, el MIP presenta modificaciones en la intensidad relativa de algunas bandas respecto al NIP. Estas diferencias pueden estar relacionadas con cambios en

el entorno químico y en la organización de los grupos funcionales originados por la presencia de la molécula plantilla durante la síntesis.

Una de las regiones de interés se localiza entre 3600 y 3000 cm^{-1} , donde se observan contribuciones correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O–H y N–H. La señal ancha en alrededor de 3600 cm^{-1} corresponde al estiramiento del grupo O–H de los grupos carboxílicos provenientes del MAA, mientras que alrededor de 3300 cm^{-1} se relacionan con el estiramiento N–H del pirrol. Asimismo, en la región de 3000 cm^{-1} se observan las bandas correspondientes al estiramiento de los enlaces C–H alifáticos, asociados principalmente con los grupos CH_3 presentes en la estructura de la matriz polimérica.

En aproximadamente 1719 cm^{-1} se identifica una banda intensidad correspondiente al estiramiento C=O asociada a los grupos carboxilo presentes en el MAA y el agente entrecruzante EGDMA. Por otra parte, la vibración del enlace C–N, correspondiente al anillo aromático del pirrol, se identificó en la región de 1253 cm^{-1} , mientras que la banda asociada al enlace C–O–C del EGDMA apareció alrededor de 1146 cm^{-1} .

Por último, en los espectros tanto de MIP y NIP desaparece la banda correspondiente al enlace C=C ($1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$), a diferencia de lo observado en el espectro del EGDMA. La ausencia de esta banda en ambos monómeros se atribuye a la ruptura del grupo vinilo presente en el agente entrecruzante, para la formación de radicales libres y el inicio de la polimerización.

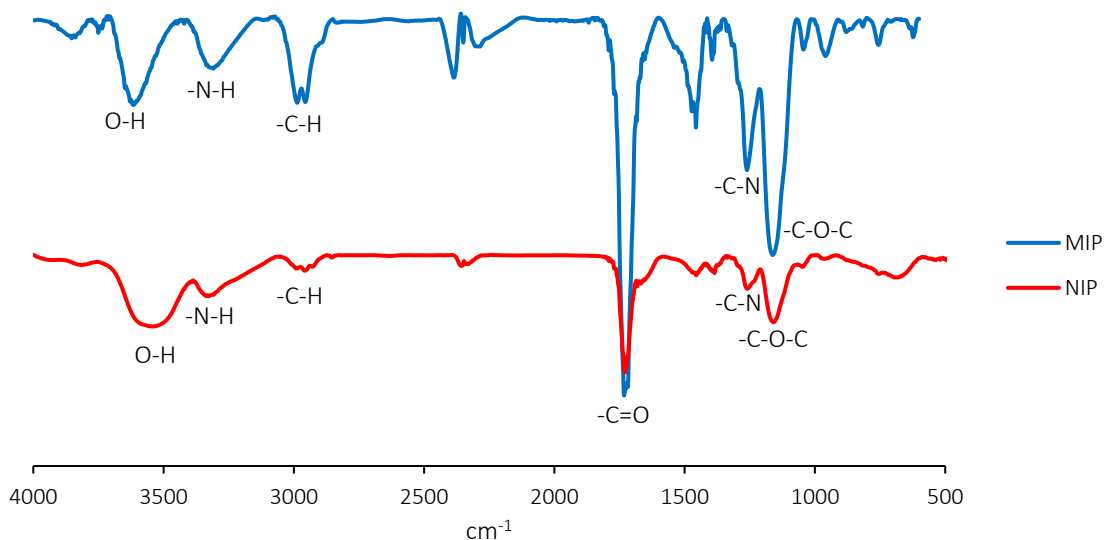


Figura 40 Espectros FTIR de MIP y NIP óptimo.

4.2.8.2 SEM: Caracterización morfológica y tamaño de partícula

Con la finalidad de conocer las características morfológicas de nuestro material polimérico sin y con la plantilla presente (NIP y MIP, respectivamente) se obtuvieron las microscopias mediante SEM, estas fueron tomadas con 5,000 aumentos empleando un voltaje de 15.0kV.

De acuerdo con las imágenes mostradas en la Figura 41a y 41b, no se observaron cambios morfológicos entre los materiales. En ambos casos se aprecia una estructura esférica. Estos resultados sugieren que la presencia de la molécula plantilla durante la síntesis no modificó de manera apreciable la forma de las partículas.

Otro parámetro importante dentro de la caracterización morfológica de los materiales es el tamaño de partícula, ya que, este se encuentra directamente relacionado con el tipo de polimerización empleado durante la síntesis. En este trabajo, tanto MIP como NIP fueron obtenidos mediante polimerización por radicales libres. De acuerdo con la bibliografía, este tipo de reacción permite obtener partículas con diámetros en la escala micrométrica e incluso nanométrica, lo cual mejora la relación superficie-volumen de los polímeros, lo que resulta en una mayor superficie de unión para el analito objetivo.

Para determinar el tamaño de partícula de ambos materiales, se empleó el programa ImageJ, obteniendo el promedio ($n=50$) del diámetro de las partículas observadas para ambas imágenes SEM de NIP y MIP. Los resultados mostraron un tamaño de partícula de 248 nm para el NIP y 481 nm para el MIP. De acuerdo, con los resultados ambos materiales se encuentran en la escala submicrométrica (100-1000 nm) reportada para sistemas sintetizados mediante polimerización por radicales.

Además, se observó un incremento en el tamaño de partícula del MIP con respecto al NIP, lo cual se atribuye a la incorporación de la molécula plantilla durante el proceso de polimerización. La presencia de la molécula de CAP durante la formación de la red polimérica favorecer cambios en el crecimiento y la organización de las cadenas del polímero, dando lugar a partículas de mayor tamaño (De Middeleer *et al.*, 2016).

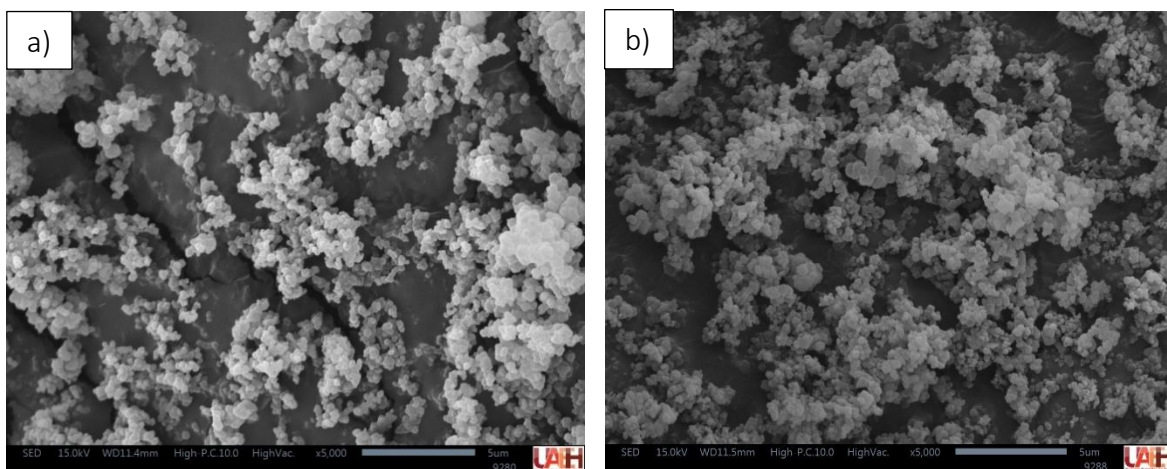


Figura 41 a) SEM obtenido para para NIP óptimo utilizando como monómeros; MAA y pirrol. b) SEM obtenido para para MIP óptimo utilizando como monómeros: MAA y pirrol.

4.2.8.3 Análisis BET: Determinación del área superficial y el tamaño de poro

La caracterización superficial de los materiales se llevó a cabo mediante la determinación del área superficial, el volumen y diámetro de poro, con el objetivo de conocer la superficie útil y la porosidad del material, ya que estos están relacionados con la interacción entre el MIP y la molécula plantilla. Para ello, se empleó un análisis BET, basado en la adsorción de nitrógeno sobre la superficie del material, obteniendo así las isothermas de adsorción mostrados en la Figura 42.

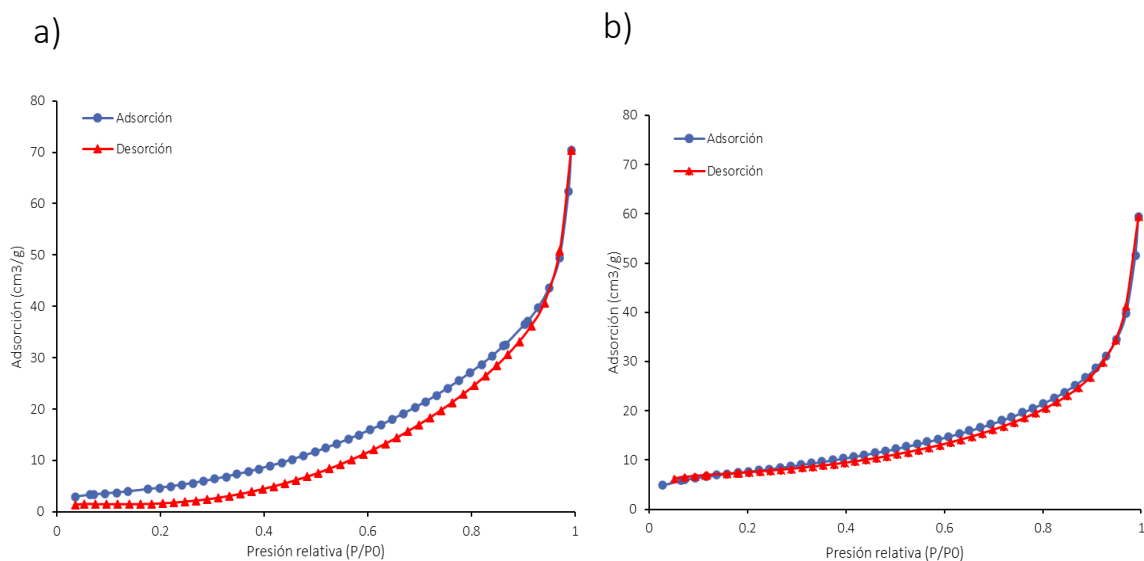


Figura 42 Isotermas BET de adsorción y desorción para a) NIP y b) MIP.

A partir de estas isotermas fue posible calcular los parámetros reportados en la Tabla 20. Los resultados mostraron que ambos materiales presentan diámetros de poro comprendidos entre 2 y 50 nm, por lo que se clasifican como materiales mesoporosos (Tominaga *et al.*, 2012).

Tabla 20 Parámetros BET obtenidos para NIP y MIP.

Parámetros	NIP	MIP
Área superficial BET	18.64 m ² g ⁻¹	27.85 m ² g ⁻¹
Volumen de poro	0.11 cm ³ g ⁻¹	0.09 cm ³ g ⁻¹
Diámetro de promedio de poro	10.47 nm	11.69 nm

De acuerdo con los valores reportados en la Tabla 20, el MIP presentó un incremento en el área superficial y el diámetro promedio de poro con respecto al NIP, lo que sugiere una mayor superficie para la interacción con la plantilla. Este resultado justifica la formación de cavidades específicas hacia el analito (De Middeleer *et al.*, 2016).

Por otro lado, se observó una disminución en el volumen total del poro del MIP respecto al NIP, lo cual se relaciona con modificaciones en la red polimérica debido a la impresión de la plantilla, dando lugar a una estructura más organizada.

4.2.8.4 Caracterización térmica: Análisis termogravimétrico (TGA)

La caracterización térmica del material polimérico se realizó con el objetivo de evaluar la estabilidad térmica y determinar la temperatura de degradación de los materiales sintetizados. Para ello, se empleó un análisis termogravimétrico (TGA), utilizando una rampa de calentamiento desde 25 a 600 °C.

La Figura 43 muestra las curvas termogravimétricas correspondientes al NIP y MIP. En el caso del MIP, la pérdida de masa (92.7%) se produce en el intervalo de 230 a 425 °C en una sola etapa; esta pérdida se atribuye principalmente a la degradación progresiva de la red polimérica, asociada principalmente con la descomposición del agente entrecruzante y los monómeros (Ansari y Ghorbani, 2017).

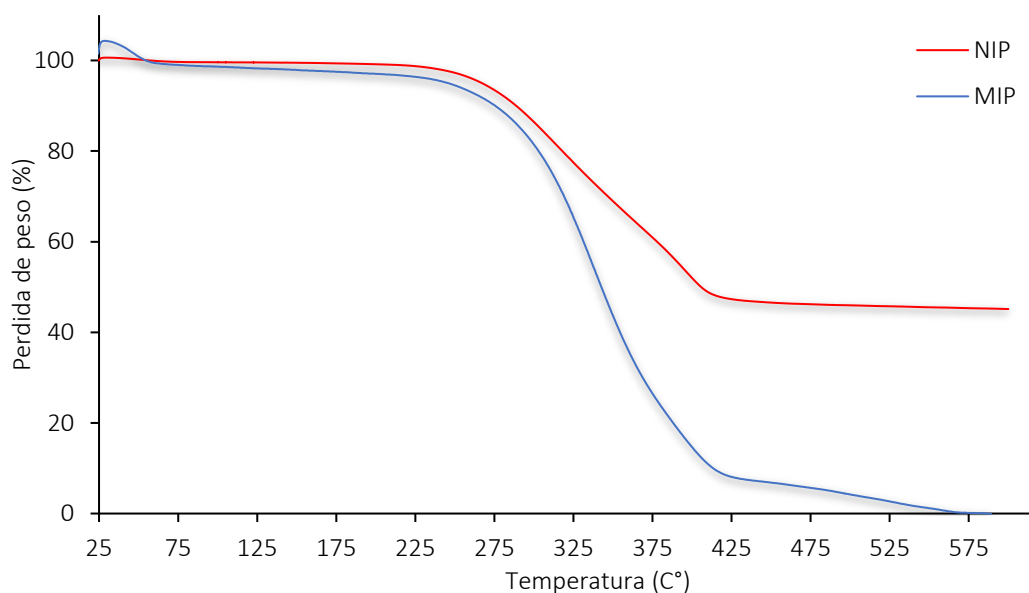


Figura 43 Curvas termogravimétricas para NIP y MIP con una rampa de temperatura desde 25°C a 600°C.

Por otra parte, el NIP se observa una pérdida de masa del 51.52 % en el intervalo de 270 a 400 °C, atribuida principalmente a la descomposición del agente entrecruzante. Posteriormente, a partir de 400 °C, la curva presenta una segunda región de estabilidad

térmica que se mantiene hasta los 600 °C. Estos resultados indican que el NIP presenta una mayor estabilidad térmica que el MIP.

Este comportamiento podría atribuirse a un mayor grado de oxidación del pirrol durante la síntesis en ausencia de la molécula plantilla, lo que favorecería la formación de oligómeros de pirrol (He *et al.*, 2025) y una red polimérica más densa y térmicamente resistente (Figura 44). En contraste, la presencia de la molécula plantilla durante la síntesis del MIP podría limitar la oxidación del pirrol, favoreciendo la formación de una red polimérica de menor densidad y, por consiguiente, con menor estabilidad térmica.



Figura 44 Síntesis de NIP (izquierda) y MIP (derecha) mostrando el grado de oxidación.

Por lo tanto, el análisis TGA permitió establecer diferencias claras entre los materiales sintetizados con y sin plantilla, evidenciando el efecto de la impresión molecular sobre la estabilidad térmica, la organización estructural y las propiedades del polímero basado en pirrol.

4.2.8.5 Caracterización electroquímica: Técnicas electroquímicas sucesivas

La caracterización electroquímica de los electrodos modificados con NIP y MIP se realizó empleando la metodología propuesta en la sección 4.2.5; basada en AdSV con el uso de técnicas electroquímicas sucesivas.

En la Figura 45 se muestran los voltamperogramas obtenidos para el GCPE sin modificar y los GCPE modificados con NIP y MIP. El GCPE sin modificar fue evaluado en buffer de fosfatos a pH 6, mientras que los electrodos modificados con NIP y MIP fueron evaluados en una solución de CAP 1 mM preparada en el mismo electrolito.

El GCPE sin modificar no presentó señales de oxidación definidas en la ventana de potencial estudiada, lo que indica la ausencia de procesos electroquímicos atribuibles al electrolito soporte o a especies interferentes presentes en las condiciones experimentales. Por otra parte, los electrodos modificados con NIP y MIP presentaron un pico anódico alrededor de -50.00 mV, correspondiente a la respuesta electroquímica de la oxidación del derivado de hidroxilamina resultado de la reducción del CAP. retenido en la superficie del electrodo. El GCPE modificado con MIP presentó una intensidad de corriente anódica de $115.16 \mu\text{A}$, mientras que el GCPE modificado con NIP presentó una corriente de $62.54 \mu\text{A}$. La respuesta obtenida con el MIP, fue 1.84 veces mayor que la obtenida con el NIP, lo que justifica la presencia de cavidades de reconocimiento específicas generadas durante el proceso de impresión, las cuales favorecen la retención y preconcentración de CAP en la superficie del electrodo.

En contraste, el NIP, al no haber sido sintetizado en presencia de la molécula plantilla, carece de las cavidades de reconocimiento específicas. Por lo tanto, aunque puede existir una interacción no específica entre el CAP y la matriz polimérica, esta es menor en comparación con la observada para el MIP. En conjunto, estos resultados evidencian el efecto de la impresión molecular sobre la capacidad de retención de CAP y, consecuentemente, sobre la respuesta electroquímica del electrodo modificado.

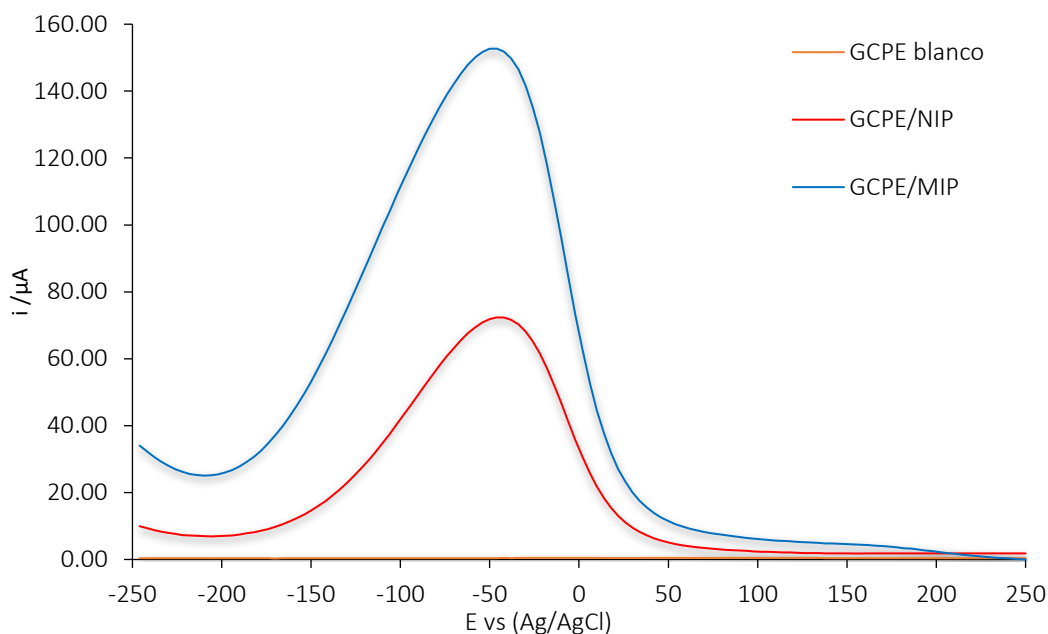


Figura 45 DPVs obtenidos mediante técnicas electroquímicas sucesivas para un GCPE modificado al 10.00 % con NIP y 10.00 % con MIP a una concentración de 1 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6 por 10 minutos a 60 rpm.

4.2.9 Optimización de parámetro críticos dentro de la metodología propuesta

4.2.9.1 Optimización del porcentaje de MIP en la pasta composite

Se optimizó el porcentaje de MIP presente en el GCPE probando porcentajes de modificante desde 0 % a 25.00 % en intervalos de 5.00 %, con la finalidad de identificar la proporción que maximiza la señal de respuesta hacia el analito.

En la Figura 46 se muestran las intensidades de corriente anódica obtenidas para los diferentes porcentajes de MIP presentes en el GCPE. En ausencia del material polimérico se observa una corriente anódica mayor que a un porcentaje de 5.00 %, debido a que el MIP es un material no conductor, lo cual dificulta la transferencia de electrones en el sensor electroquímico. Sin embargo, a partir de una proporción del 10.00 % de modificante se observa un aumento en la intensidad de corriente anódica, ya que existe una mayor cantidad de MIP presente en la superficie, lo que incrementa la cantidad de CAP adsorbido en la etapa de carga, mejorando la intensidad de la corriente anódica.

La mayor intensidad de corriente anódica se obtuvo a una proporción del 20.00 % de MIP, después de este porcentaje (25 % de MIP) se observó una disminución de la intensidad de

corriente, lo cual puede atribuirse a que el material polimérico presenta baja conductividad eléctrica. Por tanto, una mayor proporción de MIP en la pasta puede dificultar la transferencia de carga en la superficie del electrodo de trabajo. Asimismo, el exceso de MIP afecta la homogeneidad de la pasta.

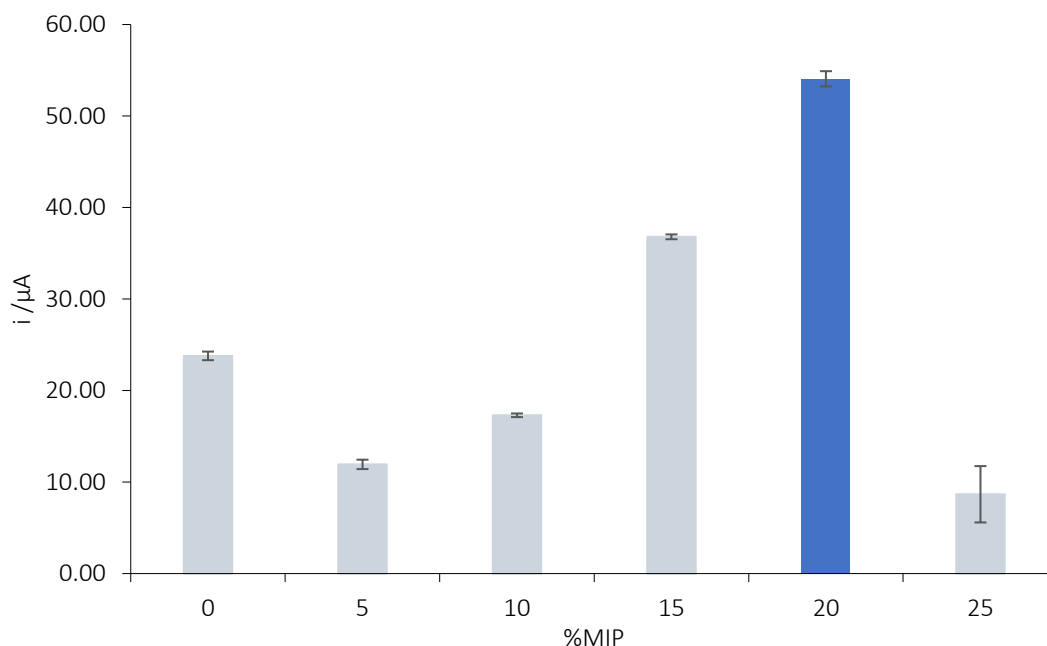


Figura 46 Intensidades de corriente anódica (i_a) obtenidas para proporciones de MIP desde 0, 5.00, 10.00, 15.00, 20.00 y 25.00 % presente en el GCPE empleando AdSV en la determinación indirecta de CAP. **Condiciones experimentales:** 0.05 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6, velocidad de agitación 60 rpm, tiempo de carga 5 min, pH de carga 6.

4.2.9.2 Optimización del pH en la etapa de carga

Con base en los valores de pKa reportados para los monómeros funcionales y el CAP, se evaluó la influencia del pH en la etapa de carga, seleccionando valores por debajo y por encima de dichos pKa (pH=3,4, 5, 6 y 7) con el objetivo de estudiar las diferentes formas de ionización de las especies involucradas y evaluar la interacción entre el CAP en solución y los monómeros funcionales (pirrol y MAA) presentes en el MIP.

En la Figura 47 se muestran los voltamperogramas obtenidos para los diferentes valores de pH utilizados en la etapa de carga. El valor óptimo se identificó en pH 6 (inserto de Figura 47), lo cual indica que la adsorción del CAP se ve favorecida en estas condiciones. Este valor se encuentra próximo a los valores de pKa tanto del MAA como del CAP, lo que sugiere la coexistencia de formas neutras y parcialmente cargadas de ambas moléculas. Esta

combinación favorece las interacciones intermoleculares, como puentes de hidrógeno, mejorando la afinidad entre el analito y los sitios de reconocimiento del MIP durante la etapa de preconcentración.

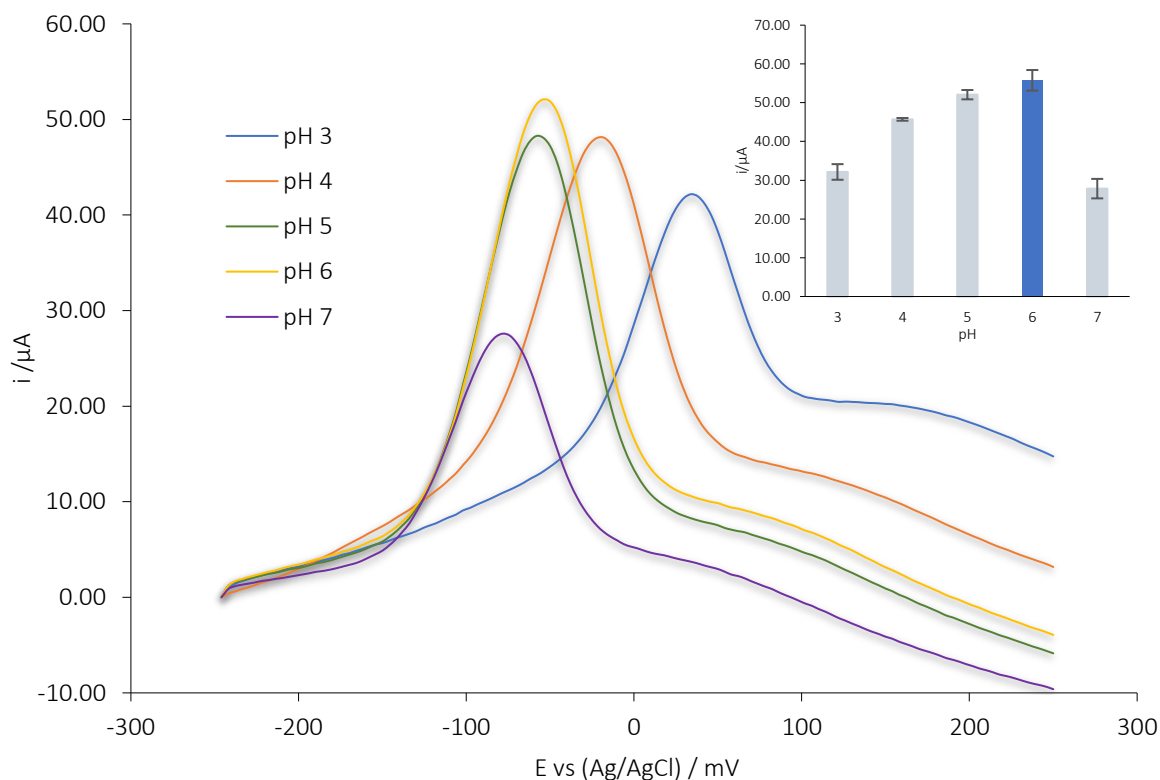


Figura 47 DPVs obtenidos en la optimización del pH en la etapa de carga (3,4,5,6 y 7) para la AdSV en la determinación de CAP utilizando un GCPE modificado con MIP **Condiciones experimentales:** 0.05 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6, 10% de MIP en GCPE, velocidad de agitación 60 rpm, tiempo de carga 5 min. El inserto muestra la intensidad de corriente anódica obtenida para cada valor de pH evaluado.

4.2.9.3 Optimización del pH del electrolito soporte

Empleando el mismo intervalo de pH de la sección anterior, se realizó la optimización univariable para el pH del medio en la determinación indirecta de CAP, dado que este parámetro está directamente relacionado con la transferencia de electrones durante la reducción-oxidación del grupo nitro presente en el CAP.

En la Figura 48 se muestran los voltamperogramas obtenidos para los diferentes valores de pH estudiados. Desde un valor de pH 3 a 6 la intensidad de corriente anódica se

incrementa progresivamente hasta alcanzar un máximo en pH 6; posteriormente, se observa una disminución en la señal.

Este comportamiento electroquímico concuerda con el intervalo de estabilidad reportado para CAP, el cual se encuentra alrededor de pH 5.5. En este valor, la molécula se encuentra predominantemente en su forma neutra, lo que se favorece la transferencia de electrones en la reducción-oxidación del CAP, incrementando la respuesta electroquímica. Sin embargo, a valores cercanos a pH 7, la señal disminuye de manera notable, lo cual puede atribuirse al inicio de la hidrólisis del CAP, provocando la degradación de la molécula.

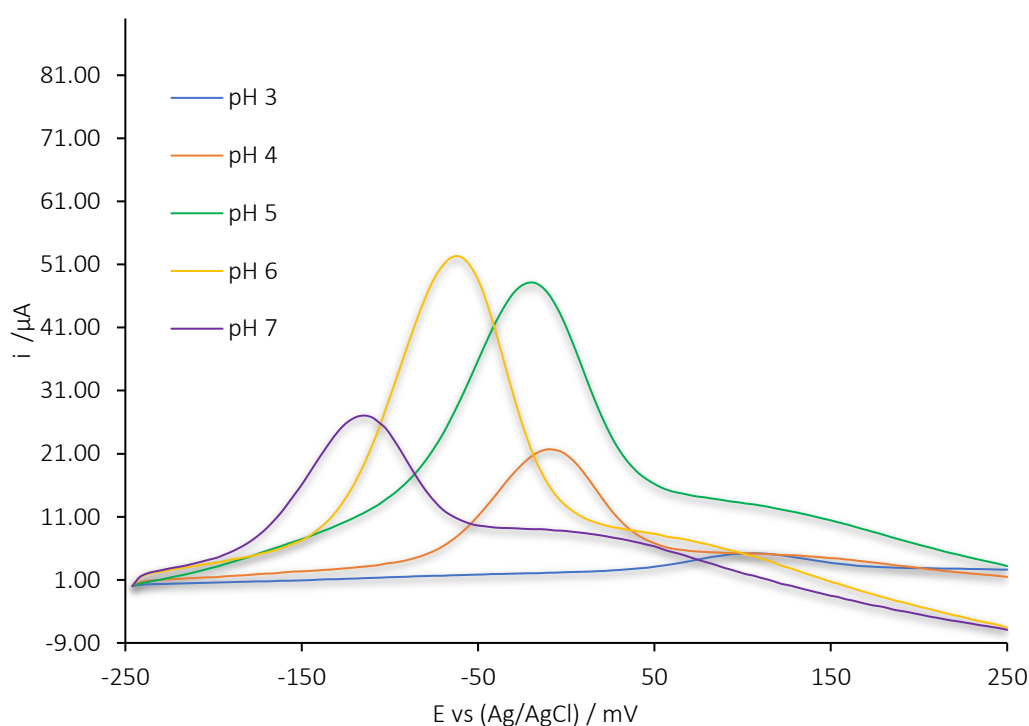


Figura 48 DPVs obtenidos en la optimización del pH en la etapa de redisolución (3,4,5,6 y 7) para la AdSV en la determinación de CAP utilizando un GCPE modificado con MIP **Condiciones experimentales:** 0.05 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6, pH de carga 6, 10% de MIP en GCPE, velocidad de agitación 60 rpm, tiempo de carga 5 min.

En la Figura 49 se muestra el gráfico del potencial en función al valor de pH, observándose una tendencia lineal con una pendiente de $-53.56 \text{ mV pH}^{-1}$. Este valor, de acuerdo con la ecuación de Nernst (Ecuación 10), indica que en el proceso de reducción-oxidación del CAP interviene el mismo número de electrones y protones, evidenciando una transferencia equimolar de ambas especies (Figura 50).

$$E = E^0 - \frac{59.20 \text{ m}}{n} \text{pH}$$

Ecuación 10

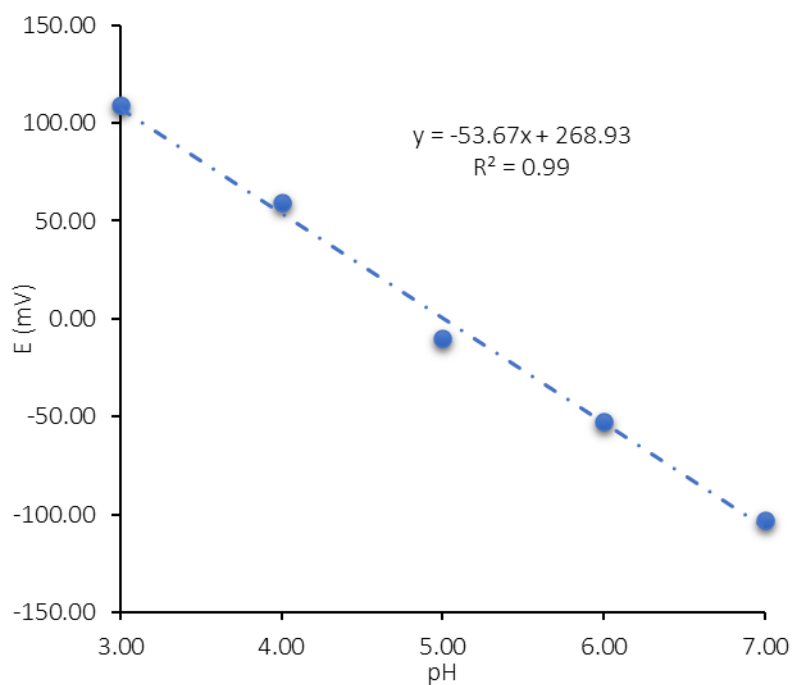


Figura 49 Relación del pH con el potencial en la etapa de redisolución para la determinación de CAP.

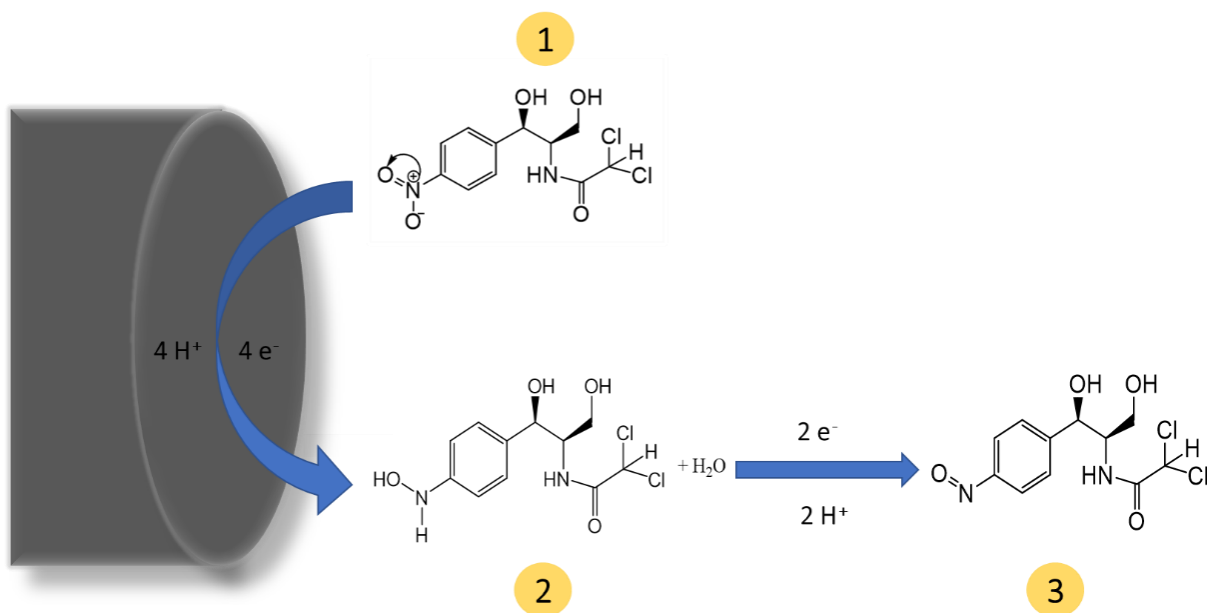


Figura 50 Mecanismo de reducción y oxidación del grupo nitro presente en la molécula de CAP.

4.2.10 Optimización de la Voltamperometría de redisolución adsortiva

4.2.10.1 Optimización del tiempo de carga

El tiempo de contacto entre el analito y el material polimérico para mejorar la interacción del CAP sobre el sensor electroquímico modificado con MIP. Se evaluaron tiempos de contacto desde un intervalo de 3 a 20 minutos.

En la Figura 51 se muestran las intensidades de corriente anódica obtenidas para los diferentes tiempos de contacto. De 5 a 10 minutos se observa un aumento en la señal electroquímica, ya que, no todas las cavidades han sido ocupadas. Posterior a los 10 minutos, se observa una ligera disminución en las i_a . Este comportamiento puede atribuirse a que los sitios de reconocimiento disponibles en el MIP se encuentran mayoritariamente ocupados por el CAP (saturación del electrodo). Por lo tanto, un incremento en el tiempo de contacto no favorece una mayor retención de CAP. En consecuencia, se seleccionó un tiempo de contacto de 10 minutos como condición óptima para la etapa de preconcentración de CAP.

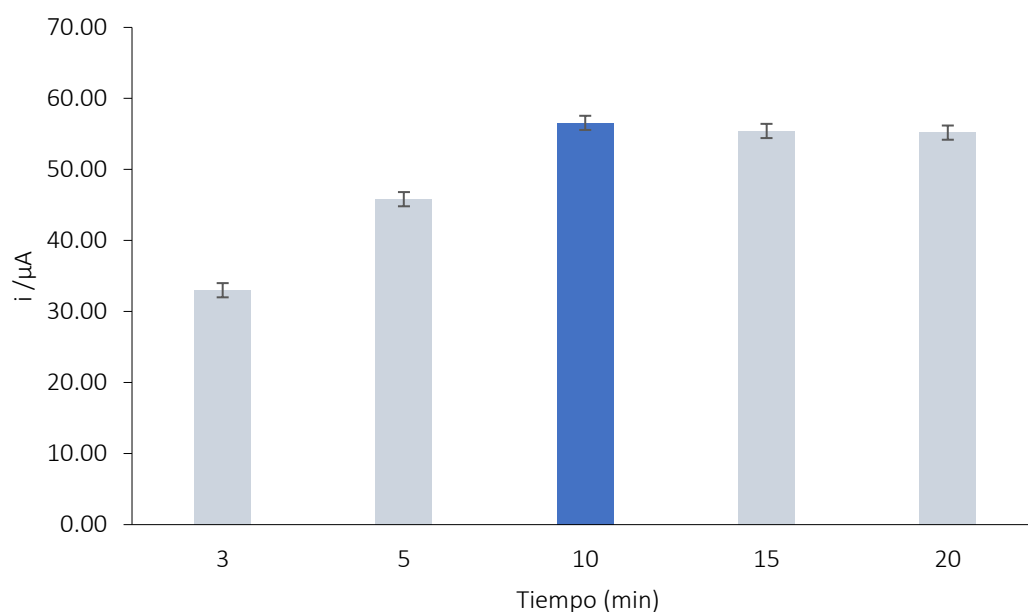


Figura 51 Intensidades de corriente anódica (i_a) obtenidas para tiempos de carga desde 3, 5, 10, 15 y 20 minutos en AdSV para la determinación indirecta de CAP. **Condiciones experimentales:** 0.05 mM de CAP, pH de carga 6, 10% de MIP en GCPE, velocidad de agitación 60 rpm, sobrepotencial de cronoamperometría: -750.0mV.

4.2.10.2 Optimización de la velocidad de agitación

Se optimizó la velocidad de agitación en la etapa de carga, para evaluar la rapidez con la que llega en CAP a la superficie del electrodo desde un intervalo de 50 a 400 rpm.

En la Figura 52 se muestran las intensidades de corriente anódica obtenidas a distintas velocidades de barrido. Observándose un máximo de intensidad de corriente anódica a 200 rpm. Posterior a esa velocidad se ve una disminución de la intensidad de corriente anódica, debido a la convección tan fuerte que no permite la correcta interacción entre el analito y el MIP.

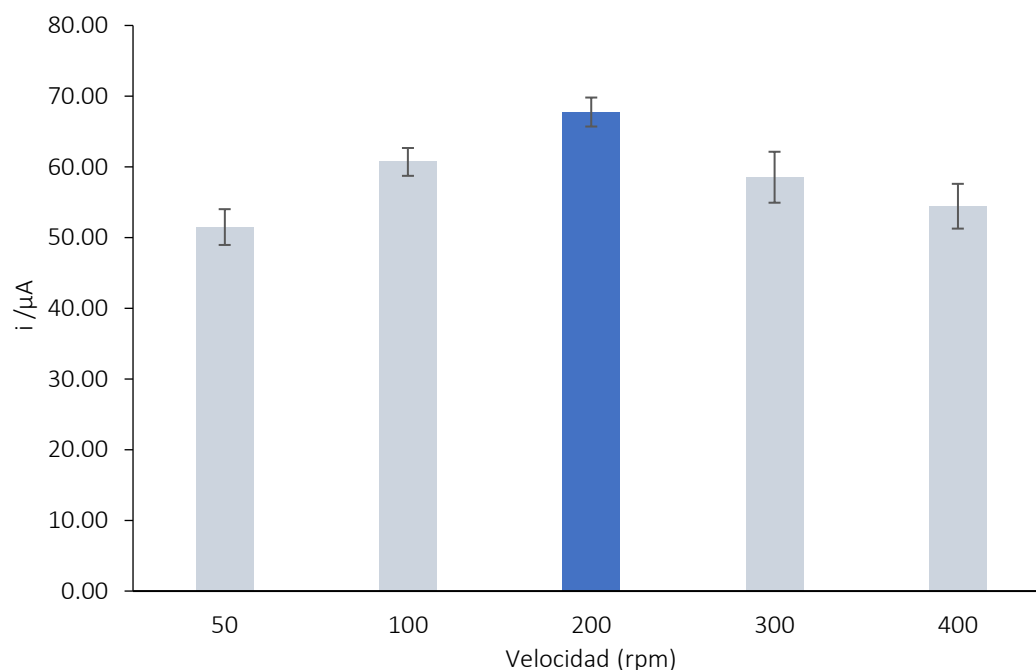


Figura 52 Intensidades de corriente anódica (i_a) obtenidas para velocidades de agitación desde 50, 100, 200, 300 y 400 rpm en AdSV para la determinación indirecta de CAP. **Condiciones experimentales:** 0.05 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6, pH de carga 6, tiempo de carga 10 min, 20% de MIP en GCPE.

4.2.10 Optimización de las técnicas electroquímicas sucesivas

4.2.10.1 Optimización de la cronoamperometría (Ventana catódica)

La optimización de la cronoamperometría se realizó probando distintos valores de sobrepotenciales desde: -700, -730, -750, -780, -800 y -850 mV considerando el potencial de reducción obtenido para CAP (-650 mV).

En la Figura 53 se muestran las intensidades de corriente anódica observadas a distintos sobrepotenciales. Entre -700 mV y -780 mV se aprecia un incremento en la intensidad de corriente anódica, porque al aplicar un potencial más negativo se favorece la reducción de una mayor cantidad de CAP. Sin embargo, a partir de -800 mV se observa una disminución en la intensidad de corriente anódica, lo cual puede atribuirse a la posible transformación de otras especies electroactivas que interfieren con el proceso de reducción del CAP.

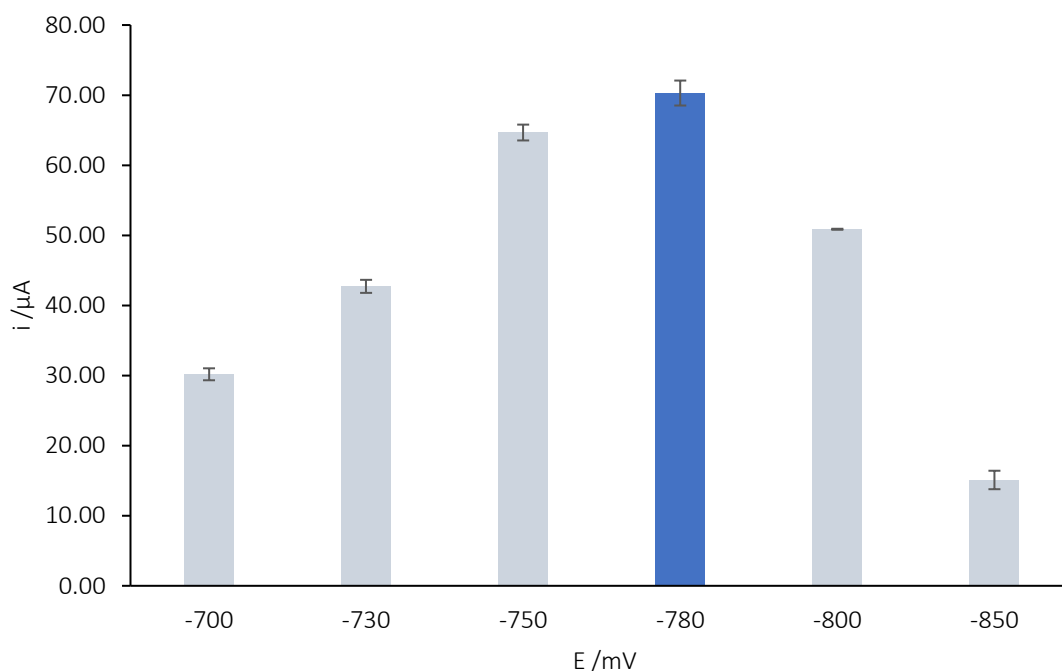


Figura 53 Intensidades de corriente anódica (i_a) obtenidas a distintos valores de sobrepotenciales en cronoamperometría desde -700, -730, -750, -780, -800 y -850 mV empleando AdSV para la determinación de CAP. **Condiciones experimentales:** 0.05 mM de CAP en buffer fosfatos pH 6, pH de carga 6, velocidad de agitación 200 rpm tiempo de carga 10 min, 20% de MIP en GCPE.

4.2.10.2 Optimización de la Voltamperometría diferencial de pulsos (Ventana anódica)

La optimización de DPV se llevó a cabo considerando cuatro variables de entrada para la técnica que son: paso de potencial, amplitud de potencial, ancho de pulso y duración de pulso. Estas variables influyen directamente en la forma en que se aplica el pulso y, por ende, en la respuesta electroquímica del sistema.

Para este propósito, se empleó un diseño de experimentos tipo Taguchi L9 (3^3) como herramienta exploratoria, con el fin de evaluar el efecto de las cuatro variables sobre la señal de respuesta.

En la Tabla 21 se muestra la matriz decodificada correspondiente al diseño Taguchi L9, considerando la intensidad de corriente anódica como variable de salida para cada experimento. Cada experimento se realizó por triplicado obteniendo para los 9 experimentos valores de % RSD menores al 10.00 %.

Tabla 21 Matriz decodificado para el diseño Taguchi L9 (3^3) en la optimización de DPV

No. Experimento	Amplitud (mV)	Ancho (mS)	Paso (mV)	Periodo (mS)	i (μ A)	% RSD
1	50.0	5.00	2.00	100	12.57	3.22
2	50.0	10.0	6.00	175	24.43	5.00
3	50.0	15.0	10.0	250	23.50	0.74
4	100	5.00	6.00	250	27.77	2.85
5	100	10.0	10.0	100	51.07	1.03
6	100	15.0	2.00	175	46.23	2.13
7	150	5.00	10.0	175	71.30	0.52
8	150	10.0	2.00	250	46.63	2.93
9	150	15.0	6.00	100	60.33	4.13

Empleando el software Minitab, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) del conjunto de datos (Tabla 22), obteniendo un coeficiente de correlación (r) y determinación (r^2) de 98.72 % y 98.15 % respectivamente, lo que indica un excelente ajuste del modelo a los datos experimentales.

Tabla 22 Análisis de Varianza para el diseño Taguchi L9 (3^3)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Amplitud	2.0	6956.0	3478.01	535.10	2.06×10^{-16}
Ancho	2.0	171.0	85.50	13.15	2.98×10^{-4}
Paso	2.0	932.1	466.06	71.70	2.21×10^{-9}

Periodo	2.0	981.8	490.89	75.52	1.33x10 ⁻⁹
Error	18	117.0	6.50		
Total	26	9157.9			

Asimismo, se evaluaron los gráficos de efectos principales (Figura 54) para las cuatro variables, los cuales mostraron que la amplitud de potencial es el factor con mayor contribución sobre la variable de respuesta, con una contribución del 75.90%. En menor proporción el periodo presentó una contribución del 10.71%, seguido del paso de potencial con 10.17% y por último el ancho de pulso con un 1.81%.

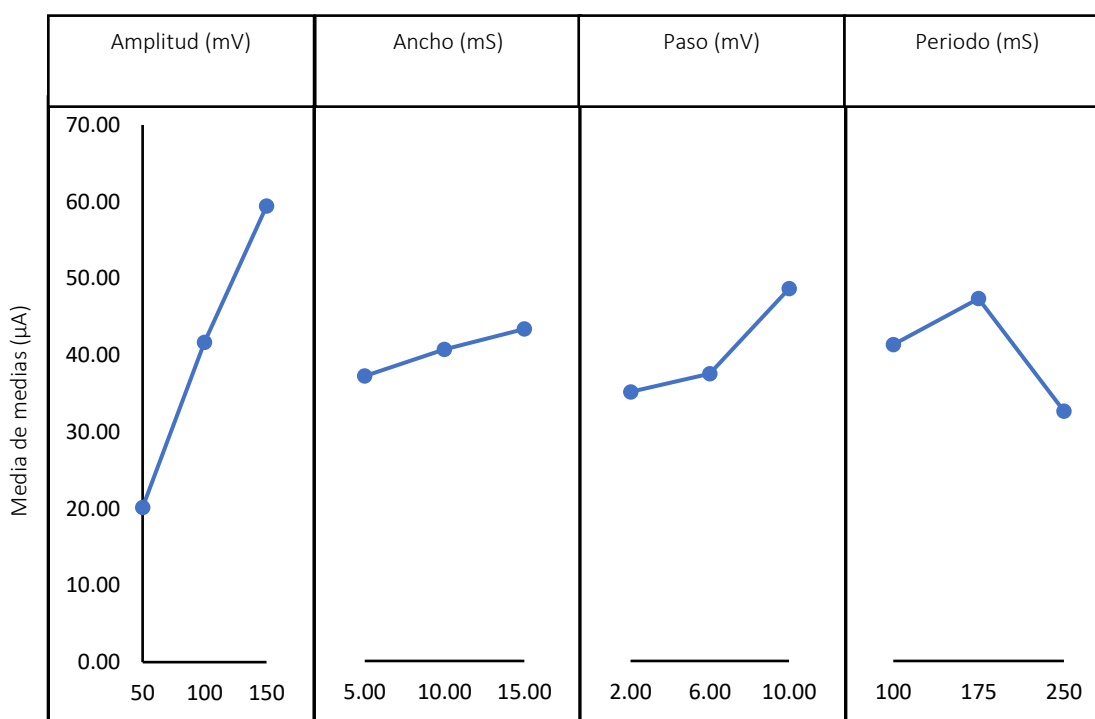


Figura 54 Gráfico de efectos principales para las variables: amplitud, ancho, paso y periodo.

Estos resultados demuestran que la amplitud de pulso es la variable más crítica en la optimización de la técnica electroquímica. Esto se debe a que la amplitud controla la altura del pulso (en mV); a mayor amplitud, mayor será el ΔE entre los dos niveles de potencial, lo que conlleva a tener mayor energía para favorecer la oxidación de la especie electroactiva sobre la superficie del electrodo, generando una mayor corriente y sensibilidad en la metodología.

Finalmente, el conjunto de datos arrojó una composición óptima de 150 mV de amplitud de potencial, 15.0 ms de ancho de pulso, 10.0 mV de paso de potencial y 175 ms de periodo, con una respuesta predicha por el modelo de 77.44 μA . Esta respuesta se comparó con la respuesta experimental de 75.34 μA ($S_x = 1.23$, $n = 3$) mediante una prueba t de Student (Ecuación 9). Para un nivel de confianza del 95 %, se obtuvo un valor de $t_{\text{exp}}=2.96$, inferior al valor crítico ($t_{\text{crit}}=4.30$). Por lo tanto, no existen diferencias significativas entre la respuesta predicha por el modelo y la respuesta experimental.

4.2.11 Curva de calibración y obtención de parámetros analíticos

Una vez optimizada la metodología para la determinación de CAP, se evaluó la relación entre la señal de respuesta y concentraciones crecientes de estándares de CAP. La curva de calibración obtenida se muestra en la Figura 55, donde se observan dos intervalos lineales: el primero a bajas concentraciones y el segundo a concentraciones más altas.

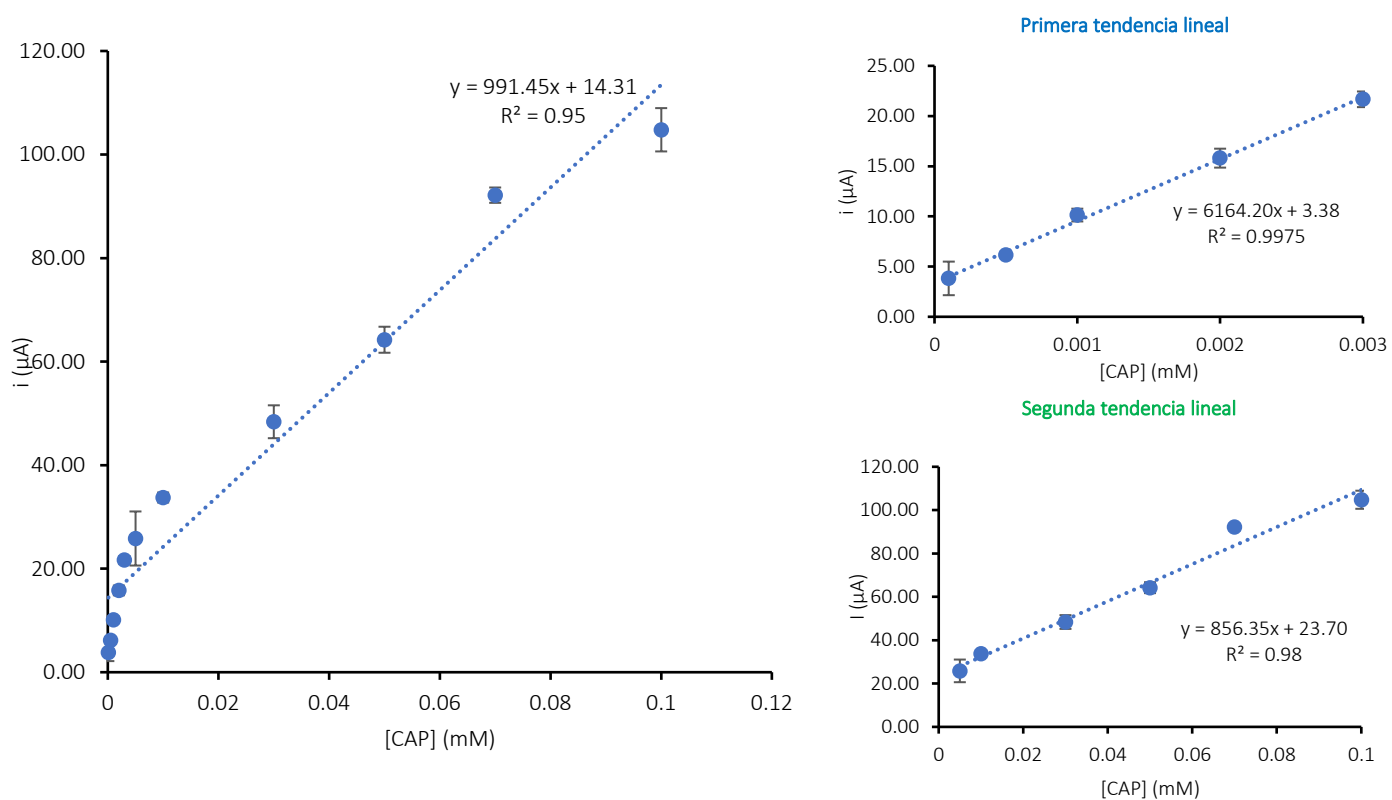


Figura 55 Curva de calibración empleando diferentes estándares de CAP empleando la metodología propuesta en la determinación indirecta de CAP. **Condiciones experimentales:** pH de redisolución 6, pH de carga 6, velocidad de agitación 200 rpm, tiempo de carga 10 min, 20% de MIP en GCPE, sobrepotencial en cronoamperometría -780 mV.

Los parámetros analíticos como LOD, LOQ y sensibilidad para cada intervalo lineal se resumen en la Tabla 23.

Tabla 23 Parámetros analíticos para el primer y segundo intervalo lineal.

Primera tendencia lineal	
Coeficiente de determinación (R^2)	0.99
Sensibilidad	$6124.20 \pm 178.10 \mu\text{A mM}^{-1}$
Intervalo lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	219.90-969.31
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	72.57
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	219.90
Segunda tendencia lineal	
Coeficiente de determinación (r^2)	0.98
Sensibilidad	$856.35 \pm 62.84 \mu\text{A mM}^{-1}$
Rango lineal (mg L^{-1})	19.44-32.31
LOQ (mg L^{-1})	19.44

De acuerdo con los parámetros analíticos del primer intervalo lineal, se lograron alcanzar límites de detección y cuantificación a nivel traza, permitiendo la determinación confiable de CAP en cuerpos de agua. Esto resulta especialmente relevante, ya que se han reportado concentraciones de CAP en un rango de 11 a $400 \mu\text{g L}^{-1}$ en lagos y ríos.

4.2.12 Pruebas de reproducibilidad y repetibilidad

Empleando la metodología propuesta, se evaluó la reproducibilidad en la síntesis del material polimérico mediante la preparación de tres MIP óptimos de manera independiente y el cálculo del porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD), el cual resultó menor al 10.00%, con un valor de 8.40%. Posteriormente, se evaluó la repetibilidad de un GCPE modificado con MIP mediante tres mediciones consecutivas utilizando el mismo sensor, obteniéndose un %RSD de 4.34%. Estos resultados demuestran que tanto la síntesis del material como la preparación de los electrodos GCPE-MIP presentan una buena precisión y reproducibilidad.

4.2.13 Análisis de muestras reales y efecto matriz

La metodología previamente establecida y optimizada se empleó para la cuantificación de CAP en muestras reales. Se analizaron cinco muestras provenientes de distintos cuerpos de agua; pozo, lago, manantial, río y presa. Previo al análisis las muestras fueron dopadas y sometidas a un pretratamiento siguiendo los pasos descritos en la metodología.

Asimismo, para cada muestra se construyó una curva de adición estándar con el fin de comparar la sensibilidad analítica frente a la curva de calibración directa ($6124.20 \pm 178.09 \mu\text{A mM}^{-1}$) y evaluar el efecto matriz en cada caso. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24 Sensibilidad y porcentajes de recuperación obtenidas para las muestras reales.

Cuerpo de agua	Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)	Valor de t ($t_{\text{crit}}=2.47$)	¿Existe efecto matriz?	Porcentaje de recuperación (%)
Pozo	6068.60	0.27	No	100.72
Lago	6397.10	1.19	No	97.20
Manantial	4268.20	12.61	Si, efecto negativo	98.25
Río	6746.60	3.73	Si, efecto positivo	101.72
Presa	6180.90	0.29	No	102.34

*Los porcentajes de recuperación para las muestras de manantial y río fueron calculados empleando curvas de adición patrón esto con el fin de eliminar el efecto matriz.

De acuerdo con los resultados obtenidos, dos de las cinco muestras analizadas presentaron efecto matriz. En la muestra de agua de manantial se observó una disminución en la sensibilidad analítica, lo que podría atribuirse a la presencia de materia orgánica, sólidos suspendidos o contaminantes de origen fecal. Estos componentes pueden adsorberse sobre la superficie del electrodo y bloquear parcial o totalmente los sitios activos de reconocimiento del MIP, reduciendo la eficiencia de la etapa de preconcentración del CAP y, en consecuencia, la respuesta electroquímica.

Por el contrario, en la segunda muestra que presentó efecto matriz se observó un incremento en la sensibilidad analítica. Este comportamiento podría estar relacionado con la presencia de especies electroactivas o compuestos presentes en el agua que favorecen la

transferencia electrónica o generan un efecto sinérgico durante el proceso de detección, incrementando la señal analítica del CAP.

A pesar de la presencia de efecto matriz en estas dos muestras, la determinación de CAP fue posible mediante el método de adición patrón, el cual permitió compensar las variaciones en la respuesta analítica y obtener resultados confiables. En contraste, las muestras de agua de pozo, lago y presa no mostraron efecto matriz significativo, lo que indica que la composición de estas matrices no afectó la respuesta del sensor electroquímico. Estos resultados demuestran la adecuada selectividad, exactitud y confiabilidad del sensor desarrollado para la determinación de CAP en diferentes cuerpos de agua, evidenciando además su potencial para aplicaciones en muestras ambientales con características fisicoquímicas diversas.

4.3 Conclusiones

En este trabajo se desarrolló una metodología electroquímica para la determinación indirecta de CAP mediante un electrodo de pasta de carbón vítreo modificado con un polímero impreso molecularmente (GCPE/MIP). La estrategia basada en técnicas electroquímicas sucesivas permitió la detección del analito sin requerir atmósferas inertes, simplificando el procedimiento experimental y favoreciendo su aplicación práctica. La modificación del electrodo con el MIP incrementó la respuesta electroquímica hacia el CAP, proporcionando límites de detección y cuantificación de 72.57 y 219.90 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Asimismo, la síntesis del MIP y la preparación del sensor presentaron una adecuada reproducibilidad y repetibilidad, con valores de RSD inferiores al 10.00 %, evidenciando la robustez del método desarrollado.

La aplicación de la metodología en muestras reales de diferentes cuerpos de agua confirmó su viabilidad analítica. Aunque dos de las cinco muestras evaluadas presentaron efecto matriz, la cuantificación de CAP fue posible mediante el método de adición patrón, compensando las variaciones en la respuesta electroquímica. En las muestras restantes no se observaron efectos de matriz significativos, lo que demuestra la selectividad y confiabilidad del sensor en diferentes matrices ambientales. Además, los porcentajes de recuperación obtenidos, comprendidos entre el 98.00 % y el 102.00 %, corroboran la exactitud del método. En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el sensor electroquímico basado en MIP constituye una alternativa sensible, selectiva, reproducible y de bajo costo para la determinación de CAP en muestras ambientales, con potencial para su aplicación en programas de monitoreo y control de contaminantes emergentes.

5. Anexos

5.1 Voltamperometría

Entre las técnicas electroanalíticas más utilizadas se encuentra la voltamperometría, la cual se basa en la medición de una corriente eléctrica en función a un potencial aplicado sobre un electrodo de trabajo sumergido en una solución electrolítica que contiene una especie electroactiva (Huang *et al.*, 2021). El flujo de corriente eléctrica se debe a reacciones de oxidación-reducción que se producen en la interfase entre el electrodo de trabajo y la disolución de electrolito (Huang *et al.*, 2021).

En la voltamperometría, se impone una señal de excitación de potencial variable a un electrodo de trabajo de una celda electroquímica. Esta señal de excitación produce una respuesta de corriente característica para cada tipo de voltamperometría (Figura 1A).

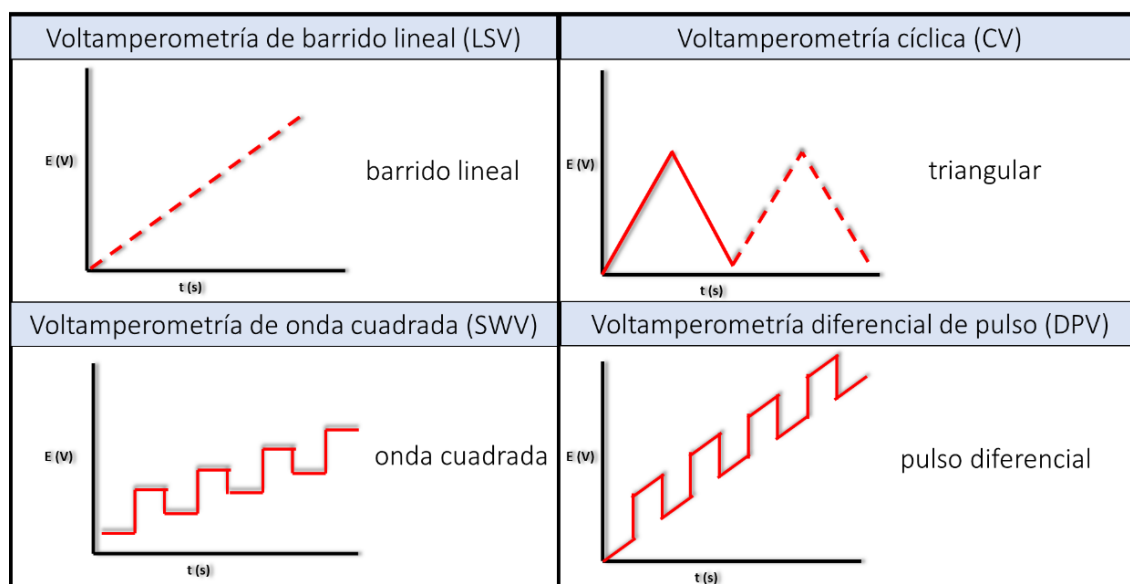


Figura 1A Señales de excitación de voltaje contra tiempo utilizadas en voltamperometría.

La intensidad de corriente registrada durante el análisis electroquímico de acuerdo con las señales de excitación es representada en un diagrama de corriente-voltaje denominado voltamperograma (Figura 2A), en donde se designa al potencial de voltaje (E) en el eje de las

abscisas (x) y a la intensidad de corriente (i) en el eje de las ordenadas (y). La forma y magnitud de esta respuesta proporcionan información sobre los procesos de transferencia de carga que ocurren en la superficie del electrodo y permiten la identificación y cuantificación de las especies electroactivas (Yamada *et al.*, 2022).

La corriente registrada en un voltamperograma está constituida por dos contribuciones principales: la corriente faradaica y la corriente no faradaica o capacitiva. La corriente faradaica se origina por la transferencia de electrones asociada a las reacciones de oxidación (pico anódico) o reducción (pico catódico) de la especie electroactiva y constituye la señal analítica de interés. En contraste, la corriente no faradaica se debe a la carga y descarga de la doble capa eléctrica formada en la interfaz electrodo-disolución, sin que ocurra una reacción electroquímica. Esta última se considera una corriente de fondo o residual que puede disminuir la relación señal/ruido y afectar la sensibilidad de la determinación (Francis *et al.*, 2022).

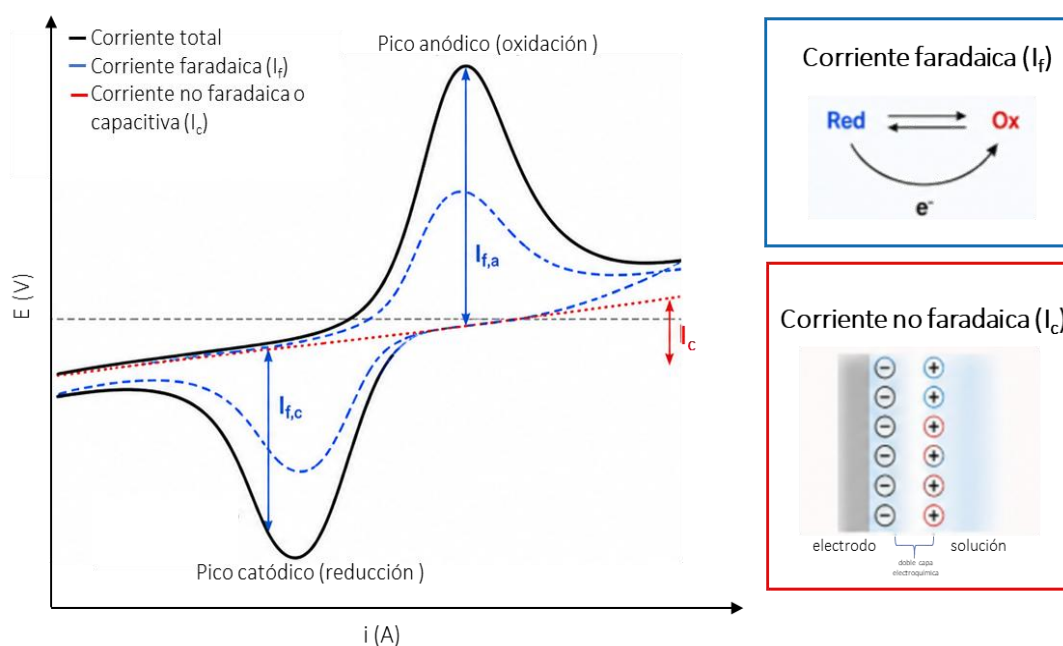


Figura 2A Tipos de corriente dentro de un voltamperograma.

La magnitud de ambas contribuciones depende, entre otros factores, de la forma en que se aplica el potencial al sistema electroquímico. Por ello, se han desarrollado diferentes

técnicas voltamperométricas que emplean distintos perfiles de excitación con el propósito de minimizar la corriente capacitiva y maximizar la contribución faradaica, mejorando así la sensibilidad, la resolución y los límites de detección del método analítico (Molina y González, 2016).

5.2 Voltamperometrías de pulsos

Las voltamperometrías de pulsos, también denominadas voltamperometría normal de pulso (NPV), de pulso diferencial (DPV) o de onda cuadrada (SWV), son técnicas electroquímicas derivadas de la voltamperometría convencional que, en lugar de emplear un barrido lineal continuo del potencial, aplican una secuencia de pulsos de potencial. La aplicación de estos pulsos permite disminuir la contribución de la corriente no faradaica o capacitiva y maximizar la corriente faradaica, incrementando así la sensibilidad de la metodología permitiendo detectar concentraciones traza de iones metálicos pesados o moléculas orgánicas (Molina y González, 2016).

La elección de la técnica voltamperométrica depende del objetivo del estudio y de las características del analito. Para la determinación de moléculas orgánicas a bajas concentraciones, se emplean preferentemente SWV y DPV (Pelzer *et al.*, 1989).

5.3 Voltamperometría diferencial de pulsos (DPV)

La DPV consiste en una perturbación mediante la imposición de un potencial al cual se impone un pulso de potencial por un intervalo de tiempo, una vez que pasa el tiempo del pulso, el potencial no regresa al potencial inicial este incrementa en forma de escalón y esta acción se realiza hasta alcanzar un potencial final y como respuesta a la perturbación obtenemos un pico con un perfil similar al de una curva gaussiana (Venton y DiScenza, 2020).

En la Figura 3A se muestra la señal de excitación empleada en la DPV, así como los principales parámetros de la perturbación, entre los que se encuentran la amplitud, el ancho de pulso, el paso y el período. La adecuada modificación y optimización de estos parámetros permite maximizar la sensibilidad de la metodología, favoreciendo la obtención de un

voltamperograma con una señal electroquímica más intensa, definida y con una mejor relación señal/ruido (Crespi, 2020).

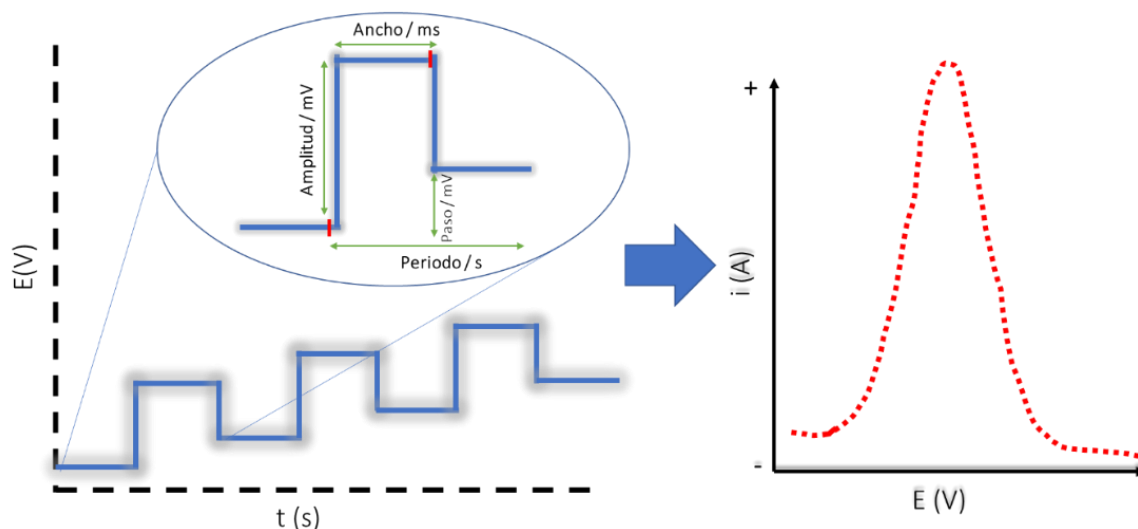


Figura 3A Señal de excitación para DPV y sus principales componentes (izquierda); voltamperograma de una DPV (derecha).

5.4 Celda electroquímica

En voltamperometría se emplea una celda electroquímica constituida por tres electrodos (Figura 4A) que se sumergen en una disolución que contiene al analito y también un exceso de un electrolito no reactivo conocido como electrolito soporte, que sirve para dar conductividad eléctrica al sistema y desde donde se lleva a cabo el transporte de materia hacia la superficie del electrodo de trabajo para que se lleve a cabo la reacción de transferencia de electrones. Los electrodos que se usan para construir la celda electroquímica son (Bard *et al.*, 2022):

a) **Electrodo de referencia (RE):** tiene como función dar una medida de potencial constante, fiable y conocida que sirva de referencia para medir la diferencia de potencial entre este y el electrodo de trabajo. El electrodo de referencia de Ag/AgCl saturado con KCl es el más utilizado en voltamperometría (Selva *et al.*, 2023).

b) **Electrodo auxiliar (CE):** también llamado contraelectrodo, tiene la función de permitir el paso de la corriente generada en el electrodo de trabajo, posibilitando cerrar el circuito eléctrico y así evitar oscilaciones en el electrodo de trabajo producidas por los

efectos de los fenómenos redox inducidos en su interfase. El electrodo auxiliar debe ser inerte en las condiciones de trabajo requeridas (potenciales, pH y solutos de la celda). Entre los más utilizados se encuentran el platino y la barra de grafito (Selva *et al.*, 2023).

c) **Electrodo de trabajo (WE):** es aquel cuyo potencial frente a un electrodo de referencia es variado con el tiempo (en voltamperometría). El electrodo de trabajo es el electrodo en el que se oxida o reduce el analito de interés. La mayoría de los electrodos de trabajo consisten en metales inertes, como oro, plata, platino o carbón inerte como carbón vítreo o electrodos de pasta de carbono (CPE), este último siendo uno de los más utilizados debido a sus ventajas como; bajo costo, facilidad de preparación, modificación y renovación (Valerio *et al.*, 2025).

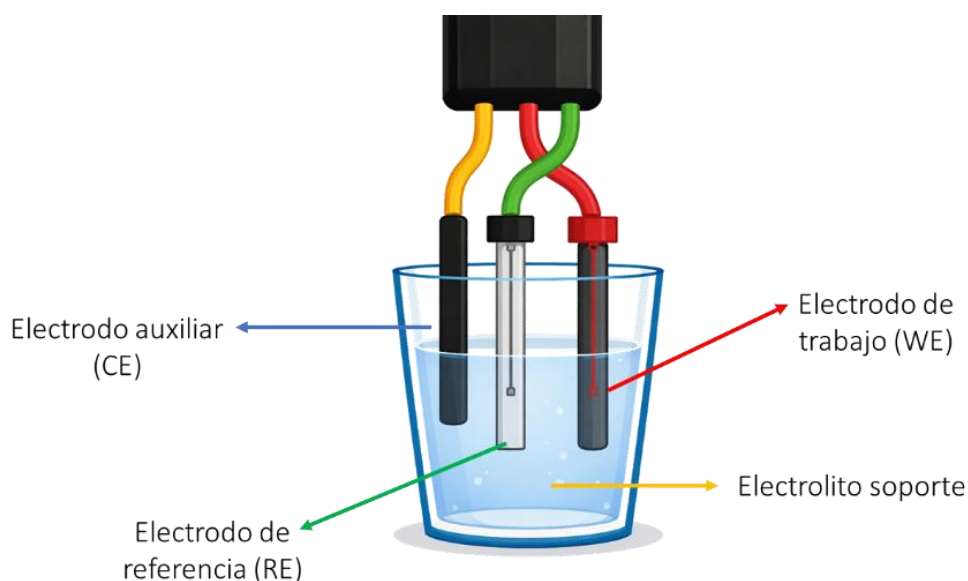


Figura 4A Esquema típico de una celda electroquímica utilizada en voltamperometría.

5.5 Sensores electroquímicos

En general, un sensor es un electrodo de trabajo que responde a un estímulo externo y lo convierte en una señal útil, que se puede medir utilizando un transductor adecuado. Un sensor electroquímico es un dispositivo químico que responde a cambios específicos en el potencial o en la corriente eléctrica como consecuencia de la presencia de una especie química que interactúa con él (Bard *et al.*, 2022).

El sensor electroquímico está formado por un receptor y un transductor (Figura 6), capaz de transformar información sobre las sustancias químicas en señales eléctricas medibles y

analíticamente útiles. El receptor interacciona con el analito produciendo o desencadenando en el mismo una serie de cambios químicos que inducen en el transductor la generación de señales eléctricas. Estas señales son transmitidas hasta un instrumento de medida y generalmente procesadas informáticamente, pudiendo inferir de ellas mediante diferentes técnicas la información requerida de la sustancia analizada (Lock y Tang, 1988; Valerio *et al.*, 2025).

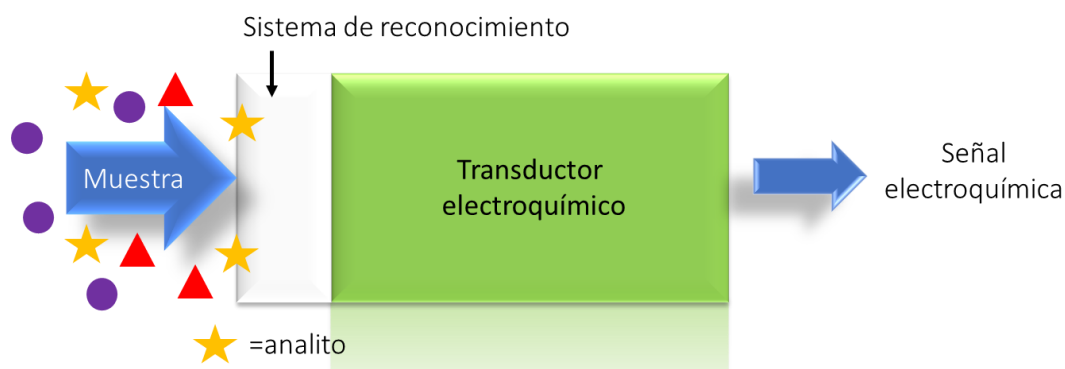


Figura 5A Representación gráfica de los elementos de un sensor electroquímico.

6. Bibliografía

Agüí, L., Guzmán, A., Yáñez-Sedeño, P., y Pingarrón, J. M. (2002). Voltammetric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*, 461, 65. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00245-3)

Alizadeh, T. (2009). High Selective Parathion Voltammetric Sensor Development by Using an Acrylic Based Molecularly Imprinted Polymer-Carbon Paste Electrode. *Electroanalysis*, 21, 1490. <https://doi.org/10.1002/elan.200804541>

Alizadeh, T., y Akhoundian, M. (2010). A novel potentiometric sensor for promethazine based on a molecularly imprinted polymer (MIP): The role of MIP structure on the sensor performance. *Electrochimica Acta*, 55, 3477. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.02.010>

Alizadeh, T., Ganjali, M. R., Zare, M., y Norouzi, P. (2012). Selective determination of chloramphenicol at trace level in milk samples by the electrode modified with molecularly imprinted polymer. *Food Chemistry*, 130, 1108. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.016>

Andersson, L., Sellergren, B., y Mosbach, K. (1984). Imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers. *Tetrahedron Letters*, 25, 5211. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)81566-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)81566-5)

Ansari, S., y Ghorbani, A. (2017). Molecularly Imprinted Polymers (MIP) for Selective Solid Phase Extraction of Celecoxib in Urine Samples Followed by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chemical Health Risks*, 7, 225. <https://doi.org/10.22034/jchr.2017.544184>

Ayala Cabana, L., De Santiago-Martín, A., Meffe, R., López-Heras, I., y De Bustamante, I. (2024). Pharmaceutical and Trace Metal Interaction within the Water–Soil–Plant Continuum: Implications for Human and Soil Health. *Toxics*, 12, 457. <https://doi.org/10.3390/toxics12070457>

Bader, R. F. W. (2003). *Atoms in molecules: A quantum theory* (Reprint ed). Clarendon Press.

Bagockij, V. S. (2006). *Fundamentals of electrochemistry* (2nd ed). Wiley-Interscience. <https://doi.org/10.1002/047174199X>

Baikeli, Y., Mamat, X., He, F., Xin, X., y Et., A. (2020). Electrochemical determination of chloramphenicol and metronidazole by using a glassy carbon electrode modified with iron, nitrogen co-doped nanoporous carbon derived from a metal-organic framework (type

Fe/ZIF-8). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204, 111066. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111066>

Bajpai, S. K., y Jhariya, S. (2015). Selective Removal of Amikacin From Simulated Polluted Water Using Molecularly Imprinting Polymer (MIP). *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 52, 901. <https://doi.org/10.1080/10601325.2015.1080096>

Bard, A. J., Faulkner, L. R., y White, H. S. (2022). *Electrochemical methods: Fundamentals and applications* (Third edition). Wiley.

Becke, A. D. (1993). Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, 98, 5648. <https://doi.org/10.1063/1.464913>

Bharti Mittu, A. C., y Chauhan, P. (2015). Analytical Method Development and Validation: A Concise Review. *Journal of Analytical y Bioanalytical Techniques*, 6, 1. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000233>

Boxall, A. B. A., Sinclair, C. J., Fenner, K., Kolpin, D., y Maund, S. J. (2004). When synthetic chemicals degrade in the environment. *Environmental Science y Technology*, 38, 368. <https://doi.org/10.1021/es040624v>

Bruckschlegel, C., Fleischmann, V., Gajovic-Eichelmann, N., y Wongkaew, N. (2025). Non-enzymatic electrochemical sensors for point-of-care testing: Current status, challenges, and future prospects. *Talanta*, 291, 127850. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.127850>

Chen, H., Chen, H., Ying, J., Huang, J., y Et., A. (2009). Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. *Analytica Chimica Acta*, 632, 80. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.068>

Cheng, D., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., y Et., A. (2020). A critical review on antibiotics and hormones in swine wastewater: Water pollution problems and control approaches. *Journal of Hazardous Materials* 387, 121682. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121682>

Chuanuwatanakul, S., Chailapakul, O., y Motomizu, S. (2008). Electrochemical Analysis of Chloramphenicol Using Boron-doped Diamond Electrode Applied to a Flow-Injection System. *Analytical Sciences*, 24, 493. <https://doi.org/10.2116/analsci.24.493>

Crapnell, R. D., Dempsey-Hibbert, N. C., Peeters, M., Tridente, A., y Banks, C. E. (2020). Molecularly imprinted polymer based electrochemical biosensors: Overcoming the challenges of detecting vital biomarkers and speeding up diagnosis. *Talanta Open*, 2, 100018. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2020.100018>

Crespi, F. (2020). Differential Pulse Voltammetry: Evolution of an In Vivo Methodology and New Chemical Entries, A Short Review. *Journal of New Developments in Chemistry*, 2, 20. <https://doi.org/10.14302/issn.2377-2549.jndc-20-3298>

de León-Martínez, L. D., Rodríguez-Aguilar, M., Ocampo-Pérez, R., Gutiérrez-Hernández, J. M., Díaz-Barriga, F., Batres-Esquivel, L., y Flores-Ramírez, R. (2018). Synthesis and Evaluation of a Molecularly Imprinted Polymer for the Determination of Metronidazole in Water Samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100, 395. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2249-5>

De Middeleer, G., Dubruel, P., y De Saeger, S. (2016). Characterization of MIP and MIP functionalized surfaces: Current state-of-the-art. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 71. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.007>

Fang, Y., Luo, R., y Chen, X. (s. f.). Chloramphenicol-induced gray baby syndrome: Case report and review of current literature. *Frontiers in Pediatrics*, 13, 1733059. <https://doi.org/10.3389/fped.2025.1733059>

Farré, M. la, Pérez, S., Kantiani, L., y Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, Advanced MS Analysis of Metabolites and Degradation Products - II*, 27, 991. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>

Forti, A. F., Campana, G., Simonella, A., Multari, M., y Scortichini, G. (2005). Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2004., 529, 257. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.059>

Francis, S., Koshy, E. P., y Mathew, B. (2022). Electroanalytical techniques. En *Design, Fabrication, and Characterization of Multifunctional Nanomaterials*, 1, 163. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820558-7.00004-2>

Fukui, K., Yonezawa, T., y Shingu, H. (1952). A Molecular Orbital Theory of Reactivity in Aromatic Hydrocarbons. *The Journal of Chemical Physics*, 20, 722. <https://doi.org/10.1063/1.1700523>

Gao, R., Khatib, M., y Bao, Z. (2026). Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors for amino acid detection: Towards wearable sensing. *Npj Biosensing*, 3, 1. <https://doi.org/10.1038/s44328-025-00065-8>

Gao, Y., Tan, L., Liu, F., Li, Q., Wei, X., Liu, L., Li, H., Zheng, X., y Xu, Y. (2021). Optimization of the proportion of multi-component rural solid wastes in mixed composting using a simplex centroid design. *Bioresource Technology*, 341, 125746. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125746>

Geng, L., Huang, J., Zhai, H., Shen, Z., Han, J., Yu, Y., Fang, H., Li, F., Sun, X., y Guo, Y. (2022). Molecularly imprinted electrochemical sensor based on multi-walled carbon nanotubes for

specific recognition and determination of chloramphenicol in milk. *Microchemical Journal*, 182, 107887. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107887>

Gil Garzón, M. J., Soto Zuluaga, A. M., Usma Gutierrez, J. I., y Gutiérrez Florez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, 7, 52.

Gruhzit, O. M., Fiskén, R. A., Reutner, T. F., y Martino, E. (1949). Chloramphenicol (chloromycetin), an antibiotic. Pharmacological and pathological studies in animals. *Journal of Clinical Investigation*, 28, 943. <https://doi.org/10.1172/JCI102184>

Guan, H., Sun, H., y Zhao, X. (2025). Application of Density Functional Theory to Molecular Engineering of Pharmaceutical Formulations. *International Journal of Molecular Sciences*, 26, 3262. <https://doi.org/10.3390/ijms26073262>

Gupta, N. V., y Shivakumar, H. (2012). Investigation of Swelling Behavior and Mechanical Properties of a pH-Sensitive Superporous Hydrogel Composite. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 11, 481. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2012.1097>.

Gutiérrez Pulido, H. y de la Vara Salazar, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos* (3.^a edición). McGraw-Hill Interamericana.

Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., y Jørgensen, S. E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—A review. *Chemosphere*, 36, 357. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(97\)00354-8](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(97)00354-8)

He, P., Tan, J., Huang, J., Yu, P., Guo, J., Chen, Y., y Liu, Y. (2025). Rational Design of Electrically Conductive Cross-Linked Polyimide–Polypyrrole with High Thermal Stability. *ACS Applied Polymer Materials*, 7, 7450. <https://doi.org/10.1021/acsapm.5c01114>

Herbers, S., Kraus, P., y Grabow, J.-U. (2019). Accurate equilibrium structures of methyl methacrylate and methacrylic acid by microwave spectroscopy and dispersion corrected calculations. *The Journal of Chemical Physics*, 150, 144308. <https://doi.org/10.1063/1.5091693>

Higuchi, T., Bias, C. D., y Marcus, A. D. (1954a). The Kinetics of Degradation of Chloramphenicol in Solution. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)*, 43, 129. <https://doi.org/10.1002/jps.3030430302>

Huang, X., Zhu, Y., y Kianfar, E. (2021). Nano Biosensors: Properties, applications and electrochemical techniques. *Journal of Materials Research and Technology*, 12, 1649. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.048>

Ibrahim, I., Yunus, S., y Hashim, A. (2013). Relative Performance of Isopropylamine, Pyrrole and Pyridine as Corrosion Inhibitors for Carbon Steels in Saline Water at Mildly Elevated Temperatures. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 4, 128.

Jeffrey, G. A. (1997). *An introduction to hydrogen bonding*. Oxford University Press.

Johnson, E. R., Keinan, S., Mori-Sánchez, P., Contreras-García, J., Cohen, A. J., y Yang, W. (2010). Revealing Noncovalent Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 6498. <https://doi.org/10.1021/ja100936w>

Kalogiouri, N. P., Kabir, A., Furton, K. G., y Samanidou, V. F. (2025). A tutorial on the synthesis and applications of molecularly imprinted polymers in analytical chemistry. *Journal of Chromatography Open*, 8, 100244. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2025.100244>

Karimian, N., Hashemi, P., Afkhami, A., y Bagheri, H. (2019). The principles of bipolar electrochemistry and its electroanalysis applications. *Current Opinion in Electrochemistry*, 17, 30. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.04.015>

Karthik, R., Govindasamy, M., Chen, S.-M., Mani, V., y Et., A. (2016). Green synthesized gold nanoparticles decorated graphene oxide for sensitive determination of chloramphenicol in milk, powdered milk, honey and eye drops. *Journal of Colloid and Interface Science*, 475, 46. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.04.044>

Kurnianto, A. A., Amer, F., Masykur, I., Muliati, y Nurul, M. (2026). Pharmaceutical residues as emerging contaminants: Health impacts and the financial burden of exposure. *Current Opinion in Environmental Science y Health*, 52, 100736. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2026.100736>

Lai, T., Shu, H., Yao, B., Lai, S., Chen, T., Xiao, X., y Wang, Y. (2023). A Highly Selective Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Copolymer Functionalized with Arginine for the Detection of Chloramphenicol in Honey. *Biosensors*, 13, 505. <https://doi.org/10.3390/bios13050505>

Li, Y., Liu, X., Zhang, R., ZomPa, D., y Et., A. (2018). Analysis of chloramphenicol in drinking water using an evaporation preparative step and isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Acta Chromatographica*, 30, 17. <https://doi.org/10.1556/1326.2017.28404>

Li, Y., Luo, L., Kong, Y., Li, Y., Wang, Q., Wang, M., Li, Y., Davenport, A., y Li, B. (2024). Recent advances in molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 249, 116018. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.116018>

Lin, J., Zhang, K., Jiang, L., Hou, J., Yu, X., Feng, M., y Ye, C. (2022). Removal of chloramphenicol antibiotics in natural and engineered water systems: Review of reaction mechanisms and product toxicity. *Science of The Total Environment*, 850, 158059. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158059>

- Liu, S., Lai, G., Zhang, H., y Yu, A. (2017). Amperometric aptasensing of chloramphenicol at a glassy carbon electrode modified with a nanocomposite consisting of graphene and silver nanoparticles. *Microchimica Acta.*, 184, 1445. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2138-y>
- Liu, S., Wu, X.-Z., Gao, Z.-H., y Jiao, F. (2013). On-site solid phase extraction and HPLC determination of chloramphenicol in surface water and sewage. *Analytical Methods*, 5, 1150. <https://doi.org/10.1039/C2AY26162F>
- Lu, T., y Chen, F. (2012). Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *Journal of Computational Chemistry*, 33, 580. <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>
- Maksymiuk, K. (2006). Chemical Reactivity of Polypyrrole and Its Relevance to Polypyrrole Based Electrochemical Sensors. *Electroanalysis*, 18, 1537. <https://doi.org/10.1002/elan.200603573>
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6, 153. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>
- Michael J. Frisch. (2016). *Gaussian 16* (Versión Revision C.01) [Multiplataforma (Windows, Linux y Unix)]. Gaussian, Inc. <https://gaussian.com/gaussian16/>
- Molina, Á., y González, J. (2016). *Pulse Voltammetry in Physical Electrochemistry and Electroanalysis: Theory and Applications*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-21251-7>
- Nafade, V., Huddart, S., Sulis, G., Daftary, A., Miraj, S. S., Saravu, K., y Pai, M. (2019). Over-the-counter antibiotic dispensing by pharmacies: A standardised patient study in Udupi district, India. *BMJ Global Health*, 4, e001869. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2019-001869>
- Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Aguilar, G. R., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Hayoon, A. G., Weaver, N. D., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., ... Murray, C. J. L. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: A systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 404, 1199. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)
- Nagy, Á. (1998). Density functional. Theory and application to atoms and molecules. *Physics Reports*, 298, 1. [https://doi.org/10.1016/S0370-1573\(97\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0370-1573(97)00083-5)
- Nesic, K., Pisinov, B., Jaksic, S., Tasic, A., Savic, B., y Pavlovic, N. (2017). Comparison of elisa and HPLC methods for the detection of mycotoxins by analysing proficiency test results. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 133, 79. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN1733079N>
- Nguyen, L. M., Nguyen, N. T. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, T. T., Nguyen, D. T. C., y Tran, T. V. (2022). Occurrence, toxicity and adsorptive removal of the chloramphenicol antibiotic in

water: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 20, 1929. <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01416-x>

Nie, M., Yang, Y., Zhang, Z., Yan, C., y Et., A. (2014). Degradation of chloramphenicol by thermally activated persulfate in aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 246, 272. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.02.047>

Olivieri, A. C., Faber, N. M., Ferré, J., Boqué, R., Kalivas, J. H., y Mark, H. (2006). Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 78, 633. <https://doi.org/10.1351/pac200678030633>

Oong, G. C., y Tadi, P. (2026). Chloramphenicol. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555966/>

Pahlevan, A., Khodadadi Karimvand, S., y Abdollahi, H. (2025). Matrix effect assessment via matrix matching strategy using multivariate curve resolution methods. *Analytica Chimica Acta*, 1378, 344692. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2025.344692>

Papich, M. G. (2013). Antimicrobial Drugs. En *Canine and Feline Gastroenterology*, 471. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3661-6.00039-0>

Paris, D. H., y Dumler, J. S. (2016). State of the art of diagnosis of rickettsial diseases: The use of blood specimens for diagnosis of scrub typhus, spotted fever group rickettsiosis, and murine typhus. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29, 433. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000298>

Patyra, E., y Kwiatek, K. (2020). Quantification and Analysis of Trace Levels of Phenicols in Feed by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Chromatographia*, 83, 715. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03890-3>

Pelzer, J., Scholz, F., Henrion, G., y Nitschke, L. (1989). Optimization of parameters for differential pulse voltammetry at the hanging mercury drop electrode. *Electroanalysis*, 1, 437. <https://doi.org/10.1002/elan.1140010510>

Peng, X., Tan, J., Tang, C., Yu, Y., y Et., A. (2008). Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 73. <https://doi.org/10.1897/06-650.1>

Rafi, J., Daniel, M., y Neppolian, B. (2024). Ultrasensitive detection of chloramphenicol in water using functionalized polymers with an aluminium organic framework. *Chemosphere*, 357, 141981. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141981>

Rayan, R. A. (2023). Pharmaceutical effluent evokes superbugs in the environment: A call to action. *Biosafety and Health*, 5, 363. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2023.10.005>

- Richardson, S. D., Plewa, M. J., Wagner, E. D., Schoeny, R., y Demarini, D. M. (2007). Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research*, 636, 178. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.09.001>
- Ruocco, A., Chiodo, L., Sforzini, M., Palummo, M., Monachesi, P., y Stefani, G. (2009). Experimental and Theoretical Investigation of the Pyrrole/Al(100) Interface. *The Journal of Physical Chemistry A*, 113, 15193. <https://doi.org/10.1021/jp905537g>
- Sathya, A., Prabhu, T., y Ramalingam, S. (2020a). Structural, biological and pharmaceutical importance of antibiotic agent chloramphenicol. *Heliyon*, 6, e03433. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03433>
- Scheffé, H. (1963). The Simplex-Centroid Design for Experiments with Mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology*, 25, 235. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1963.tb00506.x>
- Scortichini, G., Annunziata, L., Haouet, M. N., Benedetti, F., y Et., A. (2005). ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: Method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. *Analytica Chimica Acta*, 535, 43. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.12.004>
- Selva, T. M. G., Selva, J. S. G., y Prata, R. B. (2023). Sensing Materials: Diamond-Based Materials. En *Encyclopedia of Sensors and Biosensors*, 45. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822548-6.00081-9>
- Shen, J., Xia, X., Jiang, H., Li, C., Li, J., Li, X., y Ding, S. (2009). Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry and porcine muscle and liver by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877, 1523. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.040>
- Shih, I. K. (1971). Degradation Products of Chloramphenicol. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 60, 661. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600527>
- Sin, M. L., Mach, K. E., Wong, P. K., y Liao, J. C. (2014). Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert review of molecular diagnostics*, 14, 225. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.888313>
- Tocher, J. H., y Edwards, D. I. (1989). Electrochemical Characteristics of Nitro-Heterocyclic Compounds of Biological Interest. III. Nitroso Derivative Formation. *Free Radical Research Communications* 6, 169. <https://doi.org/10.3109/10715768909073415>
- Tominaga, Y., Kubo, T., Yasuda, K., Kato, K., y Hosoya, K. (2012). Development of molecularly imprinted porous polymers for selective adsorption of gaseous compounds. *Microporous and Mesoporous Materials*, 156, 161. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.02.020>

- Tran, T. V., Nguyen, D. T. C., Le, H. T. N., Bach, L. G., Vo, D.-V. N., Hong, S. S., Phan, T.-Q. T., y Nguyen, T. D. (2019). Tunable Synthesis of Mesoporous Carbons from Fe₃O(BDC)₃ for Chloramphenicol Antibiotic Remediation. *Nanomaterials*, 9, 237. <https://doi.org/10.3390/nano9020237>
- Tuerk, J., Reinders, M., Dreyer, D., Kiffmeyer, T. K., y Et., A. (2006). Analysis of antibiotics in urine and wipe samples from environmental and biological monitoring—Comparison of HPLC with UV-, single MS- and tandem MS-detection. *Journal of Chromatography B*, 831, 72. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.030>
- Valerio, T. L., Deroco, P. B., Hryniewicz, B. M., Deller, A. E., Kubota, L. T., y Vidotti, M. (2025). Electrode materials and architectures toward the development of sensors and biosensors. En *Electrochemical Sensors and Biosensors*, 1. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-31562-6.00014-9>
- Validation and Verification Guidelines for Analytical Methods. (2017). En T. Tyner y J. Francis, *ACS Reagent Chemicals*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsreagents.1004>
- Venton, B. J., y DiScenza, D. J. (2020). Voltammetry. En *Electrochemistry for Bioanalysis*, 27. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821203-5.00004-X>
- Vidal-Iglesias, F. J., Solla-Gullón, J., Rodes, A., Herrero, E., y Aldaz, A. (2012). Understanding the Nernst Equation and Other Electrochemical Concepts: An Easy Experimental Approach for Students. *Journal of Chemical Education*, 89, 936. <https://doi.org/10.1021/ed2007179>
- Wu, S., Zhang, Y., Jia, X., Mao, J., Wu, H., Wang, S., y Guo, H. (2025). Molecularly imprinted electrochemical sensor for ultrasensitive determination of chloramphenicol in milk and egg samples. *Food Chemistry*, 489, 145024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.145024>
- Wu, S., Zhang, Y., Jia, X., Wu, H., Mao, J., Huo, M., y Guo, H. (2025). Rapid and sensitive detection of chloramphenicol using polyaniline nanorods/reduced graphene oxide-based molecularly imprinted electrochemical sensor. *Microchemical Journal*, 209, 112687. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2025.112687>
- Xiao, F., Zhao, F., Li, J., Yan, R., y Et., A. (2007). Sensitive voltammetric determination of chloramphenicol by using single-wall carbon nanotube–gold nanoparticle–ionic liquid composite film modified glassy carbon electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 596, 79. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.053>
- Yamada, H., Yoshii, K., Asahi, M., Chiku, M., y Kitazumi, Y. (2022). Cyclic Voltammetry Part 1: Fundamentals. *Electrochemistry*, 90, 102005. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.22-66082>
- Yan, L., Luo, C., Cheng, W., Mao, W., y Et., A. (2012). A simple and sensitive electrochemical aptasensor for determination of Chloramphenicol in honey based on target-induced strand

release. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 687, 9.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.10.016>

Yan, Z., Gan, N., Wang, D., Cao, Y., y Et., A. (2015). A “signal-on” aptasensor for simultaneous detection of chloramphenicol and polychlorinated biphenyls using multi-metal ions encoded nanospherical brushes as tracers. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 69.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.024>

Zhang, S., Liu, Z., Guo, X., Cheng, L., Wang, Z., y Shen, J. (2008). Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 875, 399.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.035>

Zhou, M., y Heinze, J. (1999). Electropolymerization of Pyrrole and Electrochemical Study of Polypyrrole. 3. Nature of “Water Effect” in Acetonitrile. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103, 8451. <https://doi.org/10.1021/jp990162l>