

Trabajo Fin de Grado

Desarrollo de sensores electroquímicos para la
detección y cuantificación del antibiótico
Enrofloxacin

Autor/es

Raúl Gonzalo Sacristán

Director/es

Juan Carlos Vidal Ibáñez

Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza

2020

Índice

Resumen	3
Abstract.....	3
1. Introducción	4
2. Experimental	6
2.1 Reactivos y disoluciones	6
2.2 Instrumentación.....	7
2.3 Procedimiento experimental	8
2.3.1 Preparación de las muestras.....	8
2.3.2 Preparación de los electrodos	8
2.3.3. Caracterización de los electrodos	9
2.3.4. Modificación en los electrodos.....	10
2.3.5. Optimización de la determinación voltamétrica del antibiótico.....	11
2.3.6 Medidas voltamétricas	14
3. Resultados y discusión	14
3.1. Detección y cuantificación de Enrofloxacin con electrodo de gota pendiente de mercurio (HMDE)	14
3.2. Detección y cuantificación de Enrofloxacin con electrodo de carbón vítreo (GC).	15
3.3. Detección y cuantificación de Enrofloxacin con electrodo de carbón vítreo modificado.	19
3.4. Comparación de los distintos electrodos utilizados.....	24
3.4.1 Comparación electrodos reducción.	24
3.4.2 Comparación electrodos oxidación.	26
4. Conclusión.....	27
5. Referencias bibliográficas	30
Abreviaturas empleadas en esta memoria	32

Resumen

En este trabajo, se ha estudiado la detección y cuantificación electroquímica de Enrofloxacin, mediante técnicas voltamétricas, empleando diferentes electrodos de trabajo (HMDE, GC sin modificar y GC con modificado con MWCNTs y AuNPs) y comparando los resultados que aportan.

La primera parte de la memoria se centra en la caracterización de los electrodos conociendo la ventana de potenciales de cada uno de los electrodos y optimización de las condiciones de las voltametrías, eligiendo como tampón Britton-Robinson, pH=7 y el tamaño de gota 3 (más grande) para el electrodo HMDE.

Posteriormente, se realizaron medidas del antibiótico a diferentes concentraciones para estudiar la linealidad de la concentración de ENRO frente a la señal que aparecen en los voltagramas tanto a potenciales de oxidación como reducción para cada uno de los electrodos usando LSV para HMDE y DP para los electrodos de GC. También se estudió la reproducibilidad de los electrodos de GC sin modificar y modificado porque en los voltagramas se veía que había una pérdida de señal al acumular medidas sobre estos electrodos.

Finalmente, se realizó la comparación de los electrodos atendiendo la sensibilidad y límite de detección de cada uno de ellos.

Abstract

In this paper, the electrochemical detection and quantification of Enrofloxacin has been studied, using voltammetric techniques, using different working electrodes (HMDE, bare GC and GC modified with MWCNTs and AuNPs), together with a comparison of the results they provide.

The first part of the memory focuses on the characterization of the electrodes, knowing the potential window of each of the electrodes and optimization of the conditions of the voltammeteries, choosing as the Britton-Robinson buffer, pH = 7 and drop size 3 (larger) for the HMDE electrode.

Subsequently, measurements of the antibiotic were made at different concentrations to study the linearity of the currents measured in the voltagrams against the ENRO concentration, both at oxidation and reduction potentials for each of the electrodes using LSV for HMDE and DP for the electrodes of GC. The reproducibility of the unmodified and modified GC electrodes was also studied because it was seen in the voltammograms in some cases had a loss of signal when successive measurements with these electrodes.

Finally, the sensitivity and detection limit of the studied electrodes in this work, together with their electrochemical properties.

1. Introducción

Durante los últimos años, los antibióticos han estado en el punto de mira debido a su uso en gran escala y sus posibles efectos nocivos tanto en el ecosistema como en la salud humana, así como el riesgo de resistencia que pueden crear las bacterias al sobreexponerse a estos antibióticos [1]. La organización mundial de la salud (OMS) en 2015 señaló que la biodisponibilidad de antibióticos en el medio ambiente es un tema de gran interés y preocupación debido al gran impacto que pueden producir sobre él [2,3].

Este trabajo está basado en la detección y cuantificación de Enrofloxacin (ENRO) [1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(4-etil-1-piperazinil)-3-quinolincarboxílico], un antibiótico de la familia de las 6-fluoro-7-piperazinil-4-quinolonas de tercera generación, una clase de medicamentos de amplio espectro sintéticos que se usa comúnmente en el tratamiento y prevención de enfermedades animales. Debido a la adición de un ácido carboxílico y una amina terciaria contribuye a las propiedades anfóteras y lipofílicas de Enrofloxacin. La Enrofloxacin es bactericida y tiene una excelente actividad contra los patógenos Gram-positivos y Gram-negativos [4,5,6].

Se metaboliza solo parcialmente en el cuerpo mediante N-dealquilación y debido a su alto consumo, excreción y persistencia, difunde a través de excrementos y se pueden liberar en varios compartimentos ambientales como aguas superficiales, sedimentos acuáticos, aguas subterráneas, suelo y biota [7,8]. La Enrofloxacin es bastante resistente a la degradación abiótica y biótica, y tiene una vida media ambiental muy larga (hasta 72 días). En varios estudios se han encontrado concentraciones en aguas naturales entre 15 ngL⁻¹ y 0,44 µgL⁻¹ en aguas de diferentes lugares y en numerosos países [9,10].

Algunos de los métodos más usados para la determinación de quinolonas, especialmente ENRO, se basan en la cromatografía líquida: Principalmente con detección fluorimétrica, a través de su reacción previa o posterior a la columna [11]. También se ha empleado cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, separación en fase sólida o determinación espectrofotométrica, electroforesis capilar, espectrometría de absorción atómica indirecta y detecciones espectrofotométricas. Los límites de detección y rango lineal para estas técnicas son 0.009 µg mL⁻¹, 0.03–15.0 µg mL⁻¹ para HPLC-fluorimetría [12], 0.06 µg mL⁻¹ 0.20–200.0 µg mL⁻¹ para HPLC [13], 0.001 µg mL⁻¹ 0.008–0.250 µg mL⁻¹ para LC-fluorimetría [14], 2.0 µg mL⁻¹ 5–120 µg mL⁻¹ para HPLC-UV [15], 0.01 µg mL⁻¹ 0.03–1 µg mL⁻¹ para electroforesis con electroluminiscencia [16] y 1.0 µg mL⁻¹ 2.0–12.0 µg mL⁻¹ para espectrofotometría [17]. Todas estas técnicas instrumentales y poseen un buen rango lineal y muy bajos límites de detección, por lo que son las técnicas analíticas más destacadas y empleadas. Sobre todo, como sistemas de detección en cromatografía líquida, en la que se produce la separación de los componentes complejos de la matriz. Destaca por su sensibilidad y selectividad la cromatografía líquida con detección fluorescente, con la que no se presentan especies que interfieran a la hora de medir ENRO. La principal desventaja es la instrumentación compleja de estas técnicas instrumentales y su baja portabilidad para medidas *in situ*.

Por ello han desarrollado procedimientos alternativos, más rápidos y eficientes, para la medición de ENRO en el medio ambiente. Como son los métodos electroquímicos y voltamétricos con electrodos específicos, que permiten ser utilizados como sensores electroquímicos, dispositivos que brindan información sobre la composición de un sistema en tiempo real mediante el acoplamiento de una capa químicamente selectiva (el elemento de

reconocimiento) a un transductor electroquímico [11]. La enrofloxacin altera la acción de la ADN girasa bacteriana, una topoisomerasa de tipo II [8]. Además, los antibióticos pueden inducir una serie de efectos genéticos en humanos, como reacciones alérgicas. La exposición a largo plazo a los antibióticos también puede provocar efectos tóxicos crónicos en los organismos. El cociente de peligro (HQ) para Enrofloxacin es 0,00568 para un tipo de pescado importado de Tailandia como el valor es menor que 1 el riesgo es bajo. [18]

Los métodos voltamétricos pueden ser una alternativa interesante a las técnicas de separación para el análisis de antibióticos electroactivos, por su simplicidad, bajo costo, portabilidad, ahorro de tiempo, y alta sensibilidad y selectividad [4]. Se han utilizado técnicas electroquímicas para la determinación de ENRO, particularmente la voltamperometría de separación catódica con preconcentración por adsorción (AdSV) usando como electrodo estático de gota de mercurio (SMDE). Es una técnica efectiva para la determinación de fluoroquinolonas, debido a que pueden ser reducidas sobre diversos electrodos voltamétricos, con un límite de detección y rango lineal de $0.013 \mu\text{g mL}^{-1}$ $0.004\text{--}0.055 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ENRO [19].

Las principales diferencias en la determinación voltamétrica de ENRO se basan en los distintos electrodos (o electrodos modificados) electrocatalíticos empleados. Si bien no hay muchas referencias bibliográficas al respecto, se han encontrado referencias donde se produce esta determinación sobre electrodos de mercurio usando voltametría de pulso diferencial con un límite de detección de $0.036 \mu\text{g mL}^{-1}$ y un rango lineal de $14.4\text{--}18.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ [20]. Otros electrodos muy utilizados son los basados en distintos tipos de carbono (fundamentalmente carbón vítreo y pasta de carbono), ya sean modificados o no, y sobre todo en reacciones electroquímicas anódicas o de oxidación de ENRO.

Por ejemplo, con electrodo de carbón vítreo se obtiene un rango lineal de $0.3\text{--}3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ y un límite de detección de $28 \mu\text{g mL}^{-1}$ [21]. También se han utilizado electrodos de carbón vítreo modificados utilizando nanotubos de carbono de pared múltiple obteniendo un límite de detección de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y rango lineal de $0.7\text{--}280 \mu\text{g mL}^{-1}$ [22] y modificando este mismo electrodo con nanopartículas de óxido de hierro obteniendo un límite de detección de $0.09 \mu\text{g mL}^{-1}$ y rango lineal de $0.3\text{--}100 \mu\text{g mL}^{-1}$ [23]. Otros tipos de electrodos de trabajo ofrecen ventanas más amplias de potenciales anódicos, como por ejemplo el diamante dopado con boro, y con capacidad electrocatalítica obteniéndose valores de $0.057 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el límite de detección y $0.025\text{--}1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el rango de concentraciones con respuesta lineal [4].

Todos estos procedimientos voltamétricos, con distintos electrodos (modificados) de trabajo, sirven para la determinación y cuantificación de ENRO en las concentraciones establecidas por la Unión Europea con un límite máximo de residuos de antibióticos en productos animales comestibles para algunas quinolonas, como la Enrofloxacin. Este valor es de $100 \mu\text{g/kg}$ para el músculo, hígado y leche de diferentes animales y $200 \mu\text{g/kg}$ para el riñón [24].

Teniendo en cuenta lo publicado en la bibliografía científica, el presente trabajo tiene como objetivo la evaluación del comportamiento de oxidación y reducción de ENRO sobre distintos electrodos y después de su nanoestructuración. Se han estudiado las respuestas voltamétrica, tanto anódicas como catódicas, sobre electrodos de gota pendiente de mercurio (HMDE), de carbón vítreo (GC) sin modificar y modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) y con nanopartículas de oro (AuNPs). Se compara entre ellos su sensibilidad y sus rangos de respuesta de calibrados lineales. Para el uso de estos electrodos se han empleado diferentes técnicas voltamétricas como son la voltamperometría de pulso diferencial (DPV),

voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de barrido lineal (LSV), para la cuantificación del antibiótico ENRO.

2. Experimental

2.1 Reactivos y disoluciones

La disolución estándar se preparó a partir del antibiótico sólido Enrofloxacin (Sigma-Aldrich, Co; St Louis; USA; $\geq 99.0\%$ (HPLC); Rf: 17849-56-F), disolviéndolo en una disolución previamente preparada de 0.5M en H_2SO_4 , debido a que su solubilidad en agua es baja 53.9(mg/mL). La concentración de la disolución patrón inicial fué de 28mM de ENRO. Tanto la disolución como el antibiótico sólido se almacenaron a baja temperatura (4 °C) para mantener sus propiedades químicas.

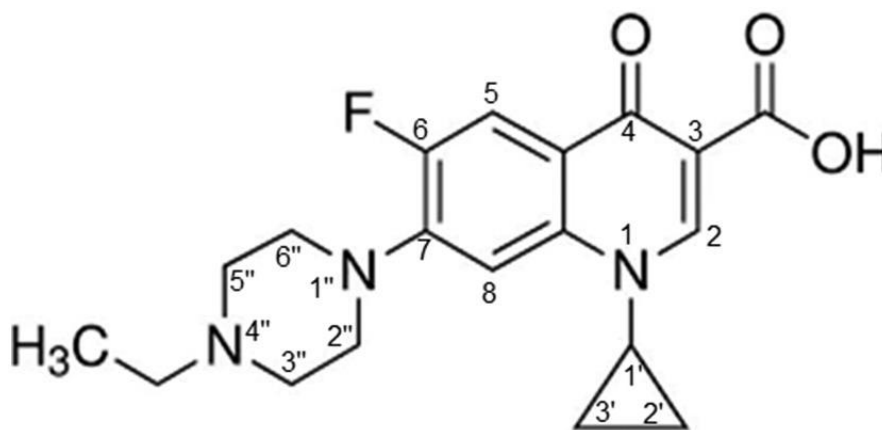


Figura 1. Estructura química de la Enrofloxacin.

Las disoluciones estándar de ENRO se prepararon a partir de la disolución anterior por dilución con electrolitos soporte para las determinaciones voltamétricas. Se ensayaron tres electrolitos soporte distintos, para comprobar su influencia sobre las medidas voltamétricas:

- (1) Britton-Robinson (B-R, 0.1M, pH 2–10),
- (b) fosfato (PBS, 0.1M, pH 7) y
- (c) HEPES (0.1M, pH 2.5-8.2)

Después de ensayos electroquímicos con estos electrolitos soporte, se llegó a la conclusión de que el tampón B-R es el que mejor funcionaba (picos voltamétricos más sensibles). Todas las mediciones voltamétricas se realizaron a temperatura ambiente (25°C).

La preparación del tampón fosfato se realizó disolviendo Na_2HPO_4 (Spectrum) en agua obteniendo una concentración de 0.1 M y ajustando el pH con una disolución de NaOH (Sigma Aldrich, Inc; St Louis; USA) 2 M hasta llegar a pH 7,0.

La disolución amortiguadora Britton-Robinson (B-R) se preparó disolviendo CH_3COOH (Merck), H_3PO_4 (Merck), H_3BO_3 (Merck) y NaOH (Sigma Aldrich, Inc; St Louis; USA) para

llegar al pH en el que se quiera trabajar (entre valores de pH 3 a 9) con una concentración de 0.1M, además disolver KCl (*Merck*) para obtener una fuerza iónica de 0.5M.

El tampón HEPES de pH=7 se preparó disolviendo el reactivo HEPES (*Merck*), obteniendo una concentración de 0.1M. Este tampón tiene una composición de 115 mM NaCl (*Merck*), 1,2 mM CaCl₂ (*Merck*), 1,2 mM MgCl₂ (*Merck*), 2,4 mM K₂HPO₄ (*Fisher Scientific U.K. Limited; Bishop Meadow Road; UK*) y 20 mM HEPES (*MERCK*). Se preparó un litro de este tampón que se puede guardar en frigorífico varias semanas.

Todas las disoluciones se prepararon usando agua desionizada de calidad Milli-Q (*Millipore*).

Se prepararon dos disoluciones a partir de nanotubos de carbono de pared múltiple MWCNTs (*Aldrich Chemistry*) y de la dispersión de nanopartículas de oro AuNPs (*NanoXact*) en Eppendorf para la preparación de los electrodos modificados. Ambas disoluciones se deben conservar refrigeradas.

2.2 Instrumentación

Para las medidas electroquímicas, voltametría cíclica, voltametría de pulso diferencial y voltametría de barrido lineal, se utilizó el Potenciostato METHROM AUTOLAB PGSTAT-12 (AUT71572; Ecochemie, Holanda). Entre sus características destacan una sensibilidad de medida de corriente de $\pm 0,2\%$ en valores de 0,10 nA, una resolución en la aplicación del potencial de $\pm 0,2\text{mV}$, impedancia de entrada en ohmios es 1T y rango de potencial de $\pm 12\text{ V}$. Mediante este potenciostato de tres electrodos se obtuvieron todas la voltametrías cíclicas, de pulso diferencial y de barrido lineal. Para la adquisición de los datos se utilizó el ordenador personal junto al Software de control y de adquisición de datos Nova (versión 2.1.4, Methrom).



Figura 2. Potenciostato AUTOLAB PGSTAT12 de Metrohm

Los electrodos de trabajo usados fueron de carbono vítreo (*Glassy carbon, GC*) (*BASi, 3.0mm de diámetro*) y electrodo multimodo de gota de mercurio. La celda electroquímica utilizada implica un electrodo de carbón vítreo (GC) como electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar de hilo de platino (0,5mm de diámetro) que permite el intercambio de electrones y un electrodo de Ag|AgCl (3M.KCl) que sirve como referencia para establecer la diferencia de potencial.

Para el uso del electrodo de mercurio se usa el sistema de electrodo Metrohm de medida por voltamperometría de Metrohm Autolab, 663VA *Stand* (Serial no: 2.663.0020), en el que ya vienen incluidos el electrodo multimodo pro (MME), electrodo de referencia Ag|AgCl(3M.KCl) y electrodo auxiliar de carbón vítreo (2mm de diámetro). Se muestra en la Fig. 3. En este *stand* necesita la interfaz de Metrohm IME663 para poder conectarse al potenciostato.



Figura 3. Metrohm Autolab, 663VA *Stand*

También se usaron balanzas analíticas (precisión $\pm 0,0001$ g) *Mettler*, pH-metro para ajustar el pH de las disoluciones analíticas, micropipetas, material de vidrio aforado, baño de ultrasonidos, Eppendorf y otros materiales de laboratorio.

2.3 Procedimiento experimental

2.3.1 Preparación de las muestras

Se toman los volúmenes necesarios de la disolución matriz con la micropipeta y se llevan a un volumen total de 15 mL, completándolo con la disolución de tampón Britton-Robinson. Las disoluciones preparadas para todos los electrodos son de 0,25mM, 0,5mM, 0,75mM, 1mM y 1,5mM. Las medidas de estas disoluciones se hicieron en todos los casos por duplicado.

2.3.2 Preparación de los electrodos

En el caso del electrodo de mercurio en los primeros días de trabajo hubo que montar el equipo nuevo siguiendo las especificaciones del fabricante. Para el uso de este electrodo antes de realizar cualquier medida hay que asegurarse de que la fuente de nitrógeno que hace que se pueda formar la gota de mercurio este encendida, tras esta operación hay que limpiar cuidadosamente los electrodos con agua miliQ que se encuentran en el stand, así como la cubeta en las que se van a añadir las disoluciones. Se seca la cubeta y los electrodos y se elige el tamaño de gota de mercurio en el que se quiera trabajar. Se entra al programa con el que se aneja el electrodo y se crea la primera gota para poder realizar la medida. Una vez concluida la medida hay que tener precaución porque el mercurio no puede caer por la fregadera, por su carácter tóxico y contaminante.

En el caso del electrodo de GC se lavaron cuidadosamente los tres electrodos con agua miliQ. El electrodo de trabajo se lava con una disolución 1:10 de HNO₃ en el que el antibiótico es más

soluble, para posteriormente pulirlo sobre un filtro en el que se añade albúmina ($0,05\ \mu\text{m}$ de diámetro). Con ello conseguimos eliminar cualquier resto de antibiótico que pudiera estar impregnado en el electrodo. es el principal inconveniente de este electrodo, es necesario su pulido para regenerar y limpiar totalmente su superficie de medidas anteriores.

Cuando este electrodo se modifica con los nanotubos de carbono o nanopartículas de Ag, no se puede realizar esta operación ya que eliminaríamos la capa que contiene el compuesto con el que lo hemos modificado, por lo que simplemente se lavaron cuidadosamente con agua MiliQ.

2.3.3. Caracterización de los electrodos

Para saber si se puede usar cada uno de los electrodos para la oxidación y/o reducción del ENRO, y dado los potenciales extremos que son necesarios en algunos casos, es preciso conocer la ventana de potencial de cada uno de estos electrodos en los distintos medios electrolito soporte. De esta forma, se comprobó si se oxidan o reducen antes de lo que haga el propio antibiótico. Se empleó preferentemente medidas de caracterización electroquímica de voltametría cíclica.

Con el tampón Britton-Robinson se obtuvieron las mejores cuantificaciones del ENRO, no dando corrientes voltamétricas en un intervalo de potenciales muy amplio. Para comprobarlo, se hicieron barridos cíclicos a potenciales muy altos de oxidación y reducción con una velocidad de barrido $V = 0,05\ \text{Vs}^{-1}$ para el electrodo GC y se corroboró con voltametría por pulso diferencial (barrido mucho más sensible) con velocidad de barrido de potenciales $v = 0,01\ \text{Vs}^{-1}$ y ΔE_{step} (variación de potencial escalonado) $= 0,002\ \text{V}$. El procedimiento en HMDE fue muy parecido, pero se estudió por voltametría de barrido lineal para la oxidación y reducción con velocidad $v = 0,04\ \text{Vs}^{-1}$ y $\Delta E_{\text{step}} = 0,02\ \text{V}$. Los voltagramas obtenidos se muestran en las Figs. X-X. Como es conocido, el electrodo de mercurio proporciona picos anódicos de corriente, por su fácil oxidación a potenciales muy pequeños, del orden de $+0,1\ \text{V}$ (vs. Ag/AgCl).

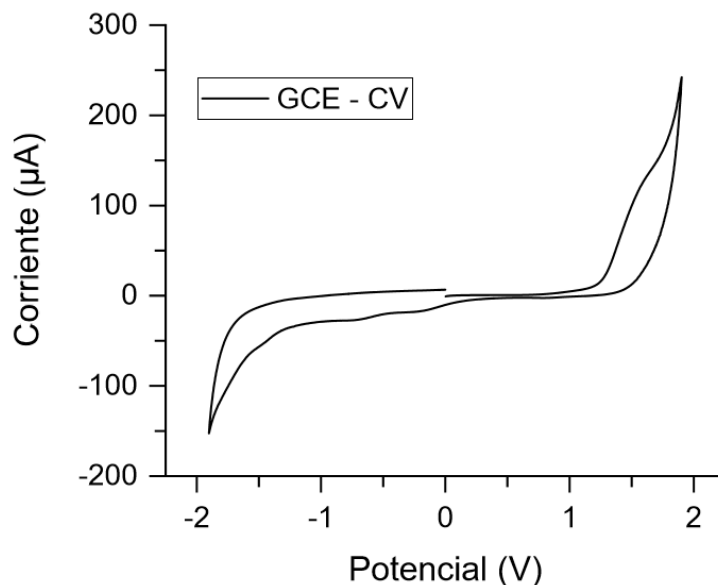


Figura 4. Test ventana de potencial mediante CV en tampón Britton-Robinson para el electrodo de carbón vítreo.

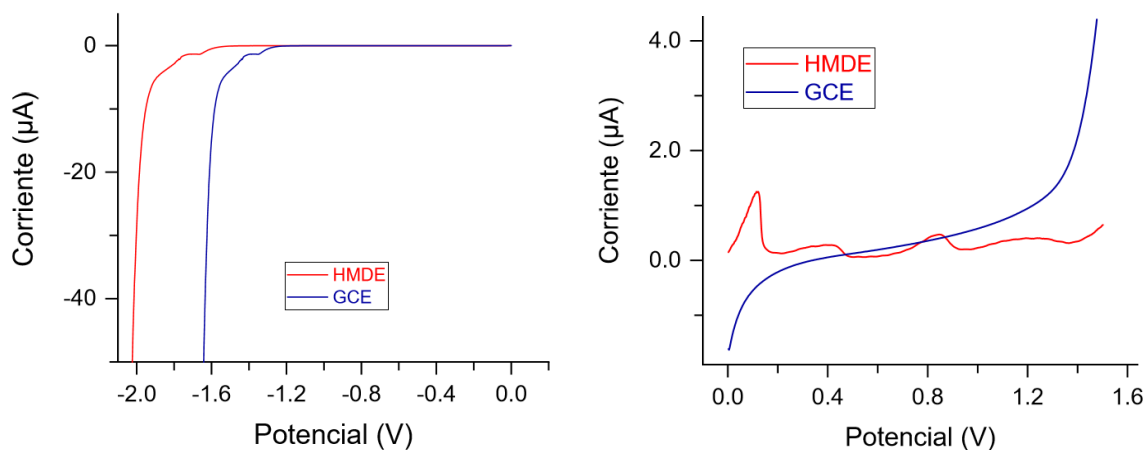


Figura 5. Test ventana de potencial mediante DP para electrodo de GC y LVS para electrodo HMDE en tampón Britton-Robinson.

Cómo se ve en las figuras 5 el electrodo GC tiene una buena ventana de potencial de -1,8 V a 1,3 V, es decir de un valor muy grande de 3,1 V y se puede usar para la determinación del antibiótico tanto para potenciales de oxidación y reducción, pero para HMDE la ventana de potencial es menor, porque se reduce a mayores potenciales, pero se oxida muy rápido. Su ventana de potencial es de -2,0 V a 0,5 V que es una buena ventana de potencial, pero solo se puede usar para la determinación a potenciales anódicos. El propio mercurio se oxida muy fácilmente a potenciales pequeños.

2.3.4. Modificación en los electrodos

Se realizaron modificaciones en el electrodo de carbono vítreo para ver si se podía mejorar la sensibilidad o aparición de nuevos picos de ENRO. Se usaron dos tipos de nanocompuestos para la modificación, nanopartículas de oro (AuNPs) y nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) que pertenece a la clase de materiales carbonosos con excelentes propiedades fisicoquímicas, termomecánicas y electroquímicas.

Nanopartículas de oro

Para la preparación de las AuNPs, se toma la dispersión de nanopartículas 0,05 mg mL⁻¹ que se encuentran en el frigorífico y se prepara una disolución en un Eppendorf. Para ello se lleva la dispersión al sonicador y se prepara una disolución con agua MiliQ (1:10, v/v). La disolución debe guardarse en el refrigerador para su mejor conservación.

Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono se encuentran en estado sólido por lo que se pesan 0,5 mg de este sólido y se disuelven en 0,5 ml de una disolución DMF:H₂O, 1:1(v/v). Se llevan a un Eppendorf que se debe guardar también en el refrigerador para poder volver a utilizarse. Se obtuvo una dispersión, por su baja solubilidad en agua, por lo que siempre que se utilizó se dispersó en untrasonidos durante 10-15 minutos. En ambos casos el depósito de los MWCNTs y AuNPs se realizó de la misma manera, tomando la dispersión preparada y se lleva entre 10 o 15 minutos al

sonicador para que la dispersión sea homogénea, con micropipeta se tomaron 5 μL del agente modificante y se depositaron sobre el electrodo de carbón vítreo. Se dejó secar al aire durante varias horas o más rápidamente con ayuda de una corriente suave de nitrógeno para acelerar el secado.

2.3.5. Optimización de la determinación voltamétrica del antibiótico

Al comienzo de la realización del trabajo se prepararon tres tipos de disoluciones tampón, con diferentes valores de pH. En el electrodo de mercurio también se pudo elegir diferentes tamaños de gota. Ante esta situación se realizaron una serie de experimentos para ver cuáles eran las condiciones más óptimas para las medidas de nuestro antibiótico.

Influencia de la disolución tampón

Al comienzo se prepararon tres tipos de tampón, Fosfato, Britton-Robinson y HEPES, para ver cuál era el más adecuado se realizaron voltagramas con solo la presencia de los tampones en el mismo pH (pH=7) para comprobar si alguno producía alguna señal en la ventana de potencial de alguno de los electrodos, así como si influía en la ventana de potencial. Tras esta operación también se comprobó si el tampón influía en la señal del antibiótico, para ambos electrodos se tomaron concentraciones de ENRO de 0,5mM.

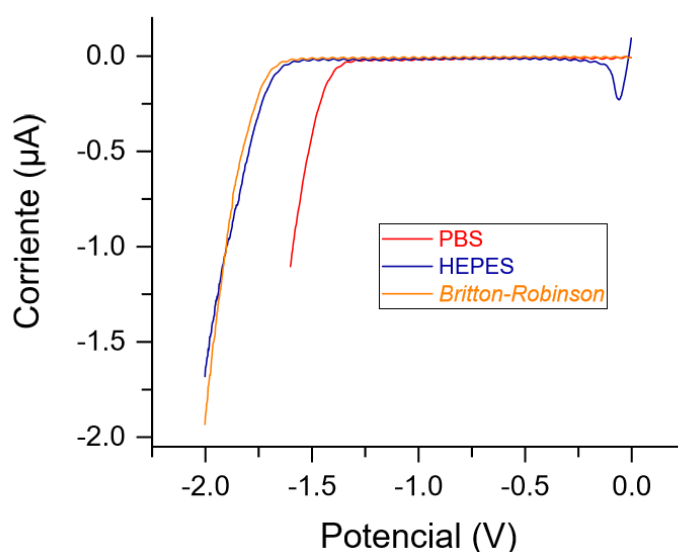


Figura 6. LSV con electrodo HMDE para cada uno de los tampones sin añadir ENRO.

$V = 0,04 \text{ Vs}^{-1}$ Step = $0,02 \text{ V}$

Como se ve en la figura, el tampón HEPES da un pequeño pico a bajos potenciales, pero como se tenían tres tampones se descartó para la determinación del analito, los restantes se siguieron haciendo pruebas con el electrodo GC.

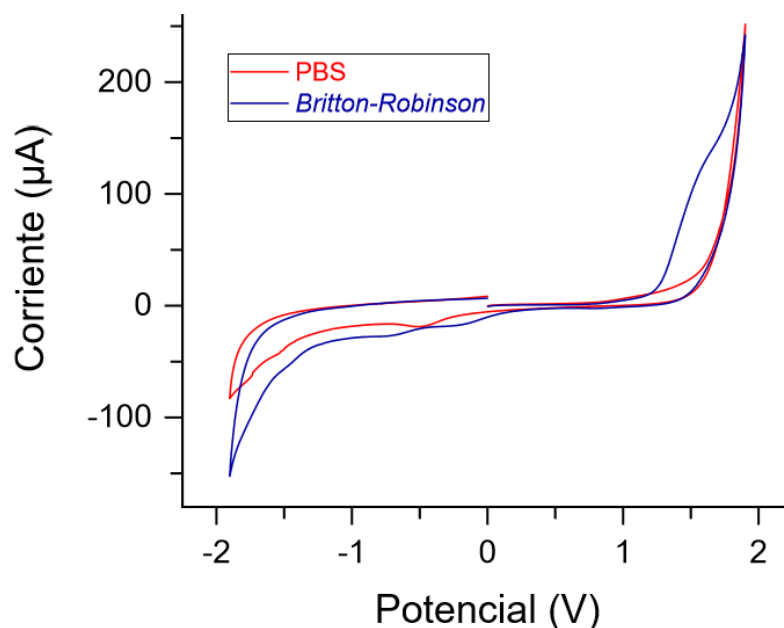


Figura 7. CV con electrodo GC para tampones PBS y B-R sin añadir ENRO. $V = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$

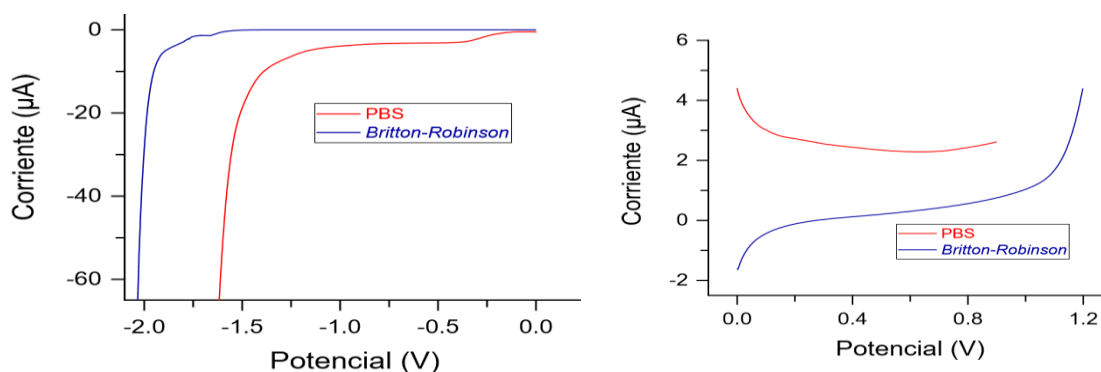


Figura 8. DP con electrodo GC para la oxidación y reducción con tampones PBS y B-R sin añadir ENRO. $V = 0,01 \text{ Vs}^{-1}$ Step = $0,02 \text{ V}$.

A la vista de los resultados y que las diferencias entre las señales con 0,5 mM de ENRO en cada uno de los tampones era mínima se decidió tomar como tampón el Britton-Robinson para todos los electrodos como se había visto en varios artículos científicos, ya que HEPES da una señal en el blanco de reducción del HMDE y entre B-R y PBS hay poca diferencia, pero a potenciales catódicos se aprecia un pequeño hombro en PBS por lo que se consideró como óptimo la disolución tampón B-R.

Influencia del pH

Una vez se había elegido el tampón que se iba a utilizar se realizaron voltagramas con ese tampón, pero variando el pH. Se eligieron pH de 3, 6.1 y 9 ya que ENRO tiene $\text{pK}_{a1} = 3,85$, $\text{pK}_{a2} = 6,0$ y $\text{pK}_{a3} = 7,59$. Este estudio se realizó con el electrodo de mercurio (HMDE), pero como se quieren comparar con el electrodo de GC se usaron las mismas condiciones para todos los electrodos. Las disoluciones estudiadas tuvieron una concentración de ENRO de 0,1mM.

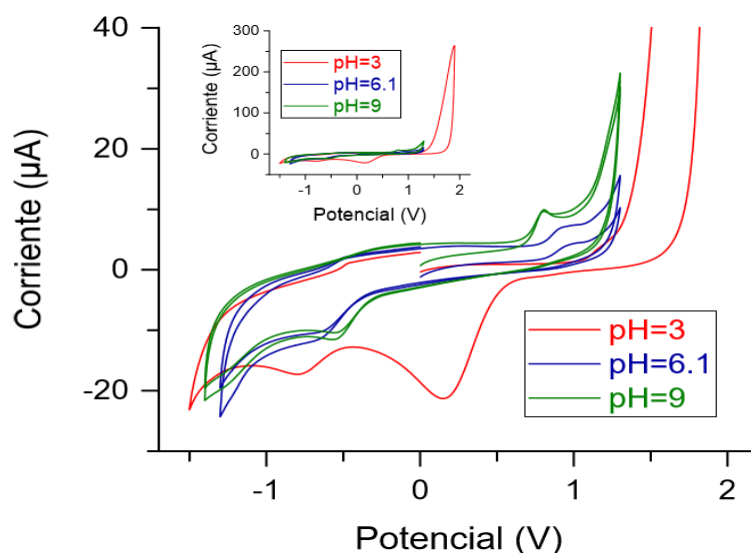


Figura 9. Disolución ENRO 0,1 mM a diferentes pHs de tampón B-R. CV con electrodo GC. $V = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$

A la vista de los resultados se descartó usar el pH más ácido ya que desplazaba mucho las señales y viendo que las variaciones entre pH 6,1 y 9 no eran muchas para esta pequeña concentración de ENRO ya que por encima de pH 6,0, el potencial máximo casi se vuelve independiente del pH se decidió usar el pH=7, intermedio entre 6,1 y 9 siguiendo las instrucciones de la bibliografía que se tenía disponible.

Efecto del tamaño de gota en el electrodo de mercurio (HMDE)

En el *stand* de Methrom se puede elegir el tamaño de gota (superficie de contacto del mercurio con la disolución) que se forma en el electrodo de mercurio y esta influye en la señal que produce el analito en el voltograma, el área puede variar entre $0,15 \text{ mm}^2$ a $0,60 \text{ mm}^2$ y su diámetro entre 0,44 y 0,88 mm por lo que se realizaron voltagramas con la misma concentración de ENRO (0,1mM) pero a diferentes tamaños de gota para ver cuál era la influencia de esta. En el blanco no afecta ya que no aparece ninguna señal en los voltagramas.

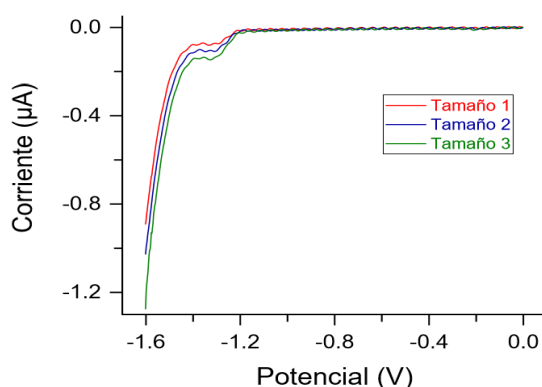


Figura 10. LSV sobre disolución 0,1 mM de ENRO con electrodo HMDE a diferentes tamaños de gota de mercurio.

Las diferencias entre las señales son pequeñas, pero algo mayores para el tamaño de gota más grande ya que al tener más superficie puede absorber mayor cantidad de ENRO y la señal es mayor, por lo que se usó este diámetro de gota (0,88 mm) para la determinación y cuantificación de ENRO.

2.3.6 Medidas voltamétricas

Todos los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Para la cuantificación de ENRO con el electrodo de GC ya sea modificado o sin modificar, se utilizó una celda electroquímica en la que se introduce una cantidad conocida de la disolución patrón de ENRO con el tampón Britton-Robinson, junto a los electrodos de referencia y auxiliar. En el caso del electrodo de mercurio las disoluciones de ENRO se introducen en la cubeta que lleva el propio *stand* del aparato y se cierra herméticamente para poder desoxigenar la celda con nitrógeno. En ambos casos tras cada medida hay que limpiar con mucho cuidado cada uno de los electrodos con agua MiliQ y secarlos con ayuda de papel de laboratorio. En el caso del GC desnudo tras cada medida hay que pulirlo con ayuda de albúmina. Las concentraciones utilizadas para las mediciones tienen concentraciones entre 0,25mM y 1,5mM.

3. Resultados y discusión

3.1. Detección y cuantificación de Enrofloxacin con electrodo de gota pendiente de mercurio (HMDE)

En la caracterización de este electrodo se comprobó que su ventana de potencial es de -2,0 V a 0,5 V como se ve en la figura 5. Esto hace que para este electrodo solo se estudie el antibiótico a potenciales negativos (reducción), ya que en potenciales positivos (oxidación), el propio mercurio se oxida antes que el analito como se ha visto anteriormente. Para la determinación y cuantificación con este electrodo se realizaron disoluciones con concentración creciente de ENRO (0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 mM). Se estudió por LSV con una velocidad de $0,04 \text{ Vs}^{-1}$ (para mejorar la sensibilidad) dando los siguientes voltagramas:

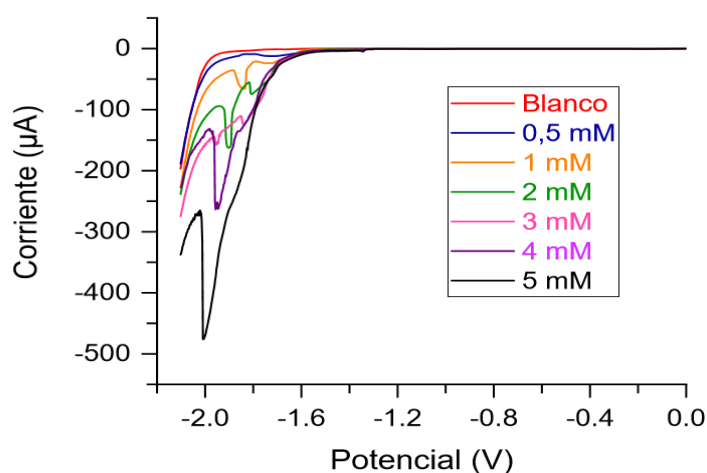


Figura 11. LSV en HMDE a diferentes concentraciones de ENRO. $V = 0,04 \text{ Vs}^{-1}$
Step = 0,02V

Se observa un aumento de corriente en la señal al aumentar la concentración de ENRO en la disolución. También se observa un ligero desplazamiento del pico hacia potenciales más negativos. Estas señales se deben a la presencia de ENRO ya que en la disolución blanco no se observaba ninguna señal.

[ENRO](mM)	Posición(V)	Altura(μ A)	Area (μ C)
0.5	-1.70	7,03	1,11
1	-1.84	42,3	1,40
2	-1.82	84,9	3,29
3	-1.95	156	10,0
4	-1.98	185	16,4
5	-2.00	230	25,4

Tabla 1. Datos recta de calibrado con electrodo HMDE reducción

A partir de los siguientes datos se elaboró una recta de calibrado para estudiar la relación entre las alturas y áreas de pico con la concentración.

(1) Señales de i_p (μ A): $y = 49,64x - 11,05$ ($R=0,9883$)

(2) Señales de A_p (μ C): $y = 5,30x - 3,81$ ($R = 0,9558$).

La ecuación de la recta de calibrado de las áreas posee menor coeficiente que la de las alturas de pico. El límite de detección y cuantificación son 0,03 mM; 0,1 mM y la sensibilidad de electrodo es alta 49,64 μ A mM⁻¹ en el caso de las alturas de pico.

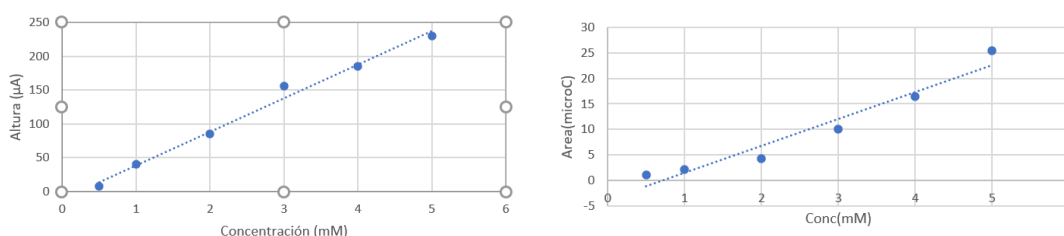


Figura 12. Rectas de calibrado para área y altura de señal frente a la concentración de ENRO con electrodo HMDE

Los picos observados en el voltograma son debidos a la reducción del anillo piperazinilo posiblemente, aunque no se ha encontrado detalladamente la forma de reducción del al ENRO, todo apunta a que el anillo de piperazinilo es el grupo funcional responsable de la electroactividad catódica del ENRO [4]

3.2. Detección y cuantificación de Enrofloxacin con electrodo de carbón vítreo (GC).

La ventana de potencial obtenida para *Glassy Carbon* (GCE) es de -1,8 V a 1,3 V, un total de 3,1 V aproximadamente como se observa en la figura 4. Esta ventana de potencial es mucho mayor que para el caso de HMDE y además se oxida a potenciales mayores que el electrodo de

mercurio por lo que sí se pudo emplear para la determinación y cuantificación de ENRO a potenciales muy anódicos. Con este electrodo también se realizó una recta de calibrado, pero a menores concentraciones de ENRO ya que en el caso de HMDE las concentraciones eran muy altas y la pendiente de la recta de calibrado era más alta que lo que se había consultado en la bibliografía. Además, en el caso de la determinación y cuantificación del analito en aguas naturales las concentraciones posiblemente sean menores que las usadas para el electrodo de mercurio.

Las concentraciones usadas en este caso fueron de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 y 1,25 mM para la oxidación como para la reducción. En la figura se aprecia como en el blanco no aparece ninguna señal, y en las que se ha añadido ENRO sí que aparece una señal que crece al aumentar la concentración de ENRO. Los voltagramas medidos permiten la cuantificación sensible del antibiótico.

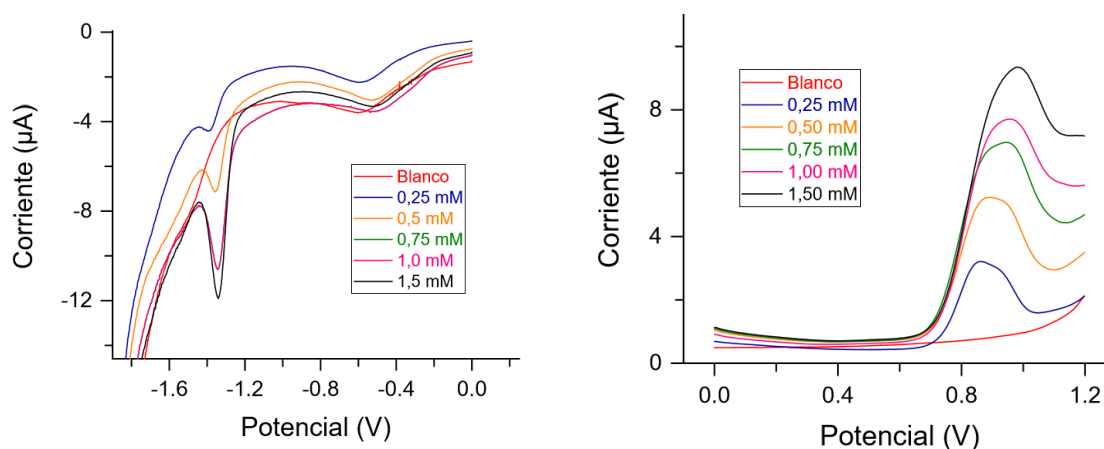


Figura 13. DPV en GC a diferentes concentraciones de ENRO a potenciales de reducción y oxidación. $V = 0,01 \text{ Vs}^{-1}$ Step = $0,02 \text{ V}$.

Los datos de esas señales se muestran en las siguientes tablas:

[ENRO](mM)	Posición(V)	Altura(µA)	Area (µC)
0	0	0	0
0.25	-1.38	0,97	0,079
0.5	-1.35	2,21	0,181
0.75	-1.35	3,31	0,278
1	-1.34	4,45	0,399
1.5	-1.34	6,20	0,563

Tabla 2. Datos recta de calibrado en electrodo GC en reducción

A partir de estos datos y al igual que en electrodo de mercurio se estudió la linealidad del aumento de concentración frente al aumento de alturas y áreas de las señales en los voltagramas. En un ajuste lineal por mínimos cuadrados se calcularon los siguientes parámetros de calibrado:

(1) Señales de i_p (μA): $y = 4,2191x + 0,0441$ ($R=0,9963$)

(2) Señales de A_p (μC): $y = 0,3855x - 0,007$ ($R = 0,9969$).

Su límite de detección y cuantificación es de 0,18 mM y 0,59 mM respectivamente. La sensibilidad es de $4,22 \mu A \text{ mM}^{-1}$.

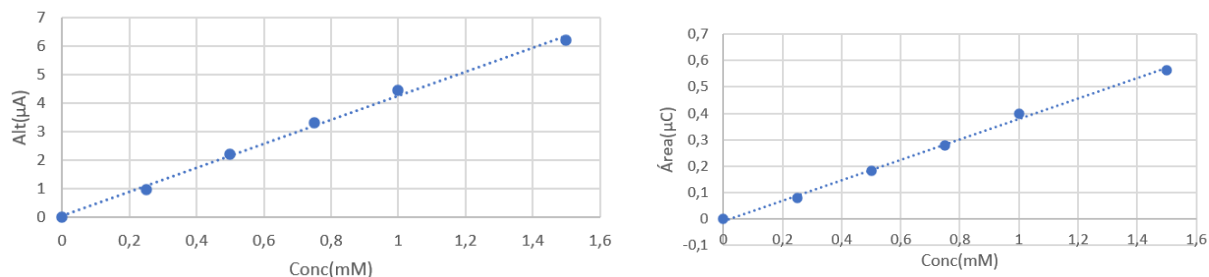


Figura 14. Rectas de calibrado para área y altura de señal frente a la concentración de ENRO con electrodo GC a potenciales anódicos.

Se siguió el mismo procedimiento para potenciales anódicos en el que también aparece una señal en el voltograma debida a la oxidación de la ENRO, ya que en el blanco no aparece ninguna señal como se observa en la figura 13. Los datos de la altura y áreas para la oxidación de ENRO se representan en la siguiente tabla.

[ENRO](mM)	Posición(V)	Altura(μA)	Area (μC)
0	0	0	0
0.25	0.85	1,90	0,42
0.5	0.87	3,36	0,71
0.75	0.89	4,25	1,03
1	0.90	5,00	1,43
1,5	0.92	6,89	1,82

Tabla 3. Datos recta de calibrado en electrodo GC en oxidación

El mecanismo de oxidación de ENRO se encuentra más estudiado en la bibliografía, y se produce a través de las reacciones electroquímicas mostradas en la figura 15.

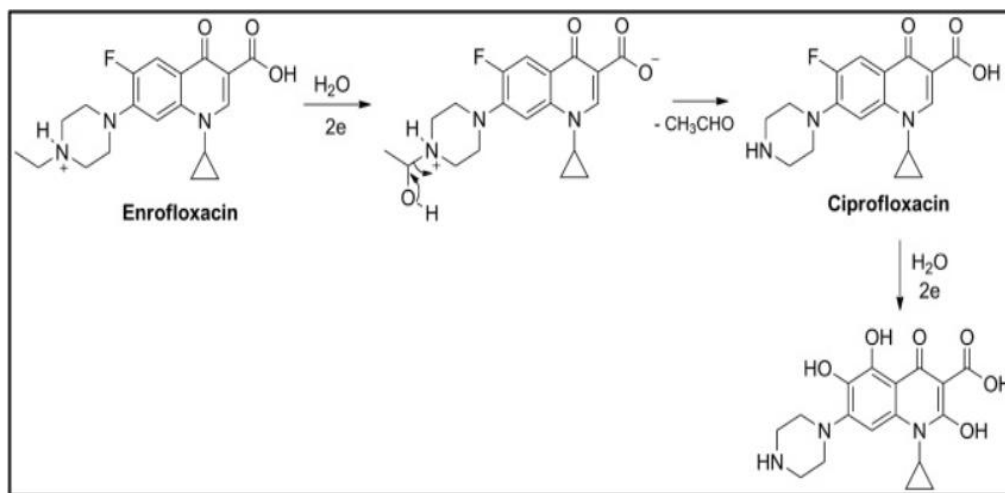


Figura 15. Mecanismo propuesto para la electro-oxidación de ENRO sobre el electrodo de GC en disolución tampón B-R

En un ajuste lineal por mínimos cuadrados se calcularon los siguientes parámetros de calibrado:

- (1) Señales de i_p (μA): $y = 4,396x + 0,636$ ($R=0,9682$)
- (2) Señales de A_p (μC): $y = 1,2245x + 0,085$ ($R = 0,9848$).

Como se puede comprobar tanto la sensibilidad como los valores de R son muy parecido para los casos de oxidación y reducción usando el mismo electrodo, son valores aceptables muy cercanos a la unidad. Su límite de detección y cuantificación es de 0,17 mM y 0,56 mM respectivamente. La sensibilidad es de $4,40 \mu A \text{ mM}^{-1}$, elevada, y que permite la cuantificación muy sensible del ENRO en este medio y con este electrodo.

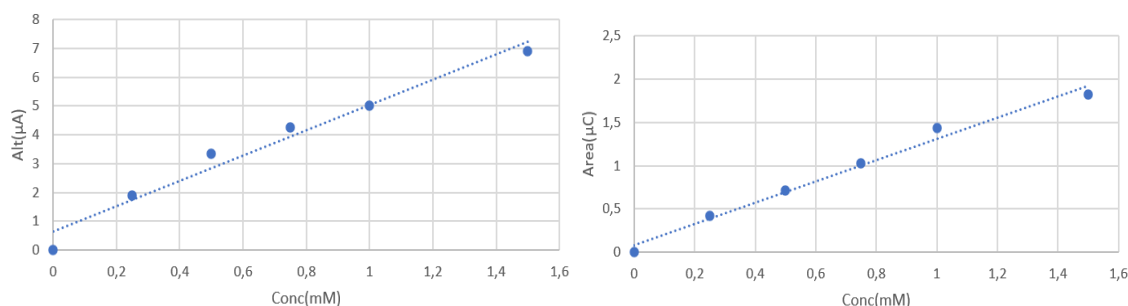


Figura 16. Rectas de calibrado para área y altura de señal frente a la concentración de ENRO con electrodo GC a potenciales catódicos.

Se observa que las señales no se desplazan con una mayor concentración de ENRO. Esto se explica en parte pues que para disolver ENRO se utiliza ácido, y los potenciales de pico se desplazan con el pH, siendo la capacidad amortiguadora insuficiente para tamponar el pH con mayores concentraciones de ENRO (y de ácido). Es evidente también que esta reducción depende del pH al variar el potencial con la concentración de protones en las disoluciones, siendo ésta su mayor influencia.

3.3. Detección y cuantificación de Enrofloxacin con electrodo de carbón vítreo modificado.

El electrodo de carbón vítreo se modificó con nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs) y nanopartículas de oro para mejorar la determinación y cuantificación voltamétrica de ENRO con respecto al GC sin modificar. No se estudió la ventana de potencial, la misma que con el electrodo sin modificar ya que la modificación no influye en la oxidación o reducción del electrodo [25]. Para potenciales catódicos los voltagramas de ENRO que se obtuvieron y sus valores cuantitativos se muestran en la figura 17 y en la tabla 4.

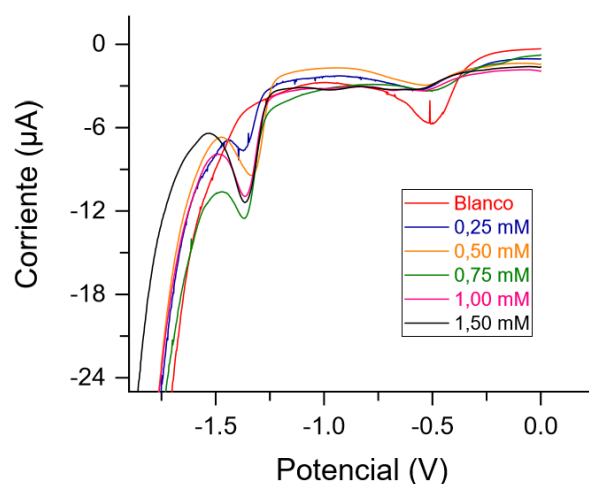


Figura 17. DPV en GC modificado con MWCNTs a diferentes concentraciones de ENRO a potenciales de reducción. $V = 0,01 \text{ Vs}^{-1}$ Step = $0,02 \text{ V}$.

[ENRO](mM)	Posición(V)	Altura(µA)	Area (µC)
0	0	0	0
0,25	-1.39	2,53	0,213
0.5	-1.33	4,67	0,456
0.75	-1.36	6,36	0,682
1	-1.36	7,91	0,811
1,5	-1.36	9,69	0,976

Tabla 4. Datos recta de calibrado en electrodo GC+MWCNTs en reducción

A partir de los datos de la tabla 4, con un ajuste lineal por mínimos cuadrados se calcularon los siguientes parámetros de calibrado:

(1) Señales de i_p (µA): $y = 6,5663x + 0,8491$ ($R=0,9654$)

(2) Señales de A_p (µC): $y = 0,6691x + 0,0769$ ($R = 0,9495$).

En el estudio del límite de detección y cuantificación, calculados como las menores concentraciones que dieron una señal debida al ENRO (3X y 10X desviación estándar del blanco como pico significativo de corriente), es de 0,11 mM y 0,38 mM respectivamente. La sensibilidad (pendiente del calibrado) es de $6,57 \mu\text{A mM}^{-1}$.

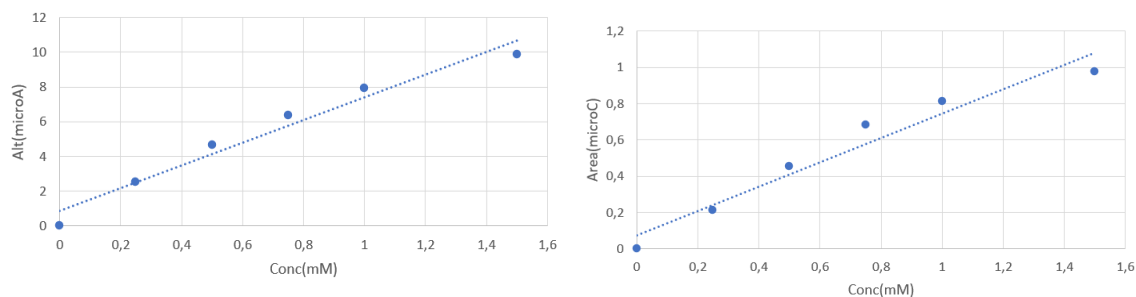


Figura 18. Rectas de calibrado para área y altura de señal frente a la concentración de ENRO con electrodo GC + MWCNTs a potenciales anódicos.

Los voltagramas anódicos con el mismo electrodo modificado, se representan en la gráfica:

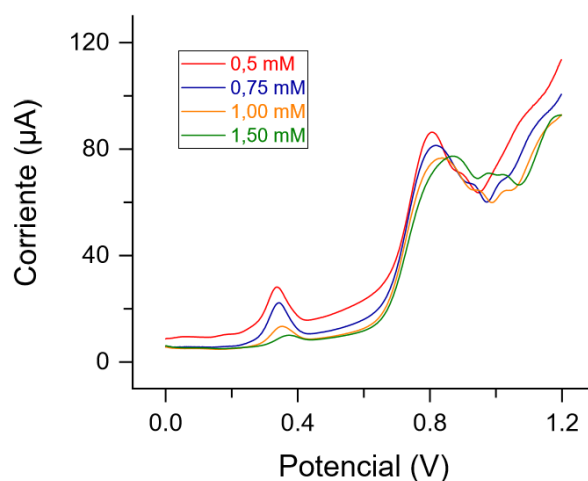


Figura 19. DPV en GC modificado con MWCNTs a diferentes concentraciones de ENRO a potenciales de oxidación. $V = 0,01 \text{ Vs}^{-1}$ Step = $0,02 \text{ V}$.

Los voltagramas con los electrodos modificados con nanotubos de carbono mostraron nuevos picos, debido a la electrocatálisis producida con la nanoestructuración y al aumento de sensibilidad producido. Es de esperar que los mecanismos de la oxidación sean distintos que el electrodo sin modificar, a diferencia de las disoluciones blanco con el mismo electrodo y disoluciones con ENRO. Para la cuantificación del antibiótico, se emplearon los picos mayores que aparecen a $E_p \sim +0,8 \text{ V}$. Si bien, con menor sensibilidad, aparece un pico no correspondiente a ENRO a $E_p \sim +0,34 \text{ V}$ que no varía con la concentración de ENRO ya que se modifica con el paso de las medidas de disolución tampón.

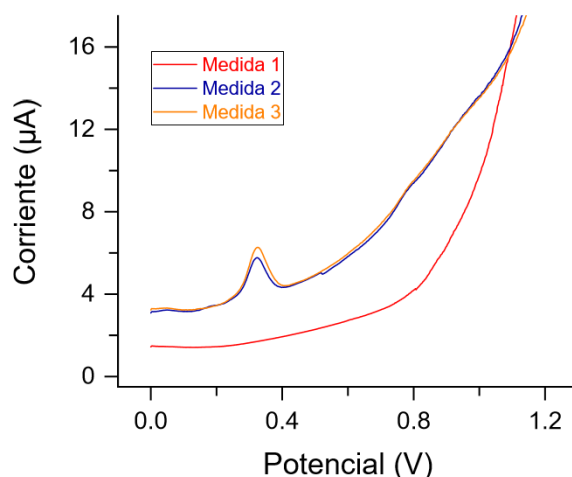


Figura 20. DPV en GC modificado con MWCNTs, varias medidas sobre blancos de tampón B-R. $V = 0,01 \text{ Vs}^{-1}$ Step = $0,02 \text{ V}$.

Los resultados de esta segunda señal ($E_p \sim +0,8 \text{ V}$) se representan en la siguiente tabla:

[ENRO](mM)	Posición(V)	Altura(µA)	Area (µC)
0	0	0	0
0.25	0.79	13,0	1,30
0.5	0.80	35,1	5,54
0.75	0.80	41,4	6,90
1	0.80	59,3	7,99
1,5	0.81	27,7	4,65

Tabla 5. Datos recta de calibrado en electrodo GC+MWCNTs en oxidación

En un ajuste lineal por mínimos cuadrados se calcularon los siguientes parámetros de calibrado:

(1) Señales de i_p (µA): $y = 58,8x + 0,36$ ($R=0,9808$)

(2) Señales de A_p (µC): $y = 8,232x + 0,43$ ($R = 0,9604$)

En ambos casos se ha eliminado el resultado anómalo que aparece a una concentración de 1,5 mM de ENRO, es debido a la pérdida de la nanoestructuración por la realización de varias medidas sin volver a modificar el electrodo.

Se calcularon valores de límite de detección y cuantificaciones de 0,01 mM y 0,04 mM respectivamente. La sensibilidad voltamétrica fue $58,8 \mu\text{A mM}^{-1}$.

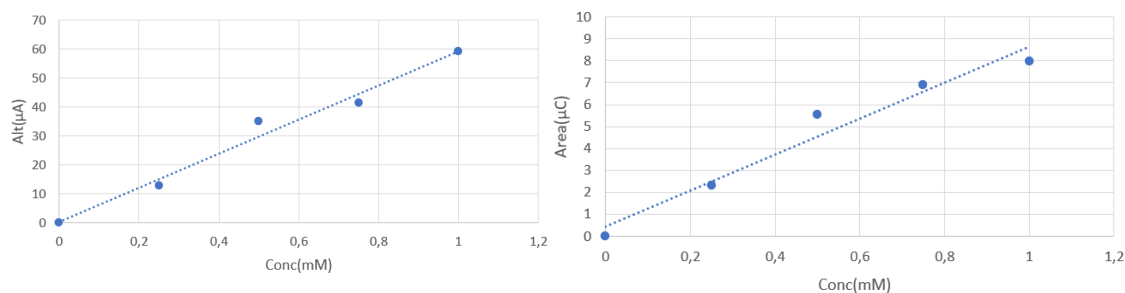


Figura 21. Rectas de calibrado para área y altura de señal frente a la concentración de ENRO con electrodo GC + MWCNTs en barridos de potencial catódicos.

Para comprobar cómo afecta a los voltagramas del ENRO la nanoestructuración del electrodo de trabajo, además de los nanotubos de carbono se ensayó la modificación de electrodos de carbono vítreo con nanopartículas de oro. Tanto en su reducción como en su oxidación. A priori, si bien las nanopartículas de oro podrían mejorar la transferencia de carga entre el electrodo y el antibiótico disuelto, y por lo tanto las corrientes de los voltagramas, su carácter hidrófilo no prevé un buen comportamiento sobre la molécula orgánica del antibiótico.

Los resultados se muestran en los voltagramas siguientes para concentraciones crecientes de un calibrado, y en las tablas 6 y 7, con los datos de las corrientes obtenidas.

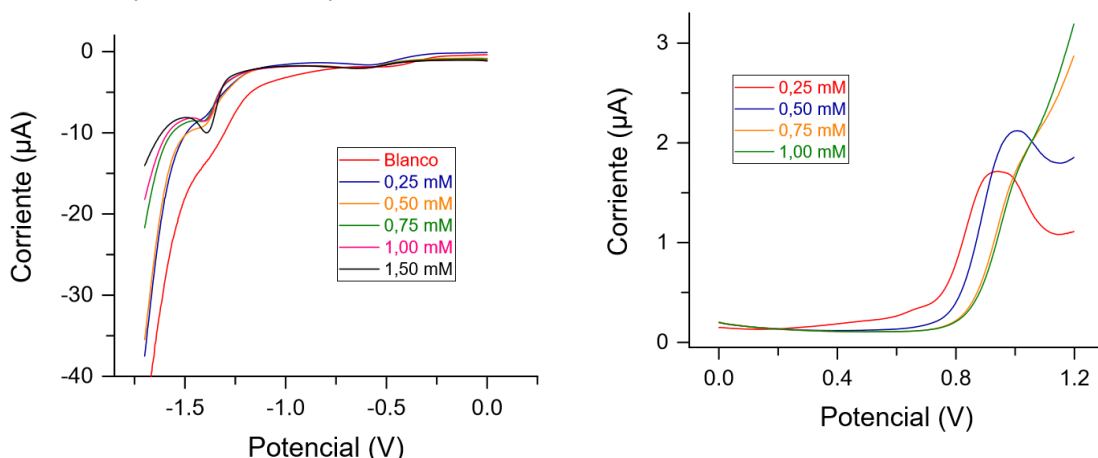


Figura 22. DPV en GC modificado con AuNPs a diferentes concentraciones de ENRO a potenciales de reducción y oxidación. $V = 0,01 \text{ Vs}^{-1}$ Step = $0,02 \text{ V}$.

Los resultados de los voltagramas de oxidación y reducción se presentan en las siguientes tablas:

ENRO(mM)	Posición(V)	Altura(μA)	Area (μC)
0	0	0	0
0.25	-1.30	0,464	0,0528
0.5	-1.39	1,28	0,111
0.75	-1.39	2,17	0,222
1	-1.39	2,67	0,277
1,5	-1.39	4,67	0,506

Tabla 6. Resultados de los máximos de corriente y potenciales de pico en medidas de concentraciones crecientes de ENRO sobre un electrodo de trabajo modificado GC-AuNPs, en un barrido catódico (reducción).

ENRO(mM)	Posición(V)	Altura(μA)	Area (μC)
0	0	0	0
0.25	0.91	1,00	0,221
0.5	0.97	1,04	0,206
0.75	0	0,0194	0,0146
1	0	0,0243	0,0158
1,5	0	0,0250	0,0238

Tabla 7. Valores E_p e i_p de los voltagramas con concentraciones crecientes de ENRO sobre un electrodo de trabajo modificado GC-AuNPs, en un barrido anódico (oxidación).

Como se ve tanto en la tabla cómo en los voltagramas se puede realizar rectas de calibrado para la reducción, pero no para la oxidación ya que la señal se pierde al realizar varias medidas, solo permitió a concentraciones de 0,25 mM y 0,5 mM. Para las demás concentraciones simplemente aparece un pequeño hombro por lo que no se pudo cuantificar ENRO con esta técnica.

Las corrientes anódicas de los voltagramas con electrodos GC-AuNPs se perdieron al cabo de pocas medidas, probablemente por la oxidación de las propias nanopartículas de oro en estas condiciones y a potenciales muy altos. En el calibrado de los voltagramas catódicos, se calcularon las siguientes ecuaciones de calibrado en altura y área de pico:

En un ajuste lineal por mínimos cuadrados al igual que para el resto de electrodos se calcularon los siguientes parámetros de calibrado para potenciales catódicos:

(1) Señales de i_p (μA): $y = 3,124x - 0,207$ ($R=0,9889$)

(2) Señales de A_p (μC): $y = 0,3374x - 0,0301$ ($R = 0,9794$)

Su límite de detección y cuantificación es de 0,24 mM y 0,80 mM respectivamente. La sensibilidad es de $3,12 \mu A \text{ mM}^{-1}$.

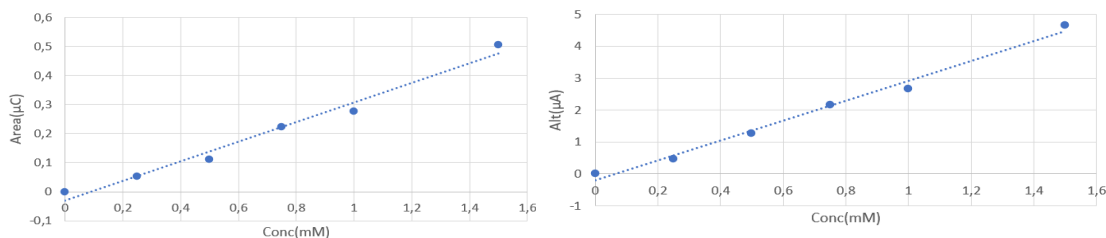


Figura 23. Rectas de calibrado para área y altura de señal frente a la concentración de ENRO con electrodo GC + AuNPs a potenciales anódicos.

Como conclusión, comparando con los nanotubos de carbono, la modificación con nanopartículas de oro no mejora las propiedades analíticas. Además de la pérdida de la capa

inmovilizada en barridos anódicos a medida que se usa repetidamente. Durando, apenas, cinco o seis medidas en estas últimas condiciones, después de las cuáles es preciso inmovilizar nuevamente las nanopartículas del electrodo para mantener su carácter electrocatalítico.

Al objeto de estudiar los tiempos de vida de cada tipo de electrodo, y la reproducibilidad de las medidas, se empleó una disolución de 0,5mM de ENRO y se realizaron 5 medidas seguidas para ver como variaba la señal en cada medida, para GCE se pudo pulir y limpiar a fondo el electrodo sin embargo para las modificaciones solo se puede limpiar con sumo cuidado con agua para no perder la superficie modificadora. Tanto para electrodos químicamente modificados como electrodos GC sin modificar.

Los valores de reproducibilidad fueron:

(1) 2,46%DSR para el electrodo GC; (2) 11,24%DSR para el electrodo GC-MWCNTs; y (2) 21,96%DSR para el electrodo GC-AuNPs. Con lo que se demuestra que la reproducibilidad es mejor para el electrodo sin modificar, y además se puede regenerar mediante pulido fácilmente y en poco tiempo. Sin embargo, tanto con los MWCNTs como con las AuNPs (mucho más en este 2º caso, por su mayor solubilidad), la capa de nanoestructuración sobre la superficie del electrodo de carbón vítreo se pierde con el uso, perdiendo sus propiedades electrocatalíticas y de aumento de la superficie del electrodo, que produce mayores corrientes.

3.4. Comparación de los distintos electrodos utilizados

Para la comparación entre los distintos electrodos que hemos estudiado, se va a dividir entre la determinación y cuantificación a potenciales anódicos y a potenciales catódicos.

3.4.1 Comparación electrodos reducción.

En el caso de la reducción se va a comparar el electrodo de HMDE con concentraciones 0; 0,5; 1; 2; 3; 4; y 5 mM y los electrodos GC con y sin modificación con concentraciones 0; 0,25; 0,75; 1 y 1,5 mM. Las concentraciones no son las mismas, pero sirve para comparar con la sensibilidad de la recta de calibrado y las concentraciones que sí coinciden.

	HMDE	GC	GC+AuNPs	GC+MWCNTs
	7,03(0,5mM)	0	0	0 (0mM)
	42,3 (1mM)	0,97	0,464	2,53(0,25mM)
	84,9 (2mM)	2,21	1,28	4,67 (0,5mM)
	156 (3mM)	3,31	2,17	6,36(0,75mM)
	185 (4mM)	4,45	2,67	7,91 (1,0mM)
	230 (5mM)	6,20	4,67	9,69 (1,5mM)
Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)	49,64	4,22	3,12	6,57

Tabla 8. Comparación altura de señal (μA) de los diferentes electrodos en reducción. Entre paréntesis se indica la concentración en mM

	HMDE	GC	GC+AuNPs	GC+MWCNTs
	1,11(0,5mM)	0	0	0 (0mM)
	1,40 (1mM)	0,079	0,0528	0,21(0,25mM)
	3,29 (2mM)	0,181	0,111	0,456(0,5mM)
	10,0 (3mM)	0,278	0,222	0,68(0,75mM)
	16,4 (4mM)	0,399	0,277	0,811(1,0mM)
	25,4 (5mM)	0,563	0,506	0,976(1,5mM)
Sensibilidad ($\mu C\text{ mM}^{-1}$)	5,30	0,385	0,337	0,669

Tabla 9. Comparación área de señal (μC) de los diferentes electrodos en reducción. Entre paréntesis se indica la concentración en mM

Como se ve en las tablas comparativas y a pesar de no tener las mismas concentraciones para HMDE y los demás electrodos, sí coinciden en las concentraciones de 0,5mM y 1mM. Para el caso de HMDE la altura y área de la señal es mucho mayor que para los demás electrodos. Esto coincide con que la sensibilidad obtenida de la pendiente de las rectas de calibrado para el HMDE es mucho mayor que para los electrodos de GC.

Si nos fijamos en las sensibilidades, tanto para las alturas o áreas de las señales, siguen un mismo patrón: son mucho mayores para HMDE seguidas por el electrodo GC modificado con MWCNTs, GC sin modificar y por último GC modificado con AuNPs. Esto se explica principalmente por la absorción de ENRO en cada uno de los electrodos, en el HMDE la absorción de ENRO es muy buena. De acuerdo a otros autores en la bibliografía consultada [19].

En el caso del electrodo GC-MWCNTs la absorción también es apreciable, debido a la presencia de huecos en la estructura de los nanotubos de carbono, grupos funcionales oxigenados que son electroactivos, una alta conductividad eléctrica, su específica estructura electrónica, así como su hidrofobicidad [23].

Para el electrodo GC sin modificar se consiguen buenas señales con una buena sensibilidad, pero por debajo de los ya mencionados y al modificarlos con AuNPs no se consigue mejorar las señales sino todo lo contrario, empeoran respecto al electrodo sin modificar, esto es debido a que no ayuda a la absorción de ENRO en su superficie y el problema de la pérdida de la capa de AuNPs ya mencionado anteriormente.

Otro punto a tener en cuenta es que, a pesar de los mejores resultados para el electrodo de mercurio, este es muy tóxico y hay que usarlo con especial cuidado para eliminar correctamente el mercurio utilizado para no dañar el medio ambiente. No obstante, las grandes ventajas del electrodo de mercurio, que sólo puede emplearse en procesos catódicos, es su gran facilidad de regeneración (se dispensan nuevas gotas del metal), su gran reproducibilidad de tamaño y área, y la alta sobretensión sobre la descarga de iones hidrógeno, que permite su uso hasta valores de potencial muy negativos.

3.4.2 Comparación electrodos oxidación.

Para barridos de potencial de oxidación solo se han obtenido señales para los electrodos GC, GC-MWCNTs y GC-AuNPs. En este último solo se han obtenido corrientes para dos concentraciones, como se ha explicado con anterioridad debido a la fácil pérdida de las nanopartículas de oro... Se comparan en la tabla 10 los valores de i_p para las mismas concentraciones de ENRO (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 y 1,5 mM) medidas con los 3 tipos de electrodos.

	Gc(alt)	Gc(área)	Gc+Au(alt)	GC+Au(área)	Gc+nanotubs (alt)	Gc+nanotus (área)
	0	0	0	0	0	0
	1,90	0,42	1,00	0,221	13,0	1,30
	3,36	0,71	1,04	0,206	35,1	5,54
	4,25	1,03	0,0194	0,0146	41,4	6,90
	5,00	1,43	0,0243	0,0158	59,3	7,99
	6,89	1,82	0,0250	0,0238	27,7	4,65
Sensibilidad ($\mu\text{A mM}^{-1}$)	4,40	1,22	-	-	58,8	8,23

Tabla 10. Comparación altura de señal (μA) y área (μC) de los 3 tipos de electrodos (GC, GC-MWCNTs, GC-AuNPs) en voltagramas anódicos (de oxidación) de las correspondientes concentraciones de ENRO.

El comportamiento de los tres electrodos en barridos anódicos es similar al ocurrido en los barridos anteriores catódicos. Aunque, de forma más acusada, el electrodo GC-AuNPs solamente puede emplearse en 2-3 medidas, perdiendo rápidamente su funcionalidad. El electrodo más sensible y que produce mayores corrientes es el electrodo modificado con nanotubos de carbono (GC-MWCNTs).

4. Conclusión

En este trabajo se han desarrollado procedimientos voltamétricos sensibles para la determinación y cuantificación de un contaminante emergente como es el antibiótico enrofloxacin. Estos procedimientos pueden ser empleados en forma de sensor, a través de la modificación nanoestructurada de la superficie de los electrodos de trabajo empleados, y para la detección y cuantificación rápida del ENRO.

Para ello se han utilizado diferentes electrodos como son HMDE, GC sin modificar y modificándolo con MWCNTs y AuNPs. Se ha comparado la eficiencia para la cuantificación de ENRO en cada uno de ellos para ver cuál es el electrodo que mejor se adapta al problema planteado.

Se optimizaron las variables para las medidas del analito, se comprobó cuál de los tampones preparados (Britton-Robinson, HEPES y PBS) funcionaba mejor con el analito propuesto a partir de los voltagramas blanco sin añadir ENRO, y las sensibilidades en los distintos tampones con la misma concentración de antibiótico.

También se comprobó la influencia del pH. La molécula de ENRO posee tres pK_a ($pK_{a1} = 3,85$, $pK_{a2} = 6,0$ y $pK_{a3} = 7,59$) debido al grupo carboxílico y el grupo piperazinil, por lo que sus reacciones voltamétricas dependen del pH a través de estos grupos funcionales. Para este estudio, se midieron los voltagramas del ENRO a valores de pH 3, 6,1 y 9, con la misma concentración de ENRO, y se comprobó cómo afectaba el pH a los voltagramas. Las diferencias pueden explicarse por cambios en la protonación de las funciones ácido-base en el resto del grupo piperazinilo básico. En el pH más ácido, el pico se desplaza mucho, pero por encima de pH 6,0, el potencial máximo casi se vuelve independiente del pH por ello se eligió pH = 7, un pH neutro que no afectara a la disolución.

Se estudio también la influencia del tamaño de gota en el electrodo de gota pendiente de mercurio (HMDE). Al igual que con las demás variables estudiadas, se tomó una disolución con la misma concentración de ENRO (0,1 mM) y se estudió el efecto de 3 tamaños de gota, que varían entre 0,44 y 0,88 mm de diámetro. La diferencia entre ellas era pequeña ya que el pico se mantenía en el mismo potencial y no afectaba al blanco. Se tomó como óptimo el mayor de los 3 tamaños 0,88 mm de diámetro y 0,60 mm² de área, dado que produjo las mayores corrientes debidas al ENRO por su mayor área que permite absorber mayor cantidad de ENRO en su superficie.

De los 3 tipos de disoluciones tampon ensayadas, el tampon Britton-Robinson en los distintos pHs produjo las mayores corrientes, comparadas con el tampon de fosfato PBS. El propio tampon HEPES dio corrientes en las disoluciones blanco, por lo que no se escogió su uso. De los tres pHs estudiados, la mejor sensibilidad se obtuvo a pH=7,0.

Se ha efectuado también un estudio electroquímico de las ventanas de electroactividad de los electrodos empleados y que han sido modificados, en las condiciones de electrolito soporte indicadas. En el caso del mercurio, puede emplearse entre los potenciales de +0,1 a -2,5 V, y para los electrodos GC y GC nanoestructurados pueden emplearse entre -1,8 V y + 1,3 V.

Se ha comparado la sensibilidad de los distintos tipos de electrodos, mediante calibrados con distintos intervalos de concentración de ENRO, y mediante el cálculo de los límites de detección y cuantificación, en las mismas condiciones de electrolito soporte y de pH en las disoluciones empleadas. Los resultados se resumen en la tabla adjunta.

	Ecuación de calibrado altura (μA)	Ecuación de calibrado área (μC)	R(altura-área)	Límite de detección	Límite de cuantificación
HMDE	$y=49,64x - 11,05$	$y=5,30x - 3,81$	0,998-0,956	0,03 mM	0,1 mM
GCE	$y=4,2191x +0,0441$	$y=0,3855x-0,007$	0,997-0,997	0,18 mM	0,59 mM
GCE-MWCNTs	$y=6,5663x+0,8491$	$y=0,6691x+0,077$	0,966-0,949	0,11 mM	0,38 mM
GC-AuNPs	$y=3,124x - 0,207$	$y=0,3374x-0,030$	0,989-0,979	0,24 mM	0,80 mM
GCE (pot.cat)	$y=4,396x + 0,636$	$y=1,2245x+0,085$	0,968-0,985	0,17 mM	0,56 mM
GCE-MWCNTs (pot.cat)	$y = 58,8x + 0,36$	$y=8,232x + 0,43$	0,980-0,960	0,01 mM	0,04 mM

Tabla 11. Resumen comparativo de los electrodos usados a lo largo del trabajo

Los distintos electrodos estudiados y en el medio optimizado permiten la determinación de concentraciones pequeñas del antibiótico ENRO, sobre todo en el caso del electrodo HMDE en donde se obtuvo la mayor sensibilidad y mejores límites de detección y cuantificación. Debido al carácter del electrodo HMDE, solamente puede ser empleado en un proceso de reducción (ondas catódicas de la ENRO), a diferencia de los electrodos GC que permiten potenciales muy oxidantes. Añadir la desventaja del uso de una sustancia muy tóxica como es el mercurio para el caso de HMDE.

El electrodo GC-MWCNTs también proporcionó buena sensibilidad, si bien el tiempo de vida no fue alto, siendo necesaria una nueva inmovilización de los nanotubos de carbono al cabo de 15-20 medidas voltamétricas. No obstante, una vez optimizadas las condiciones electroquímicas, este tiempo de vida puede mejorarse en un uso rutinario con barridos de potencial restringidos a los potenciales inicial y final del pico voltamétrico empleado en la cuantificación.

El estudio de la reproducibilidad indicó que los mejores resultados se produjeron después de los pulidos del electrodo GCE sin modificar. Sin embargo, la modificación con nanopartículas de oro condujo a medidas irreproducibles, especialmente en barridos anódicos y por la pérdida de la capa inmovilizada sobre el electrodo. Tampoco las nanopartículas de oro mejoran la velocidad de transferencia de carga del ENRO sobre el GC, no mejorando la sensibilidad de la determinación del antibiótico.

Si comparamos los electrodos que se pueden usar tanto a potenciales catódicos como anódicos, se ve que para el electrodo GCE sin modificar son muy parecidos, sin embargo para la modificación con MWCNTs a potenciales catódicos tanto la sensibilidad como los límites de detección y cuantificación son muy buenos pero en el voltograma aparece un pico a potencial ($E_p \sim +0,34 \text{ V}$) que no corresponde a la ENRO.

Las determinaciones voltamétricas que se han desarrollado permiten su adaptación a sensores para la detección y cuantificación rápida del antibiótico ENRO. La instrumentación empleada

(potenciostato y sistema de electrodos) es pequeña y portable, por lo que puede emplearse en determinaciones *in situ* en el medio ambiente.

5. Referencias bibliográficas

- [1] Han-Q.f., et. al. (2020). Distribution, combined pollution and risk assessment of antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding the Yellow Sea, North China. *Environment International*, 138, 105551-105563.
- [2] Canales-Camila, P.E. A.M. (2019). Electrochemical techniques to detect and quantify Enrofloxacin in presence of highly potential interferences: Assays in Chilean aqueous-soil matrices. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 832, 329-335.
- [3] Aris-Ahmad, I.T. H.R. (2013). *From Sources to Solution: Proceedings of the International Conference on Environmental*. Malasia: Forensic 2013.
- [4] Dönmeza-Fatih, Y.Y. Ş.Z. (2018). Electroanalytical determination of enrofloxacin based on the enhancement effect of the anionic surfactant at anodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, 84, 95-102.
- [5] Vancutsem-P.M., B.J. ,W. (1990). The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet*, 80, 173-186.
- [6] Wolfson-JS, H.D. (1985). The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.*, 581–586.
- [7] Trouchon-T., L. S. (2016). A review of enrofloxacin for veterinary use, open. *J. Vet. Med*, 8, 40-58.
- [8] A.Mitchell-Mark. (2006). Enrofloxacin. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 15, 66-69.
- [9] Ikem-Abual. (2017). Occurrence of enrofloxacin in overflows from animal lot and residential sewage lagoons and a receiving-stream. *Heliyon*, 3, 409.
- [10] Pedrosa-Marcelo, et.al (2019). Enrofloxacin and Roundup® interactive effects on the aquatic macrophyte *Elodea canadensis* physiology. *Environmental Pollution*, 249, 453-462.
- [11] Ensaifi-Ali, K. T. (2009). Determination of ultra trace amount of enrofloxacin by adsorptive cathodic stripping voltammetry using copper(II) as an intermediate . *Talanta*, 78, 942-948.
- [12] Bimazubute-M.A., et.al. (2008). Liquid chromatographic determination of enrofloxacin in nasal secretions and plasma of healthy pigs using restricted access material for on-line sample clean-up. *Journal of Chromatography A*, 1189, 456-466.
- [13] Dunnetta-Mark, W. R. (2004). Detection of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in equine hair. *Research in Veterinary Science*, 77, 143-151.
- [14] Hassouan-M.K, O. B. (2007). Multiresidue method for simultaneous determination of quinolone antibacterials in pig kidney samples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 859, 282-288.

- [15] Caro-Ester, et.al. (2006). Novel enrofloxacin imprinted polymer applied to the solid-phase extraction of fluorinated quinolones from urine and tissue samples. *Analytica Chimica Acta*, 562, 145-151.
- [16] Zhou-Xiaoming, et.al. (2008). Development and application of a capillary electrophoresis–electrochemiluminescent method for the analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in milk. *Talanta*, 75, 1300-1306.
- [17] Mostafa-Samia, M. E.-S. (2002). Spectrophotometric determination of enrofloxacin and pefloxacin through ion-pair complex formation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 173-180.
- [18] Jansomboon-Worawat, e. (2017). Determination and health risk assesment of enrofloxacin flumequine and sulfamethoxazole in imported Pangasius catfish products in Thailand. *Journal of Environmental Science and Health*, 53, 108-115.
- [19] Navalón-A, R. B. (2002). Determination of the antibacterial enrofloxacin by differential-pulse adsorptive stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 454, 83-91.
- [20] Rizk-Mohammed, e. (2000). Voltammetric analysis of certain 4-quinolones in pharmaceuticals and biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 211-218.
- [21] Antilén-Mónica, et.al. (2017). Enrofloxacin behavior in presence of soil extracted organic matter: An electrochemical approach. *Electrochimica Acta*, 244, 104-111.
- [22] Ensafi-Ali A., M. T. (2010). Simultaneous Voltammetric Determination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Urine and Plasma Using Multiwall Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode by Least-Squares Support Vector Machines. *Analytical Sciences*, 26, 803-806.
- [23] Khaloo-S.S., M. S. (2015). Fabrication of a modified electrode based on multi-walled carbon nanotubes decorated with iron oxide nanoparticles for the determination of enrofloxacin. *Micro and Nano Letters*, 10, 561-566.
- [24] Europea, U. (2009). REGLAMENTO (UE) No 37/2010 DE LA COMISIÓN. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 01-72.
- [25] Palisoc-Shirley, R. V. (2020). Highly sensitive determination of heavy metals in upland and lowland rice using AgNP/BiNP/MWCNT/nafion modified glassy carbon electrode via anodic stripping voltammetry. *IOPscience*, 30-33.

Abreviaturas empleadas en esta memoria

AdSV: Voltamperometría de separación catódica con preconcentración por adsorción

AuNPs: Nanopartículas de oro

BDD: Electrodo serigrafiado de diamante dopado con boro

B-R: Britton-Robinson

CV: Voltametría cíclica

DPV: Voltametría de pulso diferencial

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ENRO: Enrofloxacin

GCE: Electrodo de carbón vítreo

HMDE: Electrodo de gota colgante de mercurio

HPLC: Cromatografía líquida de altas prestaciones

HQ: Coeficiente de riesgo

LSV: Voltametría de barrido lineal

LC: Cromatografía líquida

MWCNTs: Nanotubos de carbono multicapa

MME: Electrodo multimodo

OMS: Organización mundial de la salud

PBS: Disolución tampón fosfato

SMDE: Electrodo estático de gota de mercurio

UV: Ultravioleta

ΔE_{step} : Variación de potencial escalonado