



**UNIVERSIDAD DE BURGOS**

**Departamento de Química**

**Área de Química Analítica**

*Trabajo de Fin de Grado*

# Determinación analítica de pesticidas

**Determinación electroquímica de imidacloprid**

**Autor: DAVID HERRERO MARTÍNEZ**

**Tutora: OLGA DOMÍNGUEZ RENEDO**

**Junio 2015**





**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL TRABAJO**

**FIN DE GRADO**

**GRADO EN: QUÍMICA**

**CURSO: 2014/2015**

Dña. **OLGA DOMÍNGUEZ RENEDO** informa de que el alumno D. **DAVID HERRERO MARTÍNEZ** ha realizado el trabajo "**DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE PESTICIDAS: DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DE IMIDACLOPRID**" bajo su tutela, y considera que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO \*

(\*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 15 de junio de 2015

Fdo.: **OLGA DOMÍNGUEZ RENEDO**



# Índice

---

<b>1. Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Introduction</b> .....	<b>3</b>
<b>3. State of the Art</b> .....	<b>5</b>
3.1. Imidacloprid.....	5
3.2. Analytical determination of imidacloprid.....	5
3.3. Screen-printed electrodes and modifications .....	6
<b>4. Objective</b> .....	<b>7</b>
<b>5. Experimental</b> .....	<b>7</b>
5.1. Reagents.....	7
5.2. Apparatus and software.....	8
5.3. Experimental procedure .....	8
<b>6. Resultados experimentales y discusión</b> .....	<b>9</b>
6.1. Determinación de IDP mediante DPV con SPCEs.....	9
6.1.1. Estudio de la respuesta electroquímica de IDP en SPCEs .....	9
6.1.2. Selección del pH de medida .....	11
6.1.3. Estudio de la posible acumulación de IDP en SPCEs.....	12
6.1.4. Calibrado, precisión y capacidad de detección .....	13
6.2. Determinación de IDP mediante SWV con SPCEs.....	14
6.2.1. Selección de la frecuencia óptima en la determinación de IDP mediante SWV .....	15
6.2.2. Calibrado, precisión y capacidad de detección .....	15
6.2.3. Comparación de las técnicas DPV y SWV en la determinación de IDP con SPCEs.....	16
6.3. Análisis de IDP en muestras acuosas mediante adición estándar .....	17
6.4. Estudio electroquímico de IDP con diferentes electrodos serigrafados... 18	
6.4.1. Determinación de IDP mediante DPV con SPAuEs .....	18
6.4.2. Determinación de IDP mediante DPV con SPC <sub>Pt</sub> Es.....	18
6.4.3. Determinación de IDP mediante DPV con SPCEs modificados.....	18
6.4.3.1. <i>SPCEs modificados con AuNPs</i> .....	19
6.4.3.2. <i>SPCEs modificados con TTF</i> .....	19
6.4.3.3. <i>SPCEs modificados con ferroceno</i> .....	19
6.4.3.4. <i>SPCEs modificados con Nafion</i> .....	20
6.4.3.5. <i>SPCEs modificados con CNTs</i> .....	20
6.4.3.6. <i>SPCEs modificados con pirrol</i> .....	20
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>21</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>21</b>



## 1. Abstract

This work reports the study of electrochemical methods for the determination of imidacloprid (IDP) in aqueous samples by using screen-printed electrodes (SPEs). A differential pulse voltammetric (DPV) method with bare screen-printed carbon electrodes (SPCEs) has been successfully developed for the determination of this compound. Square wave voltammetry (SWV) has been also tested as an alternative technique for the determination of IDP using SPCEs as well. Both methods have been validated obtaining good capability of detection ( $0.6 \mu\text{M}$  and  $1.01 \mu\text{M}$  for DPV and SWV, respectively) and reproducibility (2.3% and 4.7% for DPV and SWV, respectively). The DPV/SPCE method has been applied to the determination of IDP in sea water samples. Finally, different modified SPEs have been also tested as possible analytical systems for the determination of IDP.

## 2. Introduction

Pesticides are commonly used in agricultural crops and soils. Despite their important agricultural benefits, their presence in natural waters may cause an environmental hazard due to their toxic effects. For this reason, it is required a systematic control of their content in water in order to prevent their negative impact.

One of the most used pesticides is IDP, a synthetic insecticide utilized to control mainly sucking insects. However, this insecticide entails some untoward effects. For example, it is related to the colony collapse disorder, a phenomenon that occurs when worker bees abandon forever their hive, leaving behind the queen. That is because IDP is highly toxic for honey bees, killing them when they go to feed [1].

Many analytical procedures have been developed for the determination of IDP, including liquid chromatography, mass spectrometry or infrared spectroscopy, among others. These methods have turned out to be very sensitive in the analysis of this compound; however, they are considered tedious and time consuming, being difficult its application in routine analyses. Different electrochemical sensors (Table 1) have been then proposed as a useful alternative in the determination of IDP due to their important advantages like portability, versatility and low cost.

Classical solid electrodes are often used in the development of electrochemical sensors. The replacement of these classical electrodes by SPEs presents important advantages due to their reduced dimensions and disposable characteristics.

In this work, several electrochemical methods for the determination of IDP in aqueous samples have been studied. The first studied method was based on the use of DPV with bare SPCEs. SWV was also tested as a possible analytical technique for the determination of IDP using the same electrodes. Finally, other different SPEs including screen-printed gold electrodes (SPAuEs), screen-printed platinized carbon electrodes (SPC<sub>Pt</sub>Es) and different modified

SPCEs were also studied as possible analytical devices for the electrochemical determination of IDP.

The described methods in this work present a common first step based on the optimization of the experimental variables which may affect the analytical response. The methods were then validated by determining important parameters, namely, capability of detection and precision. Finally, the electrochemical method based on the use of DPV with bare SPCEs was selected to the determination of IDP in spiked real aqueous samples.

**Table 1.** Electrochemical methods for the determination of IDP.

Technique	Electrode	RSD	LOD	Ref.
LSV	Prussian blue/MWNT/GCE	-	0.05 $\mu\text{M}$	[2]
CV	Nanosilver Nafion®/nanoTiO <sub>2</sub> Nafion® composite modified GCE (nAg <sub>n</sub> /nTiO <sub>2</sub> n <sub>r</sub> /GCE)	2.5%	0.63 $\mu\text{M}$	[3]
CV	GCE	-	30.11 $\mu\text{M}$	[4]
CV	Reduced-graphene oxide (rGO) modified with $\beta$ -cyclodextrin polymer ( $\beta$ -CDP) GCE ( $\beta$ -CDP/rGO/GCE)	4.1%	0.10 $\mu\text{M}$	[5]
CV	Graphene oxide-modified GCE	-	0.36 $\mu\text{M}$	[6]
CV	Imprinted poly(o-phenylenediamine) membranes at reduced graphene oxide modified electrode	4.8%	0.40 $\mu\text{M}$	[7]
DPV	Drop mercury electrode	1.5%	0.01 $\mu\text{M}$	[8]
DPV	nAg <sub>n</sub> /nTiO <sub>2</sub> n <sub>r</sub> /GCE	1.8%	0.25 $\mu\text{M}$	[3]
DPV	CPE	1.4%	2.04 $\mu\text{M}$	[9]
DPV	Bismuth film electrode	2.4%	2.90 $\mu\text{M}$	[10]
DPV	$\beta$ -CDP/rGO/GCE	3.8%	0.02 $\mu\text{M}$	[5]
DPV	GCE	-	0.61 $\mu\text{M}$	[11]
DPV	Polycarbazole (PCz) and PCz/chemically reduced graphene oxide modified GCE	-	0.44 $\mu\text{M}$	[12]
DPV	Tricresyl phosphate-CPE	-	2.03 $\mu\text{M}$	[13]
DPV	Tricresyl phosphate-CPE bulk modified bismuth	<1.5%	2.93 $\mu\text{M}$	[14]
SWAdSV	Hanging mercury drop electrode	1-13%	0.02 $\mu\text{M}$	[15]
Amperometry	nAg <sub>n</sub> /nTiO <sub>2</sub> n <sub>r</sub> /GCE	-	3.10 $\mu\text{M}$	[3]
Voltammetry	(MWCNTs) composite poly(aspartic acid) film modified GCE	1.8%	0.04 $\mu\text{M}$	[16]

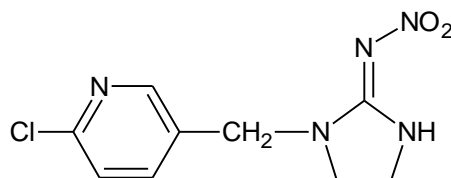
**CPE:** Carbon paste electrode; **CV:** Cyclic voltammetry; **DPV:** Differential pulse voltammetry; **GCE:** Glassy carbon electrode; **LOD:** Limit of detection; **LSV:** Linear sweep voltammetry; **MWCNTs:** Multi-walled carbon nanotubes; **RSD:** Relative standard deviation (precision); **SWAdSV:** Square wave adsorptive stripping voltammetry.



## 3. State of the Art

### 3.1. Imidacloprid

IDP is a new type of insecticide which belongs to neonicotinoid family (synthetic derivatives of nicotine). The IUPAC name of this compound is 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine and its structure is shown in Figure 1 [17]. It is made up of colourless crystals and it has a water solubility of 0.61 g/L at 20°C, being its water stability of more than 30 days [17].



**Figure 1.** Structure of IDP.

Available in the market since 1991, IDP is accounting for 11-15% of the insecticide market, being the most frequently used insecticide from the chloronicotinyl group [18]. In this way, this pesticide is frequently used to control sucking insects, some chewing insects including termites, soil insects and fleas on pets. In addition to its topical use on pets, IDP may be applied to structures, crops, soil and as a seed treatment [17].

IDP is designed to be effective by contact or ingestion. It is a systemic insecticide that translocates rapidly through plant tissues following application. It acts on several types of post-synaptic nicotinic acetylcholine receptors in the nervous system. In insects, these receptors are located only within the central nervous system. After binding to the nicotinic receptor, nerve impulses spontaneously discharged at first, followed by failure of neuron to propagate any signal. Sustained activation of the receptor results from the inability of acetylcholinesterases to break down the pesticide. This bonding process is irreversible [17, 19, 20].

In humans, the blood-brain barrier blocks access of IDP to the central nervous system, reducing its toxicity [21]. Thus, IDP is moderately toxic by ingestion, highly toxic in the aerosol form and slightly toxic in other cases [22].

The presence of IDP in water may be then considered as an important health risk taking into account the toxic effects described above. Thus, the development of sensitive and selective methods for the determination of this compound has been the objective of many research works.

### 3.2. Analytical determination of imidacloprid

The most common analytical techniques for the determination of IDP are high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array [23], mass-spectrometric [24], thermal lens spectrometric [25] or amperometric detection [26]. There are also other rapid and selective techniques like an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [27], fluorimetry [28] and Fourier Transform infrared spectroscopy [29]. However, the complexity of these methods limits their applicability in routine analyses.

Nowadays electrochemical methods have attracted the interest of many researchers due to some important advantages including low capability of detection, high analyte selectivity, compact nature, simple sample preparation procedure, cost effectiveness, adaptability to field use and minimum use of toxic organic solvents [4]. These analytical methods involve the use of different electrochemical techniques using different types of electrodes. Most of these techniques are compared in Table 1.

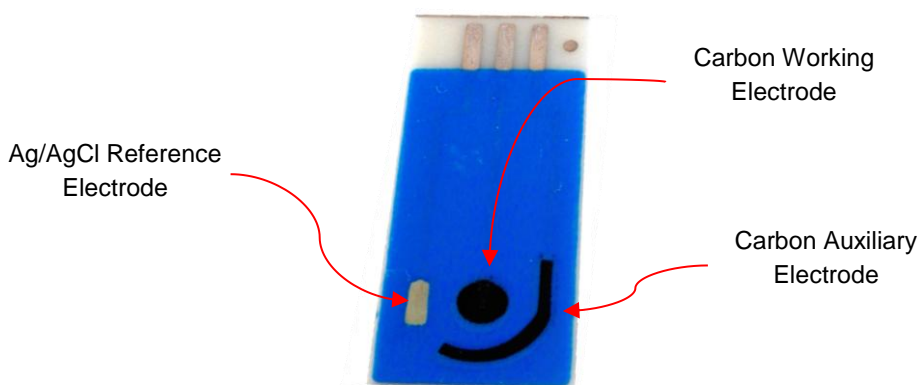
### 3.3. Screen-printed electrodes and modifications

SPEs are a kind of electrochemical devices produced by printing different inks in a plastic substrate. SPEs are widely used in analytical applications due to their low cost, ease of use, high reproducibility, size reduction and lack of contamination [30].

Furthermore, suitable modifying compounds can be incorporated into the ink or deposited onto the electrode surface increasing sensitivity and/or selectivity and expanding the field of application [30].

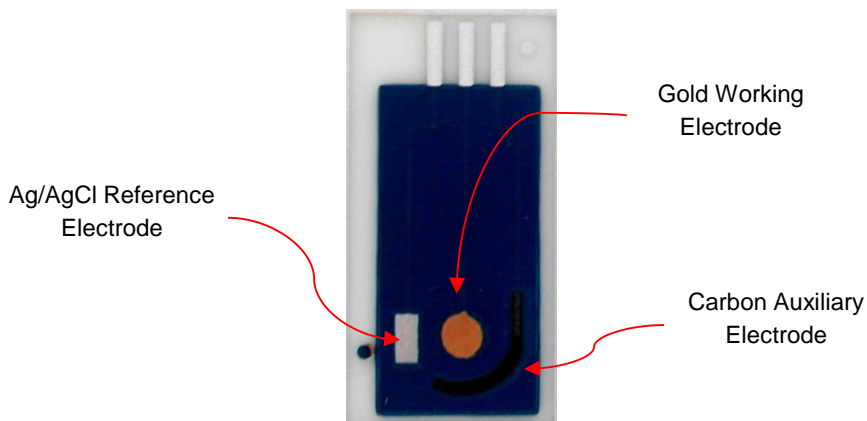
In this work, three types of SPEs have been used:

- (1) SPEs based on the use of a carbon working electrode (SPCEs).



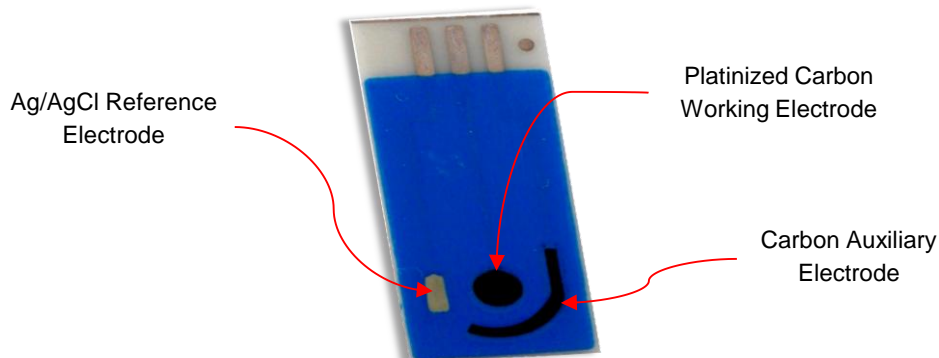
**Figure 2.** Scheme of a SPCE.

- (2) SPEs consisting of a gold working electrode (SPAuEs).



**Figure 3.** Scheme of a SPAuE.

(3) SPEs based on a working electrode fabricated with platinumized carbon ink (SPC<sub>Pt</sub>Es).



**Figure 4.** Scheme of a SPC<sub>Pt</sub>E.

As it can be seen in the above described figures, a Ag/AgCl screen-printed reference electrode (Ag/AgCl-SPE) and a carbon auxiliary electrode are used, in all cases. SPCEs were also modified with gold nanoparticles (AuNPs), redox mediators (tetrathiafulvalene (TTF) and ferrocene), polymers (pyrrole and nafion) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) in order to try to improve the sensitivity of the developed sensors.

## 4. Objective

This work aims to develop a sensitive electrochemical method to determine IDP in aqueous samples by means of using SPEs.

## 5. Experimental

### 5.1. Reagents

All the reagents used were of analytical grade and Milli Q water (Millipore, Bedford, USA) was employed for preparing all solutions.

Britton-Robinson buffer solutions were used as supporting electrolyte in all measurements. A 0.04 M Britton-Robinson solution with respect to orthoboric, orthophosphoric and acetic acids (Merck, Darmstadt, Germany) and 0.1 M of potassium chloride (VWR Chemicals, Leuven, Belgium) was prepared. As of this, solutions of different pH values were prepared by additions of a 1.0 M sodium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany) solution.

Stock standard solutions of IDP were prepared by dissolving the adequate amount of this compound purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) in Milli Q water.

Hydrogentetrachloroaurate(III) trihydrate (HAuCl<sub>4</sub>), used in the generation of AuNPs, was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Pyrrole and lithium perchlorate ( $\text{LiClO}_4$ ), used to modify SPCEs, were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and Panreac (Barcelona, Spain), respectively.

Dimethylformamide (DMF), used as solvent of MWCNTs, was purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

Cantabrian Sea water was also analysed.

## 5.2. Apparatus and software

All electrochemical measurements were performed by means of an Autolab PGSTAT128N electrochemical system with GPES software (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) using different SPEs.

The pH values of the solutions were measured with a Crison Model 2002 (Barcelona, Spain) pH-meter.

Data analysis was processed with PROGRESS [31] for robust regressions and DETARCHI [32] for capability of detection.

## 5.3. Experimental procedure

All analyses were carried out at room temperature in an electrochemical cell containing 10 mL of a Britton-Robinson buffer solution.

Differential pulse voltammetric measurements were performed using the following parameters values: potential scan, 0 to -1.5 V; modulation amplitude, 25 mV; step potential, 10 mV; interval time, 0.1 s.

Square wave voltammetric analyses were accomplished at a scan rate of 0.5 V/s, a step potential of 10 mV and an amplitude of 0.2 V. The potential scan was performed from 0 to -1.5 V.

The electrochemical deposition of AuNPs was performed in a 100  $\mu\text{L}$  drop of 0.1 mM  $\text{HAuCl}_4$ , prepared in 0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , applying a potential of +0.18 V vs Ag/AgCl-SPE for 15 s. The AuNPs modified SPCEs (AuNPs-SPCEs) were then rinsed with Milli Q water.

The pyrrole modified SPCEs were achieved by means of deposition of a 200  $\mu\text{L}$  drop of a 0.05 M pyrrole and 0.1 M  $\text{LiClO}_4$  solution, applying 3 cyclic voltammetric scans between 0 and +0.75 V with a scan rate of 10 mV/s and a step potential of 12 mV. The electrodes were then washed with Milli Q water.

The carbon nanotubes deposition was realized by dropping 5  $\mu\text{L}$  of a 3 mg/mL MWCNTs dispersion in DMF onto the working electrode surface. The solvent was left to dry at room temperature.

SPAuEs were cleaned before using by immersing them into a 0.1 KCl solution and applying a cyclic voltammetric scan between -0.4 and +0.8 V at a step potential of 12 mV and a scan rate of 50 mV/s.

## 6. Resultados experimentales y discusión

### 6.1. Determinación de IDP mediante DPV con SPCEs

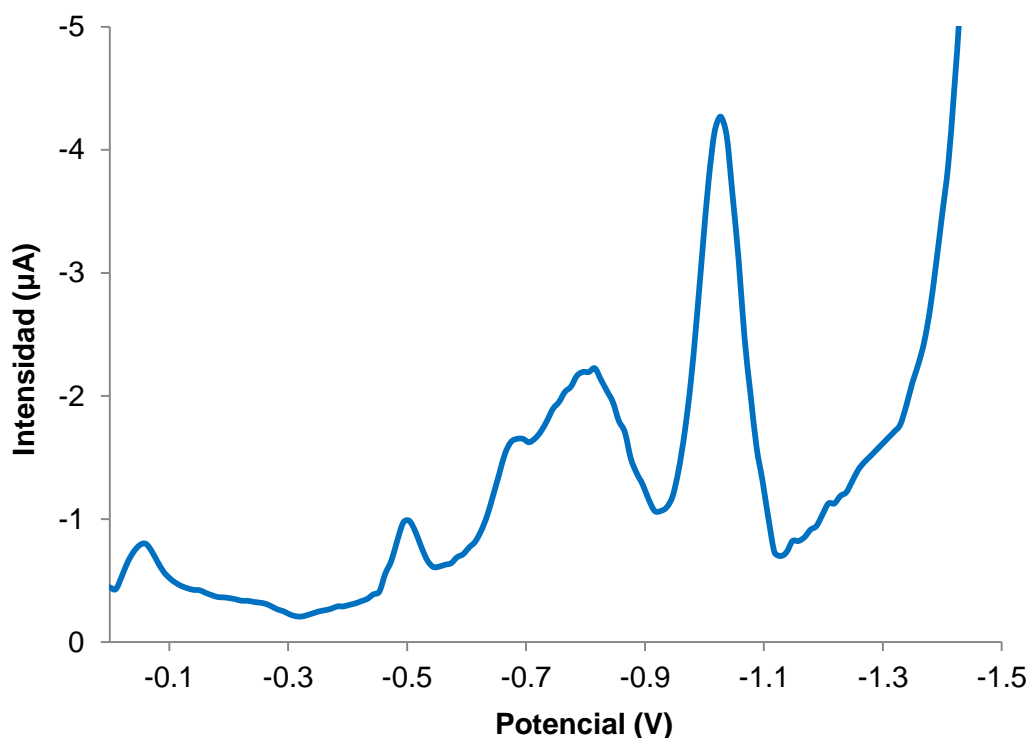
Las experiencias llevadas a cabo en este apartado demuestran que es posible determinar IDP mediante DPV empleando SPCEs.

#### 6.1.1. Estudio de la respuesta electroquímica de IDP en SPCEs

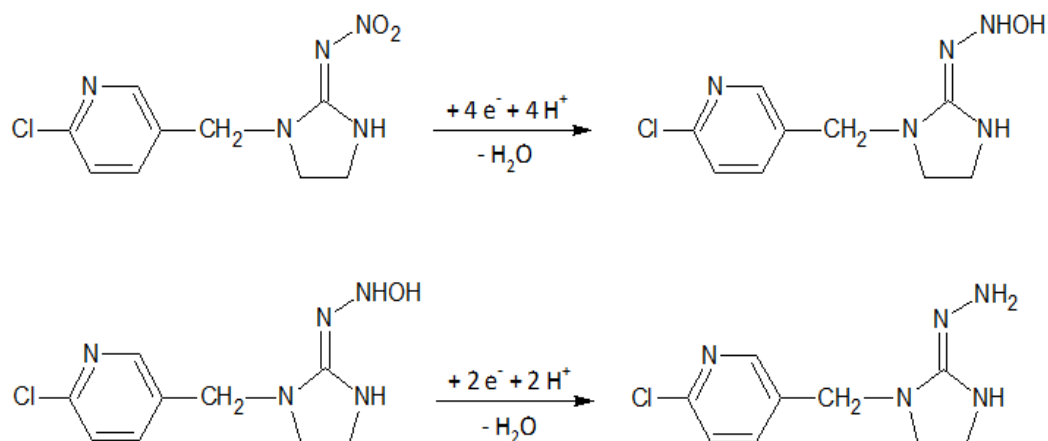
La primera etapa del trabajo experimental desarrollado consistió en el estudio de la respuesta electroquímica de IDP en SPCEs, siguiendo un procedimiento similar al utilizado por otros autores con electrodos convencionales [10]. La técnica utilizada fue DPV empleando una disolución tampón Britton-Robinson de pH 8 como electrolito soporte. Los voltamperogramas fueron registrados mediante un barrido de potenciales entre 0 y -1.5 V y una desoxigenación previa a las mediciones de 10 minutos.

En la figura 5 se muestra el voltamperograma obtenido para una concentración de IDP 36  $\mu\text{M}$ . En dicha figura puede observarse la presencia de dos picos de reducción diferentes a -0.8 V y -1.0 V.

El pico observado a un potencial de -0.8 V está relacionado con la reducción del grupo nitro presente en IDP a hidroxilamina, mientras que el pico que aparece a un potencial de -1.0 V se corresponde con la reducción de hidroxilamina a amina (Figura 6) [8, 10, 15].



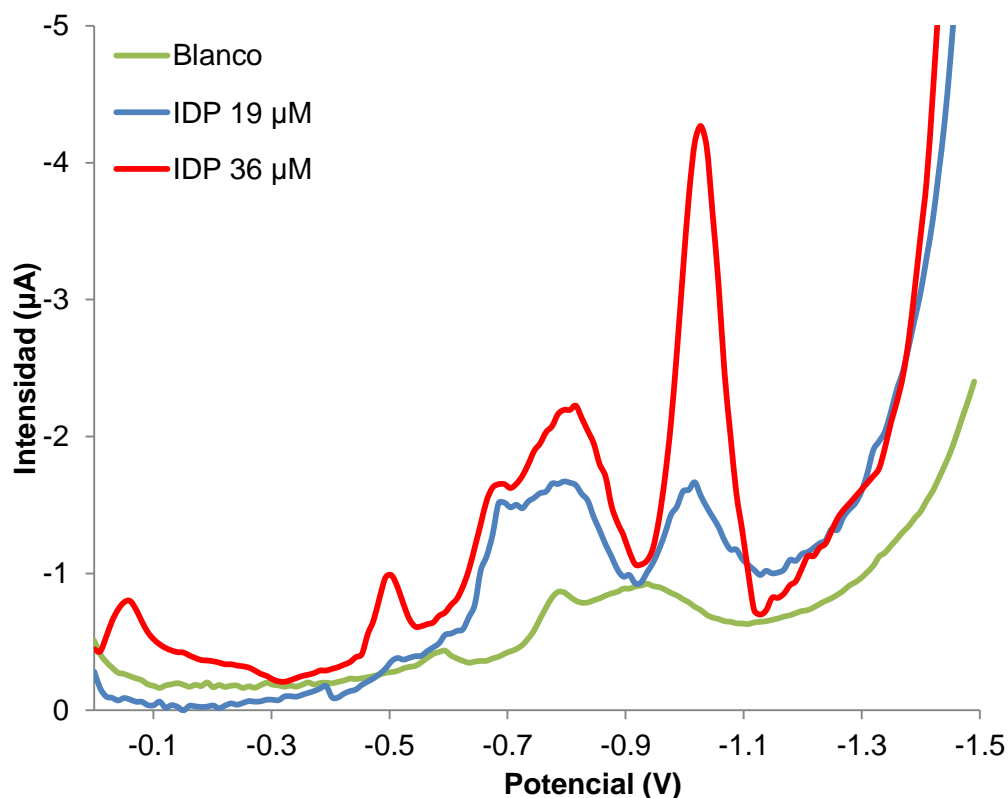
**Figura 5.** Voltamperograma obtenido mediante DPV empleando SPCEs para una concentración 36  $\mu\text{M}$  de IDP (Tampón Britton-Robinson pH 8; Potenciales vs. Ag/AgCl-SPE).



**Figura 6.** Mecanismo propuesto para la reducción de IDP.

Una vez estudiada la respuesta electroquímica del IDP en SPCEs, se realizaron una serie de experiencias adicionales con el objetivo de seleccionar el pico de reducción más adecuado para llevar a cabo la determinación analítica de IDP.

En la figura 7 se muestran los voltamperogramas obtenidos mediante DPV con SPCEs para el blanco y para concentraciones de IDP de 19 y 36  $\mu\text{M}$ , utilizando como electrolito soporte tampón Britton-Robinson (pH 8).



**Figura 7.** Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando SPCEs (Tampón Britton-Robinson pH 8; Potenciales vs. Ag/AgCl-SPE).

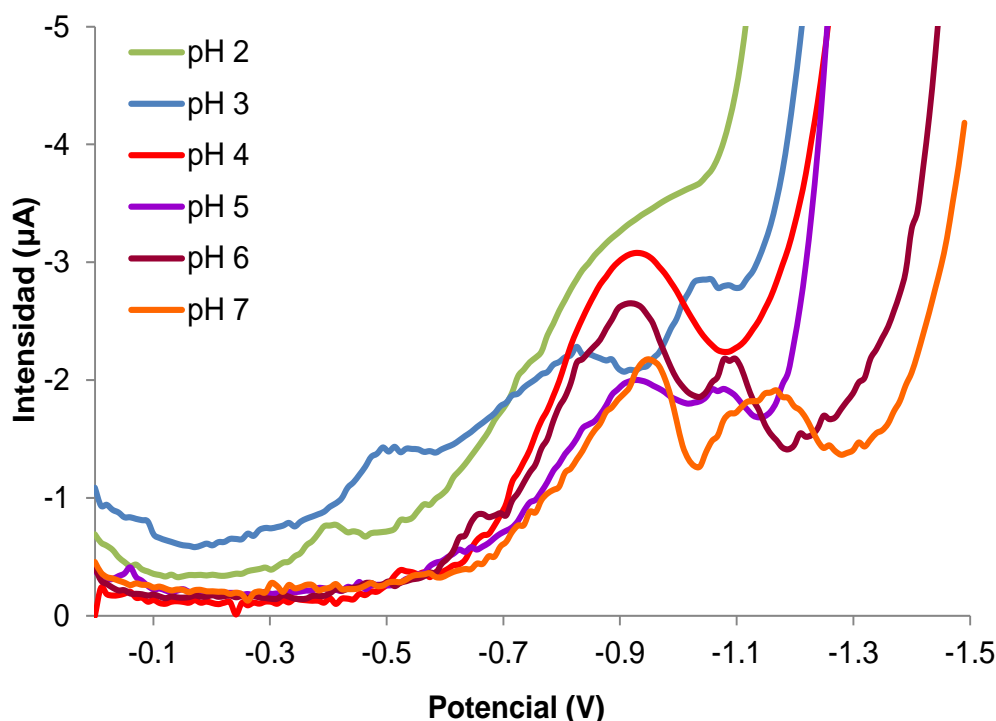
Como se observa en la figura 7, el pico de reducción que aparece a un potencial de  $-1.0$  V presenta mayor sensibilidad a la presencia de IDP que el pico de reducción obtenido a  $-0.8$  V. Además, este pico presenta mejor definición y no aparece solapado con ninguna señal del blanco. Por ello, el pico de reducción de hidroxilamina a amina fue el seleccionado para llevar a cabo la determinación analítica de IDP.

La primera etapa en el proceso de determinación de IDP mediante DPV consistió en la optimización del pH del medio.

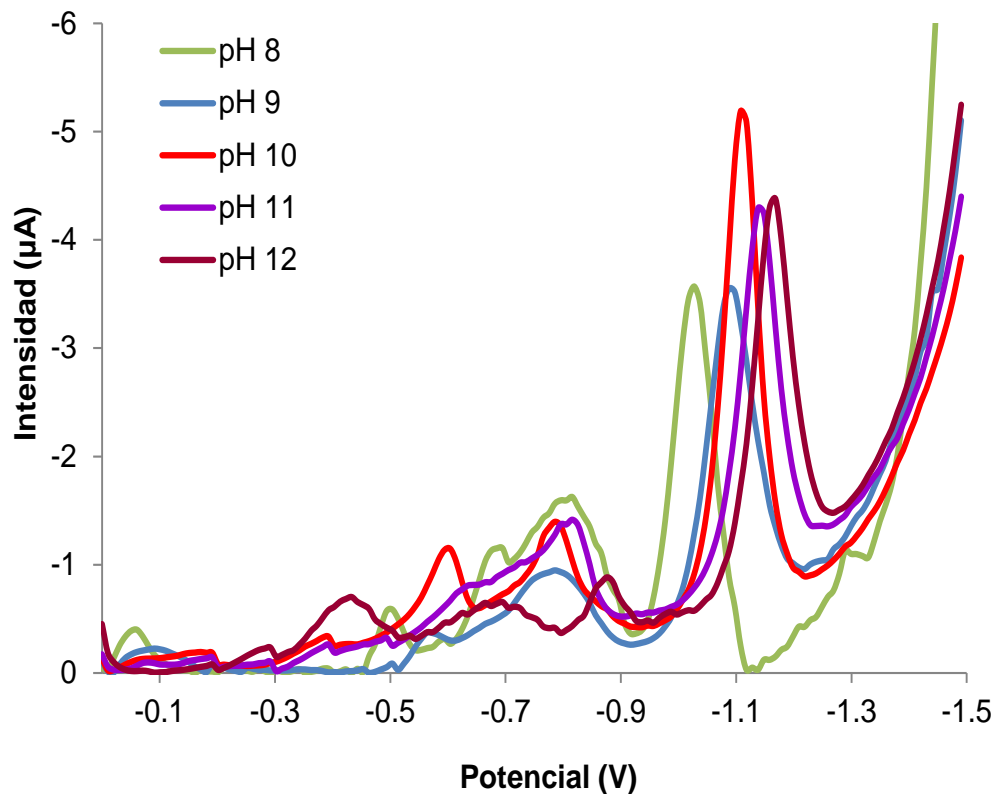
### 6.1.2. Selección del pH de medida

La optimización de los parámetros experimentales que afectan a la señal analítica es un paso importante en todo procedimiento de análisis. En el caso de determinaciones electroquímicas, el pH es uno de los parámetros que más influencia presenta en la respuesta analítica registrada. Por ello, se llevó a cabo un estudio de la variación de la intensidad del pico de reducción de hidroxilamina a amina con el valor del pH del medio. Dicho estudio se realizó para valores de pH comprendidos entre 2 y 12, para una misma concentración de IDP.

Los voltamperogramas obtenidos para los diferentes valores de pH estudiados se muestran en las figuras 8 y 9. En dichas figuras se observa que para valores de pH entre 2 y 7 no se obtienen picos de reducción con suficiente calidad analítica. Sin embargo, cuando el pH se sitúa entre 8 y 12, se observa claramente la segunda reducción del IDP.



**Figura 8.** Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando SPCEs para una concentración  $36 \mu\text{M}$  de IDP (Tampón Britton-Robinson: pH 2, pH 3, pH 4, pH 5, pH 6 y pH 7; Potenciales vs. Ag/AgCl-SPE).



**Figura 9.** Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando SPCEs para una concentración  $36 \mu\text{M}$  de IDP (Tampón Britton-Robinson: pH 8, pH 9, pH 10, pH 11 y pH 12; Potenciales vs. Ag/AgCl-SPE)

En la figura 9 puede verse como el pico de reducción más intenso se obtiene a pH 10 y a un potencial de  $-1.1 \text{ V}$ , por lo que el resto de medidas se realizaron a este valor de pH.

### 6.1.3. Estudio de la posible acumulación de IDP en SPCEs

En la determinación de especies orgánicas mediante DPV es frecuente observar un aumento de la sensibilidad del proceso analítico al realizar un proceso de acumulación previa del analito en la superficie del electrodo de trabajo. Con el objetivo de estudiar la posible acumulación de IDP en la superficie del electrodo de trabajo se realizaron diferentes experiencias basadas en la aplicación de un potencial de  $-0.9 \text{ V}$  durante diferentes tiempos (0, 60, 120 y 300 segundos) agitando la disolución de la celda. El valor de concentración de IDP utilizado para la realización de dichas experiencias fue  $4.0 \mu\text{M}$ .

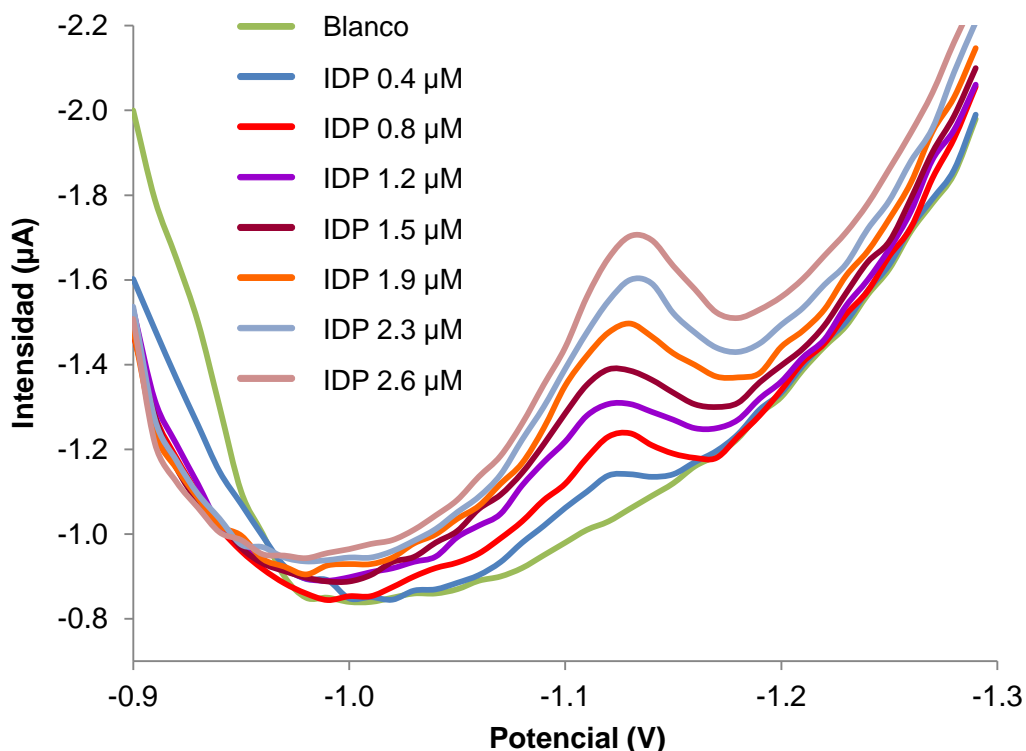
Las diferentes experiencias realizadas demostraron que la intensidad del pico a  $-1.1 \text{ V}$  no solo no aumentaba con el tiempo de acumulación sino que existía una pérdida de sensibilidad en las medidas si se llevaba a cabo dicho proceso de acumulación electroquímica. Por lo tanto, en la determinación de IDP mediante DPV no se siguió un proceso previo de acumulación del analito.



#### 6.1.4. Calibrado, precisión y capacidad de detección

Una vez encontradas las condiciones óptimas para la determinación de IDP mediante DPV con SPCEs se llevó a cabo la validación del procedimiento analítico. Para ello se realizaron diferentes calibrados en las condiciones de medida optimizadas en las etapas anteriores. Dichos calibrados se construyeron para concentraciones de IDP comprendidas entre 0.4 y 2.6  $\mu\text{M}$ .

En la figura 10 se muestran, a modo de ejemplo, los voltamperogramas obtenidos para uno de los calibrados realizados.



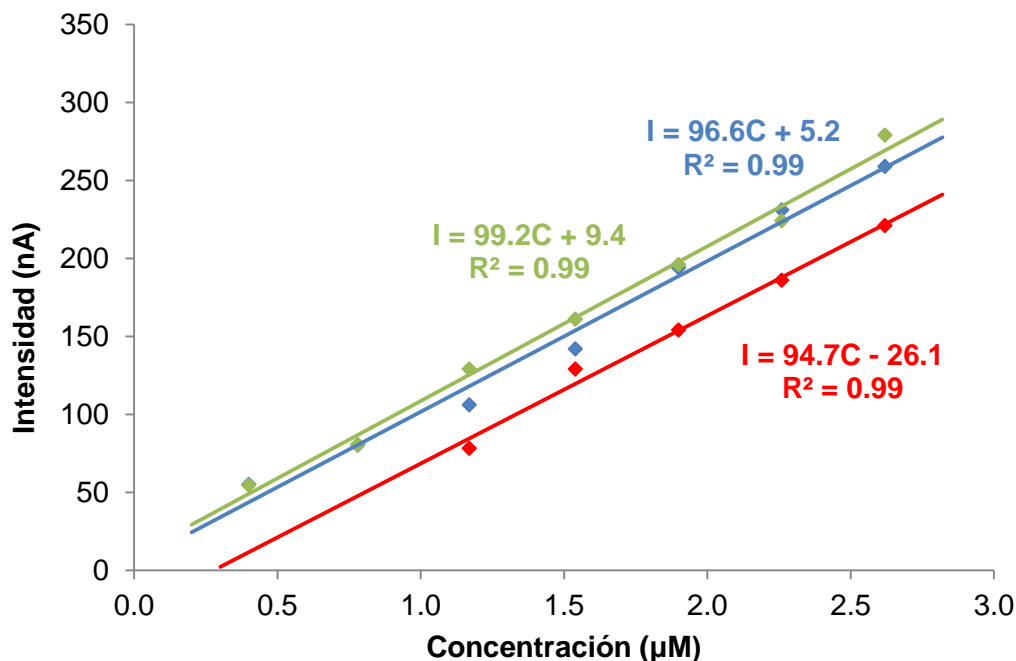
**Figura 10.** Voltamperogramas obtenidos mediante DPV empleando SPCEs para concentraciones crecientes de IDP. (Tampón Britton-Robinson pH 10; Potenciales vs. Ag/AgCl-SPE).

Para la construcción de las curvas de calibrado se eligió un método de regresión robusto, la regresión RLS (*Reweighted Least Squares*, por Mínimos Cuadrados Preponderada), basada en la regresión por mínimos cuadrados (LS) eliminando los puntos anómalos detectados por la regresión LMS (*Least Median Squares*, por Mínima Mediana de Cuadrados). Este tipo de regresión permite detectar y eliminar puntos anómalos y, además, presenta la ventaja de poder realizar la regresión cuando el número de puntos anómalos sea de hasta un 50% [33].

La regresión LMS utilizada permite la detección de dos tipos de puntos anómalos, siendo considerados como anómalos aquellos puntos con un residuo estandarizado superior a 2.5 en valor absoluto al realizar LMS [33]:

- (1) Los "outliers", que se alejan del conjunto en el eje de ordenadas.
- (2) Los "leverages", que se alejan del resto de datos en el eje de abscisas.

En la figura 11, se muestran las curvas de calibrado obtenidas una vez eliminados los puntos anómalos, a partir de las cuales se obtendrán los valores de precisión y capacidad de detección. Dichas curvas de calibrado fueron obtenidas empleando tres sistemas de electrodos serigrafados diferentes.



**Figura 11.** Rectas de calibrado para análisis con DPV construidas utilizando diferentes sistemas electródicos.

Una vez realizados los calibrados descritos, con el fin de validar el procedimiento analítico, se llevó a cabo el cálculo de la precisión y de la capacidad de detección.

La precisión se calculó en términos de reproducibilidad, a través del valor de RSD asociado a las pendientes de las rectas de calibrado. Se obtuvo un valor de 2.3% (n=3), lo cual indica una buena precisión del método utilizado.

Se calculó además la capacidad de detección, utilizando el programa DETARCHI [32], a partir de las rectas de calibrado teniendo en cuenta la probabilidad de falso positivo ( $\alpha$ ) y falso negativo ( $\beta$ ). La capacidad de detección obtenida fue  $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$  (n=3,  $\alpha=\beta=0.05$ ).

## 6.2. Determinación de IDP mediante SWV con SPCEs

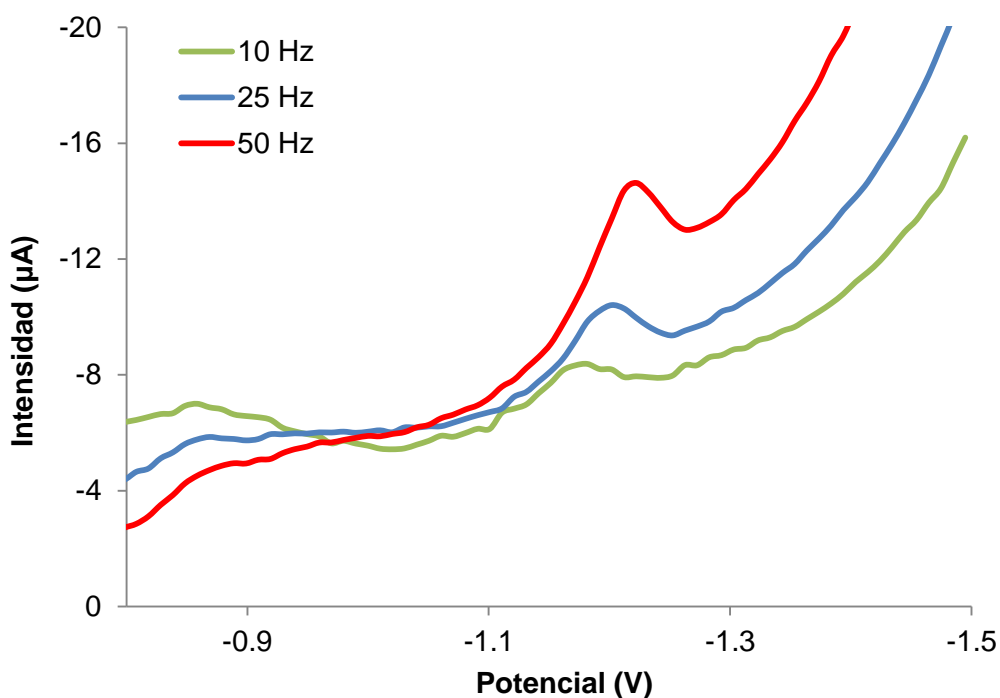
Una vez demostrado que es posible analizar IDP mediante DPV empleando SPCEs, se llevó a cabo el estudio de la posibilidad de utilizar SWV para el análisis de dicho compuesto. En la primera parte de dicho estudio se realizó una optimización de las variables experimentales que más influyen en la respuesta voltamperométrica. En este sentido, se tomó un valor de pH de 10 como el más adecuado para el estudio del pico de reducción de hidroxilamina a amina. Este valor fue seleccionado de acuerdo con las experiencias realizadas en la sección 6.1.2. para DPV.

El pico voltamperométrico obtenido mediante SWV está considerablemente influenciado por la frecuencia empleada en su obtención. Por ello se llevaron a cabo diferentes experimentos encaminados a la optimización de dicho parámetro.

### 6.2.1. Selección de la frecuencia óptima en la determinación de IDP mediante SWV

Para llevar a cabo la optimización de la frecuencia se realizaron diferentes experiencias en tampón Britton-Robinson pH 10, aplicando un barrido de potencial entre 0 y -1.5 V, con desoxigenación previa a las medidas de 10 minutos y a frecuencias de 10, 25 y 50 Hz.

En la figura 12, se muestran los voltamperogramas obtenidos para las tres frecuencias para una concentración 4.0  $\mu\text{M}$  de IDP.



**Figura 12.** Voltamperogramas obtenidos mediante SWV empleando SPCEs para una concentración 4.0  $\mu\text{M}$  de IDP a: 10 Hz, 25 Hz y 50 Hz (Tampón Britton-Robinson pH 10; Potenciales vs. Ag/AgCl-SPE).

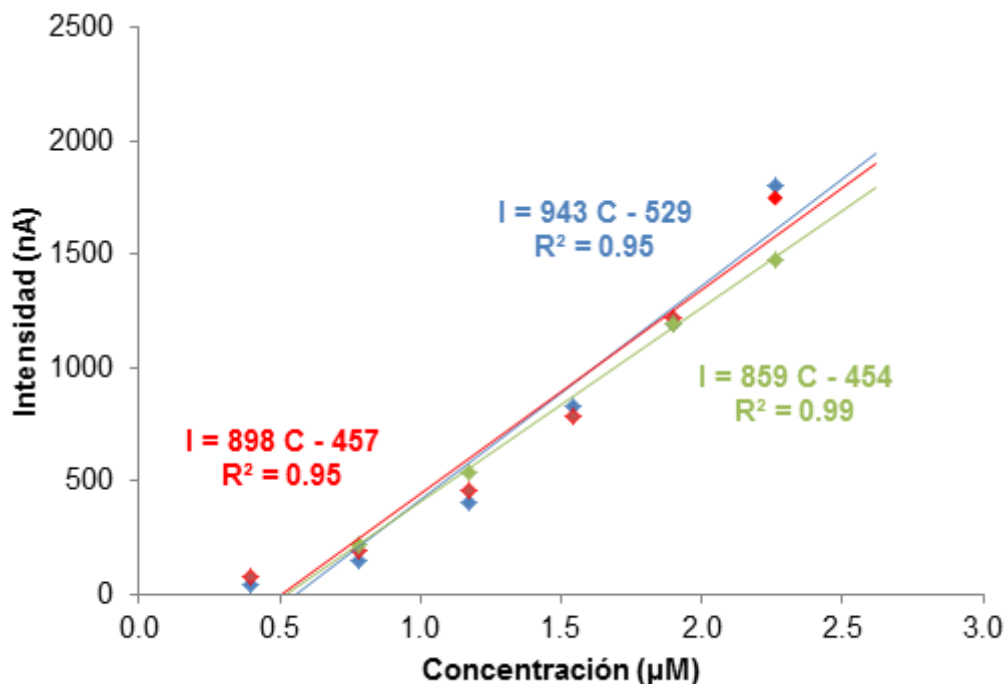
En la figura 12 puede verse que el pico voltamperométrico con mayor intensidad se obtiene para un valor de frecuencia de 50 Hz, por lo que el resto de las experiencias con SWV se realizaron utilizando dicho valor de frecuencia.

### 6.2.2. Calibrado, precisión y capacidad de detección

En la siguiente etapa del trabajo experimental se llevó a cabo la determinación analítica de IDP en las condiciones de medida optimizadas en la

etapa anterior. La determinación se realizó a concentraciones de IDP entre 0.4 y 2.6  $\mu\text{M}$ .

En la figura 13, se muestran las rectas de calibrado sin los puntos anómalos (regresión RLS), a partir de las cuales se determinó la precisión y la capacidad de detección. Estos calibrados también fueron realizados utilizando diferentes sistemas electródicos.



**Figura 13.** Rectas de calibrado para análisis con SWV construidas utilizando diferentes sistemas electródicos.

Con el fin de validar el procedimiento analítico se llevó a cabo el cálculo de la precisión y de la capacidad de detección.

La precisión se calculó en términos de reproducibilidad, a través del valor de RSD asociado a las pendientes de las rectas de calibrado. Se obtuvo un valor de 4.7% ( $n=3$ ), lo cual indica una buena precisión del método utilizado.

Se calculó además la capacidad de detección, utilizando el programa DETARCHI [32], a partir de las rectas de calibrado teniendo en cuenta la probabilidad de falso positivo ( $\alpha$ ) y falso negativo ( $\beta$ ). La capacidad de detección obtenida fue  $1.01 \pm 0.06 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ,  $\alpha=\beta=0.05$ ).

### 6.2.3. Comparación de las técnicas DPV y SWV en la determinación de IDP con SPCEs

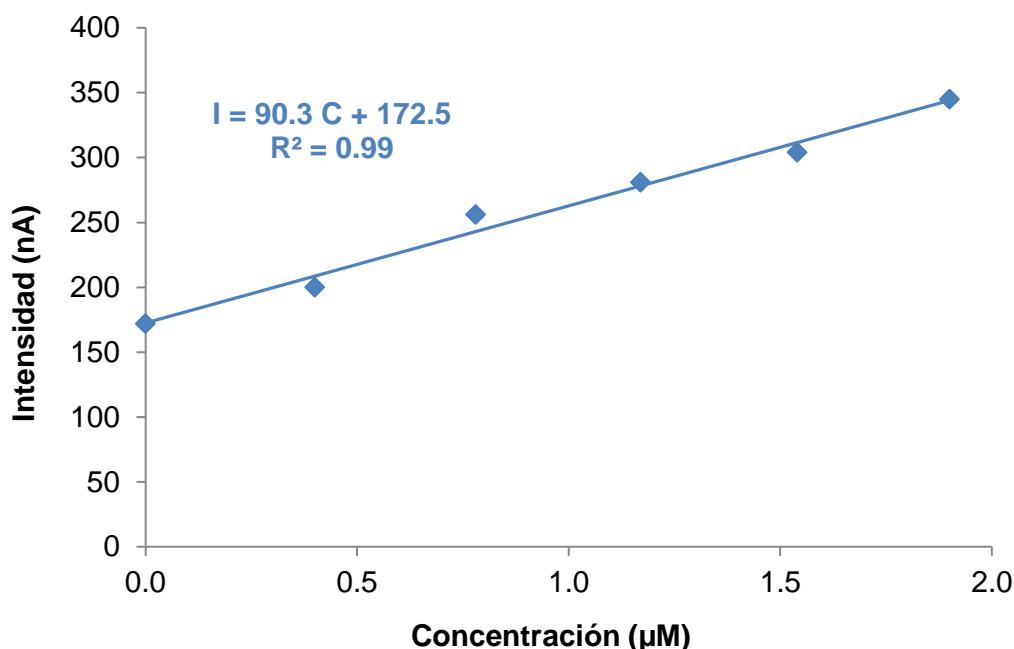
Una vez estudiadas las técnicas DPV y SWV como posibles técnicas electroquímicas para la determinación de IDP, se compararon los resultados obtenidos con el objetivo de seleccionar la más adecuada para el análisis de IDP en muestras reales.

La voltamperometría de onda cuadrada es más sensible que la diferencial de impulsos puesto que las rectas de calibrado tienen mayores pendientes. Sin embargo, presenta menor precisión en términos de reproducibilidad (RSD de 4.7% frente a 2.3%) y una peor capacidad de detección (1.01  $\mu\text{M}$  frente a 0.6  $\mu\text{M}$ ). Además, DPV presentó menos problemas en la construcción de rectas de calibrado de calidad analítica. Por ello, DPV fue la técnica utilizada para la determinación de IDP en diferentes muestras de agua.

### 6.3. Análisis de IDP en muestras acuosas mediante adición estándar

El desarrollo de un método analítico puede resultar de escaso interés si no se demuestra su eficacia en la resolución de problemas reales. Por esta razón, una vez determinadas las condiciones experimentales óptimas, la capacidad de detección y la precisión del método, se procedió al análisis de IDP en una muestra real, concretamente en agua de mar enriquecida.

Para llevar a cabo esta determinación se adicionaron 10 mL de la disolución tampón Britton-Robinson (pH 10) en la celda electroquímica, seguidamente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de agua de mar enriquecida de concentración 0.2 mM de IDP y se registró el voltamperograma. A continuación, se realizaron adiciones sucesivas de 100  $\mu\text{L}$  de IDP de concentración 0.04 mM registrándose los voltamperogramas correspondientes con los que se construyó, una vez eliminados los puntos anómalos, la curva de calibrado mostrada en la figura 14.



**Figura 14.** Puntos experimentales y curva de calibrado obtenidos mediante adición estándar para la determinación de la concentración de IDP en una muestra de agua de mar (Tampón Britton-Robinson pH 10; Potenciales vs. Ag/AgCl-SPE).

El resultado obtenido mediante adición estándar para la muestra de agua de mar enriquecida fue  $0.19 \pm 0.05$  mM. Puede verse que el valor obtenido coincide con el valor de concentración añadida al agua de mar.

## 6.4. Estudio electroquímico de IDP con diferentes electrodos serigrafiados

Una vez probada la eficacia de las técnicas electroquímicas en la determinación de IDP utilizando SPCEs, se decidió llevar a cabo un estudio empleando otros electrodos con el fin de mejorar la sensibilidad del método. En este sentido, se llevó a cabo un análisis de la posibilidad de determinar IDP mediante DPV utilizando SPAuEs, SPC<sub>Pt</sub>Es, así como, diferentes SPCEs modificados con AuNPs, polímeros (pirrol y nafion), mediadores redox (TTF y ferroceno) y MWCNTs.

### 6.4.1. Determinación de IDP mediante DPV con SPAuEs

En el caso de los SPAuEs fue necesario realizar el proceso de limpieza previo descrito en la sección 5.3. Una vez realizado dicho procedimiento de limpieza se llevó a cabo un estudio mediante DPV realizando barridos de potencial entre 0 y -1.5 V, utilizando como electrolito soporte tampón Britton-Robinson de pH 10.

Las diferentes experiencias llevadas a cabo con este tipo de electrodos demuestran que no es posible llevar a cabo el análisis de IDP a concentraciones bajas de dicho compuesto. De hecho fue imposible observar respuesta voltamperométrica para concentraciones inferiores a 0.8  $\mu$ M utilizando SPAuEs.

### 6.4.2. Determinación de IDP mediante DPV con SPC<sub>Pt</sub>Es

Un segundo tipo de electrodos serigrafiados estudiado para la determinación de IDP fueron los SPC<sub>Pt</sub>Es. En estos sistemas electródicos se utiliza un electrodo de trabajo de carbono que contiene platino.

El estudio se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior. En este caso, no se observó respuesta voltamperométrica para IDP en ningún intervalo de concentraciones. Por lo tanto, la utilización de SPC<sub>Pt</sub>Es no supone una mejora en cuanto a sensibilidad con respecto a los SPCEs.

### 6.4.3. Determinación de IDP mediante DPV con SPCEs modificados

Una vez probados tres tipos diferentes de electrodos, se planteó como posible mejora la realización de modificaciones sobre los SPCEs, con el fin de lograr una mejora en cuanto a sensibilidad.

Para las modificaciones se emplearon AuNPs, polímeros (pirrol y nafion), mediadores redox (TTF y ferroceno) y MWCNTs.

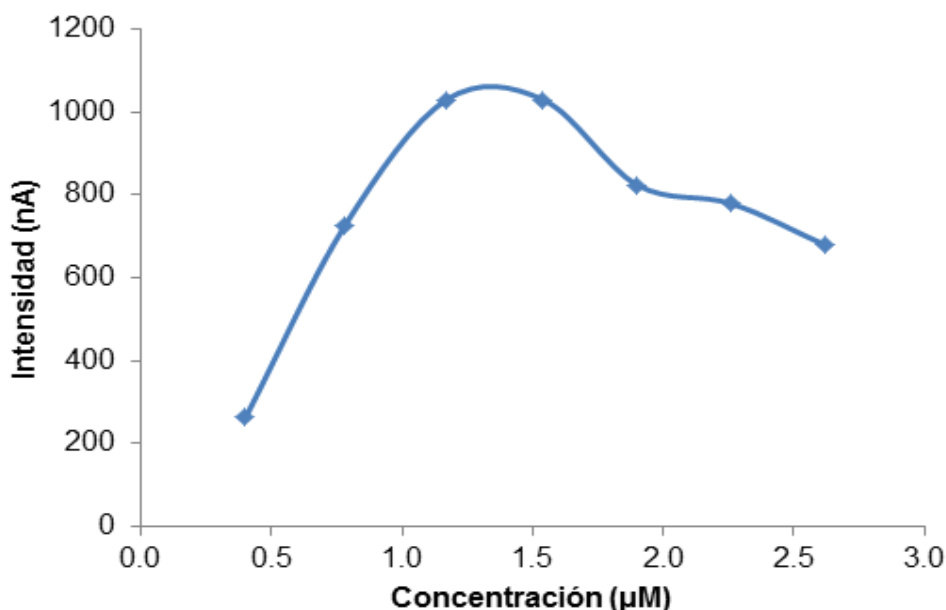
En todos los casos, se empleó DPV como técnica y tampón Britton-Robinson pH 10 como electrolito soporte. El barrido de potencial se llevó a cabo entre 0 y -1.5 V.

#### 6.4.3.1. SPCEs modificados con AuNPs

Los resultados obtenidos con SPCEs modificados con AuNPs llevaron a la conclusión de que el método era menos sensible que el basado en el empleo de SPCEs sin modificar, puesto que no se obtenía ningún pico para una concentración de IDP 3.3  $\mu\text{M}$ .

#### 6.4.3.2. SPCEs modificados con TTF

En el caso de los electrodos modificados con tetratiafulvaleno (TTF) al 2.5% pudo observarse un pico voltamperométrico a -1.1 V para una concentración de IDP 0.4  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, el electrodo únicamente permitía realizar 3 medidas (Figura 15), lo cual hace imposible obtener un calibrado con calidad analítica. Por lo tanto, la modificación de SPCEs con TTF no supone una mejora en el análisis de IDP con electrodos serigrafiados.



**Figura 15.** Evolución de la intensidad del pico de reducción obtenido a -1.1 V mediante DPV, empleando SPCEs modificados con TTF, con respecto a la concentración de IDP (Tampón Britton-Robinson pH 10; Potenciales vs. Ag/AgCl-SPE)

#### 6.4.3.3. SPCEs modificados con ferroceno

El estudio realizado empleando SPCEs modificados con ferroceno dio como resultado la ausencia de picos para una concentración de IDP 1.54  $\mu\text{M}$ . Así pues, se descartó este tipo de modificación.

#### 6.4.3.4. SPCEs modificados con Nafion

Los electrodos modificados con el polímero Nafion no supusieron una mejora en cuanto a sensibilidad con respecto a los electrodos desnudos, ya que no se obtenía ningún pico a -1.1 V para una concentración de IDP 4.0  $\mu\text{M}$ .

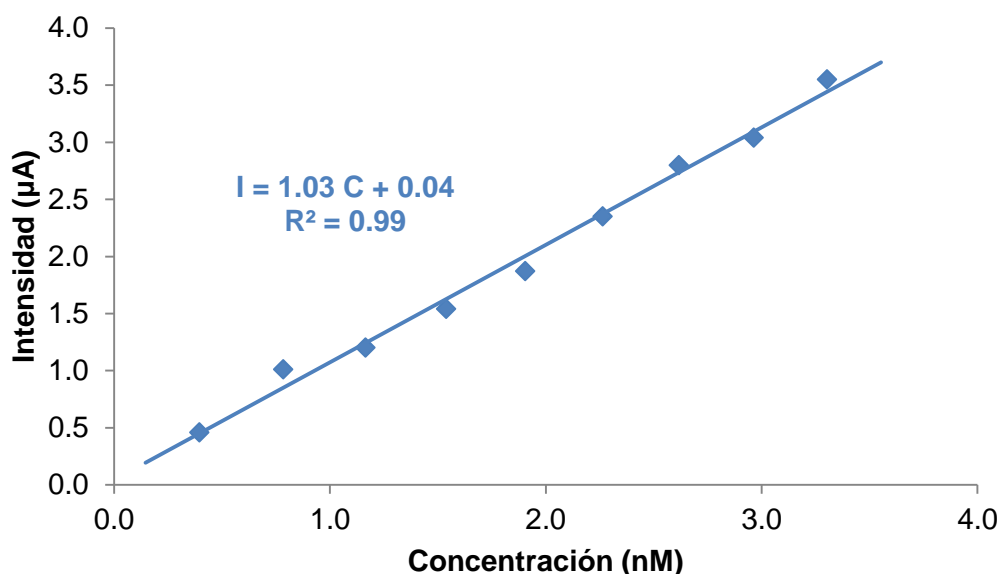
#### 6.4.3.5. SPCEs modificados con MWCNTs

La modificación de los SPCEs con MWCNTs dio lugar a la aparición de un pico a -1.1 V totalmente solapado con la respuesta electroquímica del IDP. Por lo tanto, esta modificación también fue descartada.

#### 6.4.3.6. SPCEs modificados con pirrol

Por último, se llevó a cabo la modificación de SPCEs con pirrol, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.3. Para este tipo de electrodos modificados, se observó un pico de reducción a partir de una concentración 0.4 nM de IDP, por lo que se podría reducir la capacidad de detección en tres órdenes de magnitud. Además, el pico de reducción observado aparece a un potencial de -0.6 V, lo cual supone una ventaja, puesto que al ser menor el potencial menos especies pueden interferir en la reducción del IDP.

Para este tipo de electrodos se han realizado solamente unas pocas experiencias que incluyen la construcción de calibrados como los mostrados en la figura 16, que indican una posible mejora de la sensibilidad del método. No obstante, estas experiencias requerirían estudios más avanzados para obtener resultados más completos que contemplen, por ejemplo, una optimización de los parámetros y una validación del método. Por tanto, los datos reflejados en esta memoria se presentan a modo de experiencias iniciales encaminadas a posteriores investigaciones.



**Figura 16.** Recta de calibrado obtenida mediante DPV empleando SPCEs modificados con pirrol.



## 7. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

- ✓ El IDP presenta un pico de reducción a -1.1 V que puede ser utilizado para la determinación de este compuesto mediante DPV y SWV empleando SPCEs.
- ✓ La intensidad del pico de reducción en la determinación de IDP mediante DPV está influenciada por el pH del electrolito soporte, siendo 10 el valor óptimo.
- ✓ En la determinación de IDP mediante DPV, el proceso de acumulación electroquímica genera una pérdida de sensibilidad en las medidas.
- ✓ La intensidad de pico en la determinación de IDP mediante SWV se ve influenciada por la frecuencia, siendo 50 Hz el valor óptimo.
- ✓ La reproducibilidad de los métodos propuestos en términos de RSD de las pendientes de las curvas de calibrado utilizando SPCEs es de 2.3% y 4.7% para DPV y SWV, respectivamente.
- ✓ La capacidad de detección obtenida para el IDP en las condiciones óptimas de las variables experimentales utilizando SPCEs es de  $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$  y  $1.01 \pm 0.06 \mu\text{M}$  para DPV y SWV, respectivamente.
- ✓ La técnica DPV fue elegida para el análisis de muestras reales frente a SWV por su mayor precisión, su mejor capacidad de detección y por presentar menos problemas en la construcción de rectas de calibrado de calidad analítica.
- ✓ Se ha podido llevar a cabo el análisis de IDP en muestras de agua de mar de forma adecuada mediante DPV empleando SPCEs.
- ✓ El estudio realizado sobre distintos SPEs lleva a conclusión de que es posible la determinación de IDP mediante DPV empleando SPCEs modificados con pirrol, pudiendo reducir la capacidad de detección respecto al electrodo desnudo en tres órdenes de magnitud.

## 8. Bibliografía

- [1] Johnson, R. (2010). *Honey Bee Colony Collapse Disorder*. Congressional Research Service.
- [2] Di, J.D.; Ya, H.X. (2008) *Study and determination of pesticide imidacloprid by linear sweep voltammetry at a prussian blue and MWNT modified glassy carbon electrode*, Chin. J. Anal. Lab. 27 14-17.
- [3] Kumaravel, A.; Chandrasekaran, M. (2011) *Electrochemical determination of imidacloprid using nanosilver Nafion®/nanoTiO<sub>2</sub>Nafion® composite modified glassy carbon electrode*, Sensors and Actuators B: Chemical 158, 319–326.

- [4] Guzsivany, V.J.; Gaal, F.F.; Bjelica, L.J.; Okresz, S.N. (2005) *Voltammetric determination of imidacloprid and thiamethoxam*, J. Serb. Chem. Soc. 70, 735–743.
- [5] Chen, M.; Meng, Y.; Zhang, W.; Zhou, J.; Xie, J. Diao. G. (2013)  *$\beta$ -Cyclodextrin polymer functionalized reduced-graphene oxide: Application for electrochemical determination imidacloprid*. Electrochimica Acta 108, 1–9.
- [6] Wu, L.; Zhen, H.; Weimeng, S.; Qingli, H.; Yuehua, Z.; Mingzhu, X.; Fengyun, W. (2014) *Sensitive and Selective Detection of Imidacloprid by Graphene-Oxide-Modified Glassy Carbon Electrode*; ChemElectroChem 1, 1063–1067.
- [7] Kong, L.; Jiang, X.; Zeng, Y.; Zhou, T.; Shi, G. (2013) *Molecularly imprinted sensor based on electropolymerized poly(o-phenylenediamine) membranes at reduced graphene oxide modified electrode for imidacloprid determination*; Sensors and Actuators B-Chemical 185, 424-431.
- [8] Navalon, A.; Khattabi, R.E., Casado, A.G.; Vilchez, J.L. (1999) *Differential-Pulse Polarographic determination of the insecticide imidacloprid in commercial formulations*, Mikrochim. Acta 130, 261–265.
- [9] Papp, Z.; Svancara, I.; Guzsivány, V.; Vytras, K.; Gaál, F. (2009) *Voltammetric determination of imidacloprid insecticide in selected samples using a carbon paste electrode*, Microchimica Acta 166, 169-175.
- [10] Guzsivany, V.; Kadar, M.; Papp, Z.; Bjelica, L.; Gaal, F.; Toth, K. (2008) *Monitoring of photocatalytic degradation of selected neonicotinoid insecticides by cathodic voltammetry with a bismuth film electrode*, Electroanalysis 20, 291–300.
- [11] Si, W.; Han, Z.; Lei, W.; Wu, Q.; Zhang, Y.; Xia, M.; Hao, Q.; (2014) *Fast Electrochemical Determination of Imidacloprid at an Activated Glassy Carbon Electrode*; Journal of The Electrochemical Society 161, B9-B13.
- [12] Wu, L.; Qiuju, W.; Si, Q.; Gu, W.; Zhang, Z.; Yuehua, Z.; Jiping, D.; Qingli, H. (2013) *Electrochemical determination of imidacloprid using poly(carbazole)/chemically reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode*; Sensors and Actuators B-Chemical 183, 102-109.
- [13] Papp, Z.; Guzsivány, V.; Švancara, I.; Vytřas, K. (2011) *Voltammetric Monitoring of Photodegradation of Clothianidin, Nitenpyram and Imidacloprid Insecticides Using a Tricresyl Phosphate-Based Carbon Paste Electrode*; Int. J. Electrochem. Sci., 6, 5161 – 5171.
- [14] Guzsivány, V.; Papp, Z.; Zbiljić, J.; Vajdle, O.; Rodić, M. (2011) *Bismuth Modified Carbon-Based Electrodes for the Determination of Selected Neonicotinoid Insecticides*; Molecules 16, 4451-4466.
- [15] Guiberteau, A.; Galeano, T.; Mora, N.; Parrilla, P.; Salinas, F. (2001) *Study and determination of the pesticide imidacloprid by square wave adsorptive stripping voltammetry*, Talanta 53, 943–949.
- [16] Jie, L.; Yinfeng, L.; Ge, S.; Kai, Z.; Baoxian, Y. (2014) *Sensitive determination of pesticide imidacloprid using a glassy carbon electrode modified with a film composed of multi-walled carbon nanotubes and poly(aspartic acid)*; International Journal of Environmental Analytical Chemistry 94, 884-900.
- [17] Tomlin, C.D.S. (2006) *The Pesticide Manual, A World Compendium*, 14th ed.; British Crop Protection Council: Surry, England; 598-599.

- [18] Jeschke, P.; Nauen, R. in: L. Gilbert, K. Iatrou, S. S. Gill (Eds.). (2004) *Comprehensive Molecular Insect Science*, Elsevier 5, Amsterdam, 53-105.
- [19] Buckingham, S.D.; Lapied, B.; Corronc, H.L.; Grolleau, F.; Sattelle, D.B. (1997) *Imidacloprid Actions on Insect Neuronal Acetylcholine Receptors*. J. Exp. Biol. 200, 2685-2692.
- [20] Matsuda, K.; Sattelle, D.B. (2005) *Mechanism of Selective Actions of Neonicotinoids on Insect Acetylcholine Receptors*. New Discoveries in Agrochemicals: American Chemical Society Symposium Series; Clark, J. M.; Ohkawa, H., III, Eds.; Oxford University Press: Oxford, UK; 172-183.
- [21] Sheets, L.P. (2001) *Imidacloprid: A Neonicotinid Insecticide*. Handbook of Pesticide Toxicology, 2nd ed.; Krieger, R.I., Ed.; Academic Press: San Diego, CA; Vol. 2, Chapter 54, 1123-1130.
- [22] *Label Review Manual*; U.S Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs.
- [23] Obana, H.; Okihashi, M.; Akutsu, K.; Kitagawa, Y.; Hori, S. (2002). *Determination of acetamiprid, imidacloprid and nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection*. J Agric Food Chem 50, 4464-4467.
- [24] Obana, H.; Okihashi, M.; Akutsu, K.; Kitagawa, Y.; Hori, S. (2003). *Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry*. J Agric Food Chem 51, 2501-2505.
- [25] Guzsavány, V.; Madžgalj, A.; Trebše, P.; Gaál, F. Franko M (2007). *Determination of selected neonicotinoid insecticides by liquid chromatography with thermal lens spectrometric detection*. Environ Chem Lett 5, 203–208.
- [26] de Erenchun, N.R.; de Balugera, Z.G.; Goicolea, M.A.; Barrio, R.J. (1997). *Determination of imidacloprid and its major metabolite in soils by liquid chromatography with pulsed reductive amperometric detection*. Anal Chim Acta 349, 199–206.
- [27] Watanabe, E.; Eun, H.; Baba, K.; Arao, T.; Ishii, Y.; Endo, S.; Ueji, M. (2004). *Enzyme-linked immunosorbent assay for the neonicotinoid insecticide imidacloprid in agricultural samples*. J Agric Food Chem 52, 2756–2762.
- [28] Vilchez, J.L.; Valencia, M.C.; Navalón, A.; Molinero-Morales, B.; Capitán-Vallvey, L.F. (2001). *Flow injection analysis of the insecticide imidacloprid in water samples with photochemically induced fluorescence detection*. Anal Chim Acta 439, 299–305.
- [29] Quintás, G.; Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. (2004). *Fourier transform infrared determination of imidacloprid in pesticide formulations*. J. Braz. Chem. Soc. 15, 307–312.
- [30] Apetrei, I.M.; Apetrei, C. (2015) *Study of Different Carbonaceous Materials as Modifiers of Screen-Printed Electrodes for Detection of Catecholamines*. IEEE Sensors Journal 15, 3094-3101.
- [31] Rousseeuw, P.J.; Leroy, A.M. (1989) *Robust Regression and Outlier Detection*. John Wiley and sons, New York.

- [32] Sarabia, L.; Ortiz, M.C. (1994). *DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry 13, 1-6.
- [33] Ortiz, M.C.; Sarabia, L.A.; Herrero, A. (2006) *Robust regression techniques. A useful alternative for the detection of outlier data in chemical analysis*. Talanta 70, 499-512.