



UNIVERSIDAD DE BURGOS

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

***DETERMINACIÓN DE
TIABENDAZOL CON
ELECTRODOS
SERIGRAFIADOS***

AUTORA: MARTA MELGOSA PEÑA

TUTORAS: M^a ASUNCIÓN ALONSO LOMILLO Y OLGA DOMÍNGUEZ
RENEDO

JULIO 2015



Máster "Química Avanzada"

Departamento de Química
Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos

AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DE LA TESIS DE
MÁSTER

CURSO: 2014-2015

Dña. M^a Asunción Alonso Lomillo y Dña. Olga Domínguez Renedo, Directoras de la Tesis de Máster de Dña. Marta Melgosa Peña, que lleva por título: *Determinación de tiabendazol con electrodos serigrafados*,

Autorizan

No autorizan

A defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, 16 de Julio de 2015

Dña. M^a Asunción Alonso Lomillo

Dña. Olga Domínguez Renedo

D. Jefe del Negociado o Administrador de la Secretaría de Alumnos, certifica que el alumno/a arriba mencionado tiene superado 45 créditos correspondientes al máster de Química Avanzada.

Burgos,.....

Fdo.:.....

ÍNDICE

1. – Introducción	3
2. – Fundamento teórico	4
2.1. – <i>Benzimidazol</i>	4
2.2. – <i>Tiabendazol</i>	4
2.2.1. – Determinación analítica de tiabendazol	5
2.3. – <i>Electrodos serigrafiados</i>	6
2.3.1. – Electrodo serigrafiado modificado	8
3. – Objetivo	8
4. – Experimental	8
4.1. – <i>Reactivos</i>	8
4.2. – <i>Equipos</i>	9
4.3. – <i>Procedimiento experimental</i>	9
4.3.1. – Medidas voltamperométricas	9
4.3.2. – Preparación de SPCEs modificados con AuNPs	9
5. – Resultados y discusión	10
5.1. – <i>Determinación voltamperométrica de tiabendazol con SPCEs</i>	10
5.1.1. – Selección del electrolito de trabajo	10
5.1.2. – Selección del pH de trabajo	12
5.1.3. – Precisión y capacidad de detección	13
5.1.4. – Determinación de TBZ en una muestra de agua de río	16
5.2. – <i>Determinación de tiabendazol con SPCEs modificados</i>	16
5.2.1. – Determinación de tiabendazol con SPC _{TTFES}	19
5.3.2. – Determinación de TBZ en una muestra de agua de río	20
6. – Conclusiones	22
7. – Bibliografía	23

1. – INTRODUCCIÓN

El tiabendazol (TBZ) es un fungicida que pertenece a la familia del benzimidazol. Se trata de un compuesto de gran importancia en agricultura, donde el uso de este tipo de sustancias está muy extendido.

Debido a los efectos nocivos que ejerce sobre la salud humana y el medioambiente, es de gran interés su detección en frutas, verduras y aguas. Por ello, es esencial el desarrollo de métodos analíticos simples, rápidos y sensibles para su detección.

Las técnicas analíticas convencionales empleadas en la detección de TBZ resultan efectivas y precisas, aunque requieren un elevado coste de instrumentación y de tiempo de análisis. Los sensores electroquímicos pueden considerarse como una alternativa interesante en el análisis de TBZ debido a sus características, entre las que se incluyen su facilidad de uso, su portabilidad y su capacidad para realizar análisis *in situ*.

El uso de electrodos serigrafiados (SPEs) como transductores para la construcción de sensores electroquímicos ofrece, además, grandes ventajas debido a su carácter desechable y gran versatilidad, que reside en la amplia gama de posibles métodos de modificación de la superficie, entre los que se encuentran la incorporación de mediadores redox o nanopartículas metálicas. Esto último, por lo general, mejora notablemente la sensibilidad del sensor desechable debido a sus excelentes propiedades catalíticas.

En este trabajo se ha desarrollado un método electroquímico simple y rápido para la determinación del TBZ en muestras de agua mediante voltamperometría de onda cuadrada (SWV), utilizando SPEs. En una primera etapa del trabajo se ha llevado a cabo la optimización de los parámetros experimentales, con el objetivo de conseguir medidas precisas, sensibles y selectivas de TBZ con electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs). Seguidamente, con el fin de probar la eficacia del sensor optimizado, se han analizado muestras de agua de río enriquecidas con TBZ.

En una segunda etapa, se ha probado la posibilidad de utilizar SPCEs modificados mediante diferentes procedimientos, para conseguir una mejora de la capacidad de detección del sensor en distintos tipos de muestras. Así, se han realizado experiencias con SPCEs modificados con nanopartículas de oro (AuNPs-SPCEs) y con sistemas electródicos serigrafiados basados en electrodos de trabajo de carbono platinizado (SPC_{Pt}Es). También se ha llevado a cabo el estudio de la respuesta voltamperométrica de TBZ en SPCEs modificados con mediadores redox como el hexacianoferrato (II) de potasio (SPC_{Fe(II)}Es) y el tetratiafulvaleno (SPC_{TTF}Es).

2. – FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. – BENZIMIDAZOL

El benzimidazol (Figura 1), es una clase de fungicida utilizado como pesticida de amplio espectro contra insectos, hongos y malas hierbas en una amplia variedad de cultivos de frutas y verduras [1].

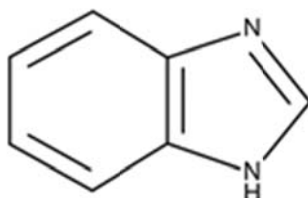


Figura 1.- Estructura química del benzimidazol.

Los beneficios generados por la utilización de fungicidas derivados del benzimidazol en agricultura son numerosos, aunque su uso masivo en los últimos años ha llevado a una gran acumulación de los mismos en el medioambiente, contaminando las aguas naturales. Este hecho no puede ser ignorado debido a sus posibles efectos nocivos en la salud. Así, la Directiva Europea del Marco del Agua ha establecido un nivel de concentración máximo de 0.1 mg/L de compuestos de benzimidazol en las aguas naturales, y una concentración total de todos los plaguicidas de 0.5 mg/L [1, 2].

2.2. – TIABENDAZOL

Uno de los derivados del benzimidazol frecuentemente empleado como fungicida es el TBZ. El TBZ, [2-(4-tiazolil) benzimidazol], (Figura 2), se introdujo en 1960 inicialmente como fármaco vermífugo en medicina y veterinaria, debido a su capacidad para eliminar lombrices intestinales en seres humanos y mamíferos en general, aunque dependiendo de la dosis suministrada, esta sustancia puede causar efectos adversos como dolor abdominal, náuseas, mareos y otras dolencias cognitivas [3].

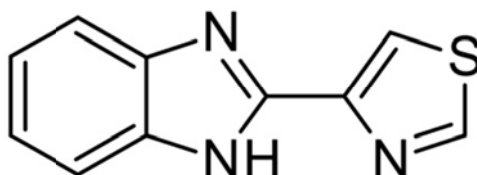


Figura 2.- Estructura química del TBZ.

Posteriormente se utilizó como fungicida en agricultura, principalmente para controlar los hongos formados después de la cosecha de frutas y verduras, además de como parasiticida y conservante de alimentos, formando parte de las ceras que se aplican sobre la piel de diferentes frutas [3].

La Agencia de Protección Medioambiental estadounidense (EPA), ha englobado al TBZ dentro de la categoría 4 de toxicidad, en la que el rango 1 se corresponde con la sustancia más tóxica y el 4 la menos tóxica. Este valor ha sido otorgado teniendo en cuenta su baja toxicidad cutánea. Sin embargo, los residuos que deja en animales o plantas comestibles representan una gran amenaza para la salud humana a través de la cadena alimentaria, ya que el TBZ se absorbe rápidamente por vía digestiva y sus metabolitos se distribuyen por todo el organismo donde pueden causar efectos nocivos, hecho que ha provocado que otros organismos oficiales lo hayan clasificado como un compuesto de elevada toxicidad [4].

Entre los efectos nocivos del TBZ, se encuentra la alteración en las hormonas tiroideas, por lo que se considera también agente carcinógeno en dosis altas [4]. Además, el TBZ se ha relacionado con enfermedades hepáticas y, en estudios con animales se han encontrado dolencias en el riñón así como problemas teratogénicos y reproductivos a dosis elevadas [3].

El uso extensivo de TBZ en frutas y verduras puede afectar a la calidad de los recursos medioambientales, por ejemplo a las aguas subterráneas y aguas superficiales. En este tipo de muestras, la determinación de residuos de TBZ es difícil, no solo por los bajos niveles en los que se encuentra presente, sino por la complejidad de la matriz. Por todo esto, es de gran importancia el desarrollo de un método simple, rápido y seguro para su determinación [4, 5].

2.2.1. – Determinación analítica de tiabendazol

El análisis de TBZ se ha llevado a cabo mediante diferentes métodos, entre los que se encuentran la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [6], la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [7], la fluorescencia [8] y la espectroscopia Raman [4]. Sin embargo, estos métodos presentan varios inconvenientes como elevado coste instrumental, procedimientos de laboratorio sofisticados, necesidad de personal cualificado, tiempo de análisis alto y complejos pretratamientos de las muestras, lo que limita su aplicación en la detección de TBZ en muestras reales.

Las técnicas electroquímicas se presentan como una interesante alternativa de análisis debido a que carecen de las limitaciones descritas anteriormente para otros métodos de análisis. Sin embargo, son muy pocos los métodos electroquímicos que existen descritos en bibliografía para la determinación de TBZ.

El primer método electroquímico desarrollado para la determinación de TBZ, utiliza un electrodo de gota de mercurio como electrodo de trabajo empleando polarografía diferencial de impulsos (DPP) como técnica

electroquímica. El método desarrollado se basa en la oxidación del mercurio y la posterior formación del complejo mercurio(II)-tiabendazol. Este método presenta buenos resultados en términos de límite de detección de acuerdo con el criterio $3s_b/m$ ($2.5 \mu\text{M}$), siendo m la pendiente de la curva de calibración y s_b la desviación estándar de 10 medidas de TBZ al valor más bajo de concentración utilizado para construir la curva de calibrado. Además, ha sido aplicado con éxito en la determinación de TBZ en diversas frutas [9].

El electrodo de mercurio ha sido también utilizado para el desarrollo de un método de análisis de TBZ mediante voltamperometría de redisolución adsorptiva basado en la reducción del complejo formado entre TBZ y Ni(II). El límite de detección obtenido resulta 100 veces menor que el descrito en el anterior trabajo aunque no ha sido empleado en el análisis de muestras reales [10].

La utilización de electrodos de mercurio, aunque proporciona métodos de elevada sensibilidad, es cada vez más reducida debido a las propiedades tóxicas de este elemento. Entre los electrodos empleados para la determinación de TBZ se encuentra el electrodo de carbono vitrificado (GCE). Así, este electrodo ha sido utilizado para la determinación de TBZ mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica empleando diferentes electrolitos de soporte (disolución 0.1 M de KOH y en mezclas metanol-agua y acetonitrilo-agua en presencia de NaClO_4). Los mejores resultados en cuanto a límite de detección se obtuvieron en KOH con valores de $0.21 \mu\text{M}$, siguiendo el criterio $3s_b/m$, aunque el método no fue aplicado en el análisis de TBZ en muestras reales. En este mismo trabajo se estudiaron también diferentes fungicidas mediante SWV en diferentes medios. En el caso del TBZ se obtuvieron picos voltamperométricos bien definidos a un potencial próximo a $+1.5 \text{ V vs Ag/AgCl/KCl (3 M)}$, en una mezcla 70:30 de metanol:agua en presencia de NaClO_4 como electrolito de soporte, aunque no se aportan datos ni de precisión ni de sensibilidad [11].

Un trabajo más reciente describe la determinación de TBZ mediante voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) empleando un GCE modificado con nanotubos de carbono funcionalizados con grupos carboxilo (MWCNT-COOH/GCE). La determinación se llevó a cabo en tampón fosfato pH 6, obteniéndose un límite de detección para el TBZ de $0.3 \mu\text{M}$, siguiendo el criterio $3s_b/m$, con un valor de desviación estándar relativa (RSD) del 4.2 %. El método propuesto fue además aplicado satisfactoriamente en la determinación de TBZ en muestras reales mediante adición estándar, concretamente en frutas [5].

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, puede decirse que las técnicas electroquímicas pueden emplearse con éxito en la determinación de TBZ. Las claras ventajas que estas técnicas presentan con respecto a los métodos tradicionales pueden verse incrementadas mediante la utilización de SPEs.

2.3. – ELECTRODOS SERIGRAFIADOS

La sustitución de los electrodos sólidos convencionales por SPEs ha incrementado las posibilidades de las técnicas electroanalíticas en el campo del análisis.

Sus numerosas ventajas, entre las que se incluyen su sencillo proceso de fabricación, su bajo coste, su reducido tamaño, sus características desechables, su portabilidad (lo cual permite un análisis *in situ* de las muestras) y la posibilidad de producción en masa, han reforzado el uso de este tipo de electrodos. Por otra parte, los SPEs evitan algunos problemas comunes relacionados con los electrodos sólidos tradicionales, como son los inevitables procesos de limpieza [12].

El proceso de serigrafado es un método de impresión directa que consiste básicamente en la deposición de tintas capa a capa sobre un sustrato utilizando una pantalla o tamiz, de tal manera que las tintas pasan a través de las zonas no obturadas de ésta, quedando impresas sobre el sustrato y definiendo así la geometría del sensor. Para llevar a cabo este proceso de impresión la tinta se deposita inicialmente sobre la pantalla. A continuación se hace pasar una rasqueta que extiende la tinta por la pantalla cubriendo los diferentes motivos diseñados en ésta. La tinta pasa a través de los poros no obturados de la pantalla, quedando depositada en el sustrato con la forma correspondiente.

La combinación sucesiva de diferentes pantallas y distintas tintas es empleada normalmente para la fabricación de los distintos electrodos (trabajo, referencia y contraelectrodo) mostrados en la figura 3.

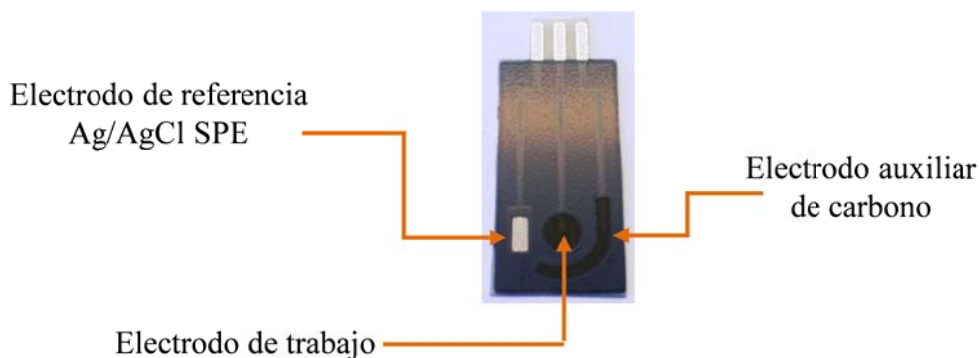


Figura 3.- Imagen de los SPEs empleados en este trabajo.

Una vez impresas las tintas sobre el soporte es necesario someterlas a un proceso de curado o endurecimiento mediante un proceso térmico, que dependiendo del material aglutinante, puede llegar a alcanzar los 1000 °C. En el caso de las tintas basadas en resinas, como las utilizadas en la fabricación de los dispositivos utilizados en este trabajo, la temperatura de curado requerida es menor, entre 80 °C y 120 °C [13, 14].

Una de las ventajas de los SPEs es que pueden ser modificados fácilmente con diferentes materiales para ser adaptados adecuadamente a las características del problema analítico concreto planteado.

2.3.1. – Electroodos serigrafiados modificados

El diseño de materiales nanométricos ha adquirido gran importancia en los últimos años debido a sus múltiples aplicaciones en varios campos. Entre estos materiales, son de gran interés las nanopartículas metálicas ya que, debido a su reducido tamaño, exhiben importantes propiedades físicas y eléctricas que las hacen muy útiles para la construcción de sensores electroquímicos más sensibles [15]. Por ejemplo, la modificación de la superficie del electrodo con nanopartículas metálicas incrementa el área superficial efectiva, mejora el transporte de masa, y en algunos casos, las propiedades catalíticas de las nanopartículas pueden reducir el potencial de trabajo o incluso mejorar la reversibilidad de algunos procesos redox [16]. Por ello, la modificación de SPEs con nanopartículas metálicas incrementa el buen rendimiento de este tipo de electrodos desechables.

Es posible encontrar en bibliografía numerosos métodos que describen la síntesis de nanopartículas metálicas utilizando distintos procedimientos, como síntesis química mediante reducción con diversos agentes o métodos electroquímicos. Estos últimos proporcionan una alternativa fácil y rápida para la preparación de nanopartículas metálicas. En este contexto, la combinación de SPEs y posterior electrodeposición de nanopartículas permite la producción de sensores electroquímicos de una forma muy sencilla [17-19].

Teniendo en cuenta las interesantes propiedades de las nanopartículas metálicas y de los SPEs, en este trabajo, se propuso la modificación de SPCEs con AuNPs (AuNPs-SPCEs) con el fin de aumentar la sensibilidad de los sensores desechables.

Otra posible modificación de los SPEs consiste en la incorporación a la tinta, utilizada en el serigrafiado del electrodo de trabajo, de mediadores redox. Así, en este trabajo se han probado también SPCEs modificados con dos mediadores diferentes: $\text{SPC}_{\text{TTFEs}}$ y $\text{SPC}_{\text{Fe(II)Es}}$.

3. – OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido desarrollar un método electroquímico sensible para la determinación de TBZ en muestras acuosas, basado en la utilización de electrodos desechables.

4. – EXPERIMENTAL

4.1. – REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se utilizó agua Mili Q (Millipore, Bedford, USA) para preparar todas las disoluciones.

Como electrolito de soporte en las medidas voltamperométricas se empleó una disolución 0.1 M de fosfato (KH_2PO_4 , Panreac, Barcelona, España) y 0.1 M de KCl (Merck, Darmstadt, Alemania). Para ajustar los valores de pH de las disoluciones se utilizó una disolución 2.0 M de NaOH (J.T. Baker, Deventer, Países Bajos).

Las disoluciones de TBZ fueron preparadas en metanol (BDH Prolabo, Francia).

Las disoluciones 0.1 mM de Au(III) fueron preparadas disolviendo la cantidad apropiada $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en H_2SO_4 0.5 M (Merck, Darmstadt, Alemania).

4.2. – EQUIPOS

Las medidas electroquímicas se realizaron con un potenciostato PalmSens® (PalmSens® Instruments BV, Houten, Países Bajos).

Las disoluciones de pH fueron medidas con un pHmetro Crison Model 2002 (Barcelona, Spain).

Los dispositivos serigrafiados (Figura 3) utilizados en este trabajo constan de un electrodo de referencia serigrafiado de Ag/AgCl (Ag/AgCl SPE) y un electrodo serigrafiado auxiliar de carbono. Como electrodo de trabajo se emplearon SPCEs, AuNPs-SPCEs, $\text{SPC}_{\text{Fe(II)}}$ ES, SPC_{TTF} ES y SPC_{Pt} ES.

4.3. – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.3.1. – Medidas voltamperométricas

Las medidas de SWV fueron realizadas a temperatura ambiente en una celda electroquímica que contenía 5 mL de electrolito soporte. El barrido de potenciales fue realizado de 0 a +1.8 V vs Ag/AgCl SPE, empleando una frecuencia de 10 Hz, un E_{step} de 25 mV y un E_{pulse} de 8 mV.

4.3.2. – Preparación de SPCEs modificados con AuNPs

La modificación de los SPCEs con AuNPs se llevó a cabo mediante la deposición de 100 μL de HAuCl_4 0.1 mM, preparado en H_2SO_4 0.5 M sobre el sistema de electrodos serigrafiados. A continuación, se aplicó un potencial de +0.18 V vs Ag/AgCl SPE durante 15 s.

Los AuNPs-SPCEs fueron finalmente lavados con agua-Milli-Q.

5. – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. – DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE TIABENDAZOL CON SPCEs

Inicialmente, se evaluó la respuesta electroquímica de TBZ mediante SWV empleando SPCEs.

En la figura 4 se muestra el voltamperograma obtenido en una disolución de TBZ de concentración 150 μM . En dicha figura puede observarse la presencia de un pico de oxidación a un potencial próximo a +1.15 V vs Ag/AgCl SPE, relacionado con la oxidación del átomo de azufre presente en la molécula [20].

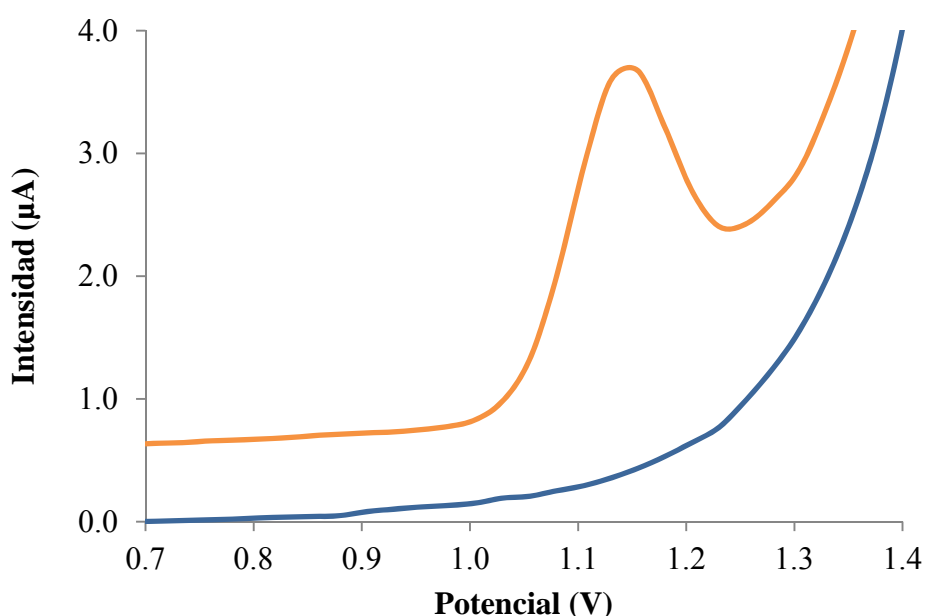


Figura 4.- Respuesta voltamperométrica obtenida mediante SWV empleando un SPCE: — Blanco — [TBZ], 150 μM (Electrolito de soporte, pH 6; Potenciales vs Ag/AgCl SPE)

Con el objetivo de maximizar dicha intensidad de oxidación como respuesta analítica para una concentración dada de TBZ, la primera etapa del trabajo consistió en la selección del electrolito de soporte más adecuado para dicho análisis y su valor de pH.

5.1.1. – Selección del electrolito de soporte

En una primera fase del trabajo experimental se llevó a cabo la determinación de TBZ mediante SWV con SPCEs empleando los diferentes medios de análisis descritos en la bibliografía, incluyendo disoluciones de NaClO_4 y mezclas metanol:agua. En ninguno de los casos se registraron buenos resultados desde un punto de vista analítico.

Por ello, se llevaron a cabo estudios en medio fosfato, concretamente en disoluciones de KH_2PO_4 50 mM o 100 mM con KCl 100 mM.

En la figura 5 se muestran los voltamperogramas obtenidos en ambos medios. Puede observarse como los mejores resultados (valores de intensidad de oxidación de TBZ más elevados) se obtuvieron utilizando como electrolito de soporte una disolución 100 mM de KH_2PO_4 con KCl 100 mM.

Figure 5 consists of two cyclic voltammograms, (a) and (b), showing the oxidation of TBZ. Both graphs plot Intensity (μA) on the y-axis against Potential (V) on the x-axis, ranging from 0.2 to 1.7 V. The legend for both graphs includes Blanco (blue line), 0.1 mM TBZ (red line), and a higher concentration of TBZ (purple line).

Graph (a) shows results for KH_2PO_4 50 mM and KCl 100 mM. The y-axis ranges from 0 to 30 μA . The Blanco curve (blue) shows a low current, starting at ~7 μA at 0.2 V and rising to ~10 μA at 1.7 V. The 0.1 mM TBZ curve (red) starts at ~30 μA at 0.2 V, drops to ~2 μA at 0.5 V, and then rises to ~25 μA at 1.7 V. The 0.6 mM TBZ curve (purple) starts at ~27 μA at 0.2 V, drops to ~2 μA at 0.5 V, and then rises to ~26 μA at 1.7 V.

Graph (b) shows results for KH_2PO_4 100 mM and KCl 100 mM. The y-axis ranges from 0 to 100 μA . The Blanco curve (blue) starts at ~10 μA at 0.2 V and rises to ~90 μA at 1.7 V. The 0.1 mM TBZ curve (red) starts at ~20 μA at 0.2 V, drops to ~2 μA at 0.5 V, and then rises to ~95 μA at 1.7 V. The 0.4 mM TBZ curve (purple) starts at ~60 μA at 0.2 V, drops to ~2 μA at 0.5 V, and then rises to ~100 μA at 1.7 V.

Figura 5.- Voltamperogramas registrados mediante SWV para adiciones sucesivas de TBZ, utilizando SPCEs: (a) KH_2PO_4 50 mM y KCl 100 mM, (b) KH_2PO_4 100 mM y KCl 100 mM. (Potenciales vs Ag/AgCl SPE)

Determinación de TBZ con electrodos serigrafados

11

5.1.2. – Selección del pH de trabajo

La respuesta electroquímica de un sensor voltamperométrico se encuentra, naturalmente, influenciada por el pH de trabajo. Por ello, en una segunda etapa se llevaron a cabo diferentes experiencias variando el pH del electrolito de soporte optimizado, con el objetivo de encontrar el valor más adecuado para dicho parámetro. Dichas experiencias consistieron en el registro de la respuesta voltamperométrica obtenida para una disolución de TBZ de concentración 0.2 mM a valores de pH 5, 6, 7, 8 y 9.

Las experiencias realizadas demostraron que la mejor respuesta voltamperométrica se observaba para el valor de pH 6 (Figura 6).

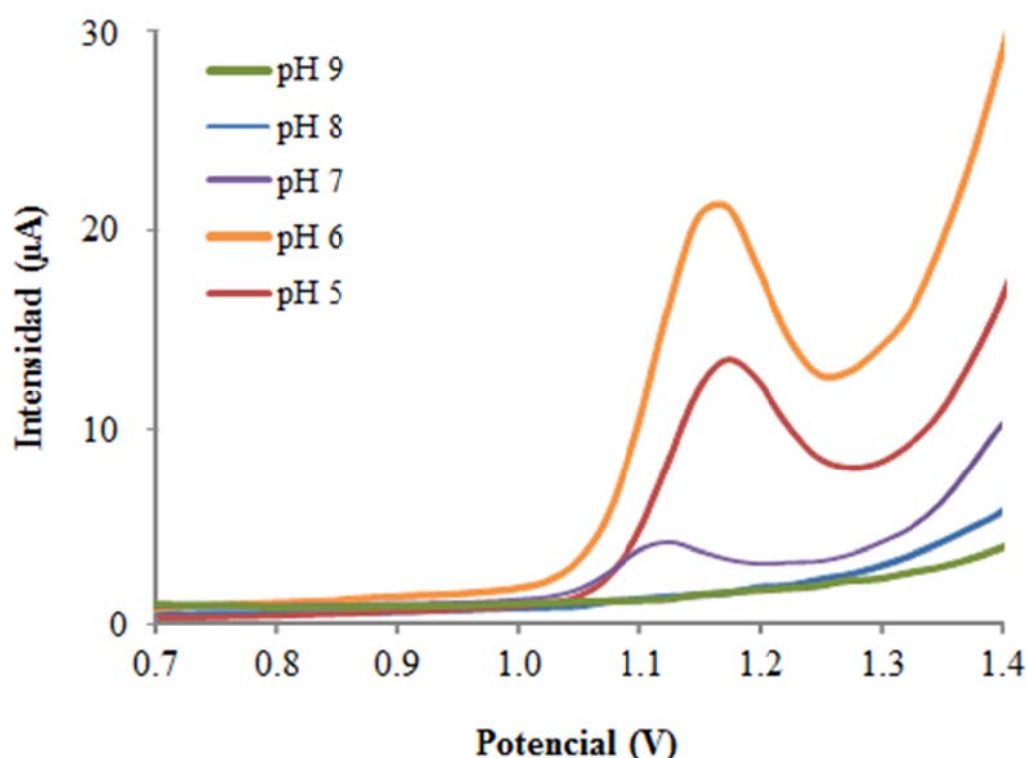


Figura 6.- Voltamperogramas registrados mediante SWV con SPCEs para diferentes valores de pH en KH_2PO_4 100 mM y KCl 100 mM para una disolución 0.2 mM de TBZ (Potenciales vs Ag/AgCl SPE).

En las condiciones experimentales optimizadas es posible obtener una respuesta voltamperométrica que aumenta linealmente con la concentración de TBZ. En la figura 7 se muestran diferentes voltamperogramas obtenidos mediante SWV, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 15 y 136 μM .

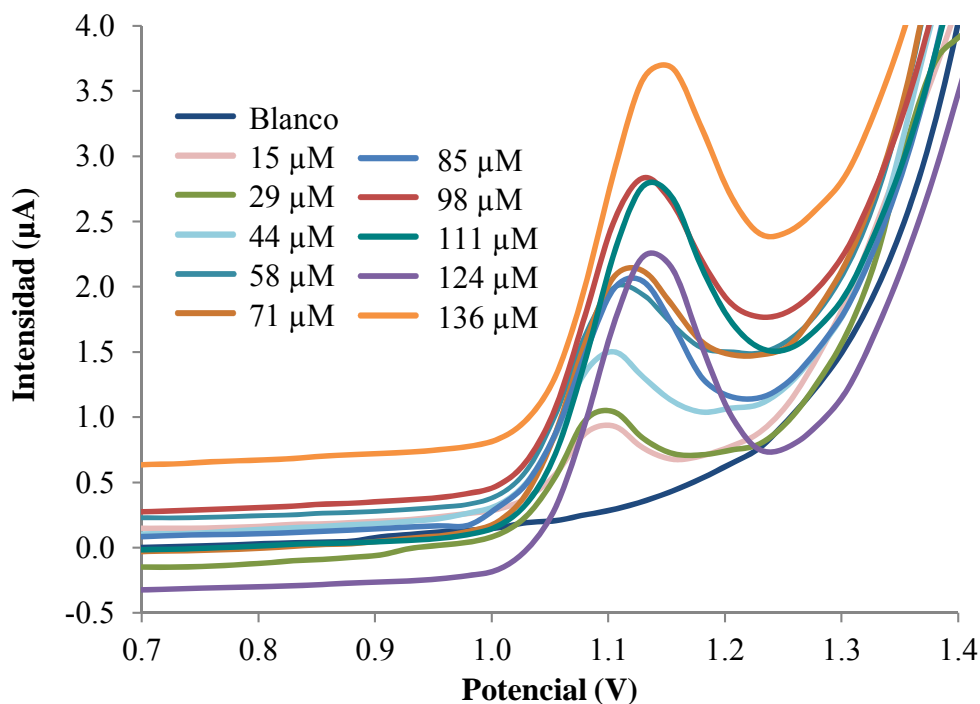


Figura 7.- Respuesta voltamperométrica obtenida mediante SWV empleando un SPCE para diferentes adiciones de una disolución de TBZ (Electrolito de soporte, pH 6; Potenciales vs Ag/AgCl SPE)

Las variaciones de intensidad de corriente registrada para las diferentes adiciones de TBZ, permiten construir una curva de calibración. Para la construcción de las curvas de calibrado se eligió un método de regresión robusto, la regresión por Mínimos Cuadrados Preponderada (*Reweighted Least Squares*, RLS), basada en la regresión por mínimos cuadrados (*Ordinary Least Squares*, OLS) realizada una vez eliminados los puntos anómalos detectados con una regresión por Mínima Mediana de Cuadrados (*Least Median Squares*, LMS) [11, 21].

En la figura 8 se muestra la curva de calibración obtenida una vez eliminados los puntos anómalos, donde puede verse como, efectivamente, existe una relación lineal entre la señal registrada y la concentración de TBZ.

5.1.3. – Precisión y capacidad de detección

Para caracterizar un procedimiento analítico y asegurar su calidad es importante establecer su precisión y su capacidad de detección.

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en unas condiciones bien definidas. Así pues, evalúa la dispersión de los resultados que se obtienen al realizar réplicas de medidas sobre una misma muestra. Se expresa estadísticamente a través de la desviación estándar

en términos relativos, ya que mientras la desviación estándar en términos absolutos aumenta con la concentración, la desviación estándar relativa (RSD) disminuye, es decir, se estabiliza a concentraciones elevadas [22].

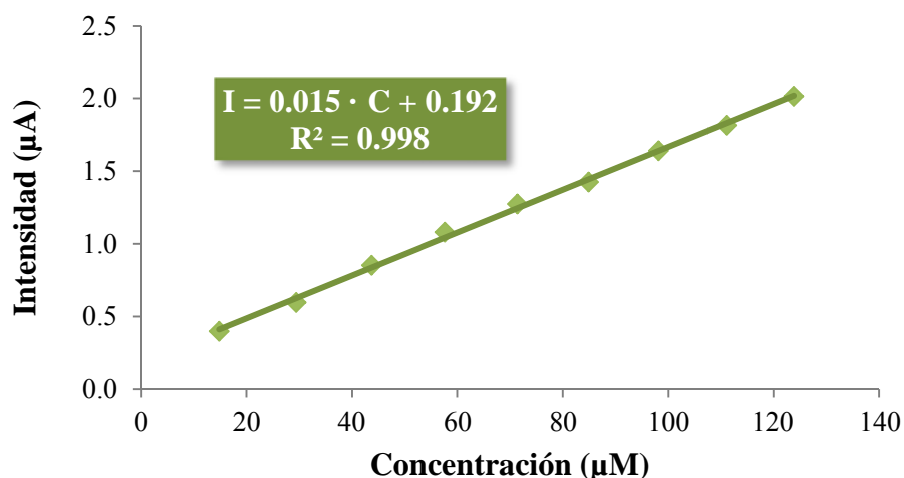


Figura 8.- Curva de calibrado obtenida mediante SWV con SPCEs en el intervalo de concentraciones de TBZ comprendido entre 15 y 136 µM. (Electrolito de soporte, pH 6)

Es recomendable distinguir entre unas condiciones de mínima variación de los factores de influencia y unas condiciones de máxima variación de los mismos sobre la precisión, lo que se conoce como condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad.

Las condiciones de repetibilidad son aquellas en las que las medidas se realizan aplicando el mismo método a un mismo material, con los mismos equipos y reactivos, el mismo operador y en un intervalo corto de tiempo, generalmente una sesión de trabajo.

Cuando las medidas se obtienen con el mismo método, sobre las mismas muestras, pero con reactivos, equipos, condiciones ambientales y operadores distintos se habla de condiciones de reproducibilidad [22].

En este caso, el factor más influyente en el procedimiento desarrollado para distinguir entre ambos índices es el electrodo serigrafiado utilizado para realizar las medidas voltamperométricas.

Inicialmente, se comprobó la reproducibilidad del procedimiento desarrollado para el método optimizado. Para la estimación de este parámetro, se realizaron tres calibrados de TBZ en las condiciones optimizadas en las etapas anteriores utilizando diferentes SPCEs. En todos los casos se hicieron adiciones de 50 µL de TBZ de concentración 1.5 mM. En la figura 9 se muestran las diferentes curvas de calibración obtenidas, una vez eliminados los puntos anómalos.

Una vez construidas las curvas de calibración, la reproducibilidad del método fue calculada en términos del valor de RSD asociado a las pendientes de dichas rectas. El valor obtenido para dicho parámetro fue de 4.0 %.

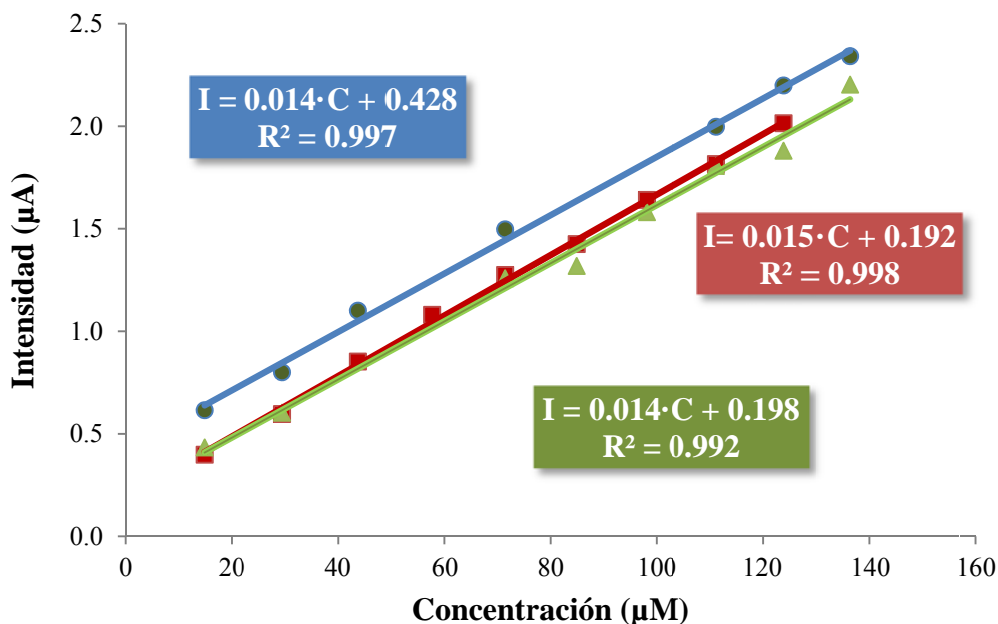


Figura 9.- Curvas de calibración construidas mediante SWV con SPCEs en el intervalo de concentraciones de TBZ comprendido entre 15 y 136 µM para la estimación de la reproducibilidad del método (Electrolito de soporte, pH 6)

El cálculo de la repetibilidad se llevó a cabo mediante la construcción de diferentes curvas de calibrado utilizando el mismo SPCE, en las condiciones óptimas de las variables experimentales. En esta ocasión no se obtuvieron buenos resultados puesto que no fue posible la reutilización del electrodo, sin embargo, este resultado carece de importancia teniendo en cuenta el carácter desechable de los electrodos utilizados.

Se analizó finalmente la capacidad de detección del procedimiento analítico, definida como la concentración o la cantidad de analito derivada de la medida más pequeña y que puede detectarse con una certeza razonable. A menor ruido y mayor sensibilidad del método, mayor será también la capacidad de discriminación entre el blanco y las muestras o patrones a baja concentración [22]. Se han de evitar dos tipos de errores [18, 23]:

- ✓ Los falsos positivos (α), denominados errores de tipo α , que consisten en dictaminar la presencia de analito cuando en realidad la muestra no lo contiene. Se trata de un error de tipo I.
- ✓ Los falsos negativos (β), denominados errores de tipo β , en los que se determina que no hay analito cuando en realidad la muestra lo contiene. Se trata de un error de tipo II.

La capacidad de detección del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de TBZ fue caracterizado teniendo en cuenta una probabilidad de falso positivo (α) y falso negativo (β) de 0.05, para lo que se utilizó el programa DETARCHI [24]. Para el cálculo de dicho parámetro de calidad se utilizaron tres regresiones lineales. El valor de capacidad de detección obtenido fue $6.7 \pm 0.8 \mu\text{M}$, sin embargo este valor fue menor que el valor del primer estándar utilizado para construir las curvas de calibrado $15 \mu\text{M}$. Por lo tanto, desde un punto de vista analítico, este último valor se estimó como capacidad de detección del método desarrollado [25].

5.1.4. – Determinación de TBZ en una muestra de agua de río

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 TBZ en una muestra real, concretamente en agua de río enriquecida con TBZ. Así, se realizó el análisis de una muestra de agua de río procedente del Arlanzón (Burgos) enriquecida con TBZ hasta una concentración de $150 \mu\text{M}$.

Para llevar a cabo esta determinación se construyeron mediante adición estándar tres curvas de calibrado que condujeron, una vez eliminados los puntos anómalos, a un valor de $147 \pm 5 \mu\text{M}$. Este resultado confirma la validez del método desarrollado.

5.2. – DETERMINACIÓN DE TIABENDAZOL CON SPCEs MODIFICADOS

La siguiente etapa del trabajo experimental consistió en el estudio de la respuesta voltamperométrica del TBZ en SPCEs modificados. En primer lugar se utilizaron AuNPs-SPCEs, según el proceso de modificación descrito en la sección 4.3.2. Desafortunadamente no se obtuvieron buenos resultados para este tipo de electrodos modificados, ya que la oxidación del oro se produce a potenciales más bajos que la señal obtenida de TBZ (Figura 10), por lo que los resultados no fueron concluyentes.

Seguidamente, se estudió la posibilidad de medir TBZ con SPC_{Pt} Es. Con este tipo de sensores, no se registró respuesta voltamperométrica de oxidación alguna para poder llevar a cabo la determinación de TBZ (Figura 11).

Finalmente, se realizaron diferentes experiencias con electrodos modificados con mediadores redox: $\text{SPC}_{\text{Fe(II)}}$ Es (Figura 12) y SPC_{TTF} Es (Figura 13). Únicamente, los electrodos modificados con TTF condujeron a resultados satisfactorios, registrándose un pico a un potencial próximo a $+ 1.15 \text{ V vs Ag/AgCl SPE}$ cuya intensidad aumenta con la concentración de TBZ. Las experiencias realizadas con este tipo de electrodos se describen con mayor detalle en las secciones siguientes.

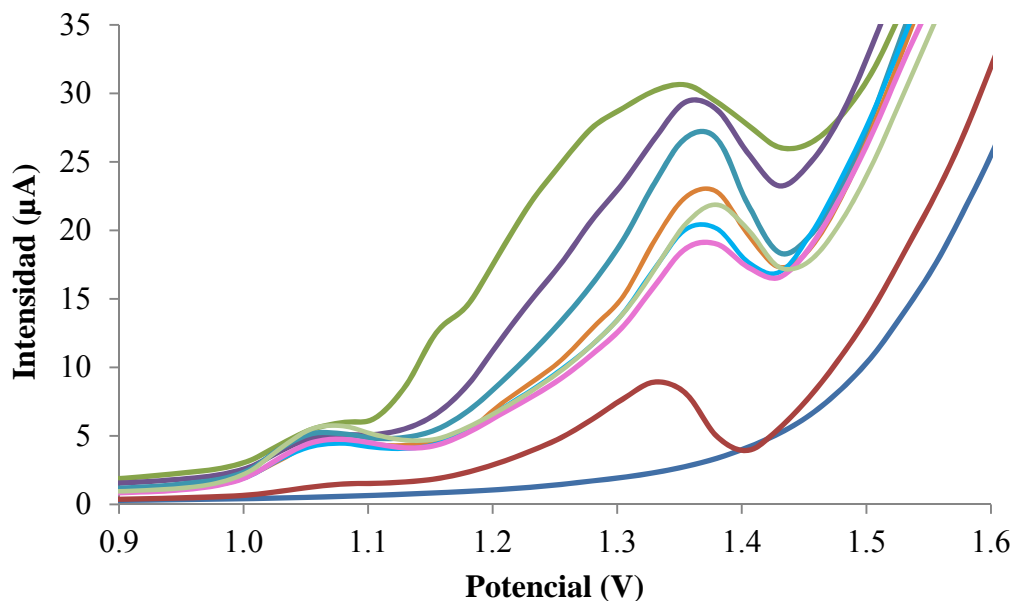


Figura 10.- Medidas voltamperométricas obtenidas mediante SWV empleando un AuNPs-SPCE en el intervalo de concentraciones de TBZ comprendido entre 12 y 97 μM (Electrolito de soporte, pH 6; Potenciales vs Ag/AgCl SPE)

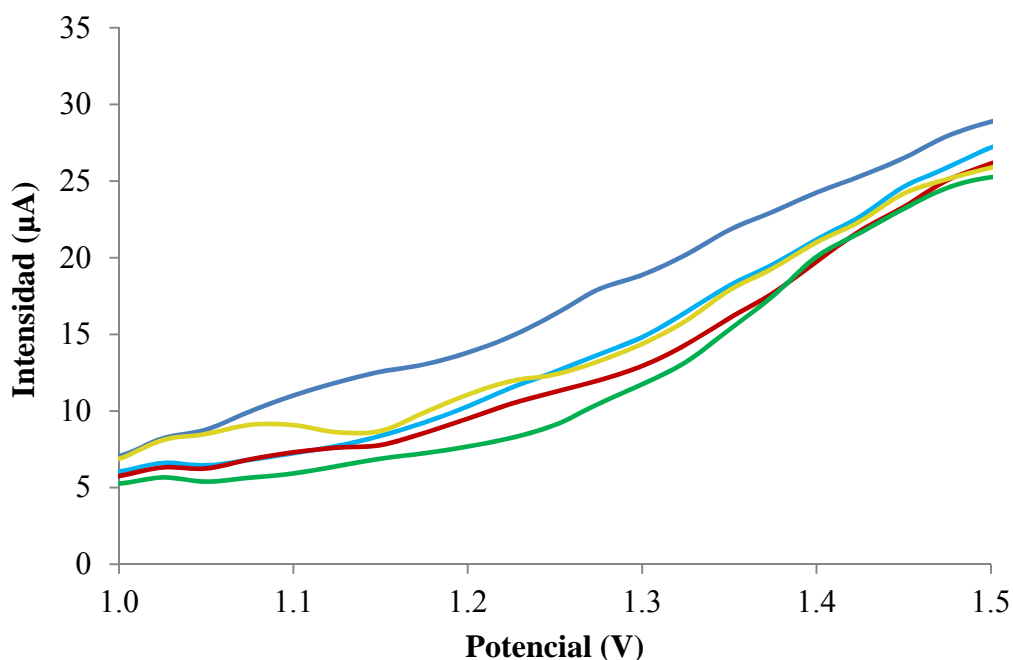


Figura 11.- Medidas voltamperométricas obtenidas mediante SWV empleando un SPC_pE en el intervalo de concentraciones de TBZ comprendido entre 20 y 140 μM (Electrolito de soporte, pH 6; Potenciales vs Ag/AgCl SPE)

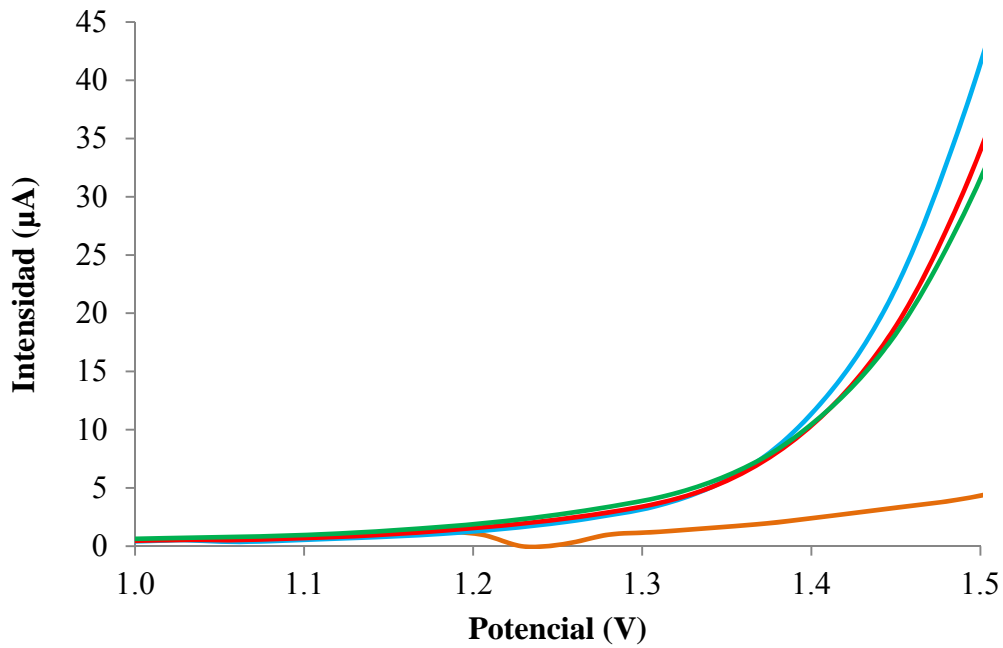


Figura 12.- Medidas voltamperométricas obtenidas mediante SWV empleando un $SPC_{Fe(III)}E$ en el intervalo de concentraciones de TBZ comprendido entre 20 y 100 μM (Electrolito de soporte, pH 6; Potenciales vs Ag/AgCl SPE)

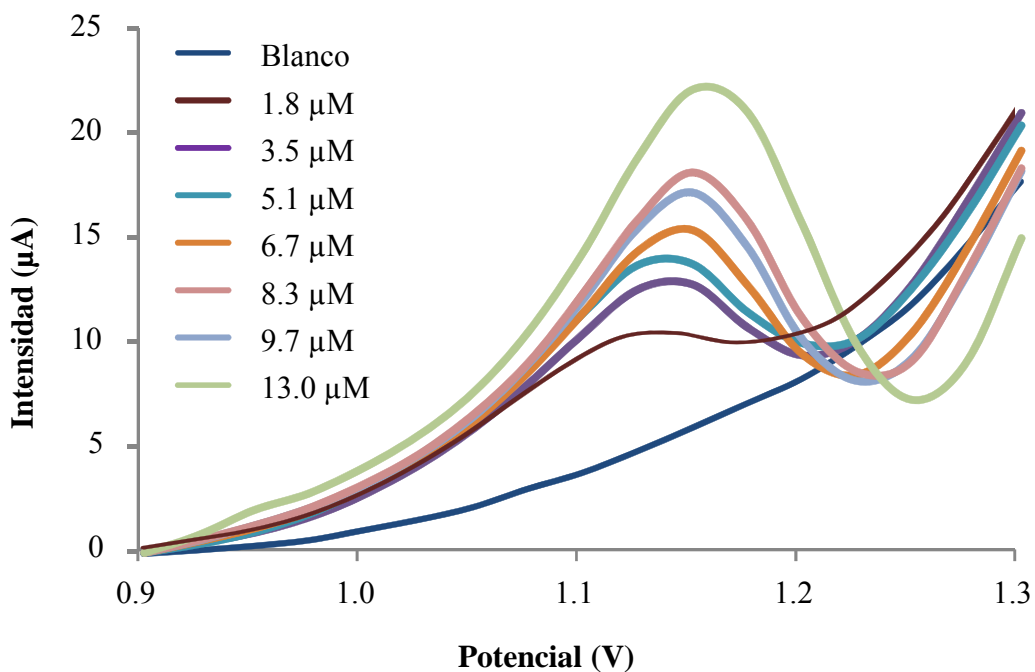


Figura 13.- Medidas voltamperométricas obtenidas mediante SWV empleando un SPC_{TFE} para diferentes concentraciones de TBZ (Electrolito de soporte, pH 6; Potenciales vs Ag/AgCl SPE)

5.2.1. – Determinación de tiabendazol con SPC_{TTFEs}

Con el fin de mejorar los resultados obtenidos en la determinación de TBZ con SPCEs, se registraron distintos calibrados con SPC_{TTFEs} en las condiciones experimentales optimizadas en las etapas anteriores del trabajo.

Inicialmente, se registraron las intensidades obtenidas en función de las diferentes adiciones de TBZ y se observó la relación lineal existente entre la señal medida y la concentración de TBZ en el intervalo de concentraciones comprendido entre 1.8 y 13 μM .

Seguidamente, para asegurar la calidad del método puesto a punto se determinó su precisión en términos de reproducibilidad y repetibilidad, así como su capacidad de detección.

Para la estimación de la reproducibilidad, se realizaron tres calibrados de TBZ utilizando diferentes SPC_{TTFEs} . En todos los casos se hicieron adiciones de 90 μL de una disolución de TBZ de concentración 0.1 mM. En la figura 14 se muestran las curvas de calibración obtenidas una vez eliminados los puntos anómalos.

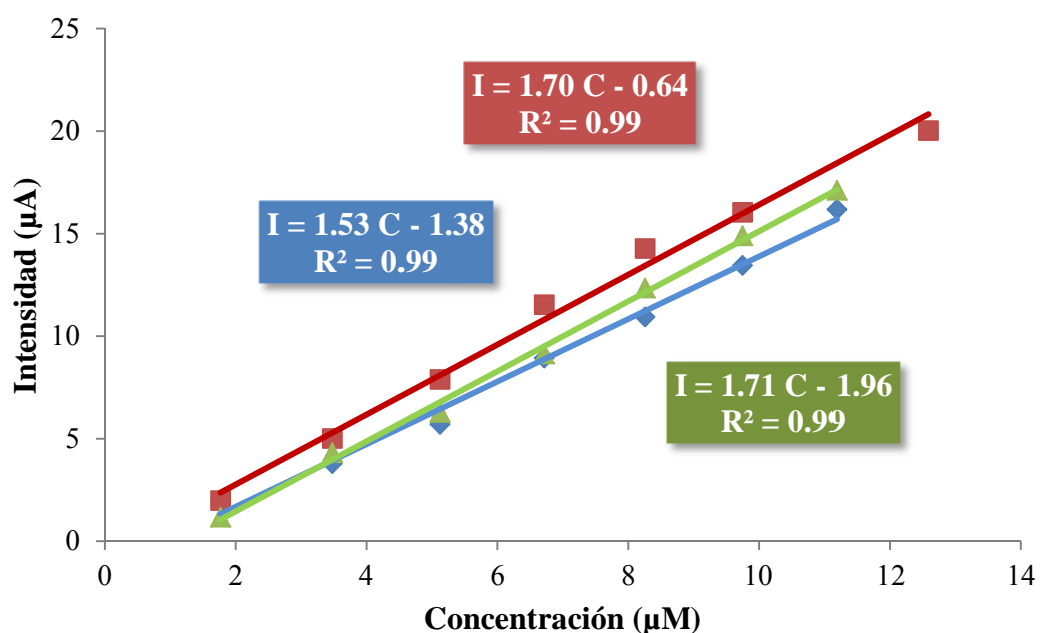


Figura 14.- Curvas de calibración construidas mediante SWV con SPC_{TTFEs} en el intervalo de concentraciones de TBZ comprendido entre 1.8 y 13 μM . para la estimación de la reproducibilidad del método (Electrolito de soporte, pH 6)

Una vez construidas las rectas de calibración, la reproducibilidad del método fue calculada en términos del valor de RSD asociado a las pendientes de dichas rectas. El valor obtenido para dicho parámetro fue de 6.2 %.

El cálculo de la repetibilidad se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento, pero empleando el mismo SPC_{TFE} . Los malos resultados obtenidos indican que no es posible la reutilización del electrodo para realizar múltiples calibrados, sin embargo, este resultado carece de importancia teniendo en cuenta el carácter desechable de los electrodos utilizados.

El procedimiento analítico desarrollado para la determinación de TBZ utilizando SPC_{TFEs} fue finalmente caracterizado mediante el cálculo de su capacidad de detección, teniendo en cuenta la probabilidad de falso positivo ($\alpha = 0.05$) y falso negativo ($\beta = 0.05$), para lo que se utilizó el programa DETARCHI [24]. Para el cálculo de dicho parámetro de calidad se utilizaron tres regresiones lineales. El valor de capacidad de detección obtenido fue $1.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$. Sin embargo este valor fue menor que el valor del primer estándar utilizado para construir las curvas de calibrado $1.8 \mu\text{M}$. Por lo tanto, desde un punto de vista analítico, este último valor se estimó como capacidad de detección del método desarrollado [25].

Puede verse que el valor de capacidad de detección obtenido con el empleo de SPC_{TFEs} es aproximadamente 10 veces menor que el estimado con SPCEs.

5.3.2. – Determinación de TBZ en una muestra de agua de río

Finalmente, para demostrar la eficiencia del método desarrollado empleando SPC_{TFEs} , se procedió a la realización del análisis de una muestra de agua de río (agua del río Arlanzón, Burgos) enriquecida con una concentración $100 \mu\text{M}$ de TBZ.

El análisis de la muestra se llevó a cabo mediante adición estándar registrándose voltamperogramas como los mostrados en la figura 15, a partir de los que se construyeron curvas de calibrado mediante regresión robusta como la mostrada en la figura 16.

El valor obtenido para la muestra de río enriquecida fue de $108 \pm 9 \mu\text{M}$ (para $n=3$), valor similar al teórico, lo que indica la validez del método desarrollado para la determinación de TBZ en muestras reales.

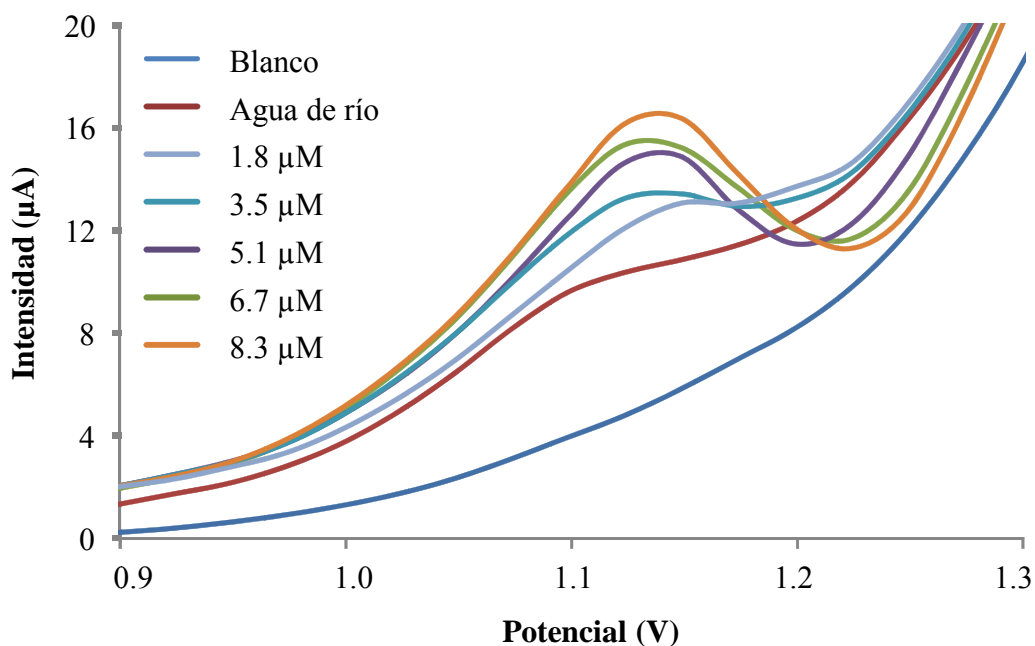


Figura 15.- Medidas voltamperométricas obtenidas mediante SWV empleando un SPC_{TFE} para la determinación de TBZ en agua de río: (Tampón fosfato, pH 6; Potenciales vs Ag/AgCl SPE)

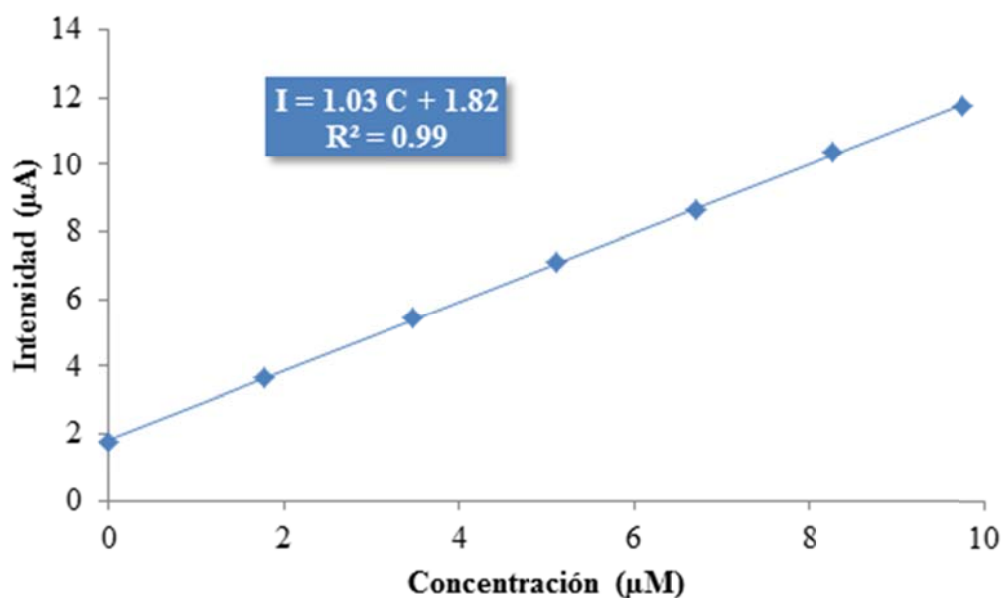


Figura 16.- Puntos experimentales y recta de calibrado obtenidos mediante adición estándar para la determinación de la concentración de TBZ en una muestra de agua de río.

6. – CONCLUSIONES

Los resultados de las experiencias realizadas en el presente trabajo pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

- El TBZ presenta un pico de oxidación a +1.15 V vs Ag/AgCl SPE que puede ser utilizado para la determinación de este compuesto mediante SWV empleando SPCEs y SPC_{TTF}Es.
- La reproducibilidad del método basado en el empleo de SPCEs en términos de RSD de las pendientes asociadas a las rectas de calibración, en el intervalo de concentración 15 a 136 μ M, es de 4.0 % (n=3).
- La reproducibilidad del método basado en el empleo de SPC_{TTF}Es en términos de RSD de las pendientes asociadas a las rectas de calibración, en el intervalo de concentración 1.8 a 13 μ M, es de 6.3 % (n=3).
- La capacidad de detección obtenida para el TBZ en las condiciones óptimas de las variables experimentales es de 15 μ M para SPCEs.
- La modificación del electrodo de trabajo con el mediador TTF proporciona una mayor sensibilidad a los dispositivos desarrollados (capacidad de detección 1.8 μ M).
- Los sencillos métodos desarrollados en este trabajo resultan adecuados para la determinación electroquímica de TBZ en muestras reales.

7. – BIBLIOGRAFÍA

- [1] Y. Wen, J. Li, F. Yang, W. Zhang, W. Li, C. Liao, L. Chen, Salting-out assisted liquid–liquid extraction with the aid of experimental design for determination of benzimidazole fungicides in high salinity samples by high-performance liquid chromatography, *Talanta* 106 (2013) 119-126.
- [2] C. Cacho, E. Turiel, C. Pérez-Conde, Molecularly imprinted polymers: An analytical tool for the determination of benzimidazole compounds in water samples, *Talanta* 78 (2009) 1029-1035.
- [3] E. Ekman, M.H. Faniband, M. Littorin, M. Maxe, B.A.G. Jönsson, C.H. Lindh, Determination of 5-hydroxythiabendazole in human urine as a biomarker of exposure to thiabendazole using LC/MS/MS, *Journal of Chromatography B* 973 (2014) 61-67.
- [4] C. Müller, L. David, S.C. Pinzaru, Detection of thiabendazole applied to organic fruit by near infrared surface-enhanced Raman spectroscopy, *Spectroscopy Europe* 24 (2013) 6-11.
- [5] J. Yang, D. Zhang, L. Wang, N. Long, M. Zhang, L. Zhang, An Electrochemical Method for High Sensitive Detection of Thiabendazole and Its Interaction with Human Serum Albumin, *Food Analytical Methods* 5 (2015) 507-514.
- [6] D.M. Victor, R.E. Hall, J.D. Shamis, S.A. Whitlock, Methods for the determination of maleic hydrazide, ethoxyquin and thiabendazole in wastewaters, *Journal of Chromatography A* 283 (1984) 383-389.
- [7] S. Navickiene, M.L. Ribeiro, A simple and rapid extraction for gas chromatographic determination of thiabendazole and imazalil residues in lemons, *Journal of The Brazilian Chemical Society* 13 (2002) 592-596.
- [8] Y. Huang, J. Wang, S.F. Xue, Z. Tao, Q.J. Zhu, Q. Tang, Determination of thiabendazole in aqueous solutions using a cucurbituril-enhanced fluorescence method, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 72 (2012) 397–404.
- [9] U. Smola, G. Sontag, Polarographic determination of thiabendazole, *Microchimica Acta* 87 (1985) 507-514.
- [10] J.A. Garcia Calzón, A.L. Miranda Ordieres, J.L. Muñoz Alvarez, J.M. López Fonseca, Electrochemical reduction of metal ions catalysed by preconcentrated adsorbed ligands: the system Ni(II)-thiabendazole, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 427 (1997) 29-34.
- [11] A. Guzmán-Vázquez de Prada, M.L. Mena, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, Voltammetric Behavior and Determination by Flow Injection with Amperometric Detection of Benzimidazoles, *Analytical Letters* 37 (2004) 65–79.

- [12] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Disposable electrochemical biosensors in microbiology, Formatex, Badajoz 2010.
- [13] J.M. Cooper, A.E.G. Cass, Biosensors: a practical approach,, Oxford University Press, Oxford, 2004.
- [14] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Enzyme modified screen printed electrodes, in Biosensors: Properties, materials and applications. 2009, Nova Science Publishers, Inc.: Nueva York.
- [15] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, L. Ferreira-Conçalves, M.J. Arcos-Martínez, Development of urease based amperometric biosensors for the inhibitive determination of Hg (II), *Talanta* 79 (2009) 1306-1310.
- [16] E. Katz, I. Willner, J. Wang, Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles, *Electroanalysis* 16 (2004) 19-44.
- [17] O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes, *Analytica Chimica Acta* 589 (2007) 255–260.
- [18] O. Domínguez-Renedo, L. Ruiz-Espelt, N. García-Astorgano, M.J. Arcos-Martínez, Electrochemical determination of chromium(VI) using metallic nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes, *Talanta* 76 (2008) 854–858.
- [19] A. Calvo-Pérez, O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, Simultaneous Determination of Cr(III) and Cr(VI) by Differential Pulse Voltammetry Using Modified Screen-Printed Carbon Electrodes in Array Mode, *Electroanalysis* 22 (2010) 2924 – 2930.
- [20] M. Firmino de Oliveira, N.R. Stradiotto, Voltammetric determination of fenbendazole in veterinarian formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30 (2002) 279–284.
- [21] M.C. Ortiz, L.A.Sarabia, A. Herrero, Robust regression techniques. A useful alternative for the detection of outlier data in chemical analysis, *Talanta* 70 (2006) 499-512.
- [22] A. Ríos Castro, M.C. Moreno Bondi, B.M. Simonet Suau, Técnicas espectroscópicas en química analítica, Síntesis, Madrid, 2012.
- [23] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, Compendium of Analytical Nomenclature, 3rd ed, Port City Press Inc, Baltimore, 2000.

- [24] L.A. Sarabia, M.C. Ortiz, DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection., *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 13 (1994) 1-6.
- [25] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A, *Biosensors & Bioelectronics* 25 (2010) 1333-1337.