

UNIVERSIDAD DE SONORA

FACULTAD INTERDISCIPLINARIA DE INGENIERÍA

Departamento de Investigación en Polímeros y
Materiales

**Desarrollo de Sensor Electroquímico Conjugado a
Polímeros Molecularmente Impresos para la
Detección de Enrofloxacino**

TESIS

Que para obtener el título de
DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

PRESENTA:

cDr. Amed Gallegos Tabanico

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2023

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**

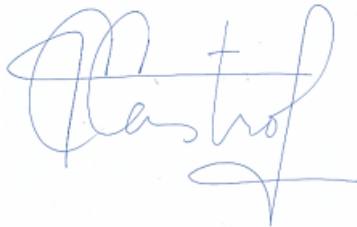


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

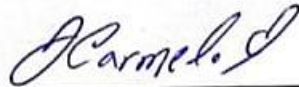
La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dra. Teresa del Castillo Castro
Jefa del Departamento

APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de doctorado del cDr. Amed Gallegos Tabanico, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencia de Materiales**.



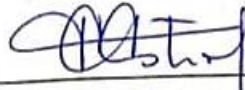
[Dr. Carmelo Encinas Encinas]

Presidente



[Dr. José Andrei Sarabia Sainz]

Secretario



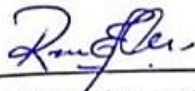
[Dra. Teresa del Castillo Castro]

Sinodal




[Dr. Dainet Berman Mendoza]

Sinodal



[Dra. Rosa Elena Navarro Gautrín]

Sinodal



[Dra. Luz Vázquez Moreno]

Sinodal Externo

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conahcyt) por el otorgamiento de una Beca (CVU No. 664874) durante la duración del posgrado para poder continuar con mis estudios.

Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) de la Universidad de Sonora (UNISON) por el aporte de reactivos, equipo e instalaciones necesarios para realizar los experimentos del presente proyecto

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPITULO 1	3
1.1 INTRODUCCIÓN	3
1.2 OBJETIVOS	6
1.2.1 OBJETIVO GENERAL	6
1.2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	6
CAPITULO 2	7
2.1 ANTECEDENTES	7
2.1.1 Contaminantes emergentes	7
2.1.2 Contaminación por antibióticos	9
2.1.2.1 Límites máximos de residuos (LMR) para antibióticos.....	10
2.1.2 Enrofloxacino.....	10
2.1.3 Polímeros de Impresión Molecular.....	12
2.1.4 Sensores electroquímicos	13
2.1.4.1 Sensores Impedimétricos.....	14
2.1.4.2 Sensores Potenciométricos.....	16
2.1.4.3 Sensores Amperométricos.....	17
2.1.4.4 Sensores Voltamperométricos	19
CAPITULO 3	23
3.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	23
3.1.1 Materiales.....	23
3.1.2 Métodos.....	23
3.1.2.1 Lavado y activación de electrodos serigrafiados.....	23
3.1.2.2 Modificación química de electrodos serigrafiados.....	24
3.1.2.3 Síntesis de polímeros molecularmente impresos.....	25

3.1.2.4 Preparación de solución de enrofloxacin.....	25
3.1.2.5 Preparación de solución de diferentes fármacos.....	26
3.1.2.6 Evaluación de electrodo-MIP con el control electrodo-NIP	26
3.1.2.7 Determinación de la enrofloxacin.....	27
3.1.2.8 Ensayo de selectividad del electrodo-MIP.....	27
3.1.2.9 Ensayo de especificidad del electrodo-MIP.....	28
3.1.3 Caracterización.....	28
3.1.3.1 Caracterización Morfológica.....	28
3.1.3.1.1 Microscopía de Fuerza Atómica.....	28
3.1.3.2 Caracterización Electroquímica	29
3.1.3.2.1 Voltamperometría Cíclica (CV)	29
3.1.3.2.2 Espectroscopía de Impedancia (EIS).....	29
3.1.3.3 Caracterización Fisicoquímica.....	30
3.1.3.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier.....	30
CAPITULO 4	31
4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1.1 Caracterización Morfológica	31
4.1.1.1 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	31
4.1.2 Caracterización Electroquímica.....	32
4.1.2.1 Voltamperometría Cíclica.....	32
4.1.2.2 Espectroscopía de Impedancia (EIS)	34
4.1.3 Caracterización Fisicoquímica	36
4.1.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier.....	36
4.1.4 Influencia del pH	38
4.1.5 Respuesta de los electrodos MIP y NIP	41
4.1.6 Detección electroquímica de enrofloxacino	42
4.1.7 Selectividad del electrodo-MIP	44
4.1.8 Especificidad del electrodo-MIP.....	47

CAPITULO 5	49
5.1 CONCLUSIONES.....	49
5.2 PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	50
REFERENCIAS	52
ANEXOS.....	68
a) Estancias Académicas	68
b) Conferencias Internacionales	68
c) Cursos y Talleres	69
d) Entrevistas	69
e) Publicaciones Científicas	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fuentes potenciales de contaminantes emergentes.....	9
Figura 2. Estructura química de la enrofloxacin.....	11
Figura 3. Principio general de impresión molecular. Un complejo de plantilla molecular (c) y monómeros funcionales (a) se polimeriza en presencia de monómeros de reticulación (b) para formar una red polimérica tridimensional.....	13
Figura 4. Desarrollo y respuesta electroquímica de sensor Impedimétrico.....	15
Figura 5. Componentes principales que forman a un sensor potenciométrico.....	17
Figura 6. Principio básico del funcionamiento de un sensor amperométrico	18
Figura 7. Señal de excitación y respuesta típica de voltamperometría de diferencial de pulso (DPV).....	20
Figura 8. Aplicación de potencial en voltamperometría de onda cuadrada.....	21
Figura 9. Esquema de voltamograma de onda cuadrada, (A) representación de un proceso redox de sistema reversible, (B) representación de un sistema irreversible.....	21

Figura 10. Micrografías de AFM a electrodos serigrafiados. Electrodo de Au desnudo (a), Electrodo de Au modificado con NIP (b), Electrodo de Au modificado con MIP (c).....	32
Figura 11. Caracterización por CV de electrodos de Au serigrafiados en solución de K ₃ [Fe(CN) ₆] 2 mM en H ₂ SO ₄ . Electrodo de Au desnudo (negro), electrodo de Au modificado con 6-mercaptohexanol (rojo), electrodo NIP (rosa) y electrodo MIP (azul).....	34
Figura 12. Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) a electrodos serigrafiados. Electrodo de oro desnudo (azul), electrodo MIP (rojo), electrodo NIP (negro) y electrodo modificado químicamente con monómero (verde).....	35
Figura 13. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR). Electrodo-MIP (verde), Electrodo-NIP (rosa), Modificación química con 3-TPM (azul), Modificación química con 6-Mercaptohexanol (rojo) y Electrodo control (negro).....	37
Figura 14. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR). Electrodo-MIP (a), Electrodo-NIP (b)	37
Figura 15. Voltametría de onda cuadrada (SWV) a muestras de enrofloxacin preparadas a una concentración de 3 mM en diferentes soluciones tampón de pH.....	40
Figura 16. Voltametría de onda cuadrada (SWV) a muestras de enrofloxacin preparadas a pH 3 en diferentes concentraciones.....	40
Figura 17. Voltametría de onda cuadrada (SWV) a electrodos de Au modificado en presencia de una muestra de enrofloxacin a 1 mM en una solución buffer de pH 3.....	42
Figura 18. Voltametría de onda cuadrada (SWV) a electrodo de Au modificado con MIP en presencia de enrofloxacin a diferentes concentraciones en solución buffer pH 3.....	44

Figura 19. Voltametría de onda cuadrada (SWV) a diferentes fármacos en concentración de 1mM en buffer de acetato pH 3.....	46
Figura 20. Evaluación de selectividad del electrodo-MIP con diferentes fármacos a una concentración de 1mM en buffer de acetato pH 3.....	46
Figura 21. Voltamperometría de onda cuadrada (SWV) a Electrodo-MIP, (a) solución de enrofloxacino a diferentes concentraciones (b) curva de calibración para solución de enrofloxacina, (c) soluciones complejas de enrofloxacino a diferentes concentraciones, (d) curva de calibración para soluciones complejas de enrofloxacina.....	48

RESUMEN

En los últimos años, el sector agroalimentario ha sido meticulosamente vigilado para verificar el cumplimiento de los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes en los productos alimenticios. La mala gestión de los antibióticos en la acuicultura se ha asociado con problemas de salud ambiental y humana. Específicamente, la acumulación de residuos de enrofloxacin en los tejidos de camarón debido a prácticas inadecuadas, ha causado daños a la salud humana. En la actualidad, los métodos de detección de antibióticos todavía se basan en técnicas cromatográficas e inmunodetección, y los procesos son lentos, laboriosos y costosos. Los polímeros de impresión molecular (MIP) son un tipo de polímeros formados por el tamaño, forma y posición de grupos funcionales específicos de una molécula de plantilla, lo que resulta en la formación de sitios de unión con afinidades y especificidades comparables a las de los anticuerpos naturales. Se utilizan ampliamente en varios campos, especialmente en sensores electroquímicos de impresión molecular debido a su estructura única, capacidad de reconocimiento específico y bajo costo. En el presente trabajo, se fabricó un sensor electroquímico para la detección rápida y sencilla de enrofloxacin (EF). La modificación de electrodos de oro (SPE) con polímeros de impresión molecular (MIP) permitió la detección de enrofloxacin mediante la técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV) en un potencial de ventana de +0.9V. La detección de enrofloxacin se realizó en un rango lineal de 10-100 $\mu\text{M L}^{-1}$ con un límite de detección de 2 $\mu\text{M L}^{-1}$. El desarrollo de un sensor de control de polímero no impreso (NIP) permitió una detección mejor y más eficiente. Además, el sensor es portátil, lo que tiene la ventaja de analizar y detectar moléculas de interés sin necesidad de llevar la muestra a un laboratorio.

ABSTRACT

In recent years, the agri-food sector has been meticulously monitored to verify compliance with the maximum limits of toxic residues and contaminants in food products. Mismanagement of antibiotics in aquaculture has been associated with environmental and human health problems. Specifically, the accumulation of enrofloxacin residues in shrimp tissues due to improper practices has caused harm to human health. Currently, antibiotic detection methods are still based on chromatographic techniques and immunodetection, and the processes are slow, laborious, and expensive. Molecular imprinted polymers (MIPs) are a class of polymers formed by the size, shape, and position of specific functional groups of a template molecule, resulting in the formation of binding sites with affinities and specificities comparable to those of natural antibodies. They are widely used in various fields, especially molecular imprinting electrochemical sensors due to their unique structure, specific recognition ability, and low cost. In the present work, an electrochemical sensor for the rapid and simple detection of enrofloxacin (EF) was fabricated. The modification of gold electrodes (SPE) with molecular imprinting polymers (MIP) allowed the detection of enrofloxacin using the square wave voltammetry (SWV) technique at a window potential of +0.9V. Detection of enrofloxacin was performed in a linear range of 10-100 $\mu\text{M L}^{-1}$ with a detection limit of 2 $\mu\text{M L}^{-1}$. The development of a non-imprinted polymer (NIP) control sensor enabled better and more efficient detection. In addition, the sensor is portable, which has the advantage of analyzing and detecting molecules of interest without having to take the sample to a laboratory.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN

Garantizar la seguridad y la calidad de los alimentos se ha vuelto uno de los problemas de salud pública a nivel mundial. Los alimentos pueden estar contaminados con metales tóxicos, residuos de medicamentos, sustancias orgánicas, micotoxinas, entre otros contaminantes emergentes (Navarro et al. 2022). La enrofloxacin, miembro de la familia de las fluoroquinolonas, es un antimicrobiano aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para uso exclusivo en medicina veterinaria y ha demostrado su eficacia en el tratamiento de enfermedades bacterianas en granjas acuícolas (Shen et al. 2022). La ventaja de la enrofloxacin radica en su amplio espectro de actividad antibacteriana, fuerte poder bactericida, acción rápida y amplia distribución en el organismo (Trouchon et al. 2016). Uno de los principales problemas que genera el mal manejo de los antibióticos precisamente para la enrofloxacin en usos acuícolas, es su asociación con aspectos ambientales y problemas de salud. Específicamente, la acumulación de residuos de enrofloxacin en los tejidos de los camarones derivados de prácticas inadecuadas ha causado problemas potenciales para la salud humana (Chen et al. 2018; Ahmad et al. 2021). Por lo tanto, es importante evaluar la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos. El sector agroalimentario ha sido cuidadosamente monitoreado para verificar el cumplimiento de los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes en los productos alimenticios (Lebelo et al. 2021).

En base a lo anterior, es de suma importancia desarrollar técnicas que pueden ayudar a detectar, monitorear y rastrear contaminantes en los alimentos. El desarrollo de nuevos dispositivos y técnicas analíticas con alta selectividad y precisión, son de gran importancia en áreas como la ambiental, alimentaria, farmacéutica, entre otras (Martínez et al. 2020). Con esta finalidad, las técnicas electroquímicas han ganado interés debido a sus ventajas tales como: bajo costo, rápida respuesta y portabilidad, en comparación con los métodos convencionales

(Abera et al. 2022; Lowinsohn et al. 2006). Los sensores electroquímicos tienen aplicaciones analíticas como quimiosensores que convierten las señales físicas, químicas y/o biológicas en una señal electroquímica cuantificable. Las propiedades de voltamperometría, conductividad amperométrica y capacitancia o impedancia se pueden utilizar para determinar un analito (Lowinsohn et al. 2006). Actualmente, para mejorar la sensibilidad y selectividad, en los procesos de detección de sustancias, se investigan las modificaciones de electrodos con polímeros impresos molecularmente (MIP's) (Chu et al. 2012; Pereira et al. 2007).

El uso de MIPs se ha convertido en una herramienta muy importante para la detección de sustancias químicas y compuestos biológicos que permiten la monitorización ambiental y alimentaria. Además, los MIP se han utilizado como nuevos materiales de reconocimiento molecular para aplicaciones en la detección y eliminación de contaminantes químicos y biológicos (Qian et al. 2014; Zhang et al. 2014).

La impresión molecular es una herramienta que se basa en los principios del reconocimiento molecular de los procesos biológicos para generar receptores macromoleculares artificiales (Blanco et al. 2004; Tarley et al. 2005) en los que una molécula diana actúa como plantilla. Los monómeros funcionales interactúan a su alrededor y, posteriormente, los monómeros los entrecruzan para copolimerizarse y formar una estructura similar a una coraza (Tarley et al. 2005). Después de la polimerización y la eliminación de la plantilla, los sitios de unión se exponen de tal manera que son complementarios a la plantilla en tamaño, forma y posición para sus grupos funcionales que se mantienen en su lugar en la estructura reticulada recién formada (Figueiredo et al. 2008).

La modificación de electrodos con MIPs podría ser una alternativa con muchas ventajas, incluyendo propiedades de reconocimiento, bajo costo y la posibilidad de un diseño cómodo y simple. Por estas razones, los sensores electroquímicos han llamado mucho la atención para la detección de compuestos orgánicos, como los contaminantes emergentes (Aaryashree et al. 2020; Liu et al. 2021).

En este trabajo se describe el desarrollo de un sensor electroquímico basado en el uso de electrodos de oro serigrafiados (SPE) modificados con polímeros molecularmente impresos para la detección de enrofloxacin por técnicas electroquímicas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Desarrollar un biosensor para la detección y cuantificación electroquímica específica de enrofloxacin, basado en polímeros molecularmente impresos, depositados en electrodos serigrafiados.

1.2.2 Objetivos específicos

1.- Desarrollar un polímero de impresión molecular (MIP) específico para enrofloxacin y depositar sobre electrodos serigrafiados.

2.- Caracterizar a los electrodos modificados con los MIP's mediante impedancia electroquímica, así como por Voltamperometría Cíclica.

3.- Caracterizar a los electrodos mediante Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier FT-IR, así como por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

4.- Evaluar la detección y cuantificación de analitos de interés mediante técnicas voltamperométricas y amperométricas.

5.- Determinar la especificidad de los MIP's hacia enrofloxacin mediante la detección específica usando en soluciones complejas, formadas con analitos de diferente naturaleza química.

CAPÍTULO 2

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Contaminantes emergentes

En la actualidad, el tema de la contaminación ambiental se ha vuelto una preocupación global debido a sus impactos negativos en los ecosistemas y la salud humana. Tradicionalmente, se han identificado y regulado contaminantes conocidos, como los gases de efecto invernadero, los metales pesados y los compuestos orgánicos volátiles. Sin embargo, existe un grupo de contaminantes que ha surgido como una nueva preocupación, los cuales son denominados contaminantes emergentes.

Los contaminantes emergentes son sustancias químicas o materiales cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero existe preocupación por sus efectos potenciales. La presencia y el impacto de los contaminantes emergentes en diferentes áreas como se muestra en la figura 1, junto con las causas y consecuencias no reguladas que estos ocasionan, se deben en parte a la falta de métodos analíticos disponibles para su detección y estudio. Además de su entrada continua al medio ambiente, provocan efectos negativos permanentes tanto para la salud humana como ambiental (Petrovic et al. 2003). Existe una gran cantidad de contaminantes emergentes, por ejemplo:

- Plaguicidas y productos químicos agrícolas. A medida que aumenta la demanda de alimentos, se incrementa el uso de plaguicidas y productos químicos agrícolas para aumentar la producción. Algunos de estos compuestos, como los herbicidas y los fungicidas, pueden persistir en el suelo y contaminar las aguas subterráneas. Además, se ha descubierto que ciertos plaguicidas tienen efectos negativos en la reproducción de especies acuáticas y en la salud humana (Castillo et al. 2020).

- Productos químicos industriales. La producción y el uso de productos químicos industriales también pueden generar contaminantes emergentes. Por ejemplo, los retardantes de llama bromados utilizados en productos electrónicos y materiales de construcción pueden liberar sustancias tóxicas al medio ambiente durante su vida útil y al final de su vida útil. Estos compuestos persistentes pueden acumularse en la cadena alimentaria y causar efectos adversos en la vida silvestre y en los seres humanos (Urbina et al. 2020).
- Farmacéuticos y productos de cuidado personal. Muchos medicamentos y productos de cuidado personal contienen sustancias químicas activas, incluyendo antibióticos, que pueden terminar en el medio ambiente a través del sistema de alcantarillado. Estas sustancias pueden encontrarse en trazas en ríos, lagos y aguas subterráneas, lo que suscita inquietudes sobre sus efectos en la vida acuática y en la calidad del agua potable. (Flórez et al. 2021).

Existe una gran importancia de abordar los contaminantes emergentes y de implementar estrategias efectivas para su detección, mitigación y regulación. Por lo tanto, es crucial abordar y monitorear también la contaminación con antibióticos para proteger los ecosistemas acuáticos y la salud humana. La identificación temprana de estos compuestos y la adopción de medidas preventivas pueden ayudar a proteger nuestro medio ambiente y preservar la salud de las generaciones futuras.

CONTAMINANTES EMERGENTES



Figura 1. Fuentes potenciales de contaminantes emergentes.

2.1.2 Contaminación por antibióticos

La contaminación por antibióticos en el medio ambiente ha surgido como una preocupación creciente en los últimos años. Los antibióticos son medicamentos utilizados para combatir infecciones bacterianas en humanos y animales. Sin embargo, su uso generalizado ha llevado a la liberación de cantidades significativas de estos compuestos en el medio ambiente, lo que plantea riesgos para la salud humana y los ecosistemas acuáticos (Martínez-Alcalá et al. 2020).

Los antibióticos pueden ingresar al medio ambiente a través de diferentes vías, como la excreción de animales y humanos tratados, la liberación de residuos de producción animal y el vertido directo o indirecto de productos farmacéuticos en el agua y el suelo (Alcalá et al 2020). Una vez en el medio ambiente, estos compuestos pueden persistir y acumularse, lo que puede tener impactos negativos en la flora y fauna acuáticas, así como en la resistencia bacteriana a los antibióticos.

2.1.2.1 Límites máximos de residuos (LMR) para antibióticos

Para abordar la contaminación por antibióticos en el medio ambiente, se han establecido límites máximos de residuos (LMR) en diferentes países. Estos LMR son concentraciones máximas permitidas de antibióticos en alimentos de origen animal, como carne, leche y huevos, para garantizar la seguridad alimentaria y minimizar la exposición humana a estos compuestos. Los LMR varían según el antibiótico y el tipo de alimento, y son establecidos por autoridades sanitarias y reguladoras (Salas et al. 2020).

Es importante destacar que los LMR se centran principalmente en la protección de la salud humana y no en la protección del medio ambiente. Sin embargo, estos límites pueden servir como indicadores para evaluar el impacto ambiental de la contaminación por antibióticos, ya que los alimentos de origen animal pueden ser una fuente de liberación de residuos al medio ambiente.

La contaminación por antibióticos en el medio ambiente es una preocupación cada vez mayor debido a los riesgos que representa para la salud humana y los ecosistemas acuáticos. Establecer límites máximos de residuos (LMR) y adoptar medidas preventivas y de gestión adecuadas son pasos cruciales para abordar este problema y garantizar la salud y el equilibrio de nuestros ecosistemas (Cuarental et al. 2022).

Actualmente existe también una gran problemática ocasionada por la presencia de fluoroquinolonas en alimentos y con su liberación al medio ambiente sin un control adecuado (Stoilova et al 2013; Moema et al 2012). Mas específicamente enrofloxacino ha surgido como un tema preocupante en relación con la contaminación por antibióticos en el medio ambiente.

2.1.3 Enrofloxacino

El Enrofloxacino también conocido como etilciprofloxacina de la familia de las fluoroquinolonas, que se caracteriza por la presencia de un átomo de flúor unido

directamente al anillo de quinolona. Este átomo de flúor juega un papel importante en la actividad antibacteriana de estas sustancias. Además del grupo funcional de flúor, las fluoroquinolonas también pueden presentar otros grupos funcionales comunes en su estructura, como grupos carbonilo, carboxilo, amino y piperazina como se muestra en la figura 2. Esta aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) para uso exclusivo en medicina veterinaria y que ha demostrado su eficacia en el tratamiento de enfermedades bacterianas que afectan principalmente a granjas acuícolas (Attili et al. 2016). El mecanismo de acción de ENRO es a nivel del núcleo celular, inhibiendo la síntesis del ácido desoxirribonucleico (DNA) de las bacterias. La ventaja que presenta la enrofloxacin es que tiene un amplio espectro de acción antibacteriana, fuerte poder bactericida, acción rápida, amplia distribución en el cuerpo, además la enrofloxacin favorece una rápida absorción ya que es un antibiótico principalmente lipofílico, con un peso molecular bajo que favorece su penetración tisular (Zordok et al. 2016).

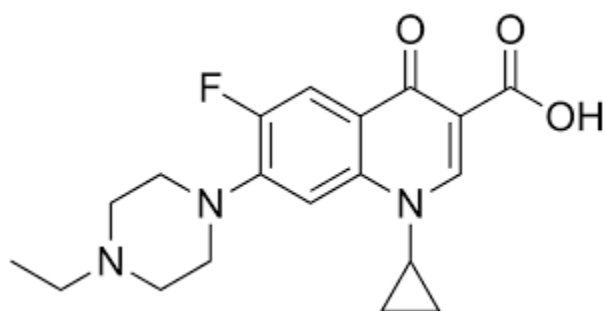


Figura 2. Estructura química de la enrofloxacin.

Por otra parte, existe un problema generado principalmente por el mal manejo de los antibióticos en la acuicultura, que se ha asociado con problemas ambientales y de salud humana. Específicamente, la acumulación de residuos de enrofloxacin en los tejidos de camarón derivado de prácticas inadecuadas y que han causado daños potenciales a la salud humana (Ma et al. 2006).

Es por esto que es de suma importancia evaluar la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos. El sector agroalimentario ha sido monitoreado

minuciosamente para verificar el cumplimiento de los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes en los productos alimenticios (Nato et al 2022).

Una de las técnicas que actualmente están siendo exploradas para la detección de contaminantes es mediante la impresión polimérica molecular. Esta herramienta se basa en los principios de reconocimiento molecular de los procesos biológicos, para generar receptores macromoleculares artificiales, es a través de la impresión molecular de polímeros sintéticos (Álvarez et al. 2019).

2.1.4 Polímeros de Impresión Molecular

Recientemente, los polímeros de impresión molecular han ganado una amplia aceptación como uso de nuevos materiales de reconocimiento molecular para aplicaciones en detección y eliminación de contaminantes químicos y biológicos (Zhang et al. 2019). La impresión molecular es un proceso en el que una molécula diana (o un derivado del mismo) actúa como una plantilla, alrededor de la cual monómeros funcionales (con grupos funcionales afines) interactúan con la plantilla a través interacciones covalentes o no covalentes. Alguno de los monómeros funcionales más utilizados en los MIP's es el ácido metacrílico (MAA), 4-vinilpiridina (4-VPY), metacrilamida ya que son materiales muy estables, y no se degradan por la acción enzimática, calor, pH, presión o en disolventes orgánicos. Posteriormente se entrecruzan mediante el uso de un monómero reticulante para copolimerizarse y formar una coraza de tipo fundido (Zhang et al. 2019). Dentro de los monómeros reticulantes más utilizados es el dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) que contiene grupos vinilos en donde éstos permiten obtener una mejor polimerización con mejor capacidad y selectividad (Sullivan et al. 2019). Después de la polimerización y eliminación de la plantilla, los sitios de unión son expuestos de tal manera que son complementarios a la plantilla en tamaño, forma y posición a sus grupos funcionales que se mantienen en su lugar por la estructura reticulada como se muestra en la Figura 3. En esencia, una memoria molecular está impresa en el polímero, que ahora es capaz de volver a enlazarse selectivamente. Por lo

tanto, los polímeros impresos molecularmente (MIP) poseen la característica más importante de los receptores biológicos: la capacidad de reconocer y vincular moléculas diana específicas además de ser estables.

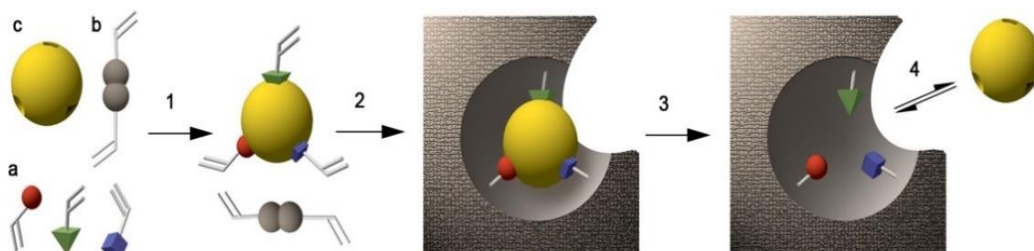


Figura 3. Principio general de impresión molecular. Un complejo de plantilla molecular (c) y monómeros funcionales (a) se polimeriza en presencia de monómeros de reticulación (b) para formar una red polimérica tridimensional (Hugon et al. 2007).

Los MIP's se han utilizado en varios campos, especialmente en el uso de sensores electroquímicos debido a su estructura y capacidad de reconocimiento específico. Los sensores electroquímicos a base de MIP's tienen propiedades tanto de reconocimiento como de transducción, es decir, el MIP como elemento de reconocimiento puede unirse específicamente a algún analito y generar una señal química o física (Duan et al. 2018). Este tipo de sensores presentan muchas ventajas ya que incluyen propiedades de reconocimiento, bajo costo y la posibilidad de un diseño cómodo y sencillo (Chen et al. 2016).

2.1.5 Sensores electroquímicos

Los sensores electroquímicos son dispositivos utilizados para detectar y cuantificar la presencia de compuestos químicos en una muestra mediante reacciones electroquímicas. Estos sensores aprovechan la capacidad de ciertos compuestos para generar corrientes eléctricas o cambios de potencial cuando se produce una reacción química en su superficie (Della et al. 2018).

La detección electroquímica se basa en la interacción entre el analito de interés y un electrodo funcionalizado con un material específico que promueve la reacción electroquímica (Della et al. 2018). A medida que el analito se acerca o se adsorbe en la superficie del electrodo, se producen cambios en las propiedades electroquímicas, como la corriente, el potencial o la impedancia eléctrica (Tonelli et al. 2019; Berg et al. 2003; Zeng et al. 2019).

Existen diferentes tipos de sensores electroquímicos, como los sensores de potenciometría, amperometría y Voltametría, cada uno con su propia metodología de medición y aplicaciones específicas. Estos sensores se utilizan en una amplia gama de áreas, como la medicina, la industria química, la seguridad alimentaria y la protección ambiental (Vasilescu et al. 2019).

La principal ventaja de los sensores electroquímicos es su alta sensibilidad, selectividad y capacidad para realizar mediciones in situ en tiempo real. Además, son relativamente económicos, compactos y fáciles de usar, lo que los convierte en una herramienta valiosa tanto en entornos de laboratorio como en aplicaciones de campo (Manikandan et al. 2018).

Los sensores electroquímicos ofrecen una forma eficiente y precisa de detectar y cuantificar compuestos químicos en diversas muestras, lo que los convierte en una tecnología fundamental para la monitorización y el control en numerosos campos de aplicación (Mishra et al. 2018).

2.1.5.1 Sensores Impedimétricos

Los sensores de impedancia se basan en la detección de cambios en la interacción entre la superficie del electrodo y el entorno, es decir, determinan el cambio de resistencia debido a la interacción entre la superficie del electrodo modificado químicamente y el entorno (Sharma et al. 2019). El método consiste en aplicar una pequeña señal de potencial sinusoidal en un cierto rango de frecuencia entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar y registrar la respuesta en forma de intensidad de corriente con una amplitud y fase diferente al potencial aplicado (Uygun et al. 2014). La relación potencial/corriente permite la identificación de

datos de impedancia, que se pueden representar en el plano complejo como Z' (la parte imaginaria de la impedancia) y Z'' (la parte real de la impedancia), conocido como gráfico de Nyquist o módulo de resistividad $|Z|$ y cambio de fase (θ) en función de la frecuencia aplicada, conocido como diagrama de Bode (Eggins et al. 2007; Bhardwaj et al. 2015). Dicho de otra manera, podemos observar procesos de resistencia en la transferencia de electrones al aplicar un potencial cuando modificamos la superficie de los electrodos. Esa respuesta se puede observar mediante la formación de semicírculos de Nyquist utilizando la técnica de espectroscopia de impedancia (EIS) como se muestra en la figura 4. El desarrollo de sensores Impedimétricos han sido utilizados en distintas investigaciones como lo es el desarrollo de un sensor Impedimétrico para la detección de gliadina desarrollado por (Fabio Bottari et al. 2018) con el fin de imitar lo que sucede en el intestino de los pacientes celíacos. (Govindasamy et al. 2017) desarrollo un sensor Impedimétrico utilizando electrodos modificados con nanotubos de carbono para la detección de cloranfenicol en muestras de leche con un limite de detección de $0.015\mu\text{M}$. Por otra parte (Que X. et al. 2013) modificaron electrodos con nano hojas de grafeno para a detección de tetraciclina utilizando métodos Impedimétricos obteniendo un límite de detección de 0.006 ng mL^{-1} .

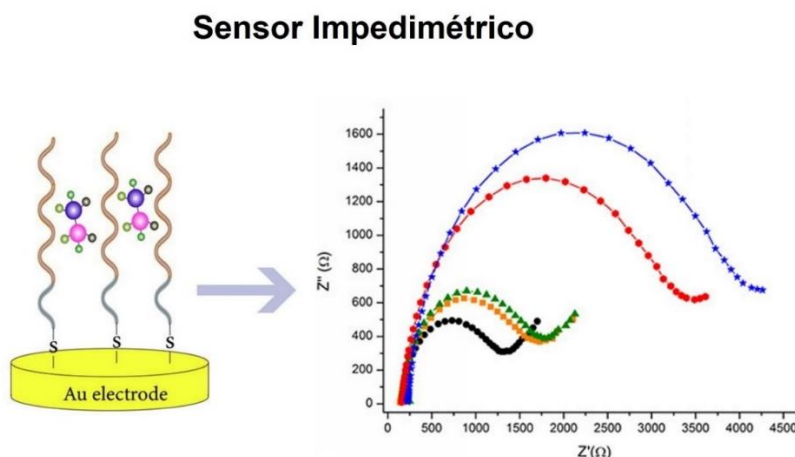


Figura 4. Desarrollo y respuesta electroquímica de sensor Impedimétrico. Modificado de (Fabio Bottari et al. 2018)

2.1.5.2 Sensores Potenciométricos

Los sensores potenciométricos se basan en medir el potencial creado por sustancias cargadas en la superficie de una membrana como material sensible. La base teórica de los sensores de potenciometría se fundamenta en la ecuación de Nernst, la cual se utiliza para calcular la concentración de disoluciones iónicas mediante la medición de los potenciales eléctricos en materiales o soluciones (Alegret et al. 2004). Estos sensores constan principalmente de tres componentes esenciales: un dispositivo de medición de potencial, un electrodo de referencia y un electrodo selectivo a iones que se desea analizar como se muestra en la figura 5. Los electrodos de referencia generalmente son de doble unión en relación a los cuales se registran las variaciones de potencial (Cadre et al. 2023). Los electrodos selectivos a iones, tal como su nombre lo indica, son electrodos que responden de manera sensible a la presencia de un tipo específico de ión en la solución, facilitando así su cuantificación (Somoza Chuay et al. 2019). El potencial registrado se puede usar para determinar la concentración de las especies responsables de la aparición de la carga superficial de la membrana (Mc Cready et al. 1951). Los sensores potenciométricos permiten modificar la selectividad del sensor cambiando las propiedades de los materiales formadores de membrana. (Mir et al. 2016) Desarrolló un sensor potenciométrico utilizando electrodos de oro serigrafiados para la detección de Triptófano con un límite de detección de $3.6 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$. (Helena et al. 2011) desarrollaron un sensor utilizando polímeros de impresión molecular para la detección de ciprofloxacino mediante técnicas potenciométricas logrando un límite de detección de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

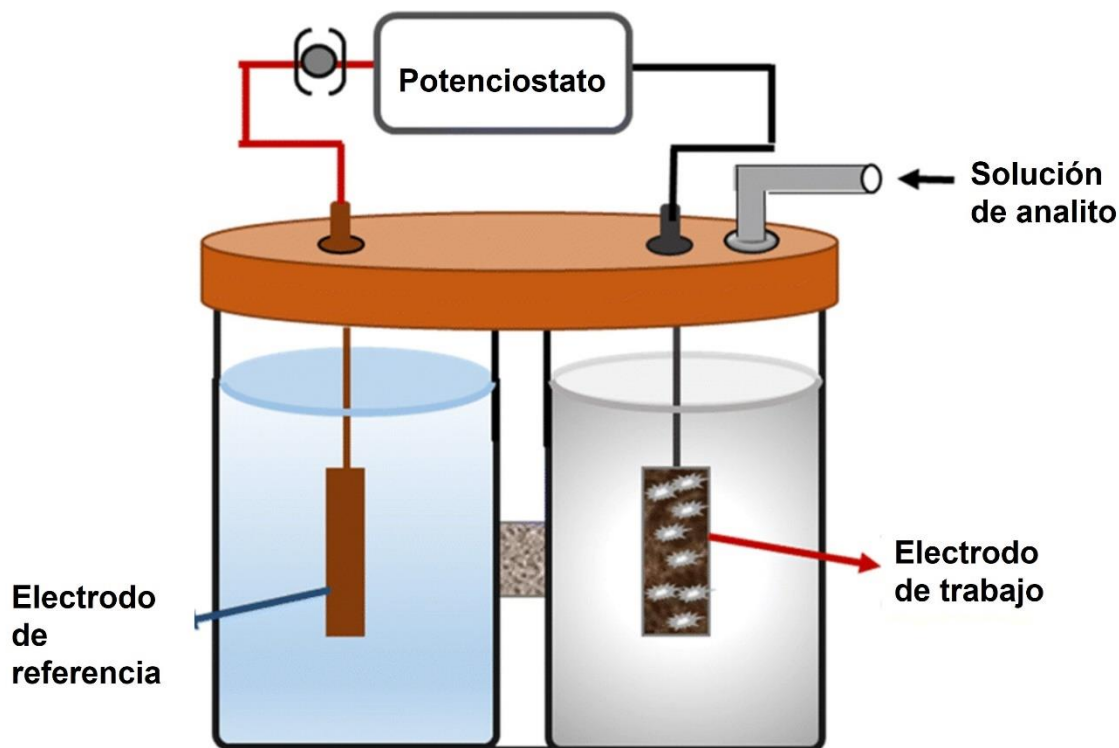


Figura 5. Componentes principales que forman a un sensor potenciométrico. Modificado de (Alegret et al. 2004)

2.1.5.3 Sensores Amperométricos

Los sensores amperométricos se basan en la medición de la corriente eléctrica generada por una reacción química o electroquímica en un electrodo. Estos sensores se utilizan para detectar y cuantificar la concentración de ciertos analitos en una muestra (Xu et al. 2023). El principio básico de funcionamiento consiste en la aplicación de un potencial eléctrico constante entre un electrodo de trabajo y un electrodo de referencia en presencia de la muestra como se muestra en la figura 6, (Xu et al. 2023). Cuando ocurre la reacción electroquímica entre el analito y el electrodo de trabajo, se genera una corriente eléctrica proporcional a la concentración del analito. El electrodo de trabajo está diseñado de manera específica para la detección del analito. Puede estar recubierto con una capa selectiva que reacciona con el analito y produce una corriente eléctrica proporcional a su concentración (Selvolini et al. 2023). La reacción electroquímica

que tiene lugar en el electrodo de trabajo puede ser de oxidación o reducción, dependiendo de las propiedades del analito y del electrodo. El electrodo de referencia, por otro lado, se utiliza para mantener un potencial constante en el electrodo de trabajo y asegurar mediciones precisas. Suele ser un electrodo con un potencial de referencia conocido y estable (Yin et al. 2023). La corriente generada por la reacción electroquímica se mide mediante un amplificador de corriente y se utiliza para determinar la concentración del analito en la muestra (Zhang et al 2019). Así mismo, se han desarrollado una gran cantidad de trabajos relacionados con la implementación de sensores amperométricos para la detección de analitos, como lo es la determinación sensible de ácido úrico (UA) basado en la modificación de electrodos serigrafados de carbono (SPCE) con óxido de grafeno (GO) desarrollado por (Preeyaporn et al 2021). Un sensor amperométrico para la detección de paracetamol en aguas contaminadas fue desarrollado por (Kumar et al. 2022) con un limite de detección de $0.29 \mu\text{M}$. Por otra parte (Zhu et al. 2023) desarrollo un sensor para la detección de homocisteína utilizando electrodos de carbono modificados con nanopartículas de oro obteniendo un límite de detección de $0.6 \mu\text{M/L}$.

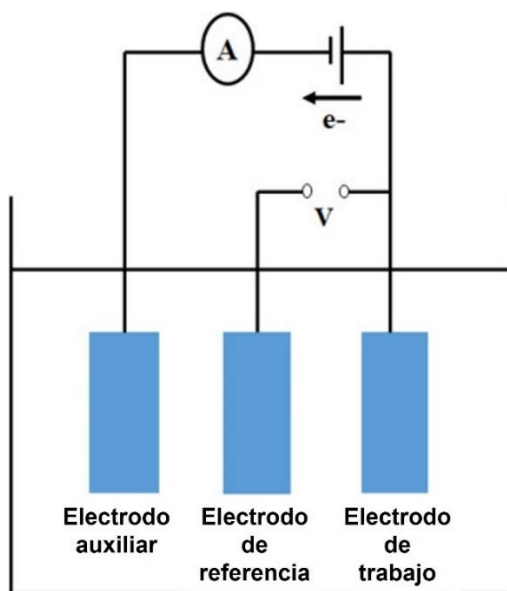


Figura 6. Principio básico del funcionamiento de un sensor amperométrico. Modificado de (Xu et al. 2023)

2.1.5.4 Sensores Voltamperométricos

En un sensor voltamétrico, se hace un barrido de potencial y se registra la corriente generada por la oxidación/reducción del analito y/o especies de interés en la superficie del electrodo (Krishnaswamy et al. 2022). Durante estos procesos redox, se produce una transferencia de electrones entre el electrodo de trabajo y la solución, lo que da como resultado un aumento en la intensidad de la corriente, donde la intensidad máxima es proporcional a la concentración del analito (Bressi et al. 2023). Al igual que en los sensores amperométricos, los electrodos de los sensores Voltamperométricos pueden modificarse utilizando diferentes materiales, lo que puede mejorar la selectividad y especificidad del sensor de una forma sencilla y eficaz (Hoshino et al 2019). Existen otros métodos de voltamperometría ampliamente utilizados, como la voltamperometría de pulso diferencial (DPV) o la voltamperometría de onda cuadrada (SWV).

En el caso de DPV, la señal de excitación consiste en un barrido lineal del potencial a través de pulsos de amplitud, duración y aumento de potencial constantes. Las respuestas resultantes son escaneos de intensidad, donde cada pulso se representa como la diferencia entre la corriente registrada antes del pulso y al final del pulso (Cetó et al 2022). Esta técnica reduce las corrientes no farádicas. De esta forma, se obtiene una reacción en la que la intensidad máxima de la corriente Faradaica es proporcional a la concentración de las especies reaccionantes, cuando se expresa como la diferencia entre la corriente obtenida y el potencial aplicado, con mayor sensibilidad que otras técnicas (Spinola Machado et al. 2022). La forma de la onda en la señal de excitación consiste en una serie de pulsos a manera de escalera, donde el potencial de base aumenta gradualmente en pequeños intervalos entre 10 y 100 mV (ancho de pulso= ΔE_s). La amplitud de pulso ΔE_p , se mantiene constante con respecto al potencial de base (Guziejewski et al. 2023). La corriente resultante del proceso se mide justo antes de la aplicación del pulso (1) y al final de la aplicación del mismo, de esta manera al graficar la diferencia de corrientes obtenidas ($I_1 - I_2$) en función del potencial aplicado (usualmente el potencial en 1), se obtienen respuestas típicas como la

mostrada en la figura 7, donde la intensidad máxima de corriente (I_p) es proporcional a la concentración de especies reactantes (Guziejewski et al. 2023).

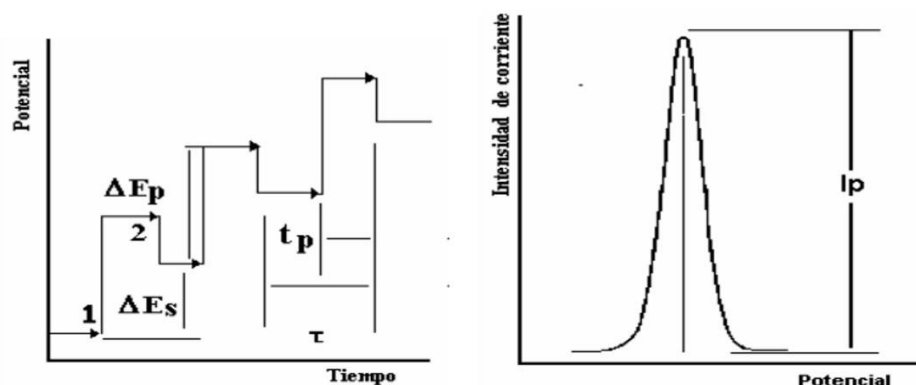


Figura 7. Señal de excitación y respuesta típica de voltamperometría de diferencial de pulso (DPV). Modificado de (Krishnaswamy et al. 2022)

La voltamperometría de onda cuadrada (SWV) es una técnica electroquímica que se utiliza para analizar y cuantificar especies químicas en solución. Es una variante de la voltamperometría, que se basa en la medición de la corriente generada cuando se aplica un potencial variable a través de un electrodo (Mirceski et al. 2021).

La SWV se caracteriza por utilizar una forma de onda cuadrada en lugar de una rampa lineal de voltaje como se muestra en la figura 8. Durante la medición, se aplica un potencial de onda cuadrada al electrodo, alternando entre un valor base y un valor máximo. Esta onda cuadrada se superpone a un potencial de polarización constante, que puede ser positivo o negativo, dependiendo de la naturaleza de la reacción electroquímica que se desea estudiar como se muestra en la figura 9 (V. Mirceski et al. 2019). La corriente generada en respuesta a la onda cuadrada es medida y registrada. La amplitud de la corriente resultante se correlaciona con la concentración del analito presente en la muestra. La frecuencia de la onda cuadrada puede variar y se elige según la aplicación específica.

La principal ventaja de la SWV es su alta sensibilidad y selectividad. La forma de onda cuadrada permite obtener una respuesta más rápida y una mejor

resolución de picos en comparación con otras técnicas voltamperométricas. Además, la superposición del potencial de polarización constante ayuda a mejorar la sensibilidad y a eliminar interferencias (Saha et al. 2023).

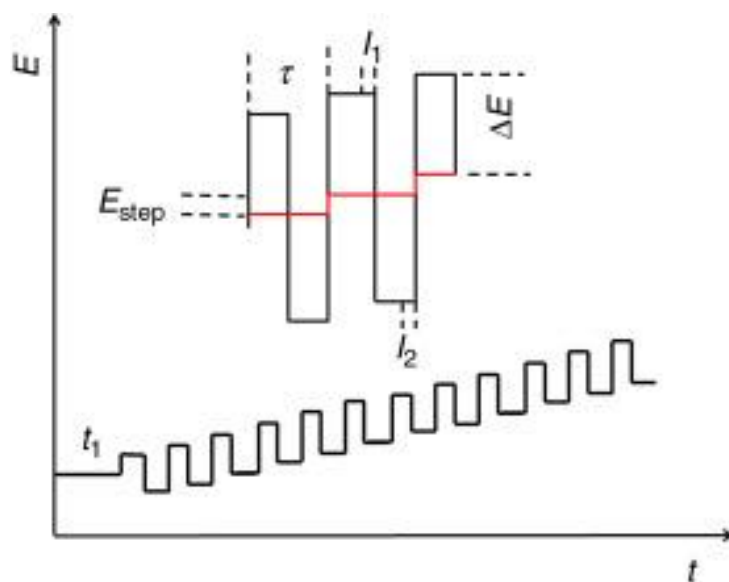


Figura 8. Aplicación de potencial en voltamperometría de onda cuadrada. Modificado de (Mirceski et al. 2021).

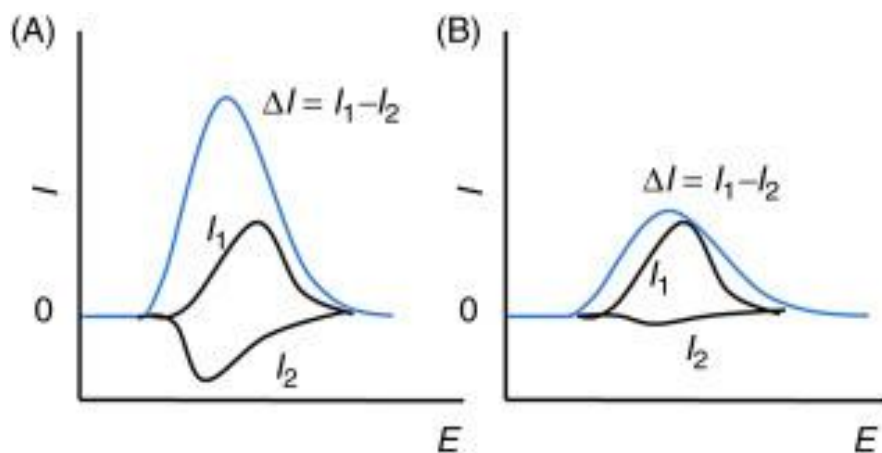


Figura 9. Esquema de voltamograma de onda cuadrada, (A) representación de un proceso redox de sistema reversible, (B) representación de un sistema irreversible. Modificado de (Mirceski et al. 2021).

El uso de sensores voltamétricos ha sido ampliamente utilizado para la cuantificación de analitos en la industria alimentaria. La industria alimentaria está obligada a cumplir con los estrictos requisitos de calidad y seguridad de la industria (Sharifi et al. 2020). Además, debe tomar medidas de control para cumplir con los consumidores en todos los aspectos de seguridad, confianza, comodidad y calidad. Por ello, resulta necesario establecer controles de calidad que permitan procesar los productos alimenticios en tiempo real, de manera fácil y económica (Martins et al. 2021).

CAPÍTULO 3

3.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1.1 Materiales

Acetonitrilo (ACN), 6-mercaptohexanol, hexacianoferrato de potasio (III) $K_3[Fe(CN)_6]$, ácido sulfúrico, 3-trimetosilpropil de metacrilato (3-TPM), enrofloxacino (EF), Ciprofloxacino (CPX), Ácido Nalidíxico (A. NALX), Diclofenaco (DIC), Azitromicina (AZI), Rifaximina (RIF), ácido metacrílico (MAA), dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), ferrocenilmetil de metacrilato y *azobisisobutironitrilo* (AIBN). Todos los reactivos fueron de grado analítico. Además, para todos los estudios electroquímicos se utilizaron electrodos de oro serigrafiados y un equipo potenciostato Sensit Smart de la marca Palm Sense.

3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Lavado y activación de electrodos serigrafiados

Los electrodos de oro serigrafiados se sometieron a un proceso de lavado y activación utilizando un potenciostato Sensit Smart. Se aplicó una gota de aproximadamente 15 μ L de una solución de H_2SO_4 a 0.1 M sobre el electrodo. Luego, se llevó a cabo un barrido de 80 ciclos utilizando la técnica de voltamperometría cíclica (CV) con un potencial de ventana de -0.7 a 1.2 V y una velocidad de barrido de 50 mV. Después de cada 20 ciclos, se realizó un lavado exhaustivo con agua para eliminar cualquier residuo presente.

Este mismo procedimiento de lavado y activación de electrodos de oro serigrafiados fue realizado de manera similar por Ayankojo y colaboradores (Ayankojo et al., 2020). En su estudio, demostraron a través de la técnica de

Voltametría cíclica (CV) que, con cada lavado realizado, los voltamogramas se volvían progresivamente más reproducibles, lo que sugiere una mayor confiabilidad en los resultados obtenidos.

3.1.2.2 Modificación química de electrodos serigrafiados

Una vez lavado y activado el electrodo de oro, se llevó a cabo su modificación química mediante la adición de una gota de 10 μL del monómero 6-mercaptohexanol al electrodo de trabajo de Au, siguiendo el procedimiento utilizado por Caratelli y colaboradores (Caratelli et al., 2021; Pagliarini et al., 2019). Estos investigadores modificaron la superficie del electrodo de Au para rellenar los espacios vacíos sin alterar, con el objetivo de evitar interacciones no deseadas en su superficie.

Posteriormente, se permitió que la modificación se secase a temperatura ambiente durante 24 horas, seguido de un lavado con abundante agua para eliminar el exceso de monómero. Luego, se llevó a cabo una segunda modificación agregando una gota de 15 μL de 3-TPM a la superficie del electrodo, y nuevamente se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas, siguiendo un procedimiento similar al reportado por Yilmaz y colaboradores (Yilmaz et al., 2022) en la modificación de electrodos de Au serigrafiados. En este caso, la finalidad era aprovechar los grupos vinilos para la formación de nuevos enlaces.

Finalmente, se realizó un lavado con abundante agua para eliminar el exceso de monómero no reactivo o cualquier residuo presente, y el electrodo modificado se almacenó para las siguientes modificaciones.

3.1.2.3 Síntesis de polímeros molecularmente impresos

La síntesis de los polímeros de impresión molecular (MIPs) se llevó a cabo sobre la superficie del electrodo que previamente había sido modificado con el monómero de 3-TPM. En un matraz de fondo redondo, se mezclaron 100 mL de acetonitrilo conteniendo 52,1 mg de enrofloxacino como molécula molde, 100 μ L de ácido metacrílico como monómero funcional y 1,09 mL de dimetacrilato de etilenglicol como monómero reticulante. Esta solución se sometió a un baño ultrasónico durante 30 minutos para promover la interacción entre el monómero funcional y la molécula molde.

Posteriormente, el electrodo de oro se sumergió en la solución y se añadieron 20 mg de ferrocenilmetil de metacrilato y 20 μ L de AIBN como iniciador. El sistema se mantuvo en agitación constante en un ambiente de nitrógeno para eliminar el oxígeno presente en la solución. La polimerización se llevó a cabo a una temperatura de 70 °C durante 24 horas, siguiendo el método de co-precipitación reportado por Wang y colaboradores (Wang et al., 2019) en su investigación.

Una vez que los MIPs se polimerizaron en la superficie del electrodo, se lavaron con una mezcla de metanol y ácido acético en una proporción de 9:1, y se mantuvieron bajo agitación magnética vigorosa durante la noche para eliminar la molécula molde de los MIPs. Finalmente, se realizaron lavados adicionales con metanol al 80%.

Además, se llevó a cabo la síntesis de una muestra control de NIP (polímeros de impresión no específicos) en las mismas condiciones, pero en ausencia de la plantilla de enrofloxacino, siguiendo el enfoque utilizado por Wang y colaboradores (Wang et al., 2019) en su investigación.

3.1.2.4 Preparación de solución de enrofloxacina

Se preparó una solución madre de enrofloxacino a una concentración de 0.01 M en H₂SO₄ a 0.1 M. A partir de esta solución madre, se prepararon diversas

muestras de enrofloxacino a una concentración de 3 mM en un buffer de acetato con un rango de pH de 3 a 6, con el propósito de evaluar y obtener la respuesta óptima del compuesto. Posteriormente, se aplicó una gota de aproximadamente 15 μL de la solución de enrofloxacino sobre un electrodo de oro desnudo, y se procedió a estudiar su comportamiento redox utilizando la técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV), siguiendo el enfoque utilizado por Lu y colaboradores (Lu et al., 2021).

3.1.2.5 Preparación de solución de diferentes fármacos

La solución se preparó a una concentración de 0.001 M en un buffer de acetato a pH 3, incluyendo los fármacos Ciprofloxacino, Ácido Nalidíxico, Diclofenaco, Azitromicina, Rifaximina y Enrofloxacino. Posteriormente, se aplicó una gota de aproximadamente 15 μL de cada solución de fármaco por separado sobre el electrodo de oro desnudo. Utilizando la técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV), se examinó el comportamiento de oxidación de cada uno de los fármacos, similar a lo que se realizó en la investigación llevada a cabo por Lu y colaboradores (Lu et al., 2021).

3.1.2.6 Evaluación de electrodo-MIP con el control electrodo-NIP

Además, con el objetivo de evaluar tanto el electrodo MIP como el electrodo control NIP, se preparó una solución de enrofloxacina a una concentración de 0.5 mM en un buffer de acetato a pH 3. Posteriormente, se aplicaron gotas de 15 μL de esta solución en cada uno de los electrodos-MIP y los electrodos-NIP respectivamente. El análisis se llevó a cabo utilizando un potenciostato mediante la técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV), con la aplicación de un rango de potencial de 0 a 1.1 V y una velocidad de barrido de 0.08 v/s con el fin de observar una señal de corriente correspondiente al pico de oxidación de la enrofloxacina, de manera similar a lo que se realizó en la investigación llevada a cabo por Akyüz y colaboradores (Akyüz et al., 2020).

3.1.2.7 Determinación de la enrofloxacin

Para la cuantificación de enrofloxacin mediante el uso de electrodos de oro modificados con MIPs, se realizó un estudio utilizando la técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV). Las muestras de enrofloxacin se prepararon a diversas concentraciones, abarcando desde 10 hasta 100 μM , utilizando un buffer de acetato con pH 3. Se aplicó una gota de 15 μL de las soluciones a distintas concentraciones sobre el electrodo MIPs.

El análisis se realizó empleando la técnica SWV, con la aplicación de un rango de potencial de 0 a 1.1 V y una velocidad de barrido de 0.08 v/s. El objetivo era observar una señal de corriente que correspondiera a la concentración del fármaco. Este estudio se inspiró de la metodología utilizada por Yan y colaboradores (Yan et al., 2017) en su investigación.

3.1.2.8 Ensayo de selectividad del electrodo-MIP

Luego de identificar los picos de corriente de oxidación correspondientes a cada uno de los fármacos presentes en las soluciones preparadas, se llevó a cabo un ensayo para evaluar la selectividad del electrodo modificado con polímeros de impresión molecular, de manera similar a lo realizado en la investigación de Yola y colaboradores (Yola et al., 2019). Se aplicaron 15 μL de la solución preparada de cada fármaco a una concentración de 0.001 M por separado, depositándola en la superficie del electrodo-MIP.

Posteriormente, utilizando un equipo potenciostato y la técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV), se efectuaron las mediciones para cada uno de los fármacos. Estas mediciones se compararon con la información previamente obtenida utilizando el electrodo de oro desnudo. Además, se realizó una comparación de la selectividad del electrodo-MIP con enrofloxacin y otros fármacos.

3.1.2.9 Ensayo de especificidad del electrodo-MIP

También se llevó a cabo un análisis con el propósito de evaluar la especificidad del electrodo-MIP hacia otros fármacos que comparten estructuras químicas similares a la del enrofloxacino. Para esta evaluación, se prepararon soluciones complejas a diversas concentraciones que abarcaban un rango de 0.1 a 1 mM para los fármacos enrofloxacino, diclofenaco, azitromicina y ácido nalidíxico. Luego, se aplicó una gota de aproximadamente 15 μL de cada solución sobre el electrodo-MIP, a fin de realizar un análisis mediante la técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV). El objetivo era evaluar la especificidad del electrodo hacia el enrofloxacino en distintas concentraciones, de manera similar a lo que se realizó en el trabajo de Ostrovidov y Colaboradores (Ostrovidov et al., 2023).

3.1.3 Caracterización

3.1.3.1 Caracterización Morfológica

3.1.3.1.1 Microscopía de Fuerza Atómica

Llevamos a cabo una caracterización morfológica detallada de los electrodos de oro serigrafiados para visualizar la modificación de la superficie del electrodo de trabajo en cada etapa, desde la modificación química hasta la implementación de los MIPs, inspirándonos en la metodología utilizada por Zhang y Colaboradores (Zhang et al., 2019) en su investigación. Para llevar a cabo esta caracterización, empleamos microscopía de fuerza atómica (AFM), utilizando un equipo modelo Alpha300RA (WiTec, Alemania).

3.1.3.2 Caracterización Electroquímica

3.1.3.2.1 Voltamperometría Cíclica (CV)

Como parte de la caracterización del electrodo de oro modificado, se llevó a cabo un análisis utilizando la técnica de voltamperometría cíclica para evaluar el grado de modificación en la superficie del electrodo en cada una de las etapas. Este estudio de voltamperometría cíclica se realizó utilizando un equipo potenciostato Sensit Smart de la marca Palm Sense. Preparamos una solución de $K_3[Fe(CN)_6]$ a una concentración de 2 mM en H_2SO_4 0.1 M. Luego, aplicamos una gota de aproximadamente 15 μ L de esta solución sobre el electrodo de oro, y procedimos a realizar barridos mediante la técnica de voltamperometría cíclica con un rango potencial de -0.7 a 0.7 V y una velocidad de barrido de 50 mV. Se repitió el mismo procedimiento en cada una de las etapas de modificación del electrodo. El propósito de la caracterización era observar los picos de corriente correspondientes al proceso redox del $K_3[Fe(CN)_6]$. Este mismo procedimiento fue empleado en la investigación llevada a cabo por Khosrokhavar y colaboradores (Khosrokhavar et al., 2020).

3.1.3.2.2 Espectroscopía de Impedancia (EIS)

Con el fin de complementar los análisis de caracterización electroquímica en los electrodos de oro serigrafados, llevamos a cabo un estudio de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). Este estudio EIS se realizó empleando el mismo equipo potenciostato Sensit Smart de la marca Palm Sense. Aplicamos una gota de la solución de $K_3[Fe(CN)_6]$ y la analizamos utilizando una frecuencia de 20 kHz. Estos estudios se llevaron a cabo en cada una de las etapas de modificación para evaluar el grado de modificación en la superficie del electrodo, siguiendo una metodología similar a la utilizada por Zouaoui y colaboradores (Zouaoui et al., 2020).

3.1.3.3 Caracterización Físicoquímica

3.1.3.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Con el propósito de realizar un estudio físicoquímico a los electrodos modificados, llevamos a cabo una caracterización utilizando la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), empleando el modo de reflectancia total atenuada (ATR). Para esta caracterización, utilizamos el equipo de infrarrojo de la marca Perkin Elmer tipo Frontier. Las mediciones se llevaron a cabo de manera individual en cada una de las etapas de modificación. Además, utilizamos el electrodo de oro serigrafiado desnudo como muestra de control, en un enfoque similar al seguido por Xu y colaboradores (Xu et al., 2022) en su metodología.

CAPÍTULO 4

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 Caracterización Morfológica

4.1.1.1 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La modificación de la superficie de los electrodos se examinó utilizando la técnica de microscopía de fuerza atómica, como se ilustra en la Figura 10. La micrografía presentada en la Figura 10(a) corresponde al electrodo de Au sin modificación. Se puede apreciar una morfología con una apariencia suave y pequeñas protuberancias, características típicas de la superficie de los electrodos de Au serigrafados. En las Figuras 10(b y c), las micrografías revelan la modificación de los electrodos de Au mediante la incorporación de una capa de matriz polimérica.

En la Figura 10(b), se muestra el electrodo control denominado polímero de no impresión molecular (NIP), el cual carece de una plantilla (enrofloxacino) para la impresión. La morfología de este electrodo presenta una ligera diferencia en su topografía en comparación con el electrodo desnudo. Por otro lado, en la Figura 10(c) se presenta la micrografía del electrodo de Au modificado con el polímero molecularmente impreso (MIP), empleando enrofloxacino como plantilla. En esta imagen, se pueden apreciar cúmulos con una disposición ordenada, junto con estructuras esféricas de aproximadamente 1 μm de tamaño sobre la superficie del electrodo.

Los resultados obtenidos concuerdan con los hallazgos de Beluomin y colaboradores (Beluomin et al., 2018), quienes observaron una mayor rugosidad en la superficie de los electrodos modificados con MIP en comparación con aquellos modificados con NIP. Esta diferencia se atribuye a la interacción entre el monómero funcional y la plantilla, lo cual da lugar a la formación de una matriz

polimérica más extensa, en concordancia con lo mencionado por Maísa y colaboradores (Maísa et al., 2021) en su investigación.

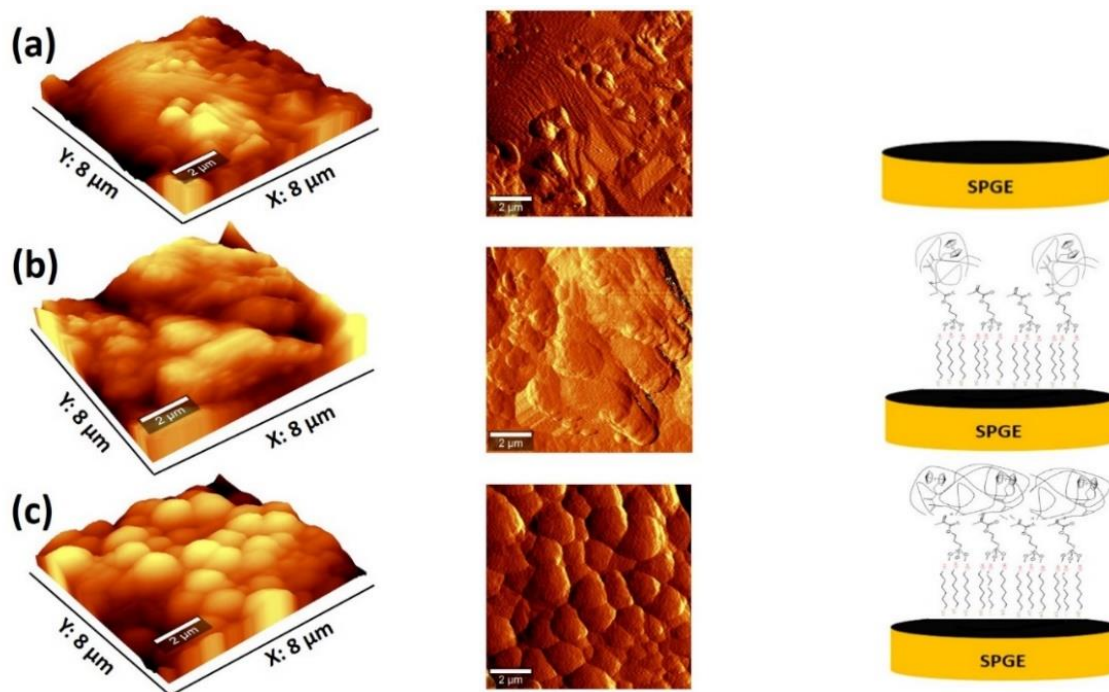


Figura 10. Micrografías de AFM a electrodos serigrafiados. Electrodo de Au desnudo (a), Electrodo de Au modificado con NIP (b), Electrodo de Au modificado con MIP (c).

4.1.2 Caracterización Electroquímica

4.1.2.1 Voltamperometría Cíclica

Las investigaciones electroquímicas que se basan en la oxidación de sustancias orgánicas representan enfoques prometedores con fines analíticos. En este estudio, se llevaron a cabo investigaciones para analizar el comportamiento de la oxidación electroquímica en los electrodos de Au en cada una de las etapas de modificación. Este análisis electroquímico se realizó utilizando la técnica de voltamperometría cíclica (CV), aplicando un rango de potencial de -0.7 a 0.7 V y una velocidad de barrido de 50 mV.

La Figura 11 exhibe los resultados derivados del análisis de CV en los electrodos de Au, donde los picos de oxidación y reducción correspondientes al electrolito soporte $K_3[Fe(CN)_6]$ son claramente visibles. Tal como se anticipaba, la modificación de los electrodos resultó en cambios en los voltamogramas cíclicos. Esto se manifiesta en el desplazamiento de los picos de óxido-reducción, así como en una disminución en la intensidad de los picos de corriente a medida que se realizaba la modificación del electrodo.

A partir de estos resultados, podemos inferir que el grado de modificación se relaciona con el correspondiente cambio en la señal de los voltamogramas de $K_3[Fe(CN)_6]$. Esta relación es congruente con lo demostrado por O'Sullivan y colaboradores, así como por Meno y colaboradores (O'Sullivan et al., 2021; Menon et al., 2018) en sus respectivas investigaciones. En sus estudios, el aumento del grado de modificación en el electrodo conlleva a una alteración en el flujo de iones del electrolito sobre la superficie del electrodo, en comparación con el contacto directo con el electrodo desnudo.

Por otro lado, se observó que los picos de oxidación y reducción de $K_3[Fe(CN)_6]$ en los electrodos de Au modificados con MIP y NIP no presentaron diferencias significativas. Debido a esto, se llevaron a cabo más caracterizaciones como complemento al análisis de los electrodos, con el objetivo de evaluar con mayor precisión el grado de modificación.

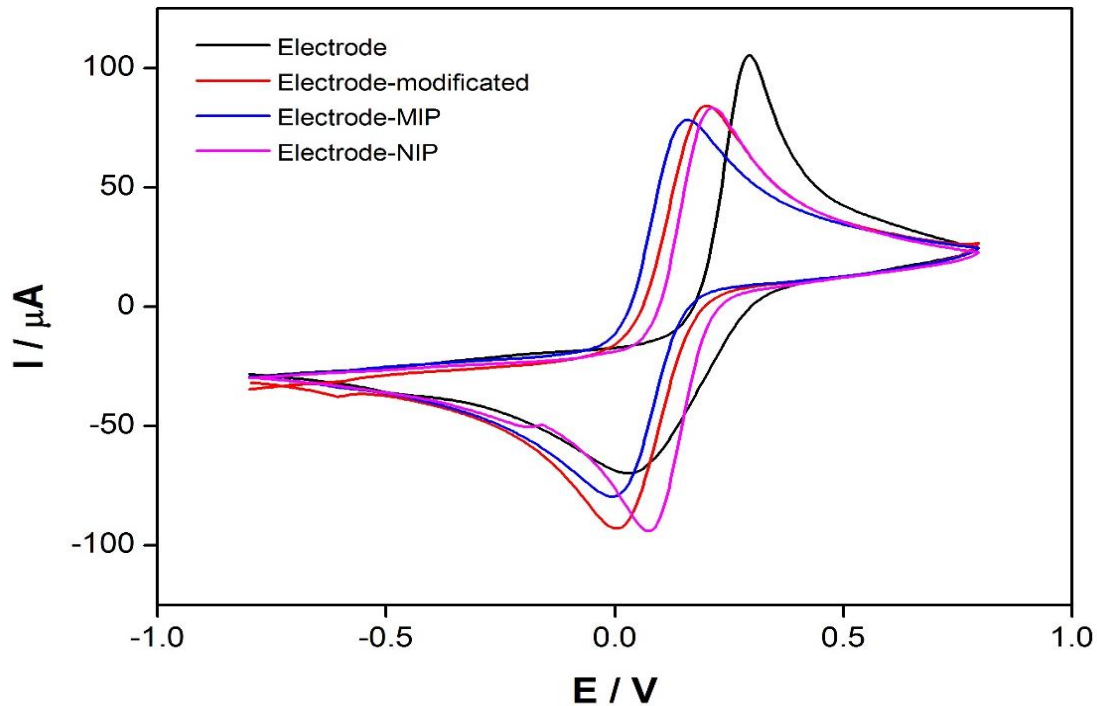


Figura 11. Caracterización por CV de electrodos de Au serigrafiados en solución de $K_3[Fe(CN)_6]$ 2 mM en H_2SO_4 . Electrodo de Au desnudo (negro), electrodo de Au modificado con 6-mercaptohexanol (rojo), electrodo NIP (rosa) y electrodo MIP (azul).

4.1.2.2 Espectroscopía de Impedancia (EIS)

Como parte integral de las caracterizaciones electroquímicas que buscan evaluar el grado de modificación en los electrodos de Au, se llevó a cabo un estudio mediante espectroscopía de impedancia electroquímica. Los espectros correspondientes a los electrodos de Au sujetos a modificaciones reflejaron un semicírculo de Nyquist, una característica que emerge cuando se incrementa la resistencia del electrodo.

La Figura 12 ilustra en color verde la señal proveniente del electrodo sometido a una modificación química mediante el monómero 6-mercaptohexanol. En este caso, el pequeño semicírculo de Nyquist indica una modificación en la resistencia del electrodo. Por otro lado, en azul se presenta la señal correspondiente al electrodo de Au sin modificación, evidenciando una forma que carece de un

semicírculo, manifestando un comportamiento de transferencia de electrones, en concordancia con lo expuesto por Laschuk y Colegas (Laschuk et al. 2021) en su investigación.

Aunque se esperarían patrones similares en las señales para los electrodos de Au modificados con MIP y NIP, nuestros resultados muestran una marcada diferencia en la transferencia de carga entre ambos. Esta diferencia se observa en la Figura 12, con la señal en rojo representando la modificación con MIP y la señal en negro para la modificación con NIP. Esta variación podría atribuirse a una disimilitud en la disposición de la red polimérica en el electrodo, resultado de las cavidades generadas por la impresión molecular y la subsiguiente eliminación de la plantilla.

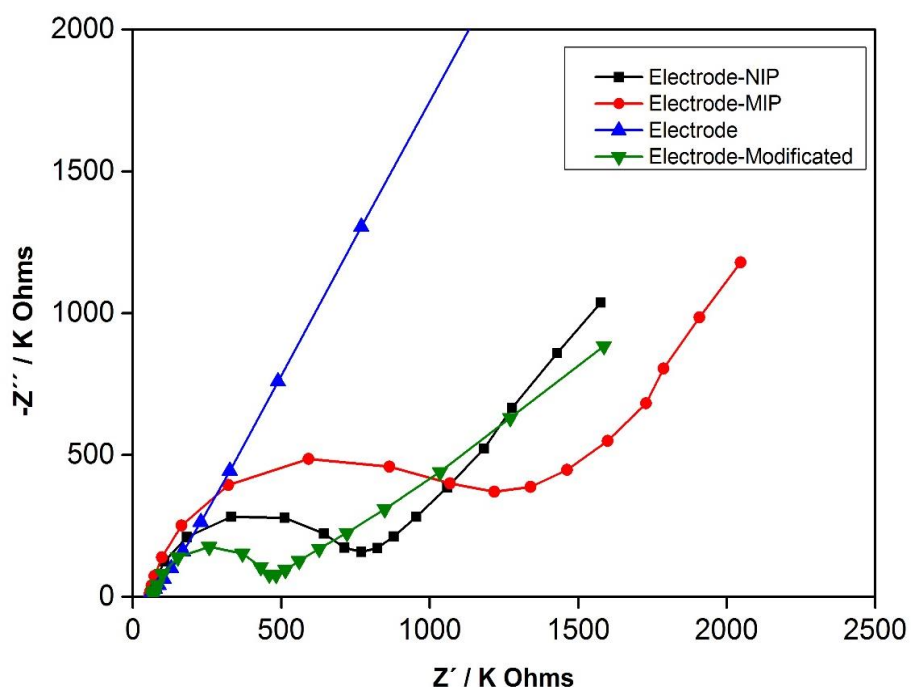


Figura 12. Espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) a electrodos serigrafados. Electrodo de oro desnudo (azul), electrodo MIP (rojo), electrodo NIP (negro) y electrodo modificado químicamente con monómero (verde).

4.1.3 Caracterización Físicoquímica

4.1.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

La figura 13 exhibe los resultados obtenidos mediante la caracterización físicoquímica utilizando la técnica de FTIR-ATR. Los espectros FTIR presentan las huellas químicas correspondientes a cada etapa de modificación en el desarrollo del electrodo-MIP. El espectro en negro representa al electrodo de oro serigrafado en su estado sin modificación, el cual se emplea como control para establecer comparaciones con los espectros de los demás tratamientos.

El espectro en rojo corresponde a la primera etapa de modificación del electrodo de oro. En él, se aprecian los enlaces C-H a 2860 cm^{-1} y O-H a 3315 cm^{-1} , atribuidos al 6-mercaptohexanol, consistentes con lo indicado por Anyaogu y Colaboradores (Anyaogu et al., 2008) en su propia investigación. Por otro lado, el color azul revela nuevas bandas en el espectro FTIR, localizadas a 1715 cm^{-1} y 1080 cm^{-1} , que corresponden a los enlaces C=O y C-O respectivamente. Estos enlaces derivan de los grupos funcionales presentes en la modificación química con 3-trimetoxisililpropil metacrilato, según lo señalado por Córdova y Colaboradores (Córdova et al., 2020).

En el espectro en verde, se muestra la modificación del electrodo con los MIPs, mientras que la línea rosa presenta la modificación con los NIPs. Ambos espectros son similares, con la diferencia principal situada en la banda de 1540 cm^{-1} , la cual se relaciona con el enlace C-F. La figura 14 es una amplificación en la región entre los 1000 y 1600 cm^{-1} , que nos permite evidenciar una señal relacionado con el enlace C-F. Dicha banda es característica de las fluoroquinolonas, como también observaron Yan y Colaboradores (Yan et al., 2013) en su investigación. Estos resultados nos permiten concluir que el electrodo-MIP efectivamente contiene la huella molecular del enrofloxacino en su modificación con los polímeros de impresión molecular, como se observa en la

(figura 14a), en contraste con el electrodo-NIP (figura 14b) que se caracteriza por la ausencia del analito.

Estos hallazgos complementan la información y contribuyen a confirmar la modificación del electrodo de oro en cada una de las etapas del proceso.

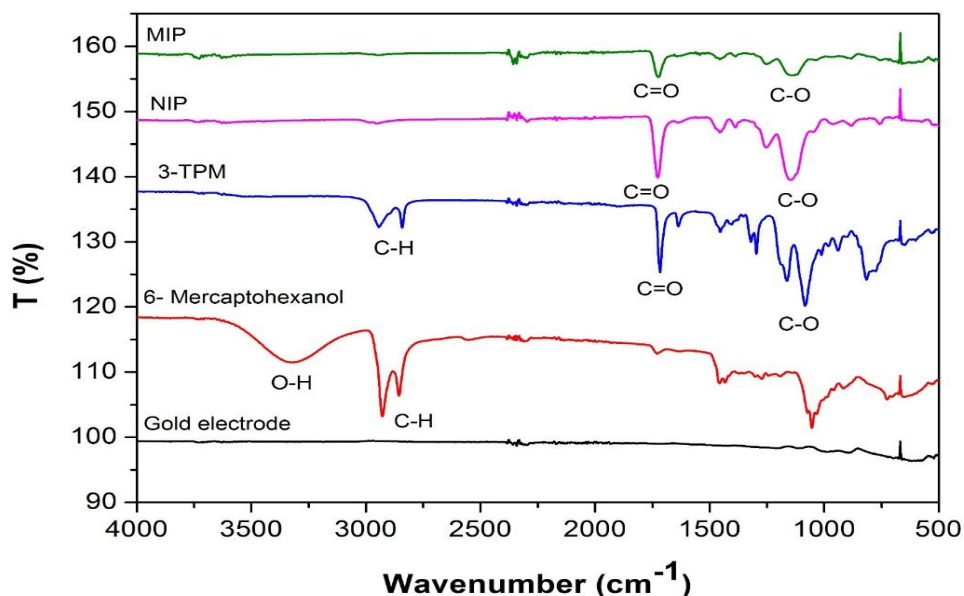


Figura 13. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR). Electrodo-MIP (verde), Electrodo-NIP(rosa), Modificación química con 3-TPM(azul), Modificación química con 6-Mercaptohexanol (rojo) y Electrodo control (negro).

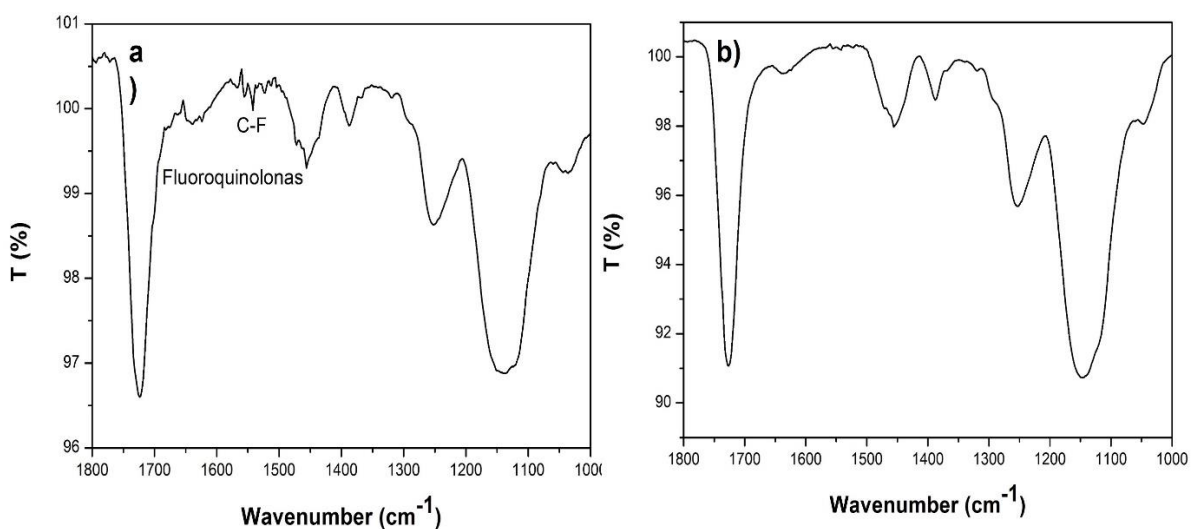


Figura 14. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR). Electrodo-MIP (a), Electrodo-NIP(b).

4.1.4 Influencia del pH

Luego de llevar a cabo una detallada caracterización electroquímica de los electrodos de oro modificados, se aplicó la técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV) como método electroanalítico principal para la determinación de enrofloxacin. El enfoque principal de este análisis radicaba en evaluar cómo el pH influía en el proceso de oxidación de la enrofloxacin. El objetivo era obtener una respuesta de corriente lo suficientemente robusta para respaldar un análisis cuantitativo adicional. Esta evaluación del pH se llevó a cabo en un rango, abarcando desde un pH 3 hasta un pH 6, utilizando un buffer de acetato.

Las representaciones gráficas de los resultados en la Figura 15 indican que a medida que el pH de la solución aumenta, el pico máximo de corriente asociado con la oxidación de la enrofloxacin disminuye en intensidad. Además, se observa un desplazamiento en el potencial de ventana para cada valor de pH de la solución. Estos resultados concuerdan con observaciones previas realizadas por Hernández y su equipo (Hernández et al., 2021), quienes señalaron que los cambios en el pH del buffer podrían tener un impacto directo en la reacción electroquímica de la enrofloxacin. Esto sugiere que las propiedades electroquímicas de la enrofloxacin son influenciadas por la acidez o la alcalinidad del entorno durante el análisis.

Cabe resaltar que la señal de corriente correspondiente a la oxidación de la enrofloxacin tiende a manifestarse en un potencial de ventana de alrededor de 0.9 V. Esta observación está respaldada tanto por este estudio como por investigaciones anteriores, como la de Siyu Lu y su grupo (Siyu Lu et al., 2021). Además, el estudio revela que la señal de corriente para la solución con un pH de 3 coincide con el mencionado potencial de ventana de 0.9 V.

Basándonos en estos hallazgos, se tomó la decisión de establecer el pH 3 como las condiciones óptimas para los experimentos subsiguientes. Estos resultados influyen significativamente en la metodología y el diseño de los

experimentos posteriores, garantizando que las condiciones sean lo más apropiadas posible para lograr mediciones precisas y consistentes.

Como parte de la investigación se centró en la construcción de una curva de calibración que relacionara la respuesta actual obtenida en función de las distintas concentraciones de enrofloxacin. La Figura 16 ilustra un pico de corriente lineal que muestra una relación directamente proporcional entre las concentraciones de enrofloxacin y la respuesta de corriente. Esto se reafirma mediante el alto coeficiente de determinación (R^2) de 0.9947.

Adicionalmente, observaciones similares se documentaron en una investigación realizada por Antilén y colaboradores (Antilén et al., 2017). En su estudio, se notó que las moléculas de enrofloxacin podrían existir en diferentes estados, como catión (ENR^+), anión (ENR^-) o zwitterión (ENR^\pm), en función del pH del entorno. Este conocimiento es esencial para comprender la complejidad de los procesos químicos y físicos involucrados en el procedimiento electroanalítico. Además, subraya la importancia de considerar la naturaleza química de las moléculas bajo estudio y cómo esta puede variar según las condiciones de pH, lo cual, impacta directamente en el rendimiento y la interpretación de los resultados electroquímicos.

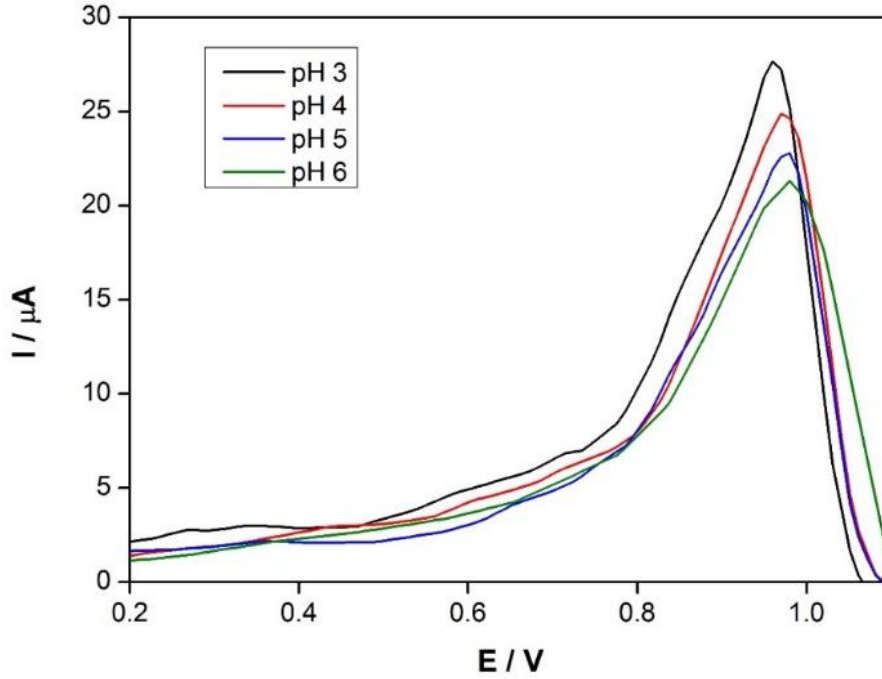


Figura 15. Voltametría de onda cuadrada (SWV) a muestras de enrofloxacin preparadas a una concentración de 3 mM en diferentes soluciones tampón de pH.

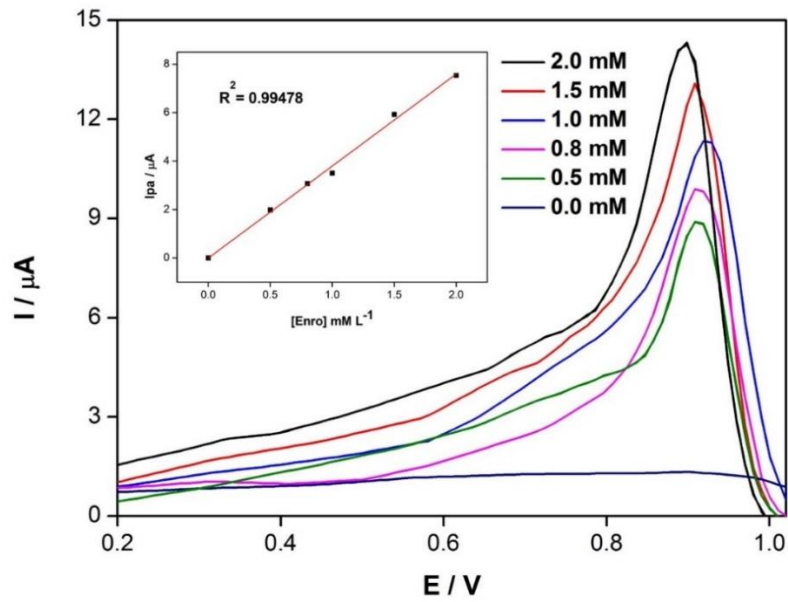


Figura 16. Voltametría de onda cuadrada (SWV) a muestras de enrofloxacin preparadas a pH 3 en diferentes concentraciones.

4.1.5 Respuesta de los electrodos MIP y NIP

Se procedió a realizar un análisis comparativo de la respuesta electroquímica entre distintos tipos de electrodos con respecto a la enrofloxacin molecularmente impresa. Esto se logró a través de la técnica de voltamperometría de onda cuadrada (SWV), evaluando los electrodos MIP, NIP y desnudo en presencia de enrofloxacin. La Figura 17 refleja el pico de corriente que corresponde al proceso de oxidación de la enrofloxacin, con una concentración de 1 mM y un potencial de ventana de 0.9 V, para el electrodo de Au modificado con MIP. Asimismo, se puede identificar un pequeño pico de corriente ligado al proceso de oxidación de la enrofloxacin en el electrodo de Au modificado con NIP. Esta respuesta puede atribuirse a interacciones no específicas o a áreas no modificadas en el electrodo de Au.

Adicionalmente, se observa una señal de corriente de oxidación menor en el electrodo de Au desnudo. Sin embargo, cuando se compara esta señal con la que se obtiene del electrodo de Au modificado con MIP, se observa una diferencia considerable. Esto se debe a que la modificación de los electrodos con MIP concentra en mayor medida la muestra de analito en las cavidades de la impresión molecular. Esto coincide con lo expuesto por Seguro y colaboradores (Seguro et al., 2022) en su investigación. Ellos realizaron la modificación de electrodos de Au serigrafiados con polímeros de impresión molecular donde observaron una mayor señal para los electrodos con MIP, adicionalmente también observaron una pequeña señal de oxidación en los electrodos de Au desnudos la que fue atribuida a la oxidación de partículas de Au formadas sobre la superficie del electrodo.

Los resultados obtenidos presentan diferencias notables no solo en comparación con los electrodos de Au desnudo, sino también entre los electrodos NIP y MIP. Esta diferencia sugiere la formación de polímeros con características distintas en los electrodos MIP y NIP, lo que refleja la influencia de la impresión molecular en la selectividad y sensibilidad del electrodo.

Este análisis comparativo proporciona un panorama de cómo la modificación molecular contribuye directamente en la capacidad de concentrar y detectar la enrofloxacin en los electrodos. La diferencia en las señales obtenidas entre los electrodos desnudo, NIP y MIP subraya la importancia de la impresión molecular para mejorar la selectividad y la respuesta del electrodo.

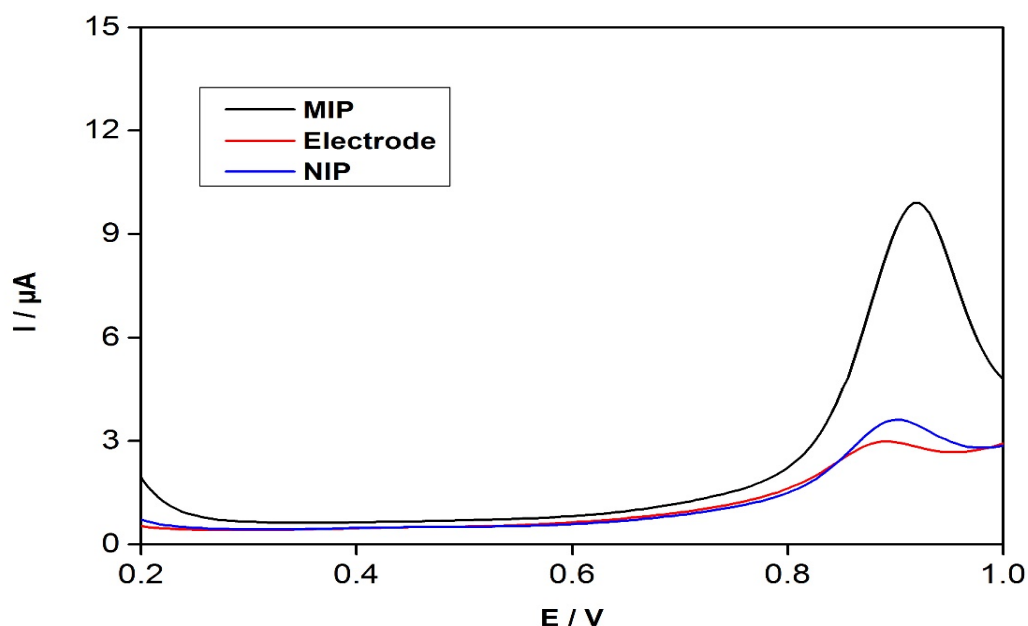


Figura 17. Voltametría de onda cuadrada (SWV) a electrodos de Au modificado en presencia de una muestra de enrofloxacin a 1 mM en una solución buffer de pH 3.

4.1.6 Detección electroquímica de enrofloxacin

En la Figura 18 se observa un análisis mediante SWV en el que se emplea un electrodo de oro modificado con MIP y distintas concentraciones de enrofloxacin en un buffer con pH 3. Los resultados obtenidos señalan un rango lineal que abarca concentraciones de enrofloxacin desde 10 hasta 100 μM , con un límite de detección (LOD) de 2 $\mu\text{M L}^{-1}$. Es importante destacar que estas concentraciones se sitúan por debajo de los límites establecidos por las comisiones reguladoras, que oscilan entre 100 y 300 μM , según lo reportado en el estudio de Lebelo y colaboradores (Lebelo et al., 2017).

El desarrollo de biosensores basados en polímeros de impresión molecular para la detección de enrofloxacino revela cualidades destacables que resultan comparables a las técnicas tradicionales de detección, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Esta plataforma de detección aporta ventajas notables, entre ellas, una inversión económica reducida y la capacidad de detectar y cuantificar analitos sin necesidad de recurrir a instalaciones de laboratorio. Una investigación similar con estas características lo presenta el sensor desarrollado por Seguro y sus colaboradores (Seguro et al., 2022), en el cual se emplean polímeros de impresión molecular para el desarrollo de un sensor electroquímico.

Estos resultados evidencian que el electrodo de oro modificado con MIP demuestra ser eficaz en la determinación de enrofloxacino. Su rango lineal de detección y el LOD obtenido se alinean adecuadamente con los parámetros requeridos por las comisiones reguladoras. La incorporación de polímeros de impresión molecular en biosensores otorga ventajas sustanciales tanto en términos de costos como de portabilidad, a la par de las técnicas de detección convencionales. De esta manera, podemos decir que el uso de polímeros de impresión molecular puede potenciar la capacidad de los biosensores para cumplir con requisitos de precisión y aplicabilidad en diferentes contextos analíticos.

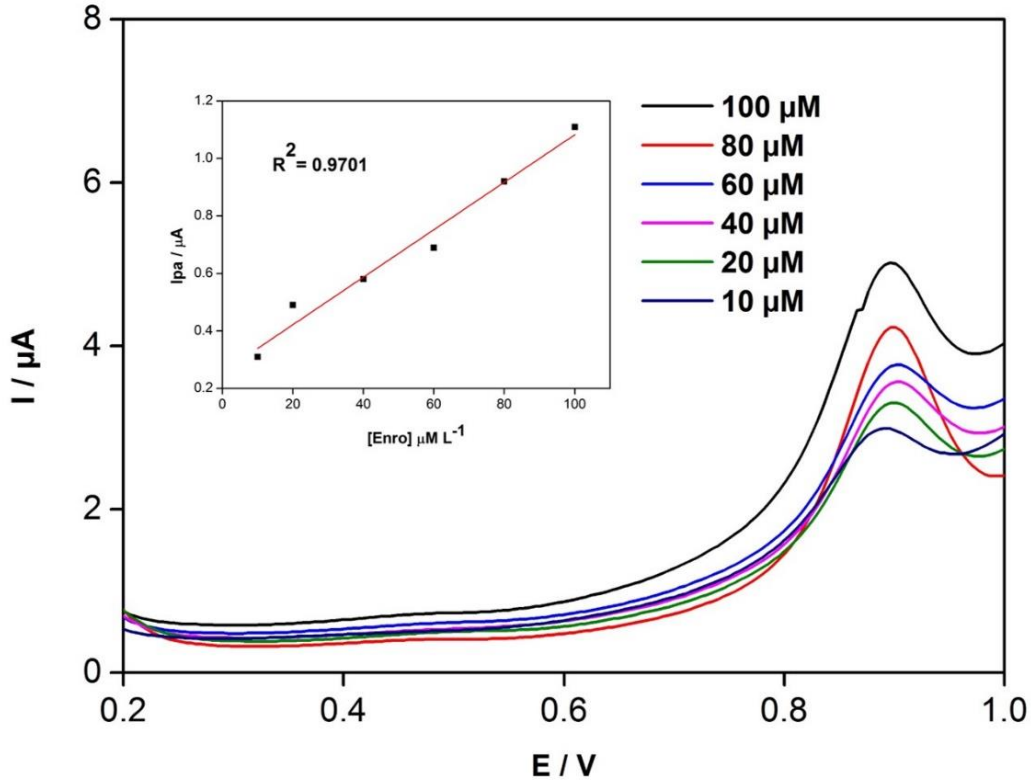


Figura 18. Voltametría de onda cuadrada (SWV) a electrodo de Au modificado con MIP en presencia de enrofloxacino a diferentes concentraciones en solución buffer pH 3.

4.1.7 Selectividad del electrodo-MIP

La figura 19 muestra el comportamiento de la oxidación de diversos fármacos, incluyendo Ciprofloxacino, Ácido Nalidíxico, Diclofenaco, Azitromicina, Rifaximina y Enrofloxacino, mediante la técnica de SWV en un buffer de acetato a pH 3. Por otro lado, se obtuvieron resultados sustantivos en el estudio de la selectividad del electrodo-MIP hacia la enrofloxacina, presentados en la figura 20. El gráfico muestra el porcentaje de señal de corriente derivada de la técnica de SWV para cada uno de los fármacos bajo análisis. La señal de corriente en color rojo representa el porcentaje de oxidación a una concentración de 1 mM para cada fármaco de manera individual al emplear el electrodo-MIP. Los resultados indican que este último presenta un porcentaje de señal de corriente más alto para la

enrofloxacin en comparaci3n con los dem1s f1rmacos. Esta diferencia se origina en la capacidad del enrofloxacin para interactuar de manera m1s efectiva con los grupos funcionales de las cavidades en la impresi3n polim3rica molecular. Espec1ficamente, este f1rmaco puede formar enlaces de hidr3geno en mayor medida que los otros compuestos debido a la adaptaci3n de la impresi3n en el pol1mero, que concuerda con el tama1o, forma y posici3n de los grupos funcionales de la mol3cula de enrofloxacin. Esta afinidad diferenciada se asemeja a lo demostrado por Qu y su equipo en su estudio de 2008 (Qu et al., 2008), donde desarrollaron pol1meros de impresi3n molecular en forma de esferas para la detecci3n de enrofloxacin, destacando la mayor selectividad de este f1rmaco.

De igual modo, en los resultados de la figura 20 se observa que el ciprofloxacino exhibe una se1al de corriente superior en comparaci3n con los otros f1rmacos. Esta respuesta se explica por la similitud estructural sustancial entre el ciprofloxacino y el enrofloxacin. No obstante, a pesar de esta inclinaci3n m1s alta del electrodo-MIP hacia el ciprofloxacino, sigue manifestando una preferencia y selectividad notables hacia el enrofloxacin. Esta diferenciaci3n reafirma la capacidad de la impresi3n molecular para crear una interacci3n selectiva y espec1fica con un analito particular en un entorno complejo de m1ltiples componentes.

En conjunto, estos resultados destacan la capacidad del electrodo-MIP para identificar y cuantificar de manera selectiva la enrofloxacin, enriqueciendo las posibilidades de la detecci3n precisa y efectiva de este f1rmaco en diversas aplicaciones.

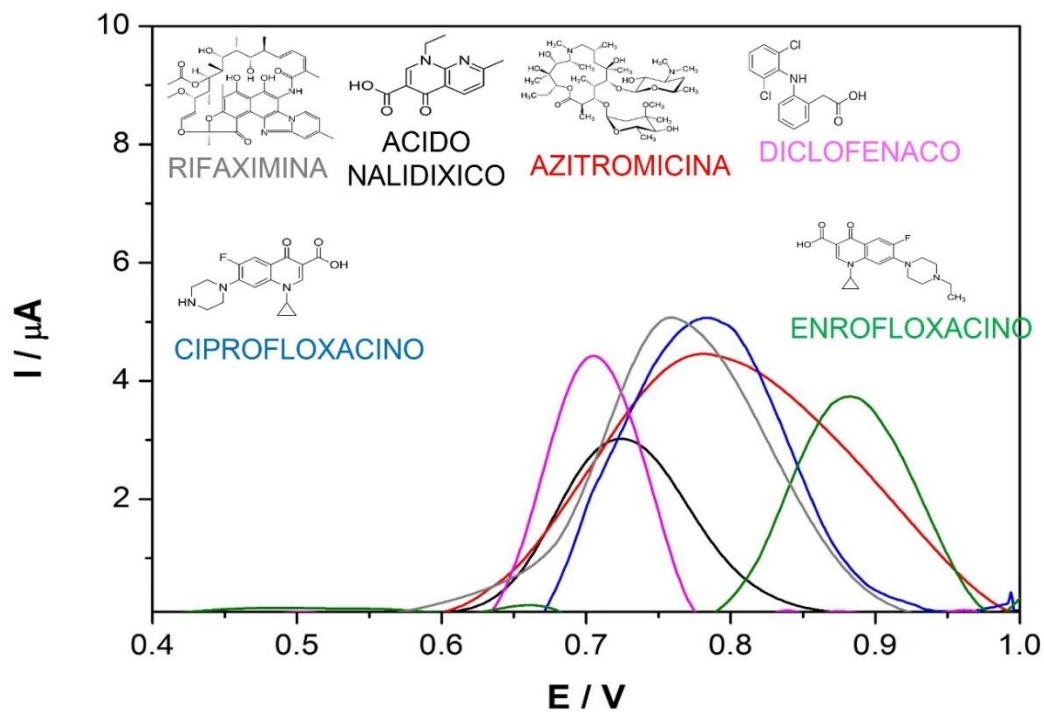


Figura 19. Voltametría de onda cuadrada (SWV) a diferentes fármacos en concentración de 1mM en buffer de acetato pH 3

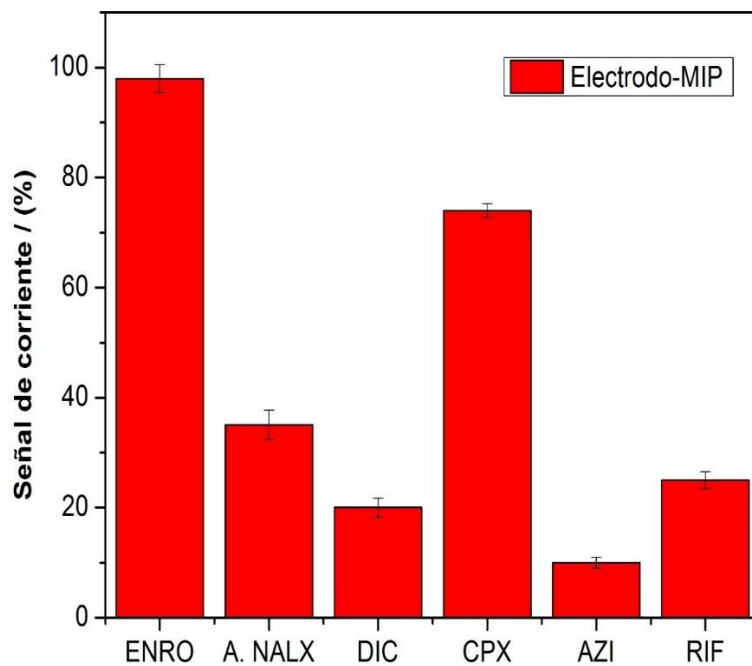


Figura 20. Evaluación de selectividad del electrodo-MIP con diferentes fármacos a una concentración de 1mM en buffer de acetato pH 3

4.1.8 Especificidad del electrodo-MIP

La figura 21 expone los resultados obtenidos en el estudio de la especificidad de los electrodos-MIP en relación con la enrofloxacin. En la figura 21(a), se representa el pico de corriente de oxidación de la enrofloxacin a diversas concentraciones, variando desde 0.1 hasta 1 mM. Se observa una progresión gradual de la corriente en función del aumento de la concentración. En la figura 21(b), se presenta la curva de calibración correspondiente, que ilustra una correlación lineal con las diferentes concentraciones de enrofloxacin. Estos hallazgos concuerdan con resultados presentados por Lu y su equipo (Lu et al., 2021), donde se encontraron correlaciones positivas entre la respuesta del sensor (expresada en términos de corriente) y las concentraciones de enrofloxacin, evidenciando dos rangos lineales en 0.05-10 μM y 10-120 μM .

Asimismo, se exploró el comportamiento de oxidación de la enrofloxacin en soluciones complejas, como se aprecia en la figura 21(c). Se observa una ligera reducción en el pico de corriente de oxidación en cada una de las concentraciones medidas, en comparación con los datos de la figura 21(a). Esta disminución podría derivar de interacciones entre los otros fármacos presentes en las soluciones y los grupos funcionales en las cavidades de la impresión polimérica molecular. Específicamente, esta interacción podría estar vinculada a la formación de puentes de hidrógeno, tal como se evidenció en el estudio de selectividad. Esta observación sugiere una interacción inespecífica de cierta magnitud hacia fármacos pertenecientes a la misma familia o que comparten una estructura química similar, como se muestra en la investigación realizada por Chen y colaboradores (Chen et al., 2022), donde se notó una respuesta significativa en fármacos interferentes, en su mayoría fluoroquinolonas.

A pesar de estas interacciones inespecíficas, los resultados persisten en demostrar una alta especificidad hacia la enrofloxacin, como refleja la curva de calibración en la figura 21(d), presentando un rango de detección lineal para las concentraciones estudiadas.

La especificidad de los electrodos-MIP hacia la enrofloxacin se reafirma mediante la curva de calibración. Aunque se percibe una ligera interacción inespecífica con fármacos de la misma familia o con estructuras químicas similares en soluciones complejas, esta interacción no afecta de manera significativa la capacidad de detección y cuantificación de la enrofloxacin en el rango de concentraciones examinado. Esta investigación resalta la confiabilidad y efectividad de los electrodos-MIP como herramientas de detección específicas y selectivas para la enrofloxacin en contextos analíticos diversos.

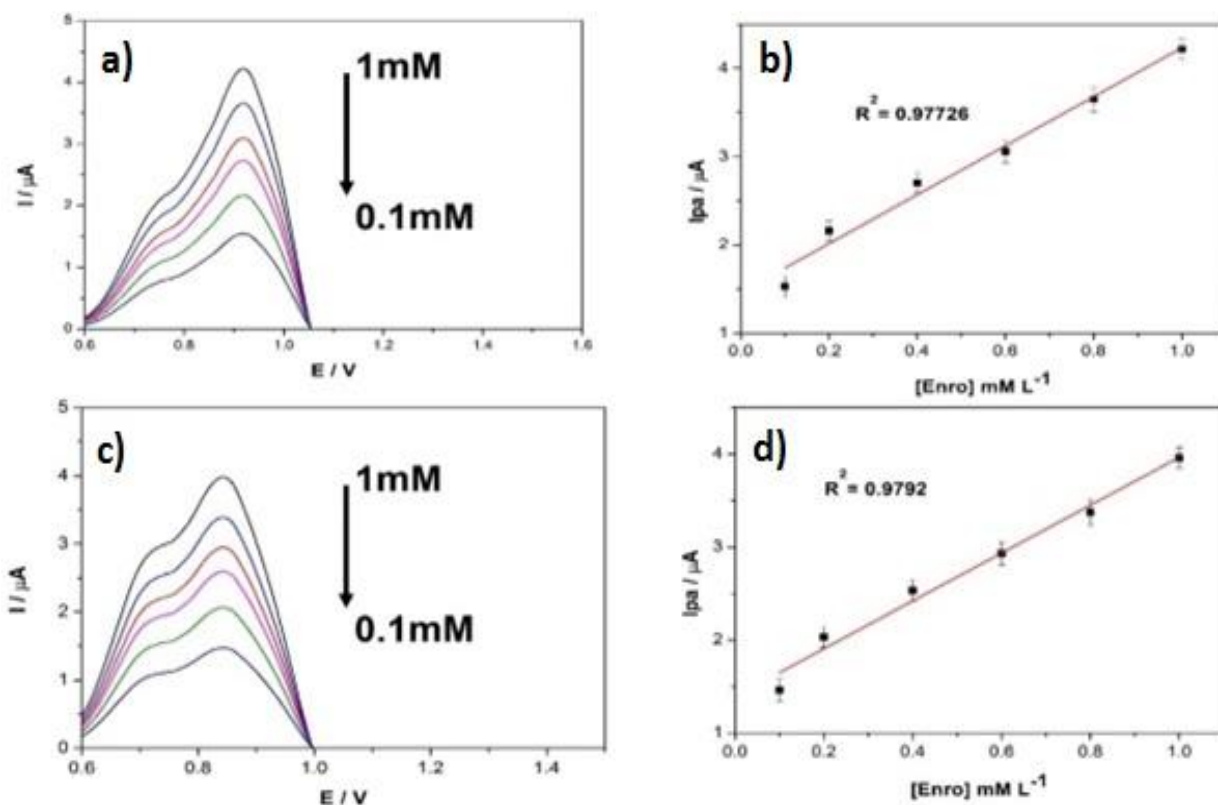


Figura 21. Voltamperometría de onda cuadrada (SWV) a Electrodo-MIP, (a) solución de enrofloxacin a diferentes concentraciones (b) curva de calibración para solución de enrofloxacin, (c) soluciones complejas de enrofloxacin a diferentes concentraciones, (d) curva de calibración para soluciones complejas de enrofloxacin.

CAPÍTULO 5

5.1 CONCLUSIONES

Este estudio dio lugar al desarrollo de un nuevo sensor electroquímico mediante la modificación de electrodos de oro serigrafiados con polímeros molecularmente impresos, con el propósito de detectar enrofloxacino. Este sensor de diseño sencillo y funcional demuestra la capacidad de detectar niveles de concentración de enrofloxacino por debajo de los límites permitidos, en contraste con los niveles detectados mediante métodos tradicionales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además, una ventaja significativa radica en su portabilidad, lo que le permite llevar a cabo la detección y el análisis en el campo, en un período de alrededor de ~5 minutos, eliminando la necesidad de trasladar la muestra al entorno de un laboratorio.

No menos importante, estos electrodos serigrafiados modificados son reutilizables, aspecto que incrementa su atractivo, especialmente cuando se compara con métodos más convencionales como los mencionados anteriormente. Esta característica no solo confiere un valor económico, sino que también contribuye a la sustentabilidad al reducir la generación de desechos y el consumo de recursos. En conjunto, este enfoque innovador aborda varios desafíos asociados con la detección precisa y eficaz de enrofloxacino.

No obstante, aunque este sensor electroquímico muestra promesas considerables, es importante mencionar algunas posibles limitaciones. La selectividad del sensor en presencia de compuestos similares podría ser objeto de un mayor estudio y refinamiento. Además, la sensibilidad y la precisión podrían mejorarse aún más en futuras investigaciones, lo que contribuiría a su aplicabilidad en una gama más amplia de escenarios. En resumen, esta investigación destaca cómo la integración de la impresión molecular en la detección electroquímica puede brindar soluciones valiosas y con potencial en el ámbito de la medicina, la seguridad alimentaria, entre otros.

5.2 PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

El desarrollo de este sensor electroquímico mediante el empleo de polímeros de impresión molecular establece un camino intrigante y lleno de posibilidades para la creación de sensores avanzados destinados a la detección de contaminantes emergentes. Este enfoque no solo presenta un salto cualitativo en términos de precisión y especificidad, sino que también ofrece una perspectiva más amplia en cuanto a la aplicación de la tecnología de impresión molecular en campos diversos.

A pesar de estos avances notables, queda un espacio importante para la investigación futura en esta área. Es esencial continuar llevando a cabo estudios exhaustivos para evaluar la selectividad del sensor frente a otras moléculas de interés. Esta evaluación contribuiría a confirmar la versatilidad y la aplicabilidad del sensor en diferentes contextos analíticos.

En el camino hacia la mejora y la innovación, resulta fundamental considerar el uso de materiales que puedan potenciar la sensibilidad del dispositivo. La incorporación de nanopartículas metálicas o monómeros con propiedades electroactivas podría tener un impacto significativo en la capacidad de detección y en la respuesta del sensor. Esta estrategia podría resultar en una mayor precisión y en la ampliación de los límites de detección.

Además, una dirección prometedora para investigaciones futuras implica explorar nuevas metodologías para la modificación de los electrodos serigrafados. Esto podría implicar la búsqueda y adaptación de técnicas de modificación que optimicen aún más el rendimiento del sensor en términos de sensibilidad, selectividad y estabilidad.

En última instancia, esta investigación sienta las bases para una nueva generación de sensores electroquímicos altamente especializados y capaces de abordar retos complejos en la detección de contaminantes emergentes. La continuación de la exploración y la innovación en este campo promete

contribuciones significativas en áreas críticas como la seguridad alimentaria, el monitoreo medioambiental y la salud pública.

REFERENCIAS

- A. Vasilescu, P. Fanjul-Bolado, A.M. Titoiu, R. Porumb, P. Epure, (2019). Progress in electrochemical (bio)sensors for monitoring wine production, *Chemosensors*. 7 1– 39. <https://doi.org/10.3390/chemosensors7040066>
- Abera, B.D.; Ortiz-gómez, I.; Shkodra, B.; Romero, F.J.; Cantarella, G.; Petti, L.; Salinas-castillo, A.; Lugli, P.; Rivadeneyra, A. (2022). Laser-induced Graphene Electrodes Modified with a Molecularly Imprinted Polymer for Detection of Tetracycline in Milk and Meat. *Sensors*, 22, 269. <https://doi.org/10.3390/s22010269>
- Ahmad, A., Kurniawan, S. B., Abdullah, S. R. S., Othman, A. R., & Hasan, H. A. (2021). Contaminants of emerging concern (CECs) in aquaculture effluent: Insight into breeding and rearing activities, alarming impacts, regulations, performance of wastewater treatment unit and future approaches. *Chemosphere*, 133319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133319>
- Akyüz, B. G., Özkorucuklu, S. P., Esengül, K. I. R., & BAŞTEMUR, G. Y. (2020). Determination Of Ciprofloxacin In Pharmaceutical Dosage, Human Serum and Urine, Using Molecularly Imprinted Polymer Modified Electrode By Voltammetry. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (20), 859-865.
- Alcalá, I. M., Soto, J., & Lahora, A. (2020). Antibióticos como contaminantes emergentes. Riesgo ecotoxicológico y control en aguas residuales y depuradas. *Ecosistemas: Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 29(3), 8.

Alegret, S., del Valle, M., & Merkoçi, A. (2004). *Sensores electroquímicos: introducción a los quimiosensores y biosensores: curso teórico-práctico* (Vol. 147). Univ. Autònoma de Barcelona.

Álvarez MD, Esteban AM. (2019). Sample Preparation via Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) in LC - MS Bioanalysis. <https://doi.org/10.1002/9781119274315.ch11>

Antilén, M. Camila Valencia, Emilia Peralta, Camila Canales, Christian Espinosa-Bustos, Mauricio Escudey, Enrofloxacin behavior in presence of soil extracted organic matter: An electrochemical approach, *Electrochimica Acta*, Volume 244, 2017, Pages 104-111, ISSN 0013-4686, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.05.104>.

Anyaogu, K. C. (2008). *Stabilized Metal Nanoparticle-Polymer Composites: Preparation, Characterization and Potential Applications* (Doctoral dissertation, Bowling Green State University).

Ayankojo, A. G., Reut, J., Öpik, A., & Syritski, V. (2020). Sulfamethizole-imprinted polymer on screen-printed electrodes: Towards the design of a portable environmental sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 320, 128600.

B. Eggins, (2007). *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons, LTD, Northern Ireland, UK,. <https://doi.org/10.1002/9780470511305>.

Bhardwaj, T. (2015). Review on biosensor technologies. *Int. J. Adv. Res. Eng. Technol*, 6, 36-62.

Blanco-López, M.C.; Lobo-Castañón, M.J.; Miranda-Ordieres, A.J.; Tuñón-Blanco, P. (2004). Electrochemical sensors based on molecularly imprinted

polymers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.*, 23, 36–48.
[https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00102-5](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00102-5)

Bressi, V., Chiarotto, I., Ferlazzo, A., Celesti, C., Michenzi, C., Len, T., ... & Espro, C. (2023). Voltammetric Sensor Based on Waste-Derived Carbon Nanodots for Enhanced Detection of Nitrobenzene. *ChemElectroChem*, e202300004.

Castillo, B., RUIZ, J. O., MANRIQUE, M. A., & Pozo, C. (2020). Contaminación por plaguicidas agrícolas en los campos de cultivos en Cañete. *Revista Espacios*, 41(10).

Cadre, J. E. V., Fontanet, J. G. G., Piña, J. J., & Pérez, M. D. L. Á. A. (2023). Métodos potenciométricos y conductimétricos de bajo costo:: una revisión. *INNOTECH*, (25 ene-jun).

Caratelli, V., Fillo, S., D'Amore, N., Rossetto, O., Pirazzini, M., Moccia, M., ... & Arduini, F. (2021). based electrochemical peptide sensor for on-site detection of botulinum neurotoxin serotype A and C. *Biosensors and Bioelectronics*, 183, 113210.

Cetó, X., Pérez, S., & Prieto-Simón, B. (2022). Fundamentals and application of voltammetric electronic tongues in quantitative analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116765.

Chen, H., Liu, S., Xu, X. R., Diao, Z. H., Sun, K. F., Hao, Q. W., ... & Ying, G. G. (2018). Tissue distribution, bioaccumulation characteristics and health risk of antibiotics in cultured fish from a typical aquaculture area. *Journal of hazardous materials*, 343, 140-148.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.017>

- Chen, J., Tan, L., Qu, K., Cui, Z., & Wang, J. (2022). Novel electrochemical sensor modified with molecularly imprinted polymers for determination of enrofloxacin in marine environment. *Microchimica Acta*, 189(3), 95.
- Chen, L., Wang, X., Lu, W., Wu, X., & Li, J. (2016). Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chemical Society Reviews*, <https://doi.org/10.1039/C6CS00061D>
- Chu, H.; Wei, X.; Wu, M.; Yan, J.; Tu, Y. (2012). An electrochemiluminescent biosensor based on polypyrrole immobilized uricase for ultrasensitive uric acid detection. *Sensor Chemistry.*, 163, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.047>
- Córdova, E. E. U., Guemez, A. D. R. L., Gómez, F. D. C., Torres, A. G. D., López, S. G., Córdova, R. H., ... & Parrilla, I. I. (2020). SÍNTESIS POR SOL-GEL DE RECUBRIMIENTOS HÍBRIDOS DE SIO₂-PMMA DEPOSITADOS POR ASPERSIÓN SOBRE SUSTRATOS METÁLICOS. *Miscelánea Científica en México*, 484.
- Cuarental, A. S., Hurtado, M. C., Pascual, V. C., & López, R. (2022). Límites máximos de residuos y contaminantes en alimentos: bases de datos. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, (36), 237-257.
- D. Moema, M.M. Nindi, S. Dube, (2012). Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, Volume 730, Pages 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.036>.
- D. Tonelli, E. Scavetta, I. Gualandi, (2019). Electrochemical deposition of nanomaterials for electrochemical sensing, *Sensors*. 19 1–28. <https://doi.org/10.3390/s19051186>

- Duan, D., Yang, H., Ding, Y., Ye, D., Li, L., & Ma, G. (2018). Three-dimensional molecularly imprinted electrochemical sensor based on Au NPs@ Ti-based metal-organic frameworks for ultra-trace detection of bovine serum albumin. *Electrochimica Acta* <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.12.146>
- F. Della Pelle, D. Compagnone, (2018). Nanomaterial-based sensing and biosensing of phenolic compounds and related antioxidant capacity in food, *Sensors*. 18 462. <https://doi.org/10.3390/s18020462>
- Fabio Bottari, Ligia Maria Moretto, Paolo Ugo, Impedimetric sensing of the immuno-enzymatic reaction of gliadin with a collagen-modified electrode, *Electrochemistry Communications*, Volume 97, 2018, Pages 51-55, ISSN 1388-2481, <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2018.10.011>
- Figueiredo, E.C.; Dias, A.C.B.; Arruda, M.A.Z. (2008). Impressão molecular: Uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 44, 361–375. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300005>
- Flórez, J. A., Méndez, D. M., Núñez, S. B., Montes, G. E., & Negrete, J. M. (2021). Productos farmacéuticos y de cuidado personal presentes en aguas superficiales, de consumo humano y residuales en el departamento de Córdoba, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 12(2), 179-197.
- G.K. Mishra, A. Barfidokht, F. Tehrani, R.K. Mishra, (2018). Food safety analysis using electrochemical biosensors, *Foods*. 7 1–11. <https://doi.org/10.3390/foods7090141>.

Govindasamy M., Chen S.-M., Mani V., Devasenathipathy R., Umamaheswari R., Santhanaraj K.J., Sathiyam A. Molybdenum disulfide nanosheets coated multiwalled carbon nanotubes composite for highly sensitive determination of chloramphenicol in food samples milk, honey and powdered milk. *J. Colloid Interface Sci.* 2017; 485:129–136. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.09.029>

Guziejewski, D., Smarzewska, S., & Mirceski, V. (2023). Analytical Aspects of Novel Techniques Derived from Square-Wave Voltammetry. *Journal of The Electrochemical Society*, 170(6), 066503.

H. Berg, (2003). Electroanalytical Methods. Guide to Experiments and Applications, Bioelectrochemistry. 59 1–133. [https://doi.org/10.1016/s1567-5394\(03\)00012-4](https://doi.org/10.1016/s1567-5394(03)00012-4).

Helena M.V. Oliveira, Felismina T.C. Moreira, M. Goreti F. Sales, Ciprofloxacin-imprinted polymeric receptors as ionophores for potentiometric transduction, *Electrochimica Acta*, Volume 56, Issue 5, 2011, Pages 2017-2023, ISSN 0013-4686, <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2010.11.082>.

Hernandez, P., Aguilar-Lira, G. Y., Islas, G., & Rodríguez, J. A. (2021). Development of a new voltammetric methodology for the determination of ciprofloxacin in beef samples using a carbon paste electrode modified with Nafion and Fullerenes. *Electroanalysis*, 33(6), 1539-1546. <https://doi.org/10.1002/elan.202060525>

Hugon-Chapuis, F., & Pichon, V. (2007). Polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de composés de milieux biologiques. *Annales De Toxicologie Analytique*, 19, 239-251. <https://doi.org/10.1051/ata:2007028>

- J.X.J Hoshino. Zhang, K., (2019). Electrical transducers: Electrochemical sensors and semiconductor molecular sensors, in: Mol. Sensors Nanodevices, Elsevier: pp. 181– 230. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814862-4.00004-1>.
- J. X., K.H. J. Zhang, (2019). Molecular Sensors and Nanodevices Principles, Designs and Applications in Biomedical Engineering A volume in Micro and Nano Technologies, 2 Edition, Elsevier Science.
- Khosrokhavar, R., Motaharian, A., Hosseini, M. R. M., & Mohammadsadegh, S. (2020). Screen-printed carbon electrode (SPCE) modified by molecularly imprinted polymer (MIP) nanoparticles and graphene nanosheets for determination of sertraline antidepressant drug. *Microchemical Journal*, 159, 105348.
- Krishnaswamy, G., Shivaraja, G., Sreenivasa, S., & DB, A. K. (2022). Voltammetric Applications in Drug Detection: Mini Review. *Voltammetry for Sensing Applications*, 281.
- Kumar, K. K., Devendiran, M., Kumar, P. S., Babu, R. S., & Narayanan, S. S. (2022). Green synthesis of curcumin-silver nanoparticle and its modified electrode assisted amperometric sensor for the determination of paracetamol. *Chemosphere*, 303, 134994.
- L. Zeng, L. Peng, D. Wu, B. Yang, (2019). Electrochemical Sensors for Food Safety, in: Nutr. Heal. Dis. - Our Challenges Now Forthcom. Time, pp. 1–11. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82501>.
- Laschuk, N. O., Easton, E. B., & Zenkina, O. V. (2021). Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials

chemistry. *RSC advances*, 11(45), 27925-27936.
<https://doi.org/10.1039/D1RA03785D>

Lebelo, K., Malebo, N., Mochane, M. J., & Masinde, M. (2021). Chemical contamination pathways and the food safety implications along the various stages of food production: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11), 5795.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18115795>

Lowinsohn, D.; Bertotti, M. (2006). Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Quim. Nova*, 29, 1318–1325.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600029>

Lu, S., Wang, S., Wu, P., Wang, D., Yi, J., Li, L., ... & Pan, H. (2021). A composite prepared from covalent organic framework and gold nanoparticles for the electrochemical determination of enrofloxacin. *Advanced Powder Technology*, 32(6), 2106-2115.

M. Petrovic, D. Barceló. (2003). Analysis and Removal of Emerging Contaminants in Wastewater and Drinking Water. *Trends Analytical Chem.*, 22, 685-696.
[https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01105-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01105-1)

Ma D., Hu Y., Wang J., Ye, S., Li, A. (2006). Effects of antibacterials use in aquaculture on biogeochemical processes in marine sediment. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.10.014>

Madikizela, L. M., Nomngongo, P. N., & Pakade, V. E. (2022). Synthesis of molecularly imprinted polymers for extraction of fluoroquinolones in environmental, food and biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 208, 114447.

- Martins, F. C., Sentanin, M. A., & De Souza, D. (2021). Categories of food additives and analytical techniques for their determination. In *Innovative Food Analysis* (pp. 123-156). Academic Press.
- Martínez-Alcalá, I., Soto, J., & Lahora, A. (2020). Antibióticos como contaminantes emergentes. Riesgo ecotoxicológico y control en aguas residuales y depuradas. *Ecosistemas*, 29(3), 2070-2070.
- Martínez-Carballo, E.; González-Barreiro, C.; Scharf, S.; Gans, O., (2007). Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution*, 148, (2), 570-579. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.11.035>
- Martínez-Valdés, M. G., Mercado-Mancera, G., Rivera-Custodio, E., & Méndez, V. H. V. (2020). Aspectos que influyen en el desarrollo de la seguridad alimentaria en el sector social. *Población y Desarrollo*, 26(51), 51-70.
- Menon, S., Jesny, S., & Kumar, K. G. (2018). A voltammetric sensor for acetaminophen based on electropolymerized-molecularly imprinted poly (o-aminophenol) modified gold electrode. *Talanta*, 179, 668-675. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.074>
- Mir Reza Majidi, Yadollah Omid, Pari Karami, Mohammad Johari-Ahar, Reusable potentiometric screen-printed sensor and label-free aptasensor with pseudo-reference electrode for determination of tryptophan in the presence of tyrosine, *Talanta*, Volume 150, 2016, Pages 425-433, ISSN 0039-9140, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.064>
- Mirceski, V., & Gulaboski, R. (2021). Square-Wave Voltammetry-Principles and Fundamentals.

- Mirceski, D. Guziejewski, L. Stojanov, Rubin Gulaboski, Differential Square-Wave Voltammetry, *Analytical Chemistry* 91 (2019) 14904-14910, <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.9b03035>.
- N. Kemper. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecological Indicators*, Volume 8, Issue 1, Pages 1-13, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>.
- Nato, O. M. F. (2022). Los agrotóxicos y la importancia del análisis de residuos en muestras ambientales y humanas. *Revista de Investigación TALENTOS*, 9(2), 1-19.
- Navarro, A. R. A. (2022). Seguridad alimentaria. In *Anales de la Real Academia de Doctores* (Vol. 7, No. 1, pp. 121-131). Real Academia de Doctores de España.
- N.W. McCready, (1951). Principles of chemical thermodynamics, New York, McGraw-Hill Book Co., [https://doi.org/10.1016/0016-0032\(51\)90556-x](https://doi.org/10.1016/0016-0032(51)90556-x).
- Ostrovidov, S., Ramalingam, M., Bae, H., Orive, G., Fujie, T., Hori, T., ... & Kaji, H. (2023). Molecularly Imprinted Polymer-Based Sensors for the Detection of Skeletal-and Cardiac-Muscle-Related Analytes. *Sensors*, 23(12), 5625.
- O'Sullivan, B., Patella, B., Daly, R., Seymour, I., Robinson, C., Lovera, P., & O'Riordan, A. (2021). A simulation and experimental study of electrochemical pH control at gold interdigitated electrode arrays. *Electrochimica Acta*, 395, 139113. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.139113>

- Pagliarini, V., Neagu, D., Scognamiglio, V., Pascale, S., Scordo, G., Volpe, G., ... & Arduini, F. (2019). Treated gold screen-printed electrode as disposable platform for label-free immunosensing of *Salmonella Typhimurium*. *Electrocatalysis*, *10*, 288-294.
- Pereira, A.C.; Aguiar, M.R.; Kisner, A.; Macedo, D.V.; Kubota, L.T. (2007). Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sens. Actuators B Chem.*, *124*, 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.047>
- Preeyaporn Reanpang, Pijika Mool-am-kha, Jantima Upan, Jaroon Jakmunee, A novel flow injection amperometric sensor based on carbon black and graphene oxide modified screen-printed carbon electrode for highly sensitive determination of uric acid, *Talanta*, Volume 232, 2021, 122493, ISSN 0039-9140, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122493>
- Qian, T.; Yu, C.; Zhou, X.; Ma, P.; Wu, S.; Xu, L.; Shen, J. (2014). Ultrasensitive dopamine sensor based on novel molecularly imprinted polypyrrole coated carbon nanotubes. *Biosens. Bioelectron.*, *58*, 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.081>
- Que X., Chen X., Fu L., Lai W., Zhuang J., Chen G., Tang D. Platinum-catalyzed hydrogen evolution reaction for sensitive electrochemical immunoassay of tetracycline residues. *J. Electroanal. Chem.* 2013; *704*:111–117. <https://doi: 10.1016/j.jelechem.2013.06.023>
- Qu*, G., Wu*, A., Shi, X., Niu, Z., Xie, W., & Zhang, D. (2008). Improvement on analyte extraction by molecularly imprinted polymer microspheres toward enrofloxacin. *Analytical letters*, *41*(8), 1443-1458.

- Urbina, J. A. J., & Solano, J. A. V. (2020). Los contaminantes emergentes de las aguas residuales de la industria farmacéutica y su tratamiento por medio de la ozonización. *Informador técnico*, 84(2), 249-263.
- Uygun, Z. O., & Uygun, H. D. E. (2014). A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 448-453.
- Salas, R. G., del Río, M. M. V., & Concepción, I. P. (2021). Uso intensivo de antibióticos profilácticos en la acuicultura: Un problema creciente para la salud humana y animal. *Universidad y Sociedad*, 13(S2), 204-210.
- Saha, C., Bhushan, M., & Singh, L. R. (2023). Pesticide sensing using electrochemical techniques: a comprehensive review. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 20(2), 243-256.
- Seguro, I.; Rebelo, P.; Pacheco, J.G.; Delerue-Matos, C. Electropolymerized, Molecularly Imprinted Polymer on a Screen-Printed Electrode—A Simple, Fast, and Disposable Voltammetric Sensor for Trazodone. *Sensors* **2022**, 22, 2819. <https://doi.org/10.3390/s22072819>
- Selvolini, G., & Marrazza, G. (2023). Sensor principles and basic designs. In *Fundamentals of Sensor Technology* (pp. 17-43). Woodhead Publishing.
- Sergeyeva T, Yarynka D, Piletska E, Linnik R, Zaporozhets O, Brovko O, et al. (2019). Talanta Development of a smartphone-based biomimetic sensor for aflatoxin B1 detection using molecularly imprinted polymer membranes. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.016>
- Sharifi, K., & Pirsá, S. (2020). Electrochemical sensors; Types and applications in the food industry. *Chemical Review and Letters*, 3(4), 192-201.

- Sharma, N. K., Nain, A., Singh, K., Rani, N., & Singal, A. (2019). Impedimetric sensors: principles, applications and recent trends. *Int. J. Innov. Technol. Explor. Eng*, 8(10), 4015-4025.
- Shen, Y., Jia, F., Liang, A., He, Y., Peng, Y., Dai, H., & Li, Y. (2022). Monovalent Antigen- Induced Aggregation (MAA) Biosensors Using Immunomagnetic Beads in Both Sample Separation and Signal Generation for Label-Free Detection of Enrofloxacin. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(7), 8816-8823. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c23398>
- Siyu Lu, Shanlin Wang, Pian Wu, Danqi Wang, Jiecan Yi, Lei Li, Ping Ding, Hongzhi Pan, A composite prepared from covalent organic framework and gold nanoparticles for the electrochemical determination of enrofloxacin, *Advanced Powder Technology*, Volume 32, Issue 6, 2021, Pages 2106-2115, ISSN 0921-8831, <https://doi.org/10.1016/j.appt.2021.04.025>.
- Spinola Machado, S. A., & Cincotto, F. H. (2022). Electrochemical Methods Applied for Bioanalysis: Differential Pulse Voltammetry and Square Wave Voltammetry. *Tools and Trends in Bioanalytical Chemistry*, 273-282.
- Somoza Chuay, J. A., Pavoni Oliver, S., Eirez Izquierdo, J. E., & Bistel Esquivel, R. A. (2019). Análisis de respuestas potenciométricas de electrodos de Vidrio/ITO y Vidrio/ITO/PANI-LS en la medición de pH. *Ingeniería Electrónica, Automática y Comunicaciones*, 40(2), 1-9.
- Stoilova, N. A.; Surleva, A. R.; Stoev, G., Simultaneous Determination of Nine Quinolones in Food by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Food Analytical Methods* 2013, 6, (3), 803-813. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9488-1>

- Sullivan MV, Dennison SR, Archontis G, Reddy SM, Hayes JM. (2019). Toward Rational Design of Selective Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) for Proteins: Computational and Experimental Studies of Acrylamide Based Polymers for Myoglobin. *J Phys Chem B*. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b03091>
- Tarley, C.R.T.; Sotomayor, M.D.P.T.; Kubota, L.T. (2005). Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação. *Quim. Nova*, 28, 1076–1086. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600024>
- Trouchon, T., & Lefebvre, S. (2016). A review of enrofloxacin for veterinary use. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6(2), 40-58. <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>
- V.S. Manikandan, B.R. Adhikari, A. Chen, (2018). Nanomaterial based electrochemical sensors for the safety and quality control of food and beverages, *Analyst*. 143 4537–4554. <https://doi.org/10.1039/c8an00497h>.
- Wang, X., Zhou, Y., Niu, Y., Zhao, S., & Gong, B. (2019). Preparation of monodisperse enrofloxacin molecularly imprinted polymer microspheres and their recognition characteristics. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2019.
- Xu, Q., Pan, Y., Li, W., & Yang, Z. (2023). Amperometric sensors. In *Fundamentals of Sensor Technology* (pp. 123-145). Woodhead Publishing.
- Xu, R., Qian, X., Zhang, Z., Yuan, F., Song, Y., Liu, J., ... & Wei, J. (2022). A molecularly Imprinted Electrochemical Sensor Based on NMWCNT/CPE for Highly Sensitive and Selective Detection of Bisphenol A. *Int. J. Electrochem. Sci*, 17(220536), 2.

- Yan, W., Zhang, J., & Jing, C. (2013). Adsorption of Enrofloxacin on montmorillonite: Two-dimensional correlation ATR/FTIR spectroscopy study. *Journal of Colloid and interface Science*, 390(1), 196-203.
- Yan, C., Zhang, R., Chen, Y., & Wang, G. (2017). Electrochemical determination of enrofloxacin based on molecularly imprinted polymer via one-step electro-copolymerization of pyrrole and o-phenylenediamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 806, 130-135.
- Yin, Y., Zeng, H., Zhang, S., Gao, N., Liu, R., Cheng, S., & Zhang, M. (2023). Hydrogel-coated microelectrode resists protein passivation of in vivo amperometric sensors. *Analytical Chemistry*, 95(6), 3390-3397.
- Yılmaz, G. E., Saylan, Y., Göktürk, I., Yılmaz, F., & Denizli, A. (2022). Selective Amplification of Plasmonic Sensor Signal for Cortisol Detection Using Gold Nanoparticles. *Biosensors*, 12(7), 482.
- Yola, M. L., & Atar, N. (2019). Development of molecular imprinted sensor including graphitic carbon nitride/N-doped carbon dots composite for novel recognition of epinephrine. *Composites Part B: Engineering*, 175, 107113.
- Zhao, L.; Huan Dong, Y.; Wang, H., (2010). Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinves of China. *Science of The Total Environment*, 408, (5), 1069-1075.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.014>
- Zhang B, Fan X, Zhao D. (2019). Computer-Aided Design of Molecularly Imprinted Polymers for Simultaneous Detection of Clenbuterol..
<https://doi.org/10.3390/polym11010017>

- Zhang, X.; Peng, Y.; Bai, J.; Ning, B.; Sun, S.; Hong, X.; Liu, Y.; Liu, Y.; Gao, Z. (2014). A novel electrochemical sensor based on electropolymerized molecularly imprinted polymer and gold nanomaterials amplification for estradiol detection. *Sens. Actuators B Chem.*, 200, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.028>
- Zhang, C., Zhao, F., She, Y., Hong, S., Cao, X., Zheng, L., ... & Wang, J. (2019). A disposable molecularly imprinted sensor based on Graphe@ AuNPs modified screen-printed electrode for highly selective and sensitive detection of cyhexatin in pear samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 284, 13-22.
- Zhu, C., Zhang, J., Zhang, S., Liu, C., Liu, X., Jin, J., & Zheng, D. (2023). An Amperometric Biomedical Sensor for the Determination of Homocysteine Using Gold Nanoparticles and Acetylene Black-Dihexadecyl Phosphate-Modified Glassy Carbon Electrode. *Micromachines*, 14(1), 198.
- Zouaoui, F., Bourouina-Bacha, S., Bourouina, M., Abroa-Nemeir, I., Halima, H. B., Gallardo-Gonzalez, J., ... & Errachid, A. (2020). Electrochemical impedance spectroscopy determination of glyphosate using a molecularly imprinted chitosan. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 309, 127753.

ANEXOS

Estancias Académicas

- Departamento de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Facultad de Ingeniería y Ciencias – Pontificia Universidad Javeriana Cali, Colombia – Julio 2021.
- Doctorado en Ciencia y Nanotecnología – Universidad Nacional de San Martín, Argentina – Octubre 2021.

Conferencias Internacionales

- Desarrollo de un sensor electroquímico conjugado con polímeros impresos molecularmente para la detección de enrofloxacino – I congreso Internacional de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias Biológicas y de la Salud CIBYS – 14 de Octubre del 2022 – en Universidad de Sonora, México.
- Sensor design based on silica nanoparticles conjugated to molecularly imprinted polymer for enrofloxacin detection – XXX International Materials Research Congress and International Conference on Advanced Materials – 14-19 de Agosto del 2022 en Cancun México.

Cursos y Talleres

- Curso Híbrido: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC): Concepto básicos, técnicas acopladas, extracción, identificación y cuantificación de compuestos bioactivos (55 horas) – 30 de abril del 2022 en Universidad de Sonora, México.
- Taller de Seguridad y Buenas Prácticas en el Laboratorio de Docencia y de Investigación (60 horas) – Academia de Bioespectroscopías Médicas – 06 de Enero del 2022 en Universidad de Sonora, México.
- Sensores y Dispositivos (40 horas) – Escuela de Nanociencia y Nanotecnología ENN 2021 – 29 de Octubre 2021 - Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires, Argentina.
- Curso Básico para el Manejo Integral de Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos en Laboratorios Académicos y de Investigación (40 horas) – 07 de Diciembre del 2020 en Universidad de Sonora, México.

Entrevista TV

- Desarrollo de Sensores electroquímicos para la detección de contaminantes emergentes - Programa televisado por TELEMAX (GilaHikers) – Julio del 2022.

Publicaciones

- Development of an Electrochemical Sensor Conjugated with Molecularly Imprinted Polymers for the Detection of Enrofloxacin. *Chemosensors* **2022**, *10*, 448.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors10110448>

Development of an Electrochemical Sensor Conjugated with Molecularly Imprinted Polymers for the Detection of Enrofloxacin

Amed Gallegos-Tabanico ¹, Jorge Jiménez-Canale ¹, Sergio G. Hernandez-Leon ², Alexel Jesús Burgara-Estrella ³, Carmelo Encinas-Encinas ¹ and José Andre-i Sarabia-Sainz ^{3,*}

¹ Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas y Rosales s/n, Colonia Centro, C.P. 83000. Hermosillo, Sonora, México.; amed.gallegos@unison.mx

² Coordinación de Ciencia de los Alimentos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.; sergerhdez@gmail.com

³ Departamento de Investigación en Física, Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas y Rosales s/n, Colonia Centro, C.P. 83000. Hermosillo, Sonora, México. ; jose.sarabia@unison.mx

* Correspondence: jose.sarabia@unison.mx

Abstract: An electrochemical sensor was fabricated for the rapid and simple detection of enrofloxacin (EF). Modification of screen-printed gold electrodes (SPE) with molecularly imprinted polymers (MIPs) allowed the detection of enrofloxacin by square wave voltammetry (SWV) measuring the oxidation peak at +0.9V. The detection principle of molecularly imprinted polymers (MIPs) is based on the formation of binding sites with affinities and specificities comparable to those of natural antibodies. The detection of enrofloxacin was in a linear range of 10-100 $\mu\text{M L}^{-1}$ with a detection limit LOD of 2 $\mu\text{M L}^{-1}$. The development of a non-imprinted polymer (NIP) control sensor allowed for a better and more efficient detection. In addition, the sensor is portable, thus has the advantage of analyzing and detecting molecules of interest without the need to take the sample to a laboratory.

Keywords: Electrochemical; Sensor; Molecularly imprinted polymers; Enrofloxacin; SPE

Citation: Gallegos-Tabanico, A.; Jiménez-Canale, J.; Hernández-Leon, S.G.; Burgara-Estrella, A.J.; Encinas-Encinas, C.; Sarabia-Sainz, J.A.

Development of an Electrochemical Sensor Conjugated to Molecular Imprinting Polymers for the Detection of Enrofloxacin.

Chemosensors **2022**, *10*, x.

<https://doi.org/10.3390/xxxxAcade>

mic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors.

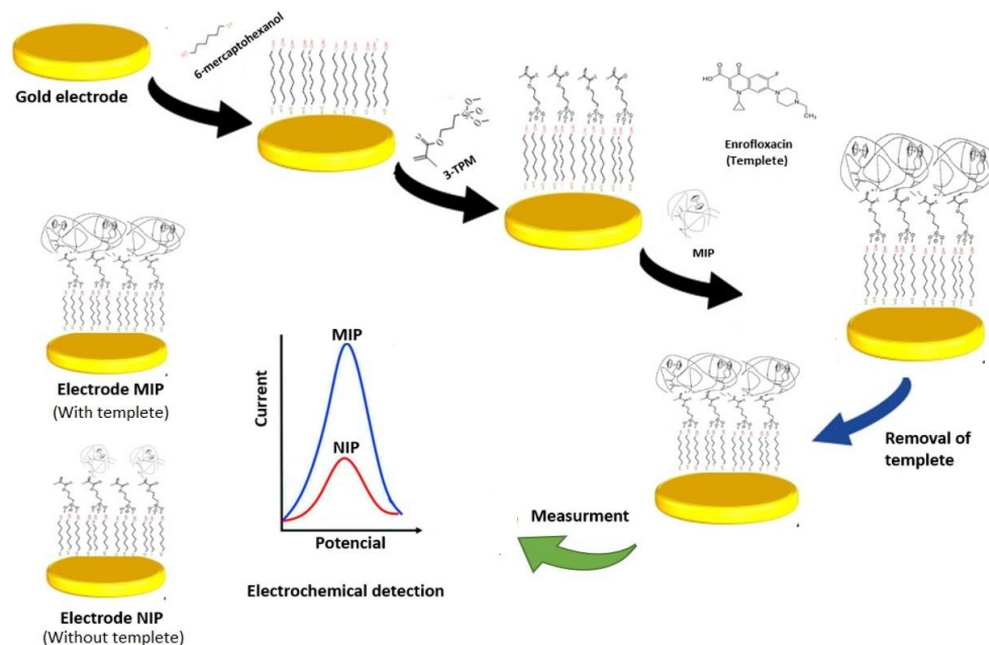
Submitted for possible open access

publication under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Scheme 1. Graphical representation of an electrochemical sensor.

1. Introduction

The development of new devices and analytical techniques with high selectivity and precision are of great importance in different areas, for example environmental, food, pharmaceutical, among others, to determine organic compounds [1]. Specifically, electrochemical techniques have gained interest due their advantages such as: low cost, fast response and portability compared with conventional methods [2, 3]. Electrochemical sensors have analytical applications such chemosensor which converts the physical, chemical and/or biological signals into a quantifiable electrochemical signal. Voltammetry, amperometry conductivity, and capacitance or impedance properties can be used to determine an analyte [3]. Actually, to improvements sensitivity and selectivity, in substances detection processes, the modifications of electrodes with molecularly imprinted polymers (MIP's) are investigated [4, 5]. The use of MIPs has become a very important tool for the detection of chemical substances and biological compounds for environmental and food monitoring. In addition, MIPs have been used as new molecular recognition materials for applications in the detection and removal of chemical and biological contaminants [6, 7].

Molecular imprinting is a tool that relies on the principles of molecular recognition of biological processes to generate artificial macromolecular receptors [8, 9] in which a target molecule acts as a template. Functional monomers interact around it, and subsequently, the monomers cross-link them to copolymerize and form a shell-like structure [9]. After polymerization and removal of the template, the binding sites are exposed in such a way that they are complementary

to the template in size, shape, and position for their functional groups which are held in place in the newly formed cross-linked structure [10].

The modification of electrodes with MIPs could be an alternative with many advantages, including recognition properties, low cost and the possibility of a comfortable and simple design. For these reasons, electrochemical sensors have drawn much attention for the detection of organic compounds, such as emerging contaminants [11, 12].

Enrofloxacin, a member of the fluoroquinolone family, is an antimicrobial approved by the Food and Drug Administration (FDA) for exclusive use in veterinary medicine and has demonstrated its efficacy in the treatment of bacterial diseases derived from aquaculture farms [13]. The advantage of enrofloxacin relies on its wide spectrum of antibacterial activity, for example, strong bactericidal power, fast action and wide distribution in the body [14]. One of the main problems generated by the mishandling of antibiotics precisely for enrofloxacin in aquaculture uses, is their association with environmental issues and health problems. Specifically, the accumulation of enrofloxacin residues in shrimp tissues derived from improper practices have caused potential problems to human health [15, 16]. Therefore, it is important to evaluate the presence of antibiotic residues in food. The agrifood sector has been carefully monitored to verify compliance with the maximum limits for toxic residues and contaminants in food products [17].

In this work, we describe the development of an electrochemical sensor based on the use of screen-printed gold electrodes (SPE) modified with molecularly imprinted polymers for the detection of enrofloxacin by electrochemical techniques.

2. Materials and Methods

2.1. Materials and reagents

Acetonitrile (ACN), 6-mercaptohexanol, potassium hexacyanoferrate (III) $K_3 [Fe(CN)_6]$, sulfuric acid, 3-trimethosixylpropyl methacrylate (3-TPM), enrofloxacin (EF), methacrylic acid (MAA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), ferrocenylmethyl methacrylate and ammonium persulfate (APS) were used. All of the reagents were of analytical grade. Additionally, screen-printed gold electrodes and a sensit smart potentiostat equipment were used for all electrochemical studies.

2.2. Electrode Preparation

Screen-printed gold electrodes were subjected to a washing and activation process using a Sensit Smart potentiostat. The process was carried out for 80 cycles in a cyclic voltammetry (CV) with a potential window from -0.7 to 1.2 V and a scanning rate of 50 mV placing a drop of a 0.1 M H_2SO_4 solution and subsequently washing with H_2O every 20 cycles.

2.3. Chemical modification of the screen-printed electrode

After washing and activating the gold electrode, it was chemically modified by adding 10 μL of the 6-mercaptohexanol monomer to the working electrode and it was dried at room temperature for 24 hours and then washed with abundant water to remove monomer excess. A second modification was performed by adding 15 μL of 3-TPM, to the electrode surface and allowed to dry at room temperature for 24 hrs. Finally, a wash with abundant water was carried out to eliminate the excess or residues of unreacted monomer and it was stored for the following modifications.

2.4. Synthesis of molecularly imprinted polymers

The synthesis of MIPs was carried out on the surface of the electrode previously modified with the 3-TPM monomer. In a round bottom flask, 100 mL of acetonitrile containing 52.1 mg of enrofloxacin as template, 100 μL of methacrylic acid as functional monomer and 1.09 mL of ethylene glycol dimethacrylate as crosslinking monomer were added. The solution was subjected to an ultrasonic bath for 30 min. Then 20 mg of ferrocenylmethyl methacrylate were added, and the solution was kept under constant stirring in a nitrogen environment to purge the oxygen present in the solution. Subsequently, the gold electrode was suspended in the solution and 11.5 mg of ammonium persulfate were added to initiate polymerization on the electrode, and it was left in a nitrogen environment for 24 hours at room temperature.

Once MIPs were polymerized on the surface of the electrode, they were washed with methanol and acetic acid in a 9:1 ratio and kept under vigorous magnetic stirring overnight to remove the template from the MIPs. Finally, additional washes were carried out with 80% methanol. Additionally, the synthesis of a NIP control sample was performed under the same conditions without the enrofloxacin template.

2.5. Sample preparation

A stock sample of enrofloxacin was prepared at 0.01 M, 36.70 mg were weighed and dissolved in 10 mL of H_2SO_4 0.1 M. To evaluate the optimal working pH, samples of 3 mM enrofloxacin at pH 3 to pH 6 were analyzed. 15 μL of solution were placed on the bare gold electrode and was analyzed using the square wave voltammetry (SWV) technique.

2.6. Morphological characterization

A morphological characterization of the screen-printed electrodes was carried out to observe the modification on the surface of the electrodes with MIPs. This characterization was carried out by atomic force spectroscopy (AFM) using the AFM model Alpha300RA (WiTec, Germany)

2.7. Electrochemical characterization

As part of the characterization of the modified gold electrode, a study was carried out using cyclic voltammetry and impedance spectroscopy (EIS) techniques to study the degree of modification of the electrode surface. Additionally, a study was carried out using atomic force microscopy (AFM) to analyze the modification in the electrode. The CV study was performed using a 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in 0.1 M H_2SO_4 solution, where a 15 μ L drop from the solution was placed on the working electrode and a CV scan was then performed with a potential window from -0.7 to 0.7 V and a scan rate of 50 mV. For the EIS study, a drop of $K_3 [Fe(CN)_6]$ solution was placed and analyzed using a frequency of 20 kHz. Additionally, a control sample of 0.5 mM enrofloxacin was taken and a 15 μ L drop of the solution was placed on the electrode modified with MIPs and another drop on the control electrode with NIPs, the analysis was carried out using the SWV technique with a potential window from 0 - 1.1 V applying a scan rate of 0.08 v/s to observe a current signal corresponding to the drug concentration.

2.8. Determination of the enrofloxacin

For the determination of enrofloxacin using gold electrodes modified with MIPs, a study using the square wave voltammetry (SWV) technique was carried out. Enrofloxacin samples were prepared at different concentrations from 10 to 100 μ M using pH 3 acetate buffer. A 15 μ L drop of the solutions was taken and placed on the MIPs-electrode, the analysis was carried out using the SWV technique using a potential window from 0 - 1.1 V and applying a scan rate of 0.08 v/s to observe a current signal corresponding to the drug concentration.

3. Results and Discussion

3.1. Morphological characterization

The modification on the surface of the electrodes was observed by atomic force microscopy as indicated in Figure 1. The bare electrode in Figure 1(a), is our reference electrode without chemical modifications, the surface of material is observed as smooth fields with small protuberances typical of the electrode. In Figure 1(b and c) the images clearly show that the polymers were coated on the bare electrode. Figure 1(b) is our control NIP sample and it was not molecularly imprinted due to the absence of the template and minimal changes occurred, however, even so it is possible to observe a disorganized morphology. Figure 1(c) shows the Au electrode modified with the MIP, it shows great adherence on the surface of the electrode, forming clusters with ordered arrangement of hemispherical structures of approximate size of 1 micrometer corresponding to the molecularly imprinted polymer.

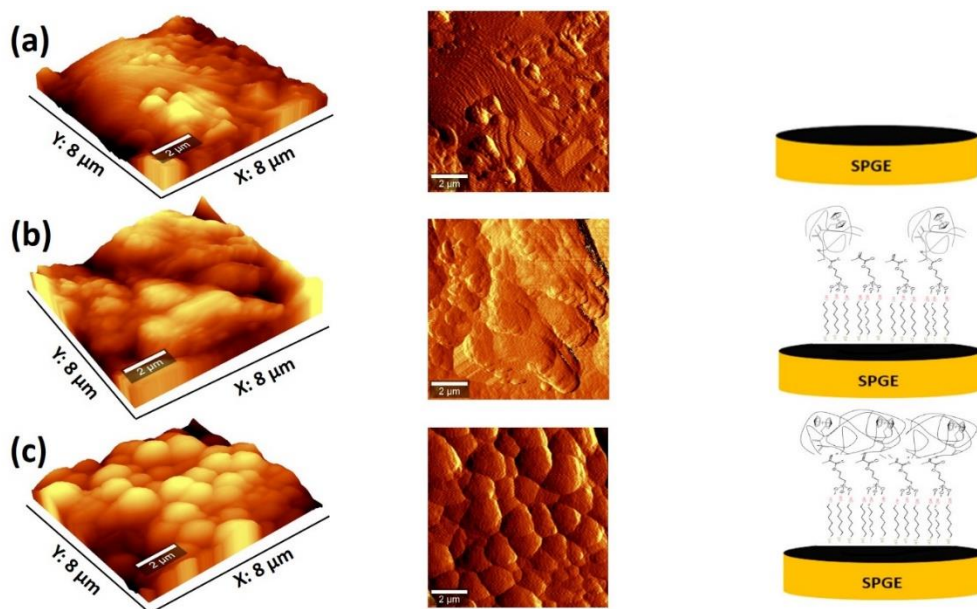


Figure 1. Atomic force microscopy. Bare electrode (a), NIP-modified electrode (b), MIP-modified electrode (c).

3.2. Electrochemical characterization

Electrochemical studies, based on the oxidation of organic substances, are promising techniques for analytical purposes. Here, studies were first carried out to determine the electrochemical oxidation behavior of gold electrodes on each step of modification with the polymers. This electrochemical study was performed by cyclic voltammetry with a potential window from -0.7 to 0.7 V and a scan rate of 50 mV. Figure 2 shows results obtained from CV analysis of the electrodes, where the oxidation and reduction peaks for $K_3[Fe(CN)_6]$ can be observed. As expected, with the modification of the electrodes the cyclic voltammograms also changed, a shift of the oxide-reduction peaks is shown, as well as a decrease in the intensity of the current peaks as the modification of the electrode is achieved. From here, we can deduce that the degree of modification is related to the corresponding change in the $K_3[Fe(CN)_6]$ signal as also shown by O'Sullivan et al. 2021 and Menon et al. 2018 [18, 19].

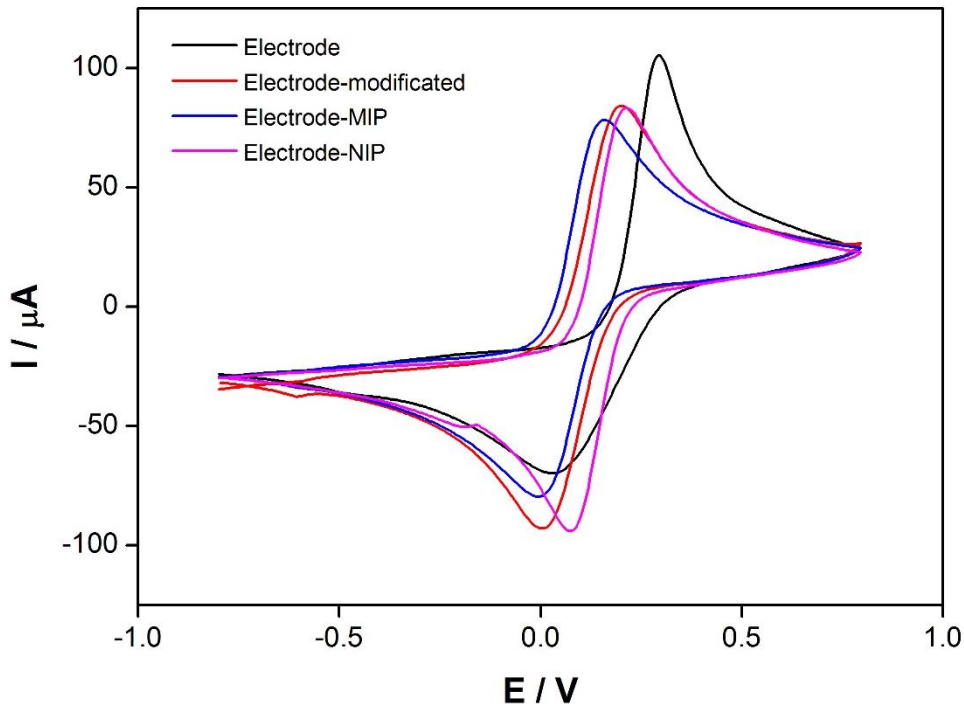


Figure 2. Characterization by CV of screen-printed gold electrodes in solution of 2 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in H_2SO_4 . Bare gold electrode (black), 6-mercaptohexanol-modified gold electrode (red), NIP-electrode (pink), and MIP-electrode (blue).

We noticed that the oxidation and reduction peaks of K3 of the modified and non-modified electrodes were not significantly different, therefore, to complement the analysis of the modified electrodes, an electrochemical impedance spectroscopy study was performed. Modified electrode spectra showed a characteristic Nyquist semicircle indicating an increase in resistance. Figure 3 shows the first chemical modification of the electrodes with 6-mercaptohexanol and shows a small Nyquist semicircle which refers to a lower resistance for electron flow compared to the unmodified electrode as presented by Laschuk et al. 2021 [21] in their research. Likewise, we would expect similar behaviors for MIP and NIP since chemically there would be no difference. However, in our experimental conditions, a considerable difference in charge transfer was observed in the MIP and NIP electrodes, which can be attributed to a difference in the distribution of the polymer network on the electrode due to the cavities formed by molecular imprinting of enrofloxacin. These results confirm the successful modification of the electrode.

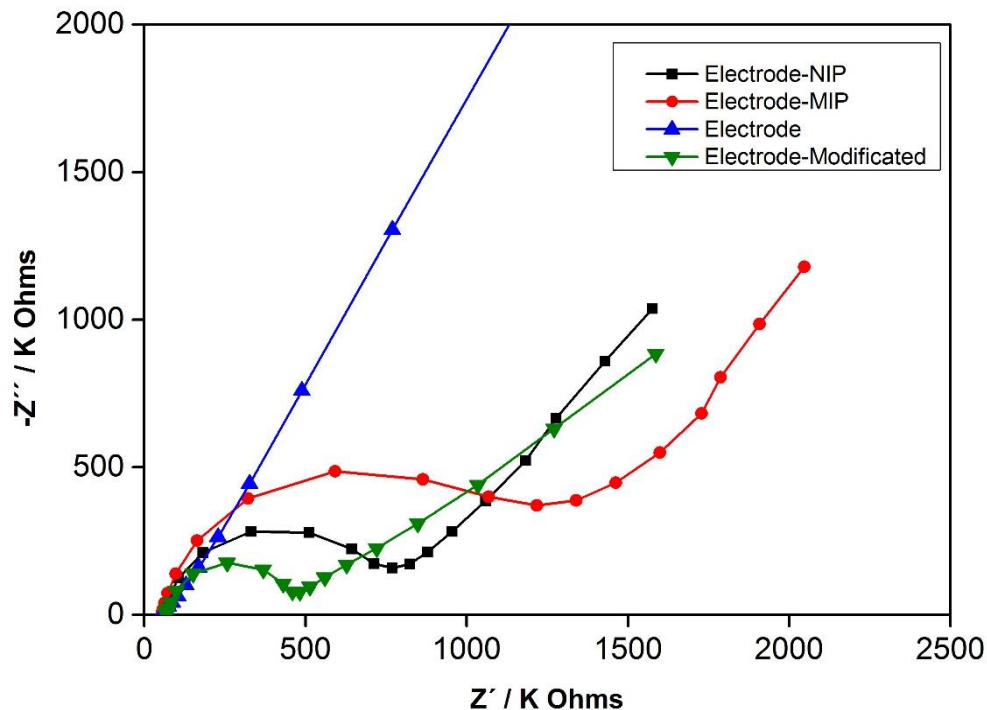


Figure 3. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) to screen-printed electrodes. Bare Gold Electrode (Blue), MIP-Electrode (Red), NIP-electrode (Black) and electrode chemically modified with monomer (green).

3.3. Influence of pH and supporting electrolyte

After electrochemical characterization of modified electrodes, square-wave voltammetry was used as the electroanalytical technique for the enrofloxacin determination. The analysis was done to evaluate the influence of pH to obtain the best enrofloxacin peak with sufficient current response for further quantitative analysis. The buffers used were in the pH range from 3 to 6. Figure 4 shows that as the pH value of the solution increases, the oxidation peak corresponding to the EF decreases the maximum current intensity peak and a shift in the window potential occurs for each pH of the solution. These results correspond to reported by Hernandez et al. 2021 [20]. The characteristic peak of oxidation of enrofloxacin appears at 0.9 V, corresponding to the peak shown in the solution with pH 3. Based on these results, we decided that the optimal conditions to work all further experiments were at pH 3. The following study consisted of obtaining a calibration curve of current response versus EF concentrations. Figure 5 shows a linearity current peak proportional to EF concentrations with the coefficient of determination (R^2) of 0.9947. This study is important to understand the nature of the chemical and physical processes involved in the electroanalytical procedure.

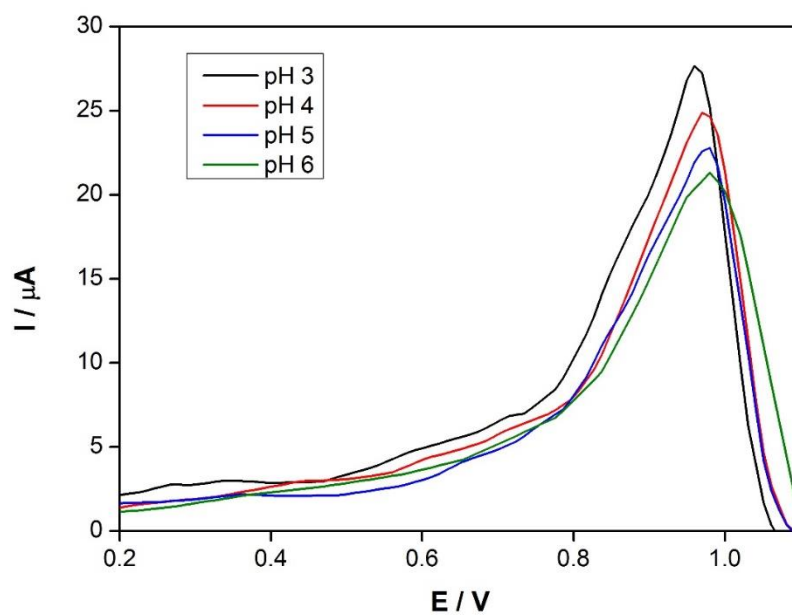


Figure 4. Square wave voltammetry (SWV). Enrofloxacin samples prepared at 3 mM concentration in different pH Buffer solutions.

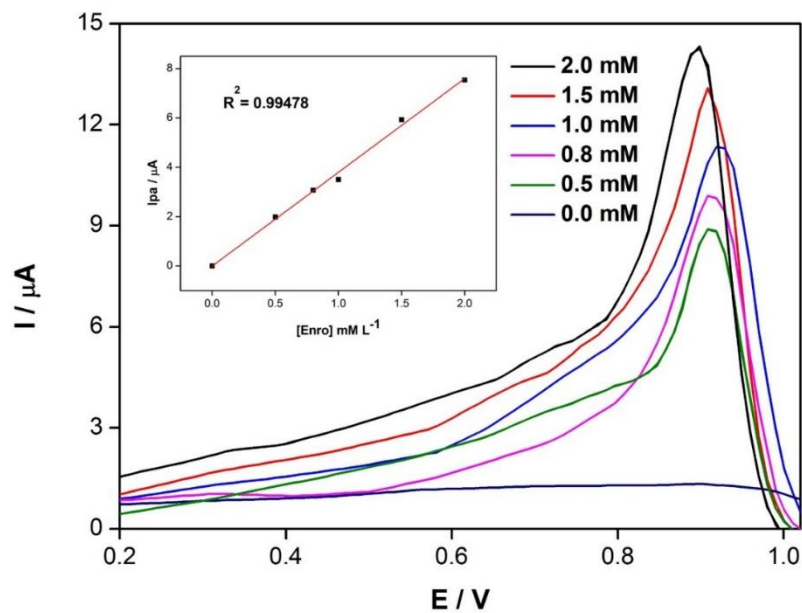


Figure 5. Square wave voltammetry (SWV). Enrofloxacin samples prepared at pH 3 in different concentration.

3.4. SWV response of electrodes to enrofloxacin detection

In order to compare the electrochemical response of the modified electrode with the molecularly imprinted enrofloxacin, SWV analysis was performed for the MIP, NIP, and bare electrodes in the presence of enrofloxacin. Figure 6 shows the well-defined oxidation peak of enrofloxacin at the window potential of 0.9 v for the electrode modified with MIP, it was also observed in the current peak shown in Figure 5 at a concentration of 1 mM; likewise a small oxidation peak is observed for the NIP control electrode, which is attributed to non-specific interactions or small unmodified areas in the electrode, it is also observed for the bare electrode that also presents a small signal corresponding to the oxidation of enrofloxacin at pH 3 as shown in Figure 4. However, when compared to the corresponding signal from the MIP-electrode, the current peak is much higher due to the modification of the electrodes with the MIPs, concentrating in a greater proportion the analyte sample in the cavities of the MIP polymer as also reported by Seguro et al. 2022 [22]. Therefore, this system may be used for the detection of enrofloxacin.

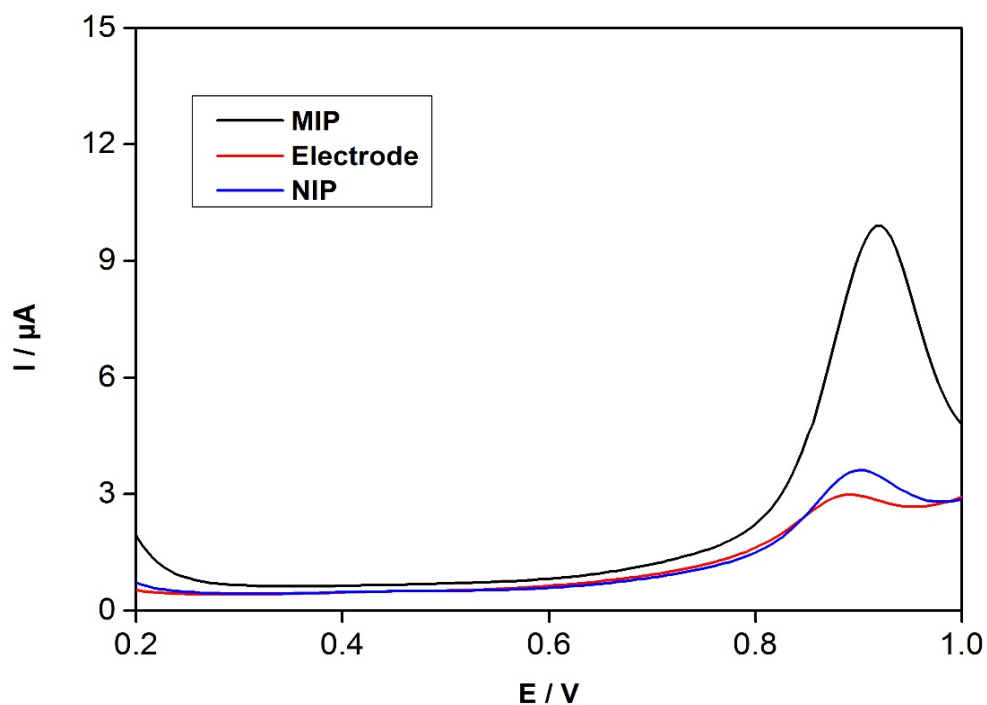


Figure 6. Square wave voltammetry (SWV) to modified gold electrodes in the presence of a sample of enrofloxacin at 1 mM in a pH 3 buffer solution.

3.5. Detection of enrofloxacin

Finally, as part of the results obtained for the determination of enrofloxacin, in Figure 7 the analysis by SWV using electrode-MIP and different concentrations of enrofloxacin prepared in buffer pH 3

is shown. The study was carried out at different concentrations of enrofloxacin, detecting a linear range of concentrations from 10 to 100 μM with a detection limit (LOD) of 2 $\mu\text{M L}^{-1}$, these concentrations of enrofloxacin are below the levels allowed of 100 to 300 μM by regulatory commissions, in this sense the development of biosensors from molecular imprinted polymers for the detection of enrofloxacin presents great characteristics comparable to the detection of conventional equipment such as HPLC or ELISA. The main advantages of this detection system are its low cost and the ability to detect and quantify analytes without having to take samples to a laboratory (portability).

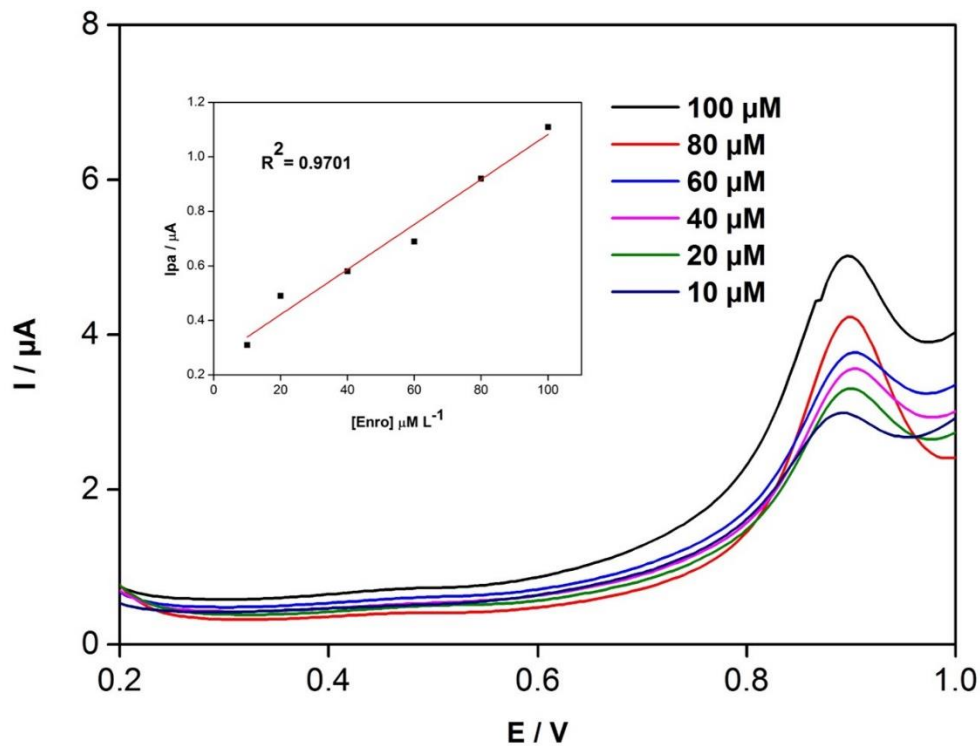


Figure 7. Square wave voltammetry (SWV) to electrode-MIP in the presence of enrofloxacin at different concentrations in buffer solution pH 3.

5. Conclusions

In summary, a new electrochemical sensor was developed from the modification of screen-printed electrodes with molecularly imprinted polymers for the detection of enrofloxacin. This easy and practical sensor can detect concentration levels of enrofloxacin compared to conventional methods such as HPLC. Additionally, since it is portable, it also has the advantage of being able to detect analytes in the field in around ~5 minutes, without the need to take the sample to a laboratory. Finally, these modified screen-printed electrodes are reusable, making them highly interesting while considering their expense, specially when comparing it to more conventional methods as mentioned before.

Author Contributions: “Conceptualization, A.G.T. and A.S.S.; methodology, A.G.T.; software, A.G.T. and A.B.E.; formal analysis, A.G.T. and A.B.E.; investigation, A.G.T. and A.S.S.; resources, J.J.C. and S.H.L.; writing—original draft preparation, A.G.T. and J.J.C; supervision, A.S.S. and C.E.E.; project administration, A.S.S. and C.E.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available from the authors under reasonable request

Acknowledgments: We are grateful to the CONACYT for financial support, under projects INFR-2016-01-268666 and INFR-2018-01-293642

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Tarley, C.R.T.; Sotomayor, M.D.P.T.; Kubota, L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 2: aplicações de MP (“Molecularly Imprinted Polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos. *Quim. Nova* 2005, 28, 1087–1101. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600025>
2. Abera, B.D.; Ortiz-gómez, I.; Shkodra, B.; Romero, F.J.; Cantarella, G.; Petti, L.; Salinas-castillo, A.; Lugli, P.; Rivadeneyra, A. Laser-induced Graphene Electrodes Modified with a Molecularly Imprinted Polymer for Detection of Tetracycline in Milk and Meat. *Sensors* 2022, 22, 269. <https://doi.org/10.3390/s22010269>
3. Lowinsohn, D.; Bertotti, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Quim. Nova* 2006, 29, 1318–1325. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600029>
4. Chu, H.; Wei, X.; Wu, M.; Yan, J.; Tu, Y. An electrochemiluminescent biosensor based on polypyrrole immobilized uricase for ultrasensitive uric acid detection. *Sens. Actuators B Chem.* 2012, 163, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.047>
5. Pereira, A.C.; Aguiar, M.R.; Kisner, A.; Macedo, D.V.; Kubota, L.T. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sens. Actuators B Chem.* 2007, 124, 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.047>
6. Qian, T.; Yu, C.; Zhou, X.; Ma, P.; Wu, S.; Xu, L.; Shen, J. Ultrasensitive dopamine sensor based on novel molecularly imprinted polypyrrole coated carbon nanotubes. *Biosens. Bioelectron.* 2014, 58, 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.081>
7. Zhang, X.; Peng, Y.; Bai, J.; Ning, B.; Sun, S.; Hong, X.; Liu, Y.; Liu, Y.; Gao, Z. A novel electrochemical sensor based on electropolymerized molecularly imprinted polymer and gold nanomaterials amplification for estradiol detection. *Sens. Actuators B Chem.* 2014, 200, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.028>
8. Blanco-López, M.C.; Lobo-Castañón, M.J.; Miranda-Ordieres, A.J.; Tuñón-Blanco, P. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2004, 23, 36–48. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00102-5](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00102-5)
9. Tarley, C.R.T.; Sotomayor, M.D.P.T.; Kubota, L.T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. *Quim. Nova* 2005, 28, 1076–1086. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600024>

10. Figueiredo, E.C.; Dias, A.C.B.; Arruda, M.A.Z. Impressão molecular: Uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2008, 44, 361–375. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000300005>
11. Aaryashree; Takeda, Y.; Kanai, M.; Hatano, A.; Yoshimi, Y.; Kida, M. A “Single-Use” Ceramic-Based Electrochemical Sensor Chip Using Molecularly Imprinted Carbon Paste Electrode. *Sensors* 2020, 20, 5847. <https://doi.org/10.3390/s20205847>
12. Liu, R.; Poma, A.; Sacchetti, A. Advances in Molecularly Imprinted Polymers as Drug Delivery Systems. *Molecules* 2021, 26, 3589. <https://doi.org/10.3390/molecules26123589>
13. Shen, Y., Jia, F., Liang, A., He, Y., Peng, Y., Dai, H., & Li, Y. (2022). Monovalent Antigen- Induced Aggregation (MAA) Biosensors Using Immunomagnetic Beads in Both Sample Separation and Signal Generation for Label-Free Detection of Enrofloxacin. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(7), 8816–8823. <https://doi.org/10.1021/acsmi.1c23398>
14. Trouchon, T., & Lefebvre, S. (2016). A review of enrofloxacin for veterinary use. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6(2), 40–58. <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006>
15. Chen, H., Liu, S., Xu, X. R., Diao, Z. H., Sun, K. F., Hao, Q. W., ... & Ying, G. G. (2018). Tissue distribution, bioaccumulation characteristics and health risk of antibiotics in cultured fish from a typical aquaculture area. *Journal of hazardous materials*, 343, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.017>
16. Ahmad, A., Kurniawan, S. B., Abdullah, S. R. S., Othman, A. R., & Hasan, H. A. (2021). Contaminants of emerging concern (CECs) in aquaculture effluent: Insight into breeding and rearing activities, alarming impacts, regulations, performance of wastewater treatment unit and future approaches. *Chemosphere*, 133319. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133319>
17. Lebelo, K., Malebo, N., Mochane, M. J., & Masinde, M. (2021). Chemical contamination pathways and the food safety implications along the various stages of food production: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11), 5795. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115795>
18. O’Sullivan, B., Patella, B., Daly, R., Seymour, I., Robinson, C., Lovera, P., & O’Riordan, A. (2021). A simulation and experimental study of electrochemical pH control at gold interdigitated electrode arrays. *Electrochimica Acta*, 395, 139113. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.139113>
19. Menon, S., Jesny, S., & Kumar, K. G. (2018). A voltammetric sensor for acetaminophen based on electropolymerized-molecularly imprinted poly (o-aminophenol) modified gold electrode. *Talanta*, 179, 668–675. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.11.074>
20. Hernandez, P., Aguilar-Lira, G. Y., Islas, G., & Rodríguez, J. A. (2021). Development of a new voltammetric methodology for the determination of ciprofloxacin in beef samples using a carbon paste electrode modified with Nafion and Fullerenes. *Electroanalysis*, 33(6), 1539–1546. <https://doi.org/10.1002/elan.202060525>
21. Laschuk, N. O., Easton, E. B., & Zenkina, O. V. (2021). Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials chemistry. *RSC advances*, 11(45), 27925–27936. <https://doi.org/10.1039/D1RA03785D>
22. Seguro, I., Rebelo, P., Pacheco, J. G., & Delerue-Matos, C. (2022). Electropolymerized, Molecularly Imprinted Polymer on a Screen-Printed Electrode—A Simple, Fast, and Disposable Voltammetric Sensor for Trazodone. *Sensors*, 22(7), 2819. <https://doi.org/10.3390/s22072819>