Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Síntesis de copolímeros de anilina y sus derivados. Aplicaciones en análisis biológicos y medio ambientales

Yánez Heras, Jorge Eduardo

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Yánez Heras, Jorge Eduardo. (2010). Síntesis de copolímeros de anilina y sus derivados. Aplicaciones en análisis biológicos y medio ambientales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Yánez Heras, Jorge Eduardo. "Síntesis de copolímeros de anilina y sus derivados. Aplicaciones en análisis biológicos y medio ambientales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Síntesis de Copolímeros de Anilina y sus Derivados. Aplicaciones en Análisis Biológicos y Medio Ambientales

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Jorge Eduardo Yánez Heras

Director de Tesis: Dr. Fernando Battaglini.

Consejero de Estudios: María dos Santos Afonso.

Buenos Aires, 2010

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

A mis Padres,

Hermanos y

Sobrinos.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Agradecimientos.

A Silvia**, por su paciencia eterna, por entenderme, por siempre estar a mi lado, por su ayuda, por ser: mi paz, alegría, inspiración, razón de luchar, simplemente por ser lo que es en mi vida.**

A mis padres Ana de Yánez **y** Jorge Yánez**, que han trabajado muy duro para sacarnos adelante, todo esto que he logrado es para ustedes y por ustedes, por sus consejos, ayuda incondicional en cada una de mis decisiones tomadas y por ser mi modelo a seguir.**

A mis hermanos Rey **y** Jorge**, por estar siempre conmigo, pendientes de mis cosas y por brindarme una mano cuando los he necesitado.**

A mis sobrinos Jorgito **y** Barbarita**, por sus hermosas risas, cariños y por los cortos pero buenos ratos compartidos.**

A mi tía Elodia**, porque sé que siempre estuviste pendiente de mi y porque desde donde estas sigues dándonos una mano.**

A Blanca León**, por su ayuda y apoyo incondicional y por ser una para mí una segunda madre.**

A mis todos tíos **por preocuparse y darme una mano cada vez que lo necesité.**

A todo mi grupo familiar **(mi tradición) por prestarme ayuda en los momentos en que la necesité y por ser uno de mis preciados tesoros, me enorgullezco de formar parte de ustedes.**

A mi tierra Venezuela **por permitirme ser quien soy y brindarme todas las riquezas de esa hermosa tierra.**

A los Orsetti **por hacerme sentir parte de su familia y por brindarme su confianza.**

A Mabel, Laura, Juani, Anita, Diego **y** Gaby**, por brindarme su amistad y hacerme sentir otro integrante de su familia.**

A mis Amigos (hermanos por elección) Deivi, Diego, Doris, Belen, Pablín C., Oscar, Maríto, Eylin, Rolo **y** Paula**, por brindarme su amistad, darme cariño y por ocupar un lugar gigante en mi pequeño corazón.**

A mis panas que adoro y más... José Luis, Yosy, Jaques (JJ), Alci, Pablo H., Anita (Divina), Vicky F., Oscar P., Beto, Gisela, Norkis, Nohemi **y** Yennifer**, por brindarme su amistad, ayuda, comprensión y por todo los buenos y lindos momentos compartidos.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

A mis amigos y compañeros de la vida, Guillermina, Lore, Sole, Sergio, Florencia, María Ana Castro, Yamila **y** Yani**, por su cariño y ayuda prestada**

A mi director y mentor, Fernando Battaglini **por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, guiarme cuando apenas toque suelo argentino, por sus sabios consejos y ayudarme con mi formación profesional.**

A mis compañeros de laboratorio Graciela Priano, Graciela González, Mauricio, Diego**,** Lore y las chicas (Sofi, Leila y Ana Sol)**, por la buena onda y por siempre estar dispuestos a ayudar.**

A todos mis compañeros de doctorado, en especial a Silvio Rodríguez**, por la buena onda en las materias cursadas y por su ayuda en mi trabajo de investigación.**

Al Dr. Cesar Barbero, Dr. Federico Williams, Dr. Gabriel Planes **y al** Dr. Martin Negri**, por ser parte importante del resultado de este trabajo brindándome ayuda con algunas medidas y aportando buenas ideas.**

A la Dra. María dos Santos Afonso por ser mi consejera de estudio.

A la Universidad de Buenos Aires **por la formación recibida en todos estos años.**

Al DQIAyQF-INQUIMAE (FCEyN-UBA) por brindarme el lugar y el apoyo para llevar acabo mi tesis doctoral.

A todos los que forman parte del DQIAyQF-INQUIMAE porque somos una gran familia disfuncional pero carismática (los que se sientan aludidos)(Copyright Andres Pal).

A las secretarias del DQIAyQF por la buena onda y predisposición. Ale y Claudia.

A ANPCyT y al CONICET por darme el sustento en todos estos años de trabajo.

Y finalmente a todos lo que no están en este mundo, pero que los tengo presentes en mis recuerdos y pensamientos.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Los polímeros conductores han sido ampliamente utilizados en diversas aplicaciones, entre ellas su uso como herramienta analítica en la fabricación de sensores. La polianilina es uno de los polímeros conductores más utilizados, ya que presenta ventajas como su fácil y económica síntesis, adecuada estabilidad y propiedades fisicoquímicas bien definidas. En base a estas propiedades se han logrado desarrollar sensores de polianilina capaces de detectar bajas concentraciones de distintas moléculas (NADH, H_2O_2, glucosa, entre otras).

Por otro lado, estos sensores también presentan ciertas limitaciones como la dificultad de derivatizar la polianilina para diseñar sistemas integrados en los que todos los reactivos necesarios estén unidos covalentemente a la superficie del electrodo. Otra limitación muy importante de la polianilina es el hecho de que ésta necesita de un pH ácido para experimentar cambios en su estado de oxidación, con los consiguientes cambios en conductividad y en velocidad de los procesos de transferencia electrónica (electroactividad). Esto limita el uso de sensores en base a polianilina a trabajar a pH menores que 5.

Este trabajo de investigación apunta a resolver los problemas inherentes a la química de la polianilina, y de esta manera desarrollar sensores que puedan superar las limitaciones de este material, pero que a su vez aproveche las ventajas del mismo. De acuerdo con esto se logró obtener una metodología de trabajo que permitió desarrollar recubrimientos basados en polianilina que presentan electroactividad a pH 7.

Esta meta fue lograda combinando la polimerización de anilina con derivados de la misma, los cuales presentan distintos grupos

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

funcionales en su estructura. La electroactividad a pH neutro y la existencia de diversos grupos funcionales en la película generada permitió extender la aplicación analítica de estos electrodos modificados, ya que además de cubrir un gran intervalo de pH, se puede realizar una fácil modificación, incorporando diversas moléculas para el reconocimiento de analitos específicos.

Gracias a las ventajas que presentan estas nuevas superficies, se logró desarrollar sensores capaces de detectar una amplia gama de sustancias: ácido ascórbico y dopamina a pH de interés biológico, trazas de distintos iones metálicos en distinto tipo de matrices acuosas; y sustancias de interés clínico-sanitario como los productos provenientes de la lisis bacteriana: LPS, ADN, BSA y fosfolípidos.

Palabras Claves: **Polianilina (PANI), Copolímeros de Anilina, Lengua Electrónica, Transporte de Masa, Transporte de Carga, Polímeros Conductores, Ácido Ascórbico, Metales Pesados, Iones Metálicos, Lipopolisacáridos, Endotoxinas, Nanosensor, Análisis Multivariado, Espectroscopia Electroquímica de Impedancia.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Conducting polymers have been widely used in several applications, among them its use as an analytical tool in sensor construction. Polyaniline is one of the most used conducting polymers, since it presents several advantages as: its easy and economical synthesis, adequate stability and well defined physicochemical properties. On this basis, it was possible to develop polyaniline sensors capable of detecting low concentrations of different molecules (NADH, H_2O_2, glucose, among others).

On the other hand, these sensors present certain limitations, as the difficulty of polyaniline derivatization to design integrated systems in which all necessary reagents are covalently bound to the electrode surface. Another very important limitation is the fact that it needs an acid pH to change its oxidation state, with the subsequently conductivity and electron transfer process rates changes (electroactivity). This constrains the use of polyaniline-based sensors to work at pH values below 5.

This research work aims to solve the inherent problems regarding polyaniline chemistry, and afterwards to develop sensors that overcome this material's limitations, but keeping its advantages. According to this, it has been possible to obtain a methodology which allowed developing polyaniline-based films that present electroactivity at pH 7.

This goal was achieved by combining the electropolymerization of aniline with some of its derivatives. These products present different functional groups on their structure. The electroactivity at neutral pH and the presence of different functional groups on the generated film allow extending the analytical application of these surfaces, since,

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

besides of covering a wide pH range, an easy modification can be carried out, incorporating recognition molecules in order to detect specific analytes.

Thanks to the advantages presented by these new surfaces, it has been possible to develop sensors capable of detecting a wide spectra of substances: ascorbic acid and dopamine at pH of biological relevance, traces of different metal ions in a varied type of aqueous matrix, and substances with clinical-sanitary interest such as products of bacterial lysis: LPS, ADN, BSA and phospholipids.

Keywords: **Polyaniline (PANI), Copolymers of Aniline, Electronic Tongue, Mass Transport, Charge Transport, Conducting Polymers, Ascorbic Acid, Heavy Metals, Metals Ions, Lipopolysaccharides, Endotoxins, Nanosensor, Multivariate Analysis, Impedance Spectroscopy.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Este trabajo de tesis ha dado lugar hasta el presente a las siguientes publicaciones:

- **Jorge Yánez Heras, Ana F. Forte Giacobone and Fernando Battaglini. "Ascorbote amperometric determination using conducting copolymers from anilina and N-(3propane sulfonic acid)-aniline", Talanta, 71 (4), pp. 1684-1689 (2007).**

- **Jorge Yánez Heras, Silvio Rodríguez, Martín Negri and Fernando Battaglini. "Chelating electrodes as taste sensor for the trace assessment of metal ions" Sensors and Actuators B: Chemical, Article in Press, Corrected Proof (2010).**

- **Jorge Yánez Heras, D. Pallarola y Fernando Battaglini. "Electronic tongue for simultaneous detection of endotoxins and other contaminants of microbiological origin." Trabajo enviado y en proceso de revisión.**

- **Jorge Yánez Heras, Gabriel Planes, Cesar Barbero, Federico Williams y Fernando Battaglini. "Caracterización fisicoquímica de superficies modificas utilizando copolímeros de anilina". Manuscrito elaborado y en proceso de revisión de los autores para ser enviado.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Indice

Capítulo I. Introducción

I.1. Introducción 3

I.2. Polímeros conductores 3

I.3. Polianilina 8

I.3.1. Propiedades electroquímicas de PANI 11

I.3.2. Polianilina aplicaciones en química analítica 15

I.4. Objetivos del trabajo 18

I.5. Referencias 19

Capítulo II. Técnicas Empleadas

II.1. Introducción 25

II.2. Técnicas electroquímicas 25

II.2.1. Conceptos generales 25

II.2.2. Celda electroquímica 26

II.2.3. Potenciostato 26

II.2.4. Cronoamperometría 28

II.2.5. Voltametría Cíclica 31

II.2.6. Espectroscopía electroquímica de impedancia 37

II.3. Técnica Gravimétrica 41

II.3.1. Microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo 41

II.4. Técnicas ópticas y espectroscópicas 45

II.4.1. Deflectometría por gradientes de concentración 45

II.4.2. Espectroscopía fotoelectroquímica de rayos X 48

II.5. Técnicas de análisis estadísticos 50

II.5.1. Análisis multivariado 50

II.5.1.1. Métodos explicativos o de dependencia 51

II.5.1.2. Métodos descriptivos o de interdependencia 52

II.6. Referencias 54

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Capítulo III. Desarrollo de Sensor Amperométrico

III.1. Introducción 61
III.2. Materiales y métodos experimentales 62
III.2.1. Materiales 62
III.2.2. Métodos 63
III.2.2.1. Síntesis de N-(3-ácido propil-sulfonico) anilina 63
III.2.2.2. Polimerización 63
III.2.2.3. Determinación de ácido ascórbico 64
III.2.2.4. Técnicas hidrodinámicas 64
III.3. Resultados 65
III.3.1. Obtención del monómero PSA 65
III.3.1.1. Caracterización electroquímica de PSA 67
III.3.2. Determinación de ácido ascórbico 74
III.3.2.1. Sensor amperométrico para ácido ascórbico 78
III.3.3. Discusión y conclusiones 80
III.3.4.Referencias 82

Capítulo IV. Propiedades Físicoquímicas

IV.1. Introducción 87
IV.2. Materiales y métodos experimentales 90
IV.2.1. Materiales 90
IV.2.2. Métodos 90
IV.2.2.1. Crecimiento de polímeros 90
IV.2.2.1.1. Crecimiento de PANI 90
IV.2.2.1.2. Crecimiento de dANI 90
IV.2.2.2. Estudio por XPS 91
IV.2.2.3. Estudios gravimétricos 92
IV.2.2.4. Transporte de masa en procesos redox a pH ácido y neutro 93
IV.2.2.5. Deflectometría por gradiente de concentración 93
IV.3. Resultados 95

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

IV.3.1. Caracterización de polimerización secuencial PANI/PSA **95**

IV.3.2. Polimerización secuencial de PANI/ otros derivados de anilina **99**

IV.3.3. Transporte de masa **102**

IV.3.3.1. Transporte de masa en medio ácido **103**

IV.3.3.2. Transporte de masa en medio neutro **107**

IV.4. Discusión y conclusiones **112**

IV.5. Referencias **116**

Capítulo V. Detección de Iones Metálicos

V.1. Introducción **121**

V.2. Materiales y métodos experimentales **126**

V.2.1. Materiales **126**

V.2.2. Métodos **126**

V.2.2.1. Construcción de sensores **126**

V.2.2.1.1. Sensor PANI/3-AFA-d-NTA **127**

V.2.2.1.2. Sensor VP **128**

V.2.2.2. Medidas de EEI **128**

V.2.2.3.Análisis mutivariado de datos **130**

V.2.2.3.1. Métodos multivariados no supervisados **130**

V.2.2.3.2. Análisis discriminante multivariado **132**

V..3. Resultados **133**

V.3.1. Detección de iones metálicos en agua milli Q **133**

V.3.2. Determinación de iones metálicos en otros tipos de muestras **148**

V..4. Discusión y conclusiones **154**

V.5. Referencias **156**

V.6. Apéndice **158**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Capítulo VI. Detección de Endotoxinas

VI.1. Introducción **163**
VI.2. Materiales y métodos experimentales **168**
VI.2.1. Materiales **168**
VI.2.2. Métodos **169**
VI.2.2.1. Construcción de sensores **169**
VI.2.2.1.1. Sensor d-NTA-Ni **169**
VI.2.2.1.2. Sensor CAP18F **170**
VI.2.2.1.3. Sensor ENP **170**
VI.2.2.2. Medidas de EEI **171**
VI.2.2.3.Análisis multivariado de datos **172**
VI.3. Resultados **174**
VI.3.1. Detección de LPS e interferentes puros **175**
VI.3.1.1. Sensor d-NTA-Ni **175**
VI.3.1.2. Sensor CAP18F **178**
VI.3.1.3. Sensor ENP **180**
VI.3.2. Detección de LPS puro y muestras contaminadas **184**
VI..4. Discusión y conclusiones **190**
V.5. Referencias **192**
V.6. Apéndice **195**

Capítulo VII. Conclusiones Generales

VII.1. Conclusiones generales **201**
VII. 2. Referencias **208**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Listado de Acrónimos.

PANI: Polianilina.

PSA: N-3 ácido propil-sulfonico anilina.

3-AFA: Ácido 3-Aminofenil acético.

2-ABA: 2-Aminobencil amnina.

d-ANI: Derivado de anilina.

d-NTA: N,N-bis(carboximetil)-L-lisina.

VP: Violeta de Piroquetacol.

LPS: Lipopolisacáridos.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

BSA: Albumina sérica bovina.

DPGP: 1,2 Dipalmitiol-sn-glicero-3-fosfato.

U.E.: Unidad de endotoxina.

WE: Electrodo de trabajo.

CE: Contraelectrodo.

RE: Electrodo de referencia.

EP: Potencial de Pico.

Ag/AgCl: Electrodo de referencia plata/cloruro de plata.

VC: Voltametría cíclica.

CA: Cronoamperometría.

EEI: Espectroscopia electroquímica de impedancia.

EQCM: Microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo.

PBD: Deflectometría por gradientes de concentración.

XPS: Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

ACP: Análisis de componentes principales.

AC: Análisis de conglomerados.

ADM: Análisis discriminante multivariado.

ADL. Análisis discriminante lineal.

ADC: Análisis discriminante cuadrático.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Capítulo I

Introducción

Polímeros conductores

Polianilina

Propiedades electroquímicas de PANI

PANI aplicaciones en química analítica

Objetivos del trabajo

Referencias

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

I.1. Introducción.

Los polímeros conjugados o de sistema Ï extendidos, son conocidos desde hace muchos años. A pesar de ello no recibieron una atención significativa en investigación hasta mediados de los años setenta, cuando MacDiarmid y colaboradores[1] mostraron que el poliacetileno, puede hacerse conductor a través de la reacción con vapores de bromo o yodo. Esto los hace merecedores del Premio Nobel de Química "por el descubrimiento y desarrollo en el campo de polímeros semiconductores y metálicos" en el año 2000[2].

I.2. Polímeros Conductores.

Los polímeros conjugados presentan uniones químicas que dan lugar a un electrón desapareado (el electrón ð) por átomo de carbono. Por lo tanto, se producen enlaces ð por solapamiento entre los orbitales p de los átomos de C de configuración sp^2, produciendo la deslocalización de los electrones a través de la cadena polimérica. Esta deslocalización electrónica provee la posibilidad de tener cargas móviles a través de la cadena polimérica.

La estructura electrónica en polímeros conductores está determinada por la simetría de la cadena (el número y el tipo de átomos dentro de la unidad repetitiva) dando lugar a propiedades desde semiconductoras hasta metálicas. El Profesor Bengt Rånby en su Simposio Nobel en 1991 designó a los polímeros conductores eléctricos como "*la cuarta generación de materiales poliméricos*"[3].

El ejemplo clásico y que puede ser considerado como polímero modelo de los polímeros conjugados es el poliacetileno, ya que es el

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

polímero conjugado más simple. En este polímero cada átomo de carbono está unido por enlace σ a dos átomos de carbono vecinos y a un átomo de hidrógeno, con un solo electrón Ï sobre cada carbono. Los enlaces C–C en el poliacetileno no son equivalentes. Ellos son, en forma alternada, un poco más largos y un poco más cortos debido a la distorsión de Peierls[4]. Entonces, la unidad repetitiva posee dos átomos de carbono $(-CH=CH)_n$. La no equivalencia de enlaces tiene un importante efecto en las propiedades electrónicas del poliacetileno, dado que crea una diferencia de energía (gap) entre el HOMO (banda Ï totalmente ocupada – banda de valencia) y el LUMO (banda Ï * vacía – banda de conducción). Entonces, en esta aproximación simple, el poliacetileno puede ser tratado como un semiconductor intrínseco, con un salto de banda, band gap, de 1.5 eV[5]. La estructura de enlaces alternados de poliacetileno es característica de los polímeros conjugados, por lo tanto al no haber bandas parcialmente llenas los polímeros conjugados son típicamente semiconductores.

Luego del descubrimiento del poliacetileno, muchos polímeros conjugados tipo polienos y sistemas aromáticos fueron sintetizados y caracterizados. Los sistemas Ï -conjugados del tipo están formados por el solapamiento de orbitales p_z del carbono. Pero existe otra familia de polímeros conjugados donde los orbitales p_z del nitrógeno también contribuyen a la conjugación. Entre los principales representantes de este tipo de compuestos se encuentran la polianilina y sus derivados, así como también poliazometinos y otros.

Los polímeros conductores poseen un conjunto de propiedades únicas: las propiedades de los metales y semiconductores y las propiedades mecánicas y de procesamiento de los polímeros. Esta

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

combinación los convierten en materiales especiales[6]. Los polímeros conductores más conocidos[7] se muestran en la Figura 1.

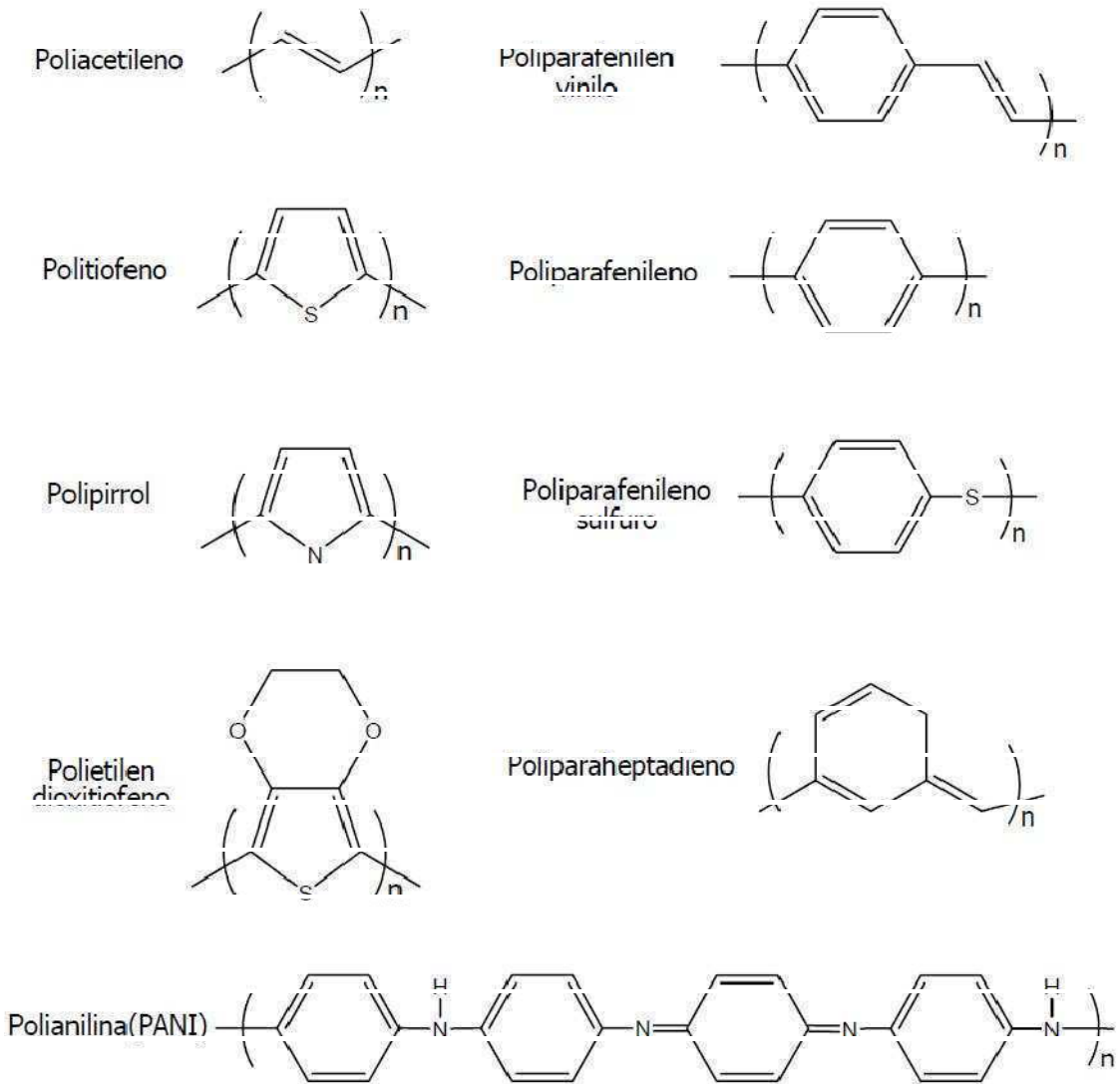


Figura 1. **Estructura de los polímeros conjugados más conocidos.**

Todos los polímeros conjugados pueden ser dopados ya sea química o electroquímicamente. Aquellos que incrementan su conductividad en varios órdenes de magnitud al ser dopados reciben el

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

nombre de polímeros conductores. La Figura 2 muestra el incremento en la conductividad obtenido por dopado[8].

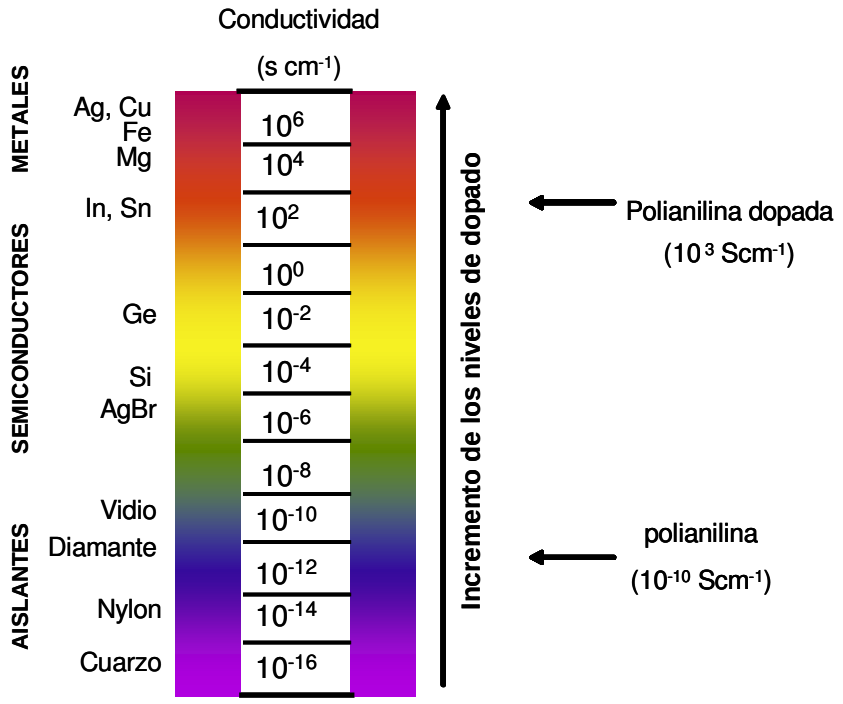


Figura 2. **Escala de valores de conductividad de distintos materiales. Demostración grafica del incremento de conductividad con el dopado.**

El dopado reversible de polímeros conductores, puede ser realizado químicamente o electroquímicamente. Por medio del dopado, el potencial electroquímico (o nivel de Fermi) se mueve por una reacción redox o por una reacción ácido-base dentro de una región de energía donde haya una alta densidad de estados electrónicos.

El proceso de dopado involucra una adición (reducción) o remoción (oxidación) parcial de los electrones desde o hacia el sistema de la cadena polimérica. El concepto de dopado es el único tema que distingue a los polímeros conductores del resto de los polímeros. Durante el proceso de dopado un polímero experimenta un cambio muy brusco en su conductividad (pasando desde 10^{-10} a 10^{-5} S cm^{-1} al régimen metálico

http://www.pdf4free.com
PDF Creator - PDF4Free v2.0

con conductividades del orden de 1 a 10^4 S cm^{-1}). La inyección de carga por dopado conduce a una amplia variedad de importantes e interesantes fenómenos. Por lo tanto, el tipo de dopado de un polímero determina su posible aplicación.

La conducción eléctrica en polímeros conductores es el resultado de la existencia de portadores de carga (que aparecen en el dopado) y de la habilidad que poseen estos portadores de carga para desplazarse a lo largo del sistema Ï conjugado. Los polímeros conjugados cuando se encuentran dopados son buenos conductores eléctricos por las siguientes razones[9]:

a) Por la introducción de portadores dentro de la estructura electrónica, ya que cada unidad repetitiva del polímero conjugado es un sitio redox activo, puede ser dopado tipo p (oxidación) o tipo n (reducción).

b) Los enlaces Ï - Ï conjugados conducen a la deslocalización de los electrones Ï a lo lago de la cadena del polímero y a la posibilidad de mover los portadores de carga en la misma, lo cual se extiende a un transporte en tres dimensiones debido a la transferencia electrónica entre cadenas.

Desde la aparición de los primeros polímeros conductores, surgió un nuevo campo de investigación que experimentó un rápido crecimiento, debido al interés que despierta las importantes aplicaciones tecnológicas que poseen estos materiales, ya que ofrecen una combinación de propiedades no conocidas en otros materiales[6], hasta el momento fueron utilizados, entre otras cosas, para recubrimientos[10], baterías[11,12], transistores moleculares[13], sensores químicos[14], etc. Todas estas aplicaciones requirieron un estudio más detallado de las

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

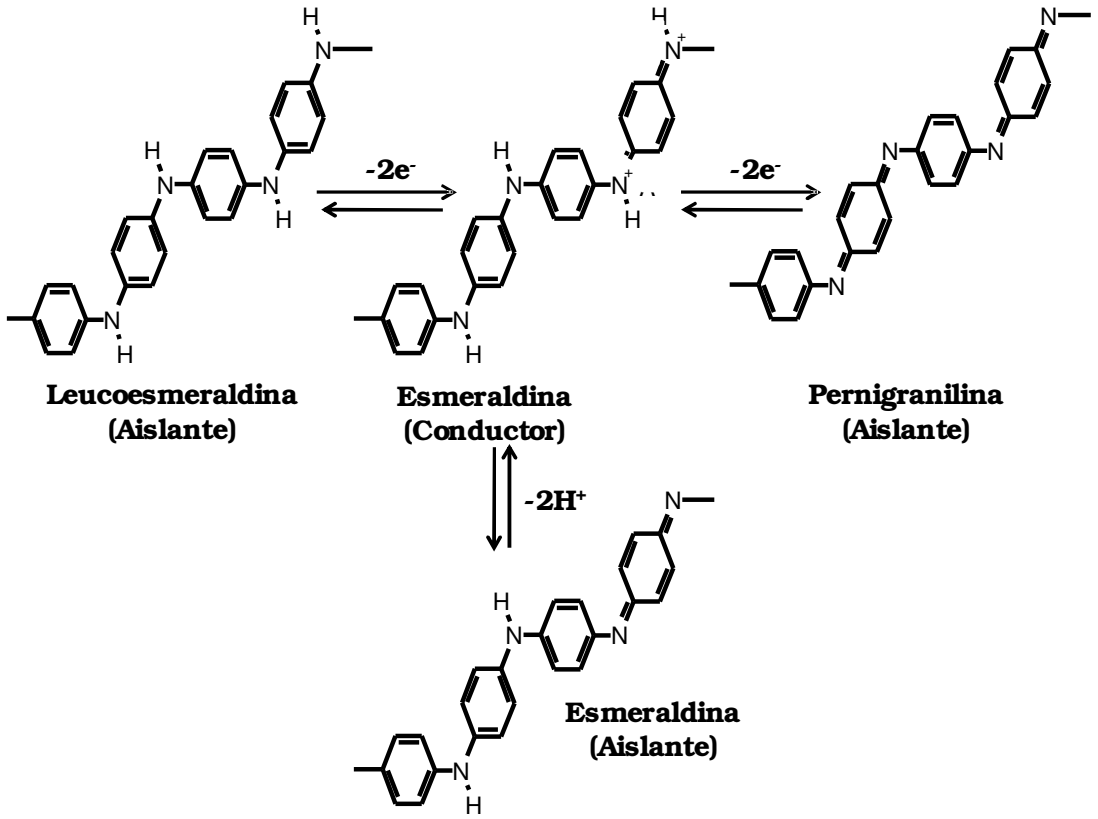
características de los polímeros para entender mejor su comportamiento y mejorar su aplicabilidad en cada caso.

La electroquímica de los polímeros conductores dopados fue descubierta en 1980, originó diversas líneas de investigación científica[15]. Sin embargo, aún hasta 1990 no se habían encontrado ejemplos de polímeros conductores estables. Este importante problema fue solucionado con la polianilina (PANI). La PANI es muy interesante como material conductor por varias razones: el monómero es económico, la reacción de polimerización es directa y se produce con un alto rendimiento, presenta una excelente estabilidad en presencia de algunos oxidantes y de ácidos fuertes y además posee propiedades redox bien definidas asociadas con los átomos de nitrógeno de las cadenas poliméricas[16].

I.3. Polianilina (PANI).

La polianilina PANI ha sido uno de los polímeros conductores más estudiados por las razones citadas anteriormente[16]. La PANI es un polímero lineal de anilina cabeza-cola que presenta tres estados de oxidación bien definidos. Así mismo presenta características ácido-base, producto de la presencia de átomos de nitrógeno capaces de protonarse dependiendo del pH del medio. El Esquema I presenta los equilibrios redox y ácido-base de la polianilina.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com



Esquema 1. **Estructura de los distintos estados de oxidación de PANI.**

Como se muestra en el esquema, la PANI presenta tres estados de oxidación definidos: el más reducido, conocido como leucoesmeraldina, de color amarillo claro; el intermedio, conocido como esmeraldina, de color verde; y el completamente oxidado, pernigranilina, de color azul oscuro. Como se puede observar, la pernigranilina posee la mitad de los anillos en su forma bencénica, mientras que la otra mitad se encuentra en forma quinónica. La esmeraldina, en cambio, posee tan solo un cuarto de los anillos en forma quinónica. Otra forma de visualizarlo es asumir que la pernigranilina posee todos los nitrógenos en forma de imina (por eso se dice que está completamente oxidada), mientras que la esmeraldina solo tiene la mitad de los nitrógenos en forma de imina (por eso se dice que está mitad oxidada). Algunos autores definen otros estados de oxidación intermedios como la "protoesmeraldina" o la

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

"nigranilina"[17] que son formas intermedias entre la leucoesmeraldina y la esmeraldina, y entre la esmeraldina y la pernigranilina respectivamente. En este trabajo no se tomará en cuenta la existencia de estas formas intermedias debido a que no son suficientemente estables como para ser detectadas por técnicas electroquímicas. Debe hacerse notar que el único estado de elevada conductividad eléctrica de la polianilina, es la esmeraldina en su forma protonada. Todos los estados restantes poseen una alta resistencia al paso de la corriente eléctrica. Este punto es clave en la fabricación de sensores ya que define las condiciones en las cuales la polianilina podrá ser utilizada como un conductor.

La polianilina puede pasar reversiblemente de un estado de oxidación a otro, así como puede protonarse o desprotonarse en forma reversible. Este paso de un estado redox a otro, puede efectuarse en forma electroquímica, o sea aplicando un potencial a un electrodo sobre el cual la polianilina se oxida o reduce; pero también puede ocurrir en forma química, o sea por reacción con un oxidante o reductor adecuado. El polímero es estable en sus estados más reducidos, mientras que cuando se encuentra como pernigranilina, es susceptible de hidrolizarse dando hidroquinona. Otro punto importante en la electroquímica de la polianilina, es la dependencia de estos procesos redox con los aniones en solución, a través de la creación de cargas positivas sobre los átomos de nitrógeno, las que deben ser contrabalanceadas de alguna manera. Esta dependencia, sumada a la dependencia con el pH, influye en las aplicaciones de la polianilina a sensores como se verá más adelante. Recordemos que la reducción de la pernigranilina a esmeraldina y la de esmeraldina a leucoesmeraldina, involucran la incorporación de protones, por lo que no solamente la conductividad dependerá del pH, sino también los potenciales de oxido-reducción y la reversibilidad de los procesos.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

I.3.1. Propiedades electroquímicas de PANI.

La PANI puede sintetizarse electroquímicamente sobre un electrodo partiendo de una solución ácida del monómero, la ventaja de este tipo de síntesis radica en el hecho de que se trata de un proceso localizado sobre la superficie de un electrodo y que se puede controlar la cantidad de polímero depositada a través de la carga empleada. Una vez electropolimerizada la PANI sobre la superficie del electrodo, esta puede ser oxidada y reducida repetidas veces por barridos de potencial del electrodo en una solución con electrolito soporte. La síntesis electroquímica puede realizarse potenciostáticamente o galvanostáticamente; potenciostáticamente puede realizarse por barridos de potencial (voltametría cíclica) o por aplicación de un potencial adecuado (cronoamperometría). La película de polímero obtenida en ambos casos difiere en la morfología. La Figura 3 muestra la voltametría característica de PANI en medio ácido. Además, se demostró que la PANI sintetizada químicamente y luego depositada de manera conveniente sobre un electrodo presenta las mismas propiedades electroactivas que PANI depositada por vía electroquímica[18].

La voltametría cíclica de PANI es muy característica y utilizada para caracterizar el polímero a través de los potenciales de pico y de la carga de oxidación del primer cambio redox (leucoesmeraldina a esmeraldina). Sin embargo es muy importante tener en cuenta el pH al cual se realiza la voltametría cíclica.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

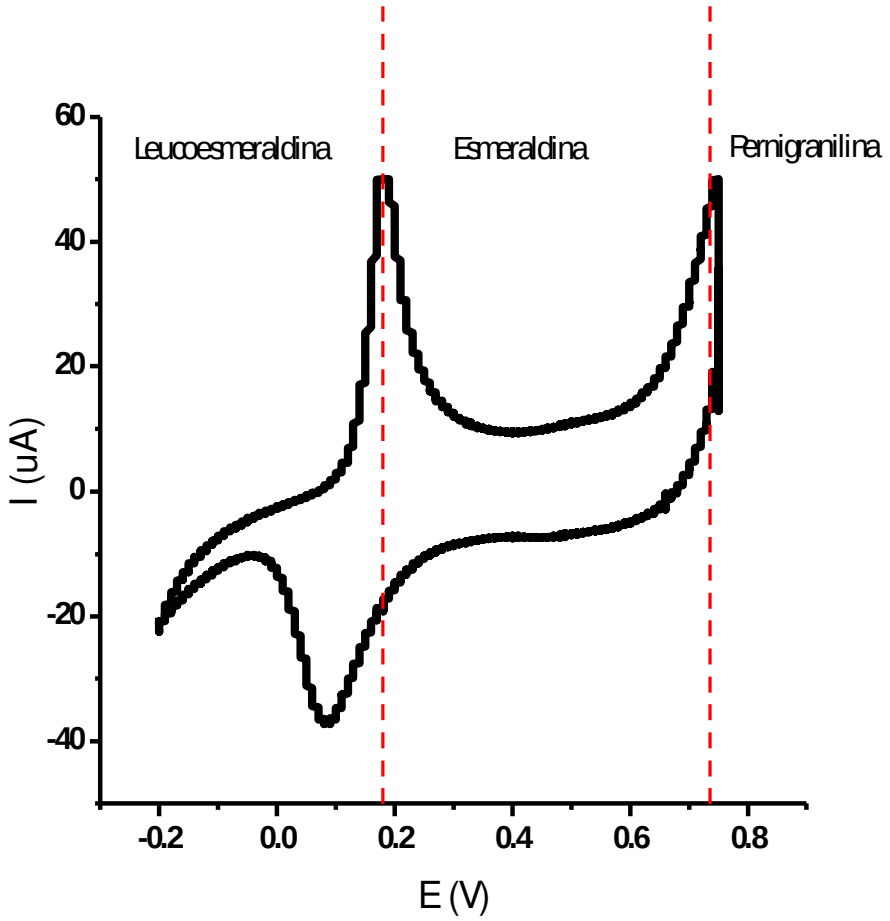


Figura 3. **Voltametría cíclica de PANI electropolimerizada sobre un electrodo de carbono vítreo en ácido sulfúrico 1.8 M entre -0.2V y 0.85V con una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1}.**

En 1986 MacDiarmind estudio los cambios electroquimicos de PANI con el pH[18]. En estudio se mostró como varia el potencial de pico de cada proceso en función del pH. En la Figura 4 se muestran los corrimientos de los picos con el pH.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

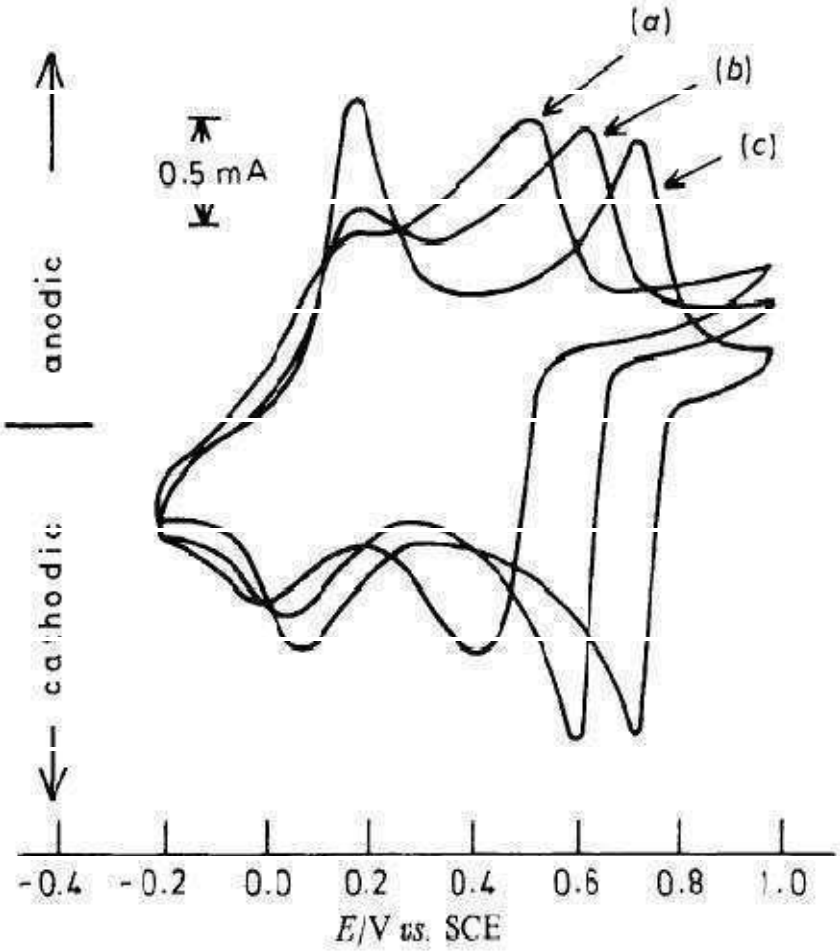


Figura 4. **Voltametría cíclica de polianilina en electrolitos de (a) pH 2, (b) pH 1 y (c) HCl 1 M.**

En este trabajo se estableció que el primer potencial de pico anódico (y el correspondiente pico catódico) son casi independientes del pH y del electrolito (a pH mayores que 1), mientras que a pH inferiores a 1 se observan cambios con el pH; mientras que para el segundo proceso de transferencia electrónica se observa que el potencial depende fuertemente del pH (Figura 5).

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

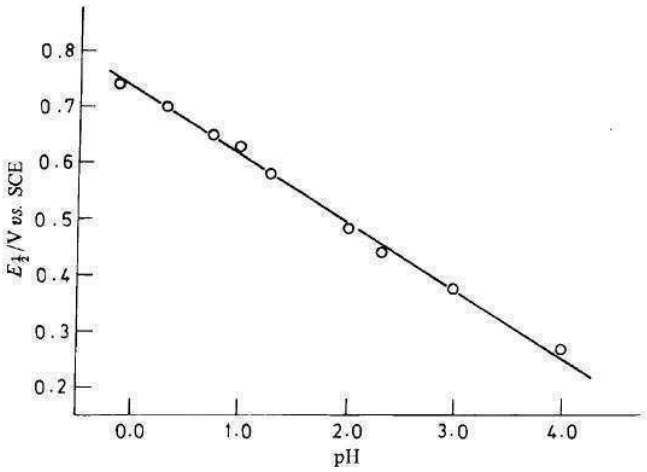


Figura 5. **Relación del $E_{1/2}$ de los procesos redox de PANI con respecto al pH. (a) Dependencia del $E_{1/2}$ del primer proceso redox de PANI con el pH (entre -2.12 y 2), pendiente = -58 por unidad de pH. b) Dependencia del $E_{1/2}$ para el segundo proceso redox con el pH (entre -0.2 y 4), pendiente = 120 mV por unidad de pH[18].**

La dependencia de los potenciales de pico con el pH produce un cambio en las transiciones aislante-conductor de PANI. Mc Manus y colaboradores[19], correlacionaron los cambios de conductividad de PANI con los cambios en las estructuras electrónicas a través de espectros de absorción electrónica. Demostraron que hay tres formas espectroscópicamente distinguibles. A partir de estas formas identificadas realizaron mediciones de conductividad a diferentes pHs y demostraron que a pHs más altos, el potencial electroquímico para la transición aislante-conductor (leucoesmeraldina-esmeraldina) se corre hacia valores más positivos.

El pH no sólo causa un desplazamiento de los picos correspondientes a los estados redox de PANI, sino que también afecta su

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

estabilidad electroquímica. Estudios previos[20] mostraron que esto no se debe a la desprotonación de la sal de esmeraldina; sino a una lenta degradación de la forma completamente oxidada de PANI, pernigranilina. Incluso se observó que realizando un barrido de potencial entre los estados leucoesmeraldina y esmeraldina, la película mantiene la actividad incluso hasta pH 9.

La influencia de la protonación sobre la conductividad también ha sido ampliamente estudiada[19,21,22] y se logro demostrar que el intervalo de potencial en el cual PANI es conductora, se desplaza hacia valores de potencial más positivos y a su vez se hace mucho más pequeño cuando se cambia el pH de 1 a 7.

I.3.2. Polianilina aplicaciones en química analítica.

Para aplicaciones prácticas de PANI en sensores biológicos es fundamental extender el intervalo de trabajo de PANI en soluciones neutras o alcalinas. Se han sugerido varias formas de lograr PANI activa a pH neutro.

Como es conocido, la polianilina se comporta como un conductor solamente en su forma medio-oxidada, (esmeraldina) cuando está protonada. A pH mayores de 5, se desprotona convirtiéndose en un aislante. Para una película de polianilina la desprotonación en la forma de esmeraldina se encuentra asociada a la salida de ambos: protones y aniones que contrabalancean las cargas dentro de la película. Esto es posible solamente si los aniones son pequeños y móviles, por ejemplo el cloruro o el bisulfato. Si se substituyen estos aniones móviles por contraiones poliméricos con cadena larga, éstos quedan atrapados dentro de la película de polianilina y el proceso global cambia. Como consecuencia de este cambio, la conductividad de la polianilina se puede

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

mantener a un pH[23] mucho más alto. Bartlett y colaboradores utilizaron este efecto para depositar películas de polianilina con contraiones poliméricos tales como poli(vinilsulfonato)[24] o poli(estirensulfonato)[25], que siguen siendo electroquímicamente activos y que conducen a pH neutro. Esta ingeniosa solución tiene varias limitaciones: la electroquímica de la película cambia con el tiempo y se debe volver a una solución de pH 5 para invertir este proceso. Si la película se deja una noche a circuito abierto en una solución a pH 7, sensibles disminuciones de las corrientes máximas son observadas al volver a un buffer de pH 5. Además, la conductividad de este film co-depositado es dos órdenes de magnitud más baja que los valores correspondientes a las películas de polianilina/bisulfato, ambas en pH 5[26]. La limitación de este dispositivo es que luego de que un de tiempo, la concentración de protones en la película se equilibra con la concentración de protones en la solución y la carga positiva en la esmeraldina se pierde.

Una solución posible a este problema sería modificar los átomos de N en la cadena lineal de polímero con un grupo alquilo. De esta manera, el polímero estará dopado con carga positiva cuando se encuentre en la forma oxidada y la única limitación será la migración de aniones. Una desventaja de este enfoque es el desorden producido en la estructura. Chilavert y colaboradores[27] encontraron una disminución importante de la conductividad cuando el tamaño del grupo aumenta para una serie de poli(anilinas-N-alquiladas). Mikhael y colaboradores[28] estudiaron el efecto de varios agentes alquilantes y acilantes que se hicieron reaccionar con polianilina en su forma de esmeraldina. El reemplazo del hidrógeno ligado al N por un grupo acilo o alquilo afecta fuertemente la conductividad del polímero. Con los acil-derivados, se observó una disminución de la conductividad eléctrica atribuida a la disminución de la densidad electrónica en las cadenas de polímero por el efecto electrón-atractor de los grupos acilo; el mismo efecto fue observado por Mc. Coy y

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

colaboradores[29]. Por el contrario, los polímeros alquilados demuestran una buena conductividad eléctrica, estos resultados se atribuyen al hecho de que los grupos alquilo aumentan la densidad electrónica Ï a lo largo de la cadena polimérica conjugada.

Varios autores han modificado la polianilina con propano-sultona para obtener el derivado de poli(anilina-N-propanosulfónico) (PSPANI)[30,31]. En particular, Chen y colaboradores[31] observaron un comportamiento de semiconductor en polímeros químicamente sintetizados.

Los dos grandes puntos a mejorar en la química de los polímeros conductores en cuanto a su aplicación a la construcción de sensores, a saber: la carencia de grupos funcionales que permitan la derivatización y la construcción de estructuras más complejas y, en segundo lugar, la limitación en el rango de pH de funcionamiento del polímero.

En vista de mejorar lo expuesto anteriormente en nuestro grupo de trabajo se sintetizó un copolímero entre anilina y 2-aminobencilamina, el cual permite la incorporación de otras moléculas por métodos suaves a través de la reacción con el amino primario libre, presente en el copolímero. Este copolímero posee prácticamente las mismas características conductoras de la PANI. En este caso, se modifico el copolímero con ferroceno-carboxialdehido por formación de una base Schiff y posterior reducción a pH 7[32]. También se sintetizó un copolímero capaz de trabajar a pH neutro a través de la modificación de PANI con alquilsultonas, de manera de reemplazar el hidrógeno del átomo de nitrógeno por un grupo alquílico unido covalentemente, que a su vez genera una carga positiva en el átomo de nitrógeno cuando es oxidado y retiene un grupo sulfonato en su estructura. De esta forma, el polímero sumergido en una solución a pH neutro muestra importantes

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

mejoras, reduciendo su resistencia eléctrica en 3 órdenes de magnitud. Este material también presenta una mayor estabilidad comparados con otros materiales obtenidos anteriormente[26]. Este sistema combinado con peroxidasa permite la construcción de sensores capaces de trabajar en el rango fisiológico de pH y de detectar concentraciones menores que 1ppm[33].

En base a los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, esta tesis se basa en mejorar las limitaciones de PANI, desarrollando nuevos materiales y entendiendo su comportamiento fisicoquímico para su aplicación en el campo de la química analítica desarrollando sensores capaces de trabajar a pH biológicos para el estudio de muestras de origen biológico o medio ambiental.

I.4. Objetivos del trabajo.

Esta tesis tiene como objetivo la modificación de PANI con el fin de desarrollar dispositivos que permitan trabajar a pH mayores que 5, donde esta no presenta electroactividad.

Sintetizar copolímeros de anilina con alguno de sus derivados capaces de producir un autodopado de iones tal que conserven las propiedades electroquímicas de la PANI.

Aplicación de estos copolímeros a la construcción de arreglos de sensores para su aplicación en la caracterización de muestras biológicas y medio ambientales.

I.4. Referencias.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(1) H. Shirakawa, E. J. Louis, A. G. MacDiarmid, C. K. Chiang and A. J. Heeger, *Chem. Commun.* 16 (1977) pp. 578-580.

(2) A. J. Heeger, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) pp. 8475-8491.

(3) W. R. Salaneck, I. Lundström and B. Rånby, *Conjugated Polymers and Related Materials: The Interconnection of Chemical and Electronic Structures*, Eds. Oxford University Press; Oxford, U.K., (1993).

(4) R. E. Peierls, *Quantum Theory of Solids*, Clarendon, Oxford, 1964.

(5) A. J. Heeger, *New Concepts and New Phenomena. Handbook of conducting polymers* (Vol 2), New York, (1986).

(6) A. G. MacDiarmid, *Curr. Appl Phys.* 1 (Iss. 4-5)(2001) pp. 2269-279.

(7) A. Heeger, *Nobel Lecture*, (2000).

(8) A. G. MacDiarmid, *Angew. Chem. Int* 40 (2001) pp. 2581-2590.

(9) C. K. Chiang; S. C. Gau; C. R. Fincher Jr.; Y. W. Park and A. G. MacDiarmid, *Appl. Phys. Lett.* 33 (1978) pp. 18-20.

(10) R. Faez, I.M. Martin, M.A. De Paoli and M.C. Rezende, *J. Appl. Polym. Sci.* 83 (2002) pp. 1568-1575.

(11) H. Karami, M. Fazlollah Mousavi and M. Shamsiour, *J. Power Sources* 117 (2003) pp. 255-259.

(12) K. Ghanbari, M. Fazlollah Mousavi, M. Shamsipur and H. Karami, *J. Power Sources* 124 (Iss.1)(2007) pp. 303-308.

(13) C.H. McCoy, I.M. Lorkovic and M.S. Wrighton *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) pp. 6934-6943.

(14) P.N. Bartlett and P.R. Birkin, *Synth. Met.* 61 (1993) pp.15-21.

(15) P. J. Nigrey, A. G. MacDiarmid and A. J. Heeger, *Chem. Commun.* 96 (1979) pp. 594-595.

(16) E. T. Kang, K. G. Neoh and K. L. Tan, *Prog. Polym. Sci.* 23 (1998) pp. 211-324.

(17) H. Neugebauer, N. S. Sariciftci, H. Kuzmany and A. Neckel, *Electronic Properties of Conjugated Polymers III - Springer Series in*

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Solid-State Sciences **(Vol. 91); Eds. H. Kuzmany- M. Mehring-S. Roth, Springer, Berlin(1989).**

(18) W.S. Huang, B.D. Humphrey and A.G. MacDiarmid, *Faraday Trans. I* 82 **(1986) pp. 2385-2400.**

(19) P.M. McManus, R. J. Cushman and S. Cheng Yang, *J. Phys. Chem.* 91 **(1987) pp. 744-777.**

(20) L. Nyholm and L.M. Peter, *Faraday Trans.I,* 90 **(1994) pp. 149-154.**

(21) J. P. Travers, J. Chroboczek, F. Devreux, F. Genoud, M. Nechtschein, A. Syed, E.M. Genies and C. Tsintavis, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 121 **(1985) pp.195-199.**

(22) A.G. MacDiarmid, J. C. Chiang, M. Halpern, W.S. Huang, S. L. Mu, N.L.D. Somasiri, W. Wu and S. I. Yaniger, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 121 **(1985) pp. 173-180.**

(23) P.N. Bartlett and Y. Astier, *Chem. Comm.* 2 **(2000) pp. 105-112.**

(24) P.N. Bartlett, P.R. Birkin, J.H. Wang, F. Palmisano and G. De Bendetto, *Anal. Chem.* 70 **(1998), pp 3685-3694.**

(25) P.N. Bartlett, J.H. Wang and E.N.K. Wallace, *Chem. Com.* (1996), pp 359-360.

(26) P.N. Bartlett and J.H. Wang, *Faraday Trans.* 92 **(1996), pp 4137-4143.**

(27) J. W. Chevalier, J. Y. Bergeron and L. H. Dao, *Macromolecules* 25 **(1992) pp. 3325-3331.**

(28) M. G. Mikhael, A. B. Padias and H. K. Jr. Hall, *J. Polym. Sci.A: Polym. Chem.* 35 **(1997) pp. 1673-1679.**

(29) C. H. McCoy, I. M. Lorkovic and M. S. Wrighton, *J. Am. Chem. Soc.* 117 **(1995) pp. 6934-6943.**

(30) J. Y. Bergeron, J. W. Chevalier and L. H. Dao, *Chem. Comm.* (1990) pp. 180-182.

(31) S. A. Chen and G. W. Hwang, *J. Am. Chem. Soc.* 117 **(1995) pp. 10055-10062.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(32) D. Raffa and F. Battaglini, *J. Electroanal. Chem.* 504 (2001) pp. 120-124.

(33) D. Raffa, K.T. Leung and F. Battaglini, *Anal. Chem.* 5 (2003) pp. 4983-87.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Capítulo II

Introducción

Técnicas electroquímicas

Conceptos generales

Celda electroquímica

Potenciostato

Cronoamperometría

Voltametría Cíclica

Espectroscopía electroquímica de Impedancia

Técnica gravimétrica

Microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo

Técnicas ópticas y espectroscópicas

Deflectometría por gradientes de concentración

Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

Técnicas de análisis estadísticos

Análisis multivariado

Métodos explicativos o de dependencia

Métodos descriptivos o de interdependencia

Referencias

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

II.1. Introducción.

Durante la realización de esta tesis han sido empleadas una numerosa gama de técnicas, las que permitieron caracterizar los distintos sistemas estudiados y comprender sus características fisicoquímicas, para su aplicación en el desarrollo de sensores. A continuación se desarrollará una breve descripción del fundamento teórico de las mismas, el tipo de información que brinda cada una de ellas, las ventajas y limitaciones en cada caso.

II.2. Técnicas electroquímicas.

II.2.1. Conceptos generales.

En esta tesis se emplearon técnicas de potencial controlado. Estas técnicas requieren el uso de un potenciostato para fijar el potencial y medir la corriente, y de una celda electroquímica, en el caso de este trabajo de tesis, de tres electrodos.

Una reacción de electrodo es un proceso químico heterogéneo que involucra la transferencia de electrones desde o hacia una superficie conductora. Se trata de un proceso anódico si las especies son oxidadas, perdiendo electrones; o bien es un proceso catódico si las especies son reducidas en la interfaz, ganando electrones. Las especies electroactivas pueden ser especies disueltas en solución, el solvente mismo, una película sobre la superficie del electrodo o el material del electrodo en sí mismo. Una reacción de electrodo de la forma general:

$$O + n\,e^- \rightleftharpoons R$$

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

involucra una secuencia de pasos que puede incluir el transporte de reactivos hasta la superficie del electrodo, la transferencia de electrones y la remoción del producto de la superficie del electrodo; por lo que la velocidad del proceso estará determinada por la velocidad del paso más lento de la secuencia[1].

II.2.2. Celda electroquímica.

Para estudiar una reacción de electrodo comúnmente se utiliza una celda que posee tres electrodos. Se llama *electrodo de trabajo* (WE) a aquel en el cual se producen los cambios electroquímicos de interés. *Electrodo auxiliar o contraelectrodo* (CE) es el electrodo sobre el cual se realiza la medición de corriente del proceso que está ocurriendo en la celda electroquímica (la corriente circula entre el electrodo de trabajo y el contaelectrodo a través de la solución de electrolito). El contraelectrodo debe tener un área mucho mayor que el electrodo de trabajo para evitar la polarización y que la reacción en éste interfiera en la respuesta del electrodo de trabajo. El tercer electrodo es el *electrodo de referencia* (RE) por el que no circula corriente y que sólo controla el potencial del electrodo de trabajo. Para optimizar su función se lo coloca lo más cerca posible del electrodo de trabajo. Con esta configuración se minimiza la caída de potencial, iR, llamada también caída óhmica. Debido a las dimensiones de los electrodos utilizados en esta tesis, los modelos que se describen corresponden al caso de electrodo plano infinito y difusión semi-infinita[2].

II.2.3. Potenciostato.

El potenciostato es el instrumento encargado de controlar el potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo. En la actualidad estos dispositivos permiten aplicar distintas funciones de

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

potencial al electrodo de trabajo que generan distintos tipos de respuesta en corriente, siendo la más popular la voltametría cíclica.

Los procesos electroquímicos generalmente no son sencillos, involucran varios pasos que incluyen desde procesos heterogéneos de transferencia de electrones y transporte de masa hasta reacciones químicas homogéneas que pueden estar acopladas, procesos superficiales tales como adsorción, entre otras. Un análisis completo de cualquiera de estos procesos electroquímicos requiere conocer cada paso individual. Como mínimo es necesario conocer la constante de velocidad estándar, los coeficientes de los procesos que involucran transferencia de electrones, la determinación del número de electrones involucrados y, si hay especies en solución, los correspondientes coeficientes de difusión.

Existe una amplia variedad de técnicas electroquímicas desarrolladas para determinar los parámetros tanto cinéticos como termodinámicos de las reacciones de electrodo. Dependiendo del sistema químico y de la información que se quiera obtener, se utilizará la técnica adecuada.

En este trabajo de tesis se han empleado principalmente tres técnicas electroquímicas básicas: cronoamperometría, voltametría cíclica y espectroscopia electroquímica de impedancia. A continuación se describirá el principio de cada una. Para mayores detalles puede consultarse la bibliografía citada[1,2].

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

II.2.4. Cronoamperometría.[3]

La cronoamperometría es una técnica en la cual el potencial del electrodo de trabajo se cambia instantáneamente y se mide la corriente en función del tiempo. En la Figura 1 se muestra esquemáticamente la perturbación de potencial aplicada al electrodo de trabajo en función del tiempo.

Para una reacción donde O y R son la especie oxidada y reducida respectivamente, ambas solubles en la solución:

$$O + n\,e^- \rightleftharpoons R$$

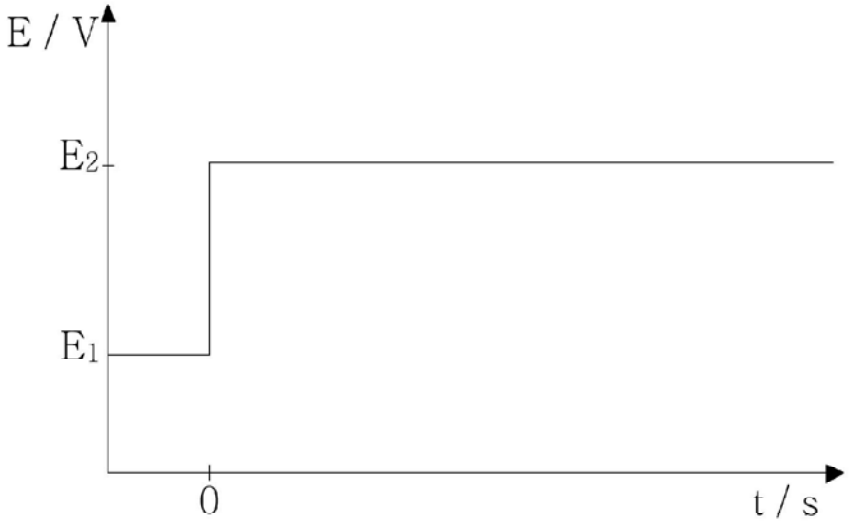


Figura 1. **Potencial en función del tiempo para un experimento de cronoamperometría.**

E_2 es tal que la reducción de O transcurre a una velocidad controlada por difusión, y el proceso queda caracterizado por las leyes de Fick. Imponiendo las condiciones de contorno adecuadas:

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

- **A t = 0, $C_O(x,0) = C_O^*$**
- **Para t > 0, $\lim_x \quad C_O(x,t) = C_O^*$**
- **$C_O(0,t) = 0$**

donde C_O^* es la concentración de O en el seno de la solución. Inicialmente (t = 0) la concentración de O es uniforme ($C_O = C_O^*$), luego de aplicada la perturbación, la concentración de O se agota sobre la superficie del electrodo y en todo momento $C_O = C_O^*$ lejos del electrodo (difusión lineal semi infinita). Las ecuaciones pueden ser resueltas aplicando la transformada de Laplace a la expresión correspondiente a la segunda ley de Fick, pudiéndose obtener las expresiones para el perfil de concentración de la especie O en función del tiempo y de la distancia. La dependencia de la corriente con el tiempo viene dada por:

$$\frac{\quad}{\quad}_{x=0} \qquad \textbf{(ii.1)}$$

que lleva a la respuesta cronoamperométrica conocida como la ecuación de Cotrell:

$$\frac{\quad \ddot{e}}{\quad} \qquad \textbf{(ii.2)}$$

donde i es la intensidad de corriente, *n* el número de electrones intercambiados en la reacción, *A* es el área del electrodo, *Do* es el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, en este caso O, *F* la constante de Faraday y *t* el tiempo. Esta ecuación relaciona la corriente i con $t^{1/2}$. A partir de un gráfico de i vs. $t^{1/2}$ puede obtenerse el coeficiente de difusión de la especie O.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

La forma del transitorio de corriente depende del tipo de proceso que esté controlando la velocidad de la reacción de electrodo. En la Figura 2 se muestran distintos tipos de transitorios posibles.

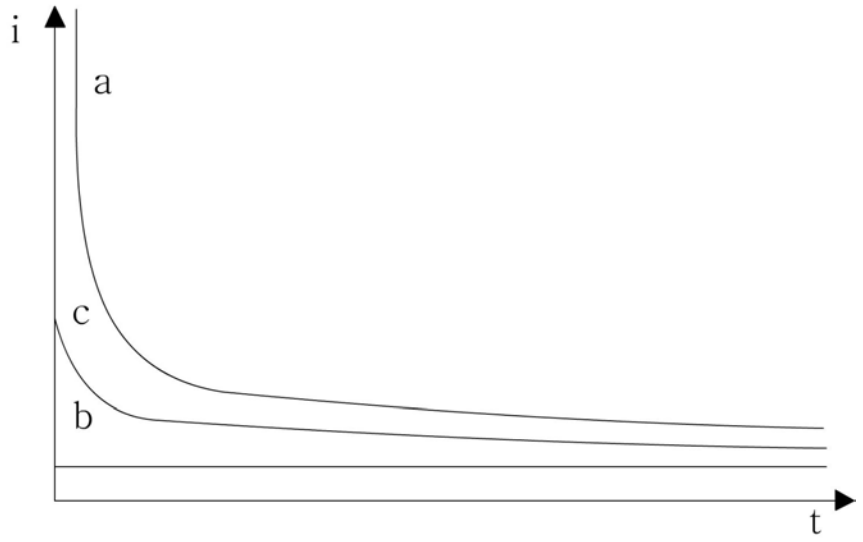


Figura 2. **Corriente vs. tiempo para experimentos de salto de potencial. a) Control difusional, b) control cinético, c) control mixto.**

Cuando la reacción está controlada por difusión, se tiene una respuesta corriente-tiempo según la curva a. Cuando la reacción está controlada cinéticamente la respuesta de corriente es del tipo representado en la curva b; esto ocurre cuando la constante de la velocidad de la reacción es pequeña (o cuando el valor de E_2 impone un sobrepotencial muy bajo para la reacción), entonces la concentración de la especie O no cambia de manera significativa ya que el sobrepotencial aplicado no es muy grande y por lo tanto la difusión no juega un rol muy importante para determinar la velocidad de la reacción. En una situación intermedia entre los casos a y b tenemos el transitorio correspondiente a la curva c, en la cual la velocidad de transferencia de carga y la velocidad de difusión son comparables y la corriente cae en el tiempo, pero de una manera más suave; se dice que el sistema se encuentra bajo control mixto.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

II.2.5. Voltametría cíclica.[4]

Por su sencillez, la voltametría cíclica (VC) ha sido una de las técnicas electroquímicas más utilizadas y conocidas para la exploración preliminar de un sistema electroquímico. A partir del barrido lineal del potencial en función del tiempo es posible mostrar a qué potenciales ocurren los procesos redox, detectar reacciones químicas acopladas, estimar velocidades de reacción, tanto en la superficie del electrodo como en solución, y hasta es posible identificar fenómenos de adsorción. En la Figura 3 se muestra la forma en la que puede variarse el potencial aplicado al electrodo de trabajo en función del tiempo.

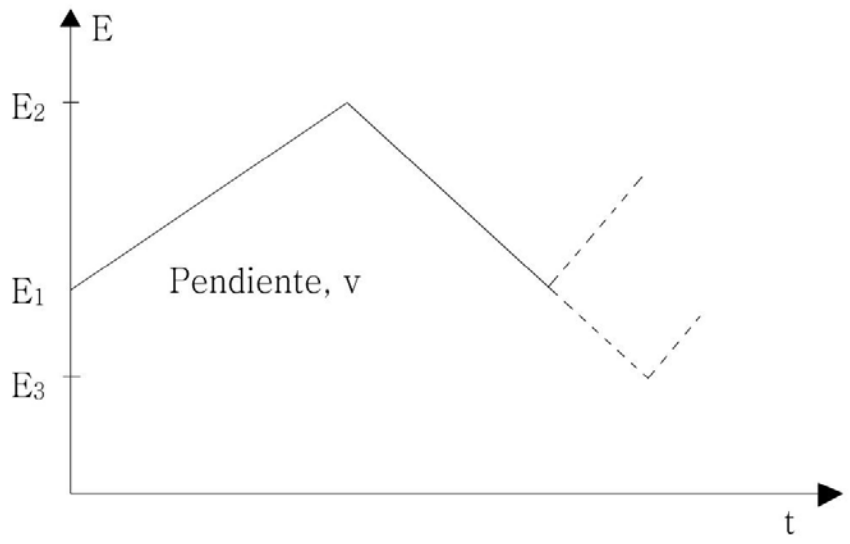


Figura 3. **Perfil de potencial en función del tiempo para voltametría cíclica.**

La velocidad de barrido usada generalmente se encuentra entre los pocos mV/s hasta 100 V/s. La respuesta en corriente se grafica en función del potencial y el eje de potencial es también un eje de tiempo. Dependiendo de la forma de la VC se podrá saber si se trata de una reacción reversible, irreversible o si se trata de una especie adsorbida electroquímicamente activa. Otras respuestas características se obtienen

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

cuando existen reacciones químicas acopladas al proceso de transferencia de carga. Nuevamente, se considera el proceso:

$$O + n\,e^- \rightleftharpoons R$$

En el marco del análisis de la curva i vs. E, la corriente depende del control cinético y difusional, observándose un crecimiento de la misma a medida que el sobrepotencial de la cupla aumenta, llegando a una corriente pico cuando la reacción comienza a estar controlada por difusión. Esta corriente pico es un parámetro característico de la voltametría. En la Figura 4 se observa el voltamograma cíclico obtenido para una reacción reversible de transferencia de 1 e-, donde la especie electroquímica se encuentra en la solución. Si el potencial se barre a través del intervalo donde se produce la reacción de oxidación (*R O*), inicialmente y como consecuencia del cambio en el potencial aplicado, la oxidación de R en la superficie se ve favorecida y por lo tanto la densidad de corriente anódica aumenta. Esta densidad de corriente continúa aumentando hasta que la concentración superficial llega a ser cero y por lo tanto la reacción pasa a estar controlada por difusión. Como la concentración superficial se mantiene en cero, y con el tiempo el flujo hacia la superficie disminuye, la densidad de corriente disminuye, y por consiguiente la respuesta presenta un pico. Para el barrido de vuelta, la reacción de transferencia electrónica en el electrodo es O R, por lo tanto la corriente cambiará su signo. La corriente catódica pasará de nuevo a través de un pico, en un proceso similar al descripto anteriormente.

La respuesta de la voltametría cíclica para una reacción de transferencia electrónica de una especie en solución puede modelarse teniendo en cuenta la velocidad de reacción de la especie electroactiva en la superficie del electrodo, su difusión y las posibles reacciones acopladas en el seno de la solución[5]. El modelo predice que la forma de

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

la curva es independiente de la velocidad de barrido de potencial para una especie reversible. El análisis de la voltametría cíclica puede conducir a obtener parámetros termodinámicos y el coeficiente de difusión.

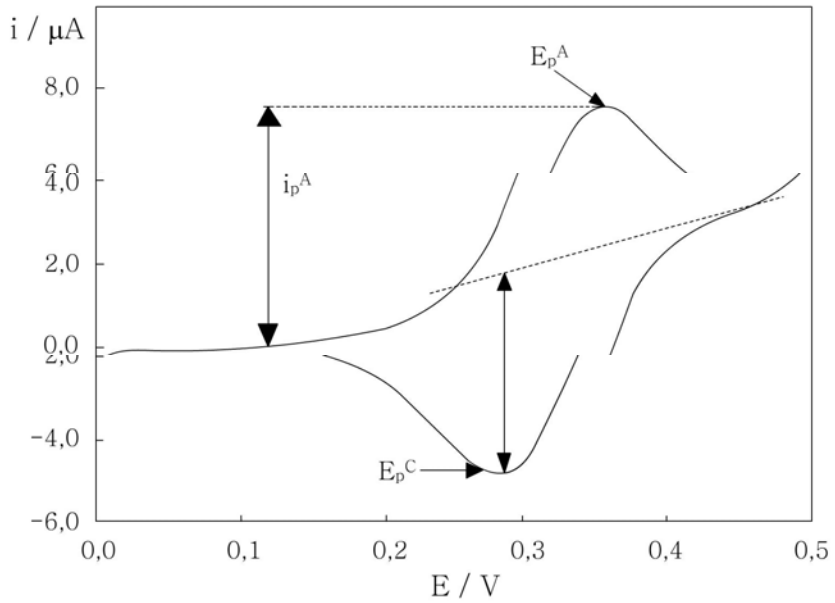


Figura 4. **Voltametría cíclica para un proceso reversible. E_p^C y E_p^A corresponden a los potenciales de pico catódico y anódico respectivamente. i_p^C e i_p^A son las corrientes de pico catódico y anódico.**

Para el caso de una especie que reacciona muy rápido con la superficie de un electrodo (caso reversible), el potencial formal para la cupla se encuentra a partir de:

(ii.3)

donde E_p representa el potencial de la corriente pico y los superíndices A y C a los procesos anódicos y catódicos, respectivamente. Mientras que el coeficiente de difusión se puede determinar a partir de graficar la corriente pico, i_p, versus la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, í, utilizando la ecuación de Randles-Sevcik, escrita a 298K,

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

* **(ii.4)**

donde la corriente de pico, i_p tiene la unidad Amper (A), el área del electrodo, *A* (cm^2), la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución, C^*_R, (mol cm^{-3}), el coeficiente de difusión, D_R (cm^2 s^{-1}) y la velocidad de barrido de potencial, *í* (V s^{-1}).

A partir de la forma del voltamograma experimental se puede comprobar la reversibilidad del sistema. Para una cupla reversible, se cumple que:

- **ÄEp = Ep^A – Ep^C = 59/n Mv**
- **$-j^C_p = j^A_p$**
- **i_p proporcional a *í* $^{1/2}$**
- **E_p independiente de *í***

En procesos electroquímicos superficiales tales como nucleación o en el caso de especies adsorbidas, la voltametría cíclica es una técnica muy usada para investigarlos y cuantificarlos.

Para el caso de especies adsorbidas, consideremos el caso más simple en el cual solamente las formas O y R se encuentran adsorbidas sobre el electrodo y son electroquímicamente activas en el intervalo de potencial de trabajo. Podemos despreciar los efectos de transporte de masa ya que las especies están confinadas en la interfaz. Si se tratara de un proceso reversible, la forma de la voltametría cíclica se muestra en la Figura 5. La principal diferencia entre voltametría cíclica de especies adsorbidas y la de especies en solución es que los picos son simétricos y más agudos.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

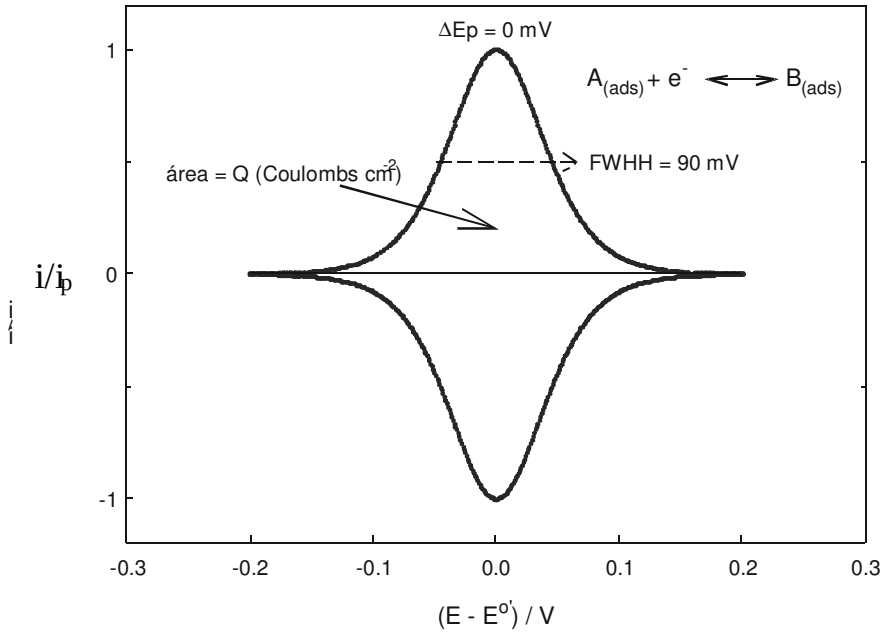


Figura 5. **Voltametría cíclica teórica para la oxido-reducción de una especie adsorbida donde las energías libres de adsorción de las especies O y R son iguales y la adsorción sigue la isoterma de Langmuir.**

La corriente aumenta desde cero hasta la corriente de pico y cae nuevamente a cero. Las cargas asociadas con los procesos anódicos y catódicos son iguales. La simetría de los picos ocurre porque solamente puede ser reducida la cantidad de reactivo(O) presente sobre la superficie del electrodo. Los valores de Ip, Ep y el ancho a media altura de los picos depende del tipo de isoterma de adsorción que posea el sistema y de las fuerzas relativas de adsorción de las especies O y R. Cuando la adsorción puede ser descripta por una Isoterma de Langmuir, se llega a que el potencial de pico anódico es igual al catódico y la densidad de corriente de pico está dada por la ecuación:

(ii.5)

donde Ã⁰ corresponde al exceso superficial de la especie O antes de comenzar el barrido. Puede observarse en la ecuación (ii.5) que la

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

corriente de pico es proporcional a la velocidad de barrido y no a la raíz cuadrada de la misma, como en el caso de especies en solución. El área bajo el pico de reducción corresponde a la carga asociada con el proceso de reducción de la especie O adsorbida, por lo que es posible obtener la cantidad de exceso superficial de O mediante la ecuación (ii.6)

— **(ii.6)**

En el caso de un sistema irreversible, el pico de ida no es simétrico y no se observa pico para el proceso inverso. Si el sistema fuera cuasirreversibles, existe pico de vuelta, pero no son simétricos y los potenciales de pico no coinciden.

Cuando una especie se encuentra unida al electrodo químicamente, éste recibe el nombre de electrodo químicamente modificado. Este tipo de electrodos han sido extensivamente estudiados por su aplicación en catálisis y determinación de analitos del tipo antígeno-anticuerpo. Su comportamiento es similar al mencionado anteriormente y su respuesta puede ser analizada de la misma manera.

Los procesos superficiales debidos a especies adsorbidas pueden estar combinados con procesos debidos a especies que difunden desde la solución. Un ejemplo de este tipo es la reducción de protones sobre el electrodo de platino.

Los procesos de deposición también presentan una voltametría cíclica característica donde se observan entrecruzamiento de los picos y el pico de vuelta es agudo y simétrico debido a que el material electroactivo está siendo depositado sobre el electrodo.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

II.2.6. Espectrometría electroquímica de impedancia.(EEI)[6]

La espectroscopía de impedancia es una técnica muy interesante para estudiar sistemas y procesos electroquímicos. Frente a otras técnicas presenta la ventaja de que no es destructiva y puede ser usada para investigar procesos tanto en el seno de la solución como en la interfase con constantes de tiempo del orden de minutos hasta microsegundos. Las técnicas de barrido de potencial comentadas anteriormente, normalmente colocan a los electrodos en condiciones alejadas del equilibrio, en cambio, los métodos de impedancia se basan en la perturbación del electrodo con una señal alterna de pequeña magnitud permitiendo realizar medidas en el equilibrio o estado estacionario. La perturbación se realiza sobre el potencial aplicado, además esta perturbación es de forma sinusoidal, de la forma:

(ii.7)

donde V_t es el voltaje aplicado a un determinado tiempo t, V_o es la amplitud máxima del voltaje y es la frecuencia en Hz. La respuesta en corriente obtenida también es sinusoidal a la misma frecuencia pero desplazada en fase:

(ii.8)

donde I_t es la corriente a un determinado tiempo t, I_o es la amplitud de la corriente y es el desplazamiento de fase de la corriente frente al voltaje aplicado.

La impedancia se define de manera análoga a la resistencia en el caso de un circuito de corriente continua como:

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

— **(ii.9)**

y a partir de esta definición, se observa que la impedancia tiene una magnitud y un desplazamiento de fase Ô y en notación compleja tiene la forma:

(ii.10)

donde j = î ¯ y Z' es la parte real y Z" la parte imaginaria de la impedancia.

Los valores de impedancia obtenidos experimentalmente se representan comúnmente en de dos formas, mediante los llamados diagramas Nyquist ó Bode, utilizando su carácter vectorial. En los diagramas Nyquist se representa la parte imaginaria de la impedancia frente a la real. Los diagramas Nyquist son muy útiles para obtener parámetros de los espectros de impedancia en el plano complejo. Pero la información que presentan no es completa puesto que no se puede saber la frecuencia a la que se midió el valor de impedancia, por lo que habría que etiquetar los datos con los valores de frecuencia a los que se han obtenido. Por su parte el diagrama Bode suele representar el ángulo de fase y el logaritmo de la magnitud de la impedancia frente al logaritmo de frecuencia, aunque a veces se representa el logaritmo de las partes real e imaginaria frente al logaritmo de la frecuencia, en cualquier caso, en el diagrama Bode sí que se representa toda la información obtenida mediante las medidas de impedancia.

El tratamiento de los datos obtenidos se puede realizar de dos formas, bien obteniendo la ecuación de la función de transferencia a partir de la información de los procesos involucrados o bien mediante la obtención de un circuito equivalente que reproduzca el espectro de

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

impedancia obtenido durante el experimento. Estos circuitos están formados por elementos eléctricos como resistencias, condensadores, etc. Que reproducen el comportamiento de los procesos reales como la resistencia del electrolito entre los electrodos referencia y trabajo, la doble capa que se forma en la interfase electrodo\disolución o la transferencia de carga que ocurre durante un proceso farádaico. La Figura 6 muestra los circuitos equivalentes para los diagramas de Nyquist obtenidos.

Es importante destacar que en este trabajo de tesis solo fueron estudiados los patrones de respuestas de las superficies estudiadas por esta técnica tomando así solo los valores de Z' y Z" a las frecuencias de trabajo, sin analizar a detalle el diagrama de Nyquist o el de Bode, ya que los procesos estudiados en este trabajo son complicados y difíciles de representar en forma de circuito eléctrico. Estos patrones de respuestas obtenidos fueron analizados por métodos multivariados para clasificar y discriminar entre diferentes muestras.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

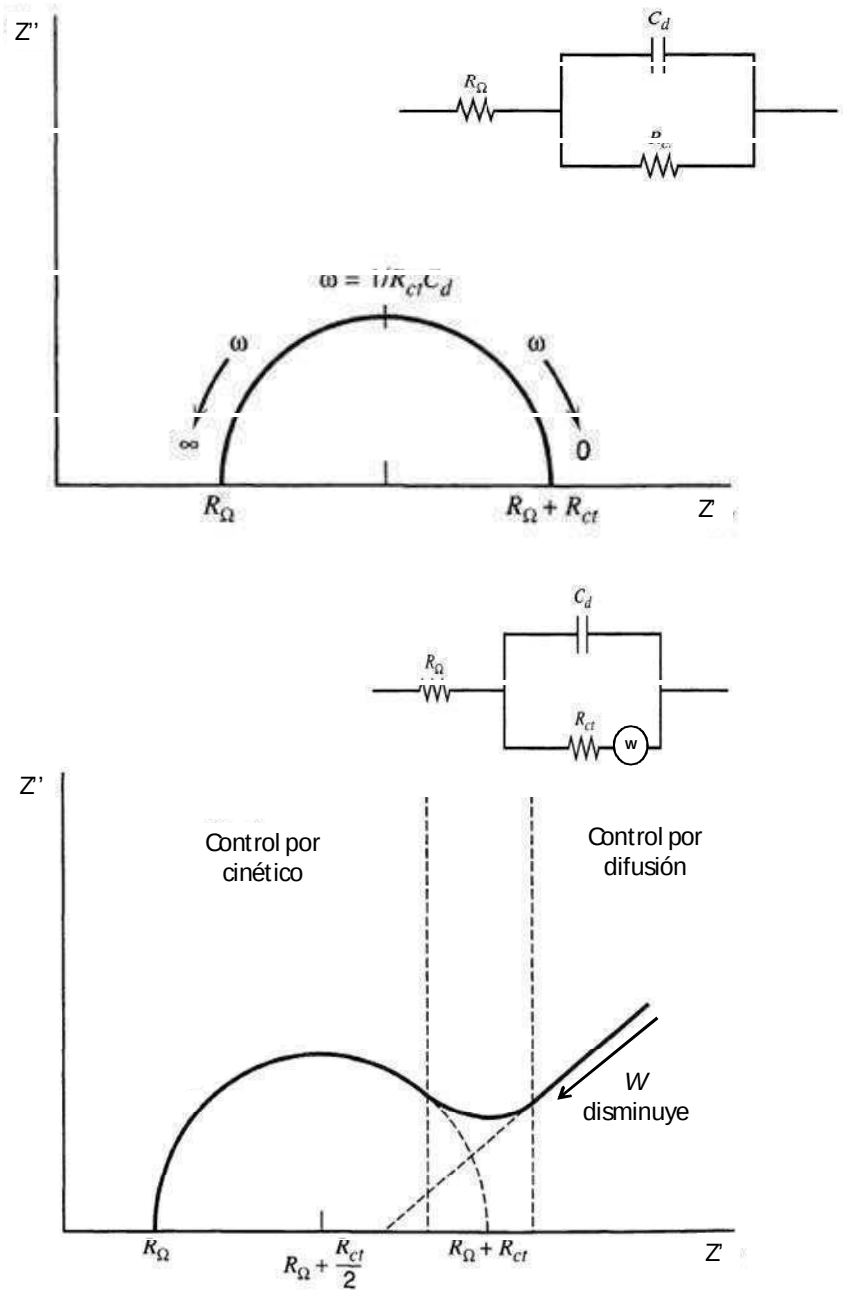


Figura 6. **Diagrama Nyquist y circuito equivalente de una celda electroquímica y un proceso simple O + n e- ⟶ R, a)sin difusión, b) con difusión.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

II.3. Técnica gravimétrica.

II.3.1. Microbalanza electroquímica de cristal de Cuarzo.

La microbalanza de cristal de cuarzo (EQCM) es un detector de masa que utiliza una oblea (disco) de cuarzo con oro depositados en ambas caras de la misma. Puede ser usada en solución y sirve para estudiar fenómenos interfaciales en electroquímica. Esta técnica es muy sensible a los cambios de masa en una interfase solución-sólido.

La oblea de cuarzo es un material piezoeléctrico que se deforma suavemente como respuesta a un campo eléctrico aplicado[7]. Hay muchos materiales que se comportan de esta manera, sin embargo el cuarzo tiene propiedades químicas, eléctricas y mecánicas que lo hacen el material piezoeléctrico más utilizado[8]. Los electrodos en ambas caras del disco se usan para inducir una oscilación de campo eléctrico perpendicular a la superficie de la oblea. Esta oscilación produce una oscilación mecánica en toda la oblea de cuarzo, como se muestra en la Figura 7.

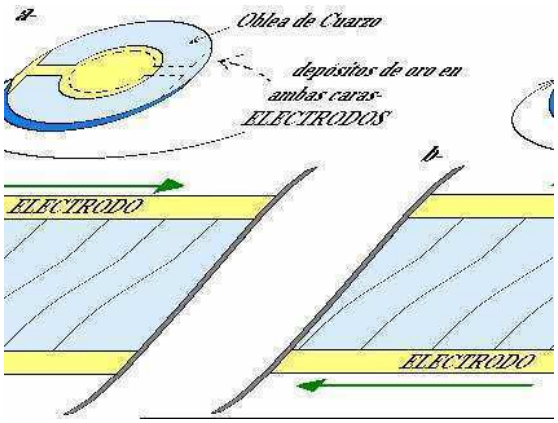


Figura 7. **a) Cristal de cuarzo con los depósitos de oro en ambas caras (electrodos) b) Deformación mecánica durante la oscilación del campo eléctrico a la frecuencia fundamental.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Para que la información obtenida con EQCM se refiera sólo a cambios de masa, la monocapa o la película delgada depositada sobre el cristal de cuarzo debe tener un comportamiento rígido. Las películas rígidamente acopladas, se mueven sincrónicamente con el cristal de cuarzo y la frecuencia del dispositivo piezoeléctrico disminuye linealmente con la masa depositada sobre el cristal[9]. Cuando la película no se acopla rígidamente al cristal de cuarzo, la respuesta del cristal depende del espesor y de las propiedades viscoelásticas de la capa depositada debido a una desigualdad en la velocidad de propagación de la onda acústica en el cuarzo y en la película superficial[8] y a la atenuación de la onda resonante.

En 1959, Sauerbrey[8] relacionó el cambio de frecuencia de resonancia (Δf_S) de un cristal de cuarzo piezoeléctrico con la masa depositada sobre la superficie del cristal mediante la relación mostrada en la ecuación 11, válida cuando $\Delta f_S << f_S$:

$$\Delta f = \frac{\Delta f}{\sqrt{\rho}} \qquad \text{(ii.11)}$$

donde Δf es el cambio de frecuencia medido, f_S es la frecuencia resonante del cristal, Δm es el cambio de masa, A el área activa piezoeléctrica, ρ_Q es la densidad del cuarzo y μ_Q es el coeficiente elástico. De acuerdo con los valores dados por el fabricante la ecuación anterior, con el equipo utilizado en este trabajo de tesis,se puede representar de la siguiente manera:

$$\Delta f = \text{Hz}\ \mu g^{-1} cm^2 \cdot \Delta m \qquad \text{(ii.12)}$$

La ecuación de Sauerbrey supone una película rígida con densidad de velocidad de transmisión de la onda acústica idéntica a la del cristal

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

de cuarzo. También supone que el depósito es uniforme, y que la sensibilidad de EQCM no es uniforme a lo largo de la dirección radial del cristal de cuarzo resonante, con sensibilidad máxima en el centro del mismo[10]. Esta aproximación ha sido muy usada en medidas gravimétricas en fase gaseosa, como en la evaporación de metales.

Los dispositivos piezoeléctricos sumergidos en líquidos viscosos[11] también responden a cambios de masa. La frecuencia de resonancia de resonadores de cuarzo de corte AT sumergidos en líquidos depende de las propiedades globales del líquido (densidad, viscosidad y conductividad) y de las propiedades interfaciales de la interfaz sensor-líquido (mojabilidad, rugosidad de la superficie, módulo de corte, etc).

Las propiedades eléctricas del cristal de cuarzo sin carga pueden ser descriptas por un circuito equivalente conocido como Butterworth, Van y Dyke (BVD)[8] mostrado en la Figura 8. Este circuito está formado por una rama móvil que consta de un circuito RLC en paralelo con una rama estática formada por una capacidad C_0. La equivalencia eléctrica al modelo mecánico (masa, respuesta elástica y pérdidas de fricción del cristal de cuarzo) son la inductancia L, la capacidad C y la resistencia R, respectivamente.

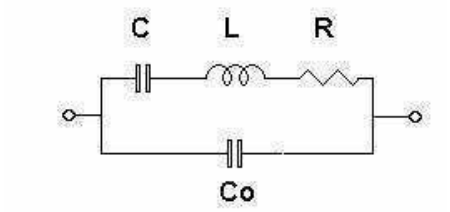


Figura 8. **Representación gráfica del circuito equivalente de Butterworth-Van Dyke (BVD).**

La capacitancia estática en paralelo con la rama móvil, C_0 posee tres contribuciones: la capacidad eléctrica del compensador de placas paralelas formado por ambos electrodos que intercalan al cristal de

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

cuarzo ($C^{0'}$), la capacitancia parásita de pérdida debido a los conectores (C_P) y la capacidad de la doble capa eléctrica (C_{dl}) cuando el metal de los electrodos está en contacto con una solución electrolítica acuosa.

En la rama serie del circuito eléctrico equivalente, L es proporcional a la masa inercial del cristal, C es la energía que guarda el cristal de cuarzo durante la oscilación y R representa las pérdidas por fricción del cristal de cuarzo.

Como ya dijimos, los cristales de cuarzo de corte AT sumergidos en líquidos, también son afectados por la viscosidad, densidad y conductividad del líquido. Para un líquido Newtoniano es necesario agregar una inductancia L1 y una resistencia R1 adicionales en la rama serie del circuito BVD. Algunos valores típicos para los elementos equivalentes eléctricos de un cristal de 10 MHz de corte AT montado en la celda de medición son: C = 33 fF, R= 10 Ù, L= 30 mH, C0= 1-10 pF y R= 400 Ù para agua.

En muchos casos el cambio de frecuencia producido por el líquido se suma al cambio de frecuencia debido a un cambio de masa en la superficie del cristal. En esos casos ha sido posible seguir la adsorción de biomoléculas o fenómenos de electrodeposición y stripping, permitiendo llevar a cabo microgravimetrías en contacto con líquidos.

Recientemente, el tratamiento se extendió a dispositivos piezoeléctricos en contacto con medios viscoelásticos: líquidos y polímeros. Se comprendió entonces que si la masa depositada no se encuentra acoplaba rígidamente al cristal de cuarzo durante la oscilación, no es posible la separación de la masa inercial y de las medidas de pérdida de energía realizando mediciones sólo a la frecuencia de resonancia. La impedancia del cristal de cuarzo en el intervalo de

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

frecuencias acústicas fue introducida para estudiar la masa y los cambios viscoelásticos y para ello se realizó una caracterización eléctrica completa del comportamiento del cristal cerca de la resonancia empleando analizadores de impedancia o analizadores de redes que operan en el intervalo de frecuencias de MHz[12]. Dado que la onda acústica transversal penetra la película superficial y el líquido viscoso, la aditividad de los elementos eléctricos equivalentes en el circuito de BVD es sólo válida bajo ciertas condiciones particulares. Martin y colaboradores estudiaron la impedancia cerca de la resonancia de cristales cubiertos con películas poliméricas, en aire, con un modelo BVD modificado para considerar las propiedades viscoelásticas de la película[13,14].

El uso de las técnicas de impedancia acústica para describir los cambios de volumen y los cambios viscoelásticos en películas de polímeros, en aire o en contacto con líquido, electrolitos y bajo transformaciones electroquímicas simultáneas ha sido ampliamente discutido en la bibliografía[15-20].

II.4. Técnicas ópticas y espectroscópicas.

II.4.1. Deflectometría por gradientes de concentración (Probe beam deflection, PBD).

Desde hace más de 50 años se ha demostrado la posibilidad de utilizar fenómenos ópticos de interferencia y refracción para la detección de perfiles de concentración en interfases sólido/líquido y líquido/líquido. R. Muller[21] en su trabajo resume las técnicas interferométricas aplicadas al estudio de interfases electrodo/electrolito. Ya en 1937, Lamm[22] describió la aplicación de métodos de refracción

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(deflexión) para el estudio de gradientes de concentración y para determinar coeficientes de difusión.

Los métodos de refracción han sido más explotados que los métodos interferométricos quizás debido a que estos últimos requieren un arreglo experimental más complejo. Por otro lado, los métodos de deflexión tienen la ventaja de que pueden usarse fuentes de láser económicos que proveen un haz estrecho y altamente estable, además de poseer un desarrollo de detectores de posición económicos y fáciles de implementar. Royce[23], Pawliszyn[24-26] y Russo[27] y sus colegas estudiaron la aplicación de los métodos de refracción para la investigación de interfases electrodo/electrolito. Esta técnica recibe el nombre de efecto mirage o deflectometría por gradientes de concentración (PBD). La espectroscopia fototérmia de deflexión (PDS) es la técnica precursora a PBD.

Mandeleis y Royce[28] realizaron un cálculo detallado del camino de un haz láser sobre el perfil de concentración en la interfase electrodo/ electrolito. Por otro lado, Decker y colaboradores[28-31] desarrollaron una descripción teórica de la técnica PBD aplicada a experimentos galvanodinámico ac y dc, principalmente para aplicaciones fotoelectroquímicas. Barbero y colaboradores[32] desarrollaron un modelo teórico para describir el comportamiento de PBD en procesos discontinuos, tales como la aplicación de saltos de potencial para determinar coeficientes de difusión iónica. Las reacciones discontinuas representan casos típicos de procesos electroquímicos tales como el intercambio iónico de películas electroactivas y la formación y disolución de monocapas[32]. Este tratamiento incluye descripciones teóricas simples basadas en óptica geométrica.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tanto las técnicas de deflexión como de interferencia dedicadas a describir la interfase electrodo/electrolito utilizan los perfiles de índice de refracción que se establecen cerca de la superficie del electrodo como consecuencia del consumo o de la generación de especies solubles en el electrolito. Como consecuencia del cambio en el índice de refracción, se altera el recorrido óptico con lo cual cambia el patrón de interferencia. En el caso de PBD, los cambios en el índice de refracción causan la deflexión del haz de prueba que se encuentra alineado y paralelo a la superficie de un electrodo plano. Debido a que la concentración del electrolito y el índice de refracción son directamente proporcionales, la generación de iones produce un aumento en el índice de refracción cerca de la superficie del electrodo el cual decae hacia el seno de la solución. En este caso, el haz de prueba es deflectado hacia la región con mayor índice de refracción, esto es, hacia la superficie del electrodo. Esta situación se muestra esquemáticamente en la Figura 9. Según los ejes coordenados x, y y z, una deflexión hacia la superficie del electrodo queda definida como una deflección negativa ψ(-).

La deflexión de un haz láser que viaja paralelo y muy cerca de la superficie del electrodo, esta dado por la siguiente ecuación:

— — — **(ii.13)**

donde n/ c describe la relación entre el índice de refracción n y la concentración del electrolito, c; w representa el camino óptico sobre el cual el haz de láser interactúa con el perfil de concentración y es la variación de la concentración con la distancia (gradiente de concentración). La ecuación se cumple para ángulos pequeños y bajo consideraciones de la óptica geométrica[21].

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

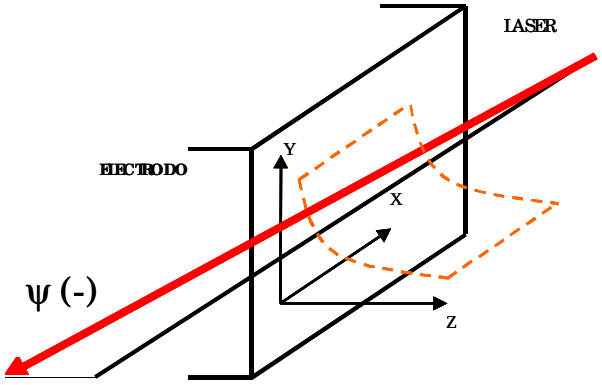


Figura 9. **Esquema de deflexión de un haz y definición de los ejes coordenados.**

El signo de la deflexión del haz da idea acerca del tipo de flujo neto (desde o hacia la superficie del electrodo) que acompaña a la reacción electroquímica[33,34]. Combinando el signo con la medida simultánea de la corriente en la voltametría cíclica o el transitorio de corriente debido a un salto de potencial puede definirse el tipo de carga de ion (anión o catión) que se está intercambiando principalmente.

II.4.2. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, también denominada espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA), es uno de los diferentes tipos de espectroscopía de electrones, como la espectroscopia Auger, de impacto electrónico y la espectroscopía fotoeléctrica ultravioleta. El principio de funcionamiento de la técnica consiste en la absorción de un fotón de rayos X por un átomo que produce, por lo general, un ion excitado y un electrón. El proceso puede describirse a través de la ecuación:

(ii.14)

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

donde A^{+*} representa el ion excitado formado cuando el elemento A interacciona con el fotón de rayos h . La relajación del ion excitado puede producirse de dos formas. Estas son:

(ii.15)

ó

(ii.16)

En este caso, los subíndices indican que las energías del fotón resultante son distintas de sus correspondientes en la primera ecuación.

El primer proceso de relajación es el fundamento de los métodos de fluorescencia de rayos X. El segundo se denomina emisión de electrones Auger y es el fundamento de la técnica homónima.

En XPS, se utiliza una fuente monocromática de rayos X y se mide la energía cinética de los electrones desprendidos de la muestra (e_1 en la primera ecuación) a través de un espectrómetro de electrones. La energía cinética E''_k del electrón emitido se utiliza para calcular la energía de unión del electrón a través de la ecuación:

(ii.17)

La energía de unión es propia para un electrón de cada elemento y por consiguiente, es útil con fines de identificación.

Las energías de unión de los electrones K y L están influidas en no muy fuertemente por los electrones de enlace externos, dado que éstos influyen en el campo de fuerza del núcleo Por lo tanto, las energías de unión varían ligeramente en función del estado de oxidación de un

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

elemento, así como con la naturaleza del elemento o los elementos con los cuales se combina.

Es importante destacar que esta es una de las técnicas más empleadas para la caracterización de polímeros. Una de las ventajas que ofrece esta técnica es que da la composición de la muestra por elemento y da también información cuantitativa, lo cual permite obtener una estequiometria[35-43].

II.5. Técnicas de análisis estadísticos.

II.5.1. Análisis multivariado.

Podemos definir las técnicas Multivariados como, un conjunto de métodos estadísticos que permiten el análisis de forma simultánea de más de dos variables observadas en una investigación. Desde una concepción amplia podemos definir el análisis multivariado como un conjunto de métodos que analizan las relaciones entre un número razonablemente amplio de variables (medidas), tomadas sobre cada elemento de análisis, en una o más muestras simultáneamente.

El análisis multivariado es de aplicación en la investigación, en las siguientes circunstancias:

- **Reducción de datos. Se trata de simplificar la estructura del fenómeno investigado buscando la mayor simplicidad, lo que permitirá una interpretación muy fácil, como por ejemplo análisis de componentes principales (ACP).**

- **Clasificación y agrupación, como por ejemplo análisis de conglomerados (AC).**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

- **Análisis de las relaciones de dependencia.**

- **En la construcción de modelos, como por ejemplo análisis discriminante multivariado (ADM).**

Los diferentes métodos de análisis multivariado no solo difieren entre sí por el objetivo o tipo de resultados obtenidos sino que existen ya diferencias en la tabulación, forma de codificar y en el trabajo con las variables ya que algunos métodos pueden trabajar con variables nominales, mientras que otros solo lo hacen con variables ordinales y métricas.

Una clasificación de gran utilidad es el diferenciar las técnicas multivariadas en dos grupos básicos: métodos descriptivos o de interdependencia y métodos explicativos o de dependencia.

II.5.1.1. Métodos explicativos o de dependencia (métodos supervisados)[44,45]

Se emplean en contextos de investigación experimentales. En estas técnicas consideramos a las variables independientes como causas potenciales de las variables dependientes. Su objetivo es contrastar hipótesis relativas. Por ejemplo: regresión lineal, análisis discriminante, regresión logística, modelos de respuesta probit, logic, modelos loglineales, entre otros. De los cuales solo se explicara el análisis discriminante, ya que será utilizado en este trabajo de tesis.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Análisis discriminante[46,47]

Se utiliza en los casos en los que la muestra pueda dividirse en grupos conocidos de antemano (como variables politómicas y dicotómicas), siempre que los predictores sean variables escalares.Sus objetivos son:

- **Calcular la probabilidad de que los individuos pertenezcan a uno u otro de los grupos a partir de los predictores.**

- **Determinar cuáles de las variables predictoras son realmente útiles (ya que algunos pueden resultar innecesarios).**

II.5.1.2. Métodos descriptivos o de interdependencia (métodos no supervisados)[46-48]

Se emplean en contextos de investigación experimentales. En estas técnicas consideramos a las variables independientes como causas potenciales de las variables dependientes. Su objetivo es contrastar hipótesis relativas. Por ejemplo: como análisis de conglomerados, análisis factorial, análisis de componentes principales, análisis de correspondencias simples y múltiples, etc. De los cuales se explicara el análisis de conglomerados y análisis de componentes principales, ya que será utilizado en este trabajo de tesis.

Análisis de conglomerados[46,47]

Esta técnica consiste en clasificar individuos o variables semejantes entre sí en las variables que hemos medido sin un criterio de clasificación a priori. Permite agrupar individuos o variables en función de su semejanza.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Análisis de componentes principales[48]

Su objetivo es reducir los datos a partir de las correlaciones para encontrar un número reducido de factores que los expliquen. En las etapas se miden las variables, se computan las correlaciones y arreglan en una matriz para posteriormente extraer los factores (que son combinaciones lineales de las variables). A veces es necesario rotar los ejes de coordenadas para interpretar los resultados de forma más efectiva.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

II.6. Referencias.

(1) R. Pletcher, R. Greef, R. Peat, L.M. Peter and J. Robinson, *Southampton Electrochemistry Group, University of Southampton, Instrumental Methods in Electrochemistry* (ed. 2nd), Horwood Publishing, Chemical Science Series, Inglaterra, (2001)

(2) A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications* (ed. 2nd), Wiley & Sons Inc.: New York,(2001).

(3) A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications* (ed. 2nd), Wiley & Sons Inc.: New York,(2001). Chapter 5.

(4) A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications* (ed. 2nd), Wiley & Sons Inc.: New York,(2001). Chapter 6.

(5) R. S. Nicholson and I. Shain, *Anal. Chem.* 36 (1964) pp. 706-723.

(6) A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications* (ed. 2nd), Wiley & Sons Inc.: New York,(2001). Chapter 10.

(7) D. A. Buttry and M. D. Ward, *Chem. Rev.* 92 (1992) pp. 1355-1379.

(8) G. Sauerbrey, *Z. Phys.* 155 (1959) pp. 206-222.

(9)M. Yang, M. Thomson and W. C. Duncan Hewitt, *Langmuir* 9 (1993) pp. 802-811.

(10) H. D. Hillier and M. D. Ward, *Anal. Chem.* 64 (1992) pp. 2539-2554.

(11) K. K. Kanazawa and J. G. Gordon, *Anal. Chim. Acta*, 175 (1985) pp. 99-105.

(12) A. Janshoff, H. J. Galla and C. Steinem, *Angew. Chem. Int.*, 39 (2000) pp. 4004-4032.

(13) S. J. Martin and G. C. Frye, *Proc. IEEE Ultrasonics Symp. IEEE.* New York (1991) pp. 393-398.

(14) S. J. Martin, V. E. Granstaff and G. C. Frye, *Anal. Chem.* 63 (1991) pp. 2272 –2281.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(15) H. Muramatsu and K. Kimura, *Anal. Chem.* 64 (1992) pp. 2502-2507.

(16) R. A. Etchenique and E. J. Calvo, *Anal. Chem.* 69 (1997) pp. 4833-4841.

(17) E. J. Calvo, R. Etchenique, P. N. Bartlett, K. Singhal, C. Santamaria, *Faraday Discuss.* 107 (1997)pp.141-157.

(18) Doris E. Grumelli, Erica S. Forzani, Gustavo M. Morales, María C. Miras, Cesar A. Barbero, and Ernesto J. Calvo, *Langmuir* 20 (2004), pp. 2349-2355.

(19) R. M. Q. Mello, R. M. Torresi S. I. Córdoba de Torresi and E. A. Ticianelli, *Langmuir* 16 (2000), pp. 7835-7841.

(20) L.P. Bauermann and P.N Bartlett, *Electrochim. Acta*, 50 (2005) pp. 1537-1546.

(21) R.H. Muller, *Advances in Electrochemisrty and Electrochemical Engineerring* (vol. 9), P. Delahay-C. W. Tobias, John Wiley & Sons, INC, New York, (1973).

(22) O. Lamm, *Nova Acta Regiae Scientiarium Upsaliensis*, Sr. IV 10, 1.(1937).

(23) B.S.H. Royce, D. Voss, A. Bocarsly, *Journal de Physique* (Paris), *Colloque 44* 10,(1983).

(24) J. Pawliszyn, M.F. Weber, M.J. Dignam, A. Mandelis, R.D. Venter and S. M. Park, *Anal. Chem.* 58 (1986) pp. 236-239.

(25) J. Pawliszyn, M.F. Weber, M.J. Dignam, S. M. Park, *Anal. Chem.* 58 (1986) pp. 239-242.

(26) J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 60 (1988) pp. 1751-1758.

(27) R.E. Russo, F.R. McLarnon, J.D. Apear and E.J. Cairos, *J. Electrochem. Soc.*134 (1987) pp. 2783-2787.

(28) A. Mandelis and B.S.H. Royce, *Applied Optics* 23 (1984) pp. 2892-2901.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(29) F. Decker, R.T. Neuenschwander, C.L. Cesar and A.F.S. Fenna, *J. Electroanal. Chem.* 228 (1987)pp. 481-486.

(30) F. Decker, M. Fracastoro- Decker, *J. Electroanal. Chem.* 243 (1988) pp. 187-191.

(31) M. Fracastoro-Decker and F. Decker, *J. Electroanal. Chem.* 266 (1989) pp. 215-225.

(32) C. Barbero, M.C. Miras and R. Kötz, *Electrochim. Acta* 37 (1992) pp. 429-437.

(33) C. Barbero, M.C. Miras, O. Hass, R. Kötz, *J. Electrochem. Soc.*,1991, 138, 669-672.

(34) O. Hass, *Faraday Disc. Chem. Soc.* 88 (1989) pp. 123-131.

(35) S. L. Hsu, A. J. Signorelli, G. P. Pez and R. H. Baughman, *J. Chem. Phys.*, 69 (1978) pp.106-111.

(36) J. G. Eaves, H. S. Munro and D. Parker, *Polym.Commun.*, 28 (1987) pp. 38-42.

(37) T. A. Skotheim, M. I. Florit, A. Melo and W. E. O'Grady, *Phys. Rev. B*, 30 (1984) pp 4846-4849.

(38) E. T. Kang, K. G. Neoh, T. C. Tan, S. H. Khor and K. L. Tan, *Macromolecules*, 23 (1990), pp 2918- 2926.

(39) P. Snauwaert, R. Lazzaroni, J. Riga, J. J. Verbist and D. Gonbeau, *J. Chem. Phys.*, 92 (1990) pp. 2187-2193.

(40) K. L. Tan, B. T. G. Tan, E. T. Kang and K. G. Neoh, *J. Chem. Phys.*, 94 (1991) pp. 5382-5388.

(41) E. T. Kang, K. G. Neoh, Y. K. Ong, K. L. Tan and B. T. G. Tan, *Macromolecules*, 24 (1991). pp. 2822-2828.

(42) **G. Morea, L. Sabbatini, P. G. Zambonin, A. J. Swift, R. B. West and J. C. Vickerman, *Macromolecules*, 24 (1991) pp. 3630-3637.**

(43) M. J. Obrzut and F. E. Karasz, *Macromolecules*, 22 (1989) pp. 458-464.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(44) S. M. Scott, D. James and Z. Ali, *Microchim. Acta* 156 (2007), pp. 183–207.

(45) L.A Berrueta, R.M. Alonso-Salces and K. J. Héberger, *Chromatogr. A*, 1158 (2007), pp. 196-214.

(46) R.A. Johnson and D.W Wichern, *Applied Multivariate Statistical Analysis*, Prentice Hall, New Jersey, 2002.

(47) A.Struyf, M. Hubert and P.J. Rousseeuw, *Comput. Statist. Data Anal.* 26 (1997), pp. 17-37.

(48) L. Kaufman and P.J Rousseeuw, *Statistical Data Analysis Based on the L1 Norm. In: Cl ustering by means of medoids.*, Y. Dodge (Ed.); North-Holland, Amsterdam, 1987.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Capítulo III

Introducción

Materiales y métodos experimentales

Resultados

Caracterización electroquímica de PSA

Determinación de ácido ascórbico

Sensor amperométrico de ácido ascórbico

Discusión y conclusiones

Referencias

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

III.1. Introducción

El ácido ascórbico se encuentra presente en las frutas y los vegetales. La relevancia de esta molécula se debe a que se encuentra involucrada en múltiples procesos: la respuesta del sistema inmune[1], la absorción del hierro en sangre[1], y también porque se encontró que sus niveles de concentración puede ser utilizados para evaluar el estrés en animales y plantas[2,3]. Por lo tanto su cuantificación resulta de interés en diversas áreas, desde la investigación básica hasta en medidas de control de calidad en la industria farmacéutica y alimentaria.

La oxidación electroquímica directa de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico es posible solo a sobrepotenciales. El potencial normal de la cupla es -0.145 V[4] con respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl, pero la oxidación sobre electrodos de carbono vítreo y platino requiere potenciales de 0.45 V para carbono vítreo y 0.65 V para platino vs. Ag/AgCl[4]. Este hecho dificulta la cuantificación, dado que la necesidad de trabajar a estos altos valores de potencial trae como consecuencia la oxidación de otros componentes que pueda contener el sistema, incluyendo reacciones que envenenan la superficie del electrodo. En consecuencia, la técnica posee baja selectividad, poca sensibilidad y limitada reproducibilidad, por lo cual raramente es utilizada para la cuantificación de este analito.

Uno de los métodos electroquímicos utilizados con más éxito se basa en la combinación de la cromatografía liquida de alta eficiencia con detección electroquímica (HPLCEC), el cual tiene un límite detección de 20 uM[5].

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Debido a los altos costos de la técnica descrita anteriormente y a las limitaciones que presentan los métodos electroquímicos en la determinación de ácido ascórbico, muchos grupos han desarrollado métodos basados en electrodos modificados con polímeros conductores logrando obtener superficies modificadas con PANI que logran catalizar la oxidación del ácido ascórbico en una solución de pH ácido y neutro a potenciales menores de 0.45V con respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl[6-11].

Otro gran avance en la determinación de ácido ascórbico por vía electroquímica fue el realizado por Bartlett[12], quien logró realizar la oxidación de ácido ascórbico a un potencial de 0.055 V y a pH neutro utilizando un electrodo de carbono vítreo que fue modificado con PANI dopada con poli(vinilsulfonato), teniendo limites de cuantificación entre 5 y 40 mM. De acuerdo a estos resultados y los obtenidos por otros grupos de investigación[6-13], resulta interesante diseñar una superficie capaz de catalizar la oxidación de ácido ascórbico a bajos potenciales y que sea capaz de detectar concentraciones del orden de uM de ácido ascórbico a pH fisiológico.

III.2. Materiales y métodos experimentales.

III.2.1. Materiales

Anilina, propanosultona, buffer tris y buffer fosfato provistos por Sigma –Aldrich Argentina. Todos estos reactivos son de calidad analítica salvo la anilina, que fue destilada al vacio para obtenerla con mayor grado de pureza. El ácido ascórbico, dopamina y acido úrico de calidad analítica fueron suministrado por Merck.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

III.2.2. Métodos.

III.2.2.1. Síntesis de N-(3-ácido propil-sulfónico) anilina (PSA).

La síntesis de PSA se llevó a cabo disolviendo con agitación constante 0.7 g de propanosultona en 2.5 ml de (anilina destilada previamente). Después de unos minutos se observo la formación de un precipitado blanco, este precipitado fue filtrado y posteriormente recristalizado en metanol/acetona.

Para comprobar la obtención del producto deseado se analizo el producto obtenido de la recristalización utilizando un RMN (Brukcer AC 200), el cual opera a 200 MHz para ^{1}H y usando como solvente agua deuterada, el producto también fue analizado utilizando un espectrómetro de masa Shimadzu (QP5050A) de impacto electrónico, el cual trabajo con un potencial de ionización de 70 eV.

III.2.2.2. Polimerización.

La polimerización fue llevada a cabo sobre electrodos de carbono vítreo de 3 mm de diámetro utilizando un bipotenciostato PINE Instruments AFRDE 5, utilizado en modo potenciostato. Las señales de corriente y voltaje fueron adquiridas en la computadora utilizando una tarjeta de adquisición de datos (LabPC 1200, Texas Instrument).

La polimerización secuencial fue llevada a cabo realizando voltametrías cíclicas entre -0.2 y 0.85 V vs Ag/AgCl con una velocidad de barrido de 10 mV/s. El primer paso se realizo realizando 6 voltametrías cíclicas en una solución 0.09M de anilina en ácido sulfúrico 1.8 M, una vez hecho esto el electrodo fue lavado con abundante agua milli Q y

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

sumergido en una solución de ácido sulfúrico 1.8 M y se le realizaron 2 voltametrías cíclicas para comprobar la presencia de PANI sobre la superficie del electrodo, luego se lavó el electrodo con abundante agua milli Q y se sumergió el electrodo en una solución de PSA 0.01 M en ácido sulfúrico 1.8 M y se realizaron voltametrías cíclicas de acuerdo con los pasos indicados en cada experimento (4,7,15 voltametrías).

La copolimerización electroquímica se realizo llevando a cabo (4, 7 y 15 dependiendo del experimento) voltametrías cíclicas entre -0.2 y 0.85 V vs Ag/AgCl con una velocidad de barrido de 10 mV/s en una solución de PSA y anilina con un total de concentración de co-monómeros igual a 0.1 M.

III.2.2.3. Determinación de ácido ascórbico.

La determinación de ácido ascórbico fue llevada a cabo por diferentes vías. La voltametría cíclica a una velocidad de barrido de 2 mV/s fue utilizada para observar la respuesta y sensibilidad a ácido ascórbico y el efecto de las posibles interferencias de los diferentes electrodos modificados. Los resultados de estos estudios se utilizaron para elegir el tipo de sensor y el potencial de trabajo para las determinaciones llevadas a cabo por medio de técnicas hidrodinámicas.

III.2.2.4. Técnicas hidrodinámicas.

La celda de inyección de flujo fue fabricada en acrílico donde la boca de entrada de flujo está ubicada al frente y separada del electrodo de trabajo por 0.5 mm, mientras que la boca de salida del flujo está ubicada al costado y separada del electrodo de trabajo por 1 mm. Como electrodo de trabajo fue utilizado un electrodo de carbono vítreo de 3 mm de diámetro. El contraelectrodo utilizado fue el tubo de salida de la celda

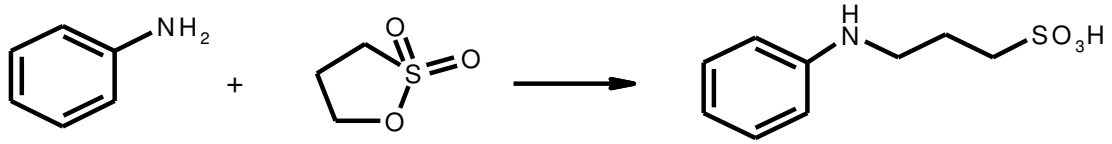
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

hecho de acero inoxidable y el electrodo de referencia de Ag/AgCl fue colocado aguas abajo, a la salida del flujo. El potencial de trabajo fue de 0 V vs Ag/AgCl. La muestra (10 ml buffer fosfato 100 mM pH=7) fue circulada continuamente a través de la celda con una velocidad de flujo de 1.5 ml/min. Para el sistema de inyección de muestra se utilizo un "*loop*" de 200 µl con la misma velocidad de flujo

III.3. Resultados.

III.3.1. Obtención del monómero N-(3-ácido propil-sulfónico) anilina (PSA).

Basado en los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo[14], se realizó la síntesis de un monómero derivado de anilina con propanosultona.



Esquema I. **Síntesis del monómero N-(3-ácido propil-sulfónico) anilina (PSA).**

La reacción entre la anilina y la propanosultona ocurre de manera muy sencilla, originando el monómero PSA, en donde se observa que un hidrógeno del grupo amino de la anilina es sustituido por la cadena alquílica.

Una vez purificado el monómero de PSA se le realizó un estudio por H^1-RMN en agua deuterada (Figura 1) y un análisis de espectrometría de masa (Figura 2).

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

En la Figura 1, se pueden ver las señales correspondientes a los valores de desplazamiento químico (ä): 2.15 (multiplete para dos hidrógenos), 2.95 (triplete para dos hidrógenos), 3.55 (triplete para dos hidrógenos), 7.5 (multiplete para cinco hidrógenos). Para la integración se tomó como referencia el multiplete de la zona aromática que corresponde a 5 hidrógenos.

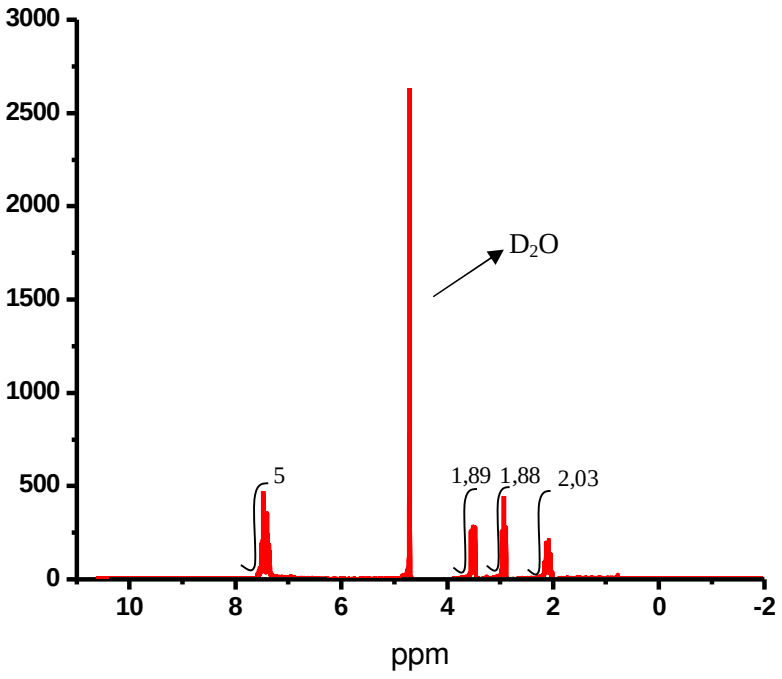


Figura 1. **RMN H¹ para PSA en agua deuterada.**

En la Figura 2 se observa claramente el ion molecular M^+=215 y las fragmentaciones típicas de este. La relación masa carga de este ion molecular corresponde al peso molecular del monómero, de acuerdo con esto y con los resultados obtenidos del RMN llevan a concluir que el producto obtenido es el PSA.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

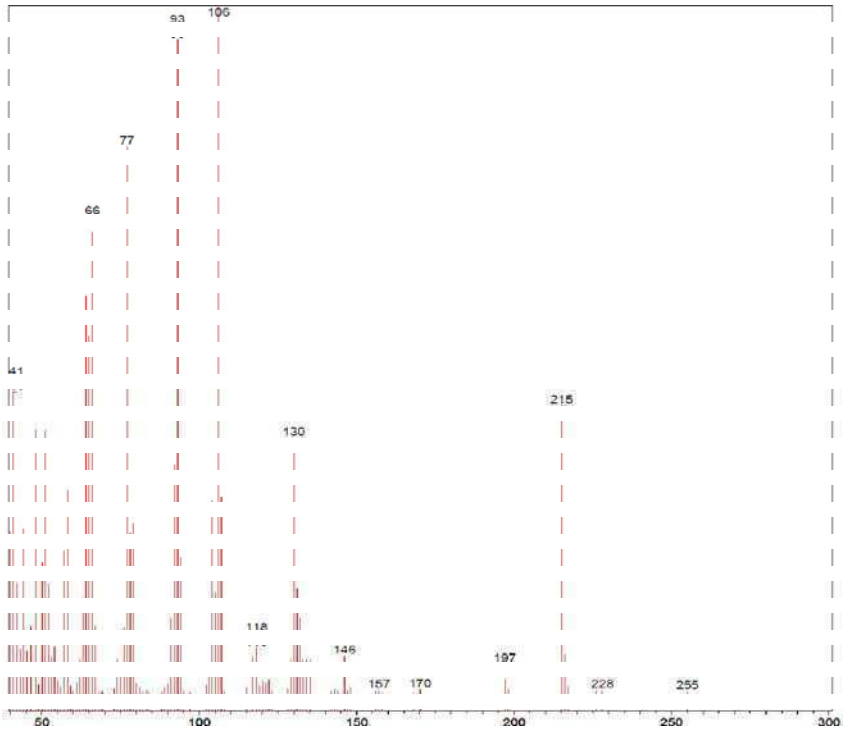


Figura 2. **Masas para PSA.**

III.3.1.1. Caracterización electroquímica de PSA.

Se estudió la respuesta electroquímica del PSA realizando su polimerización en medio ácido en las mismas condiciones en que se polimerizó la anilina (Figura 3)

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

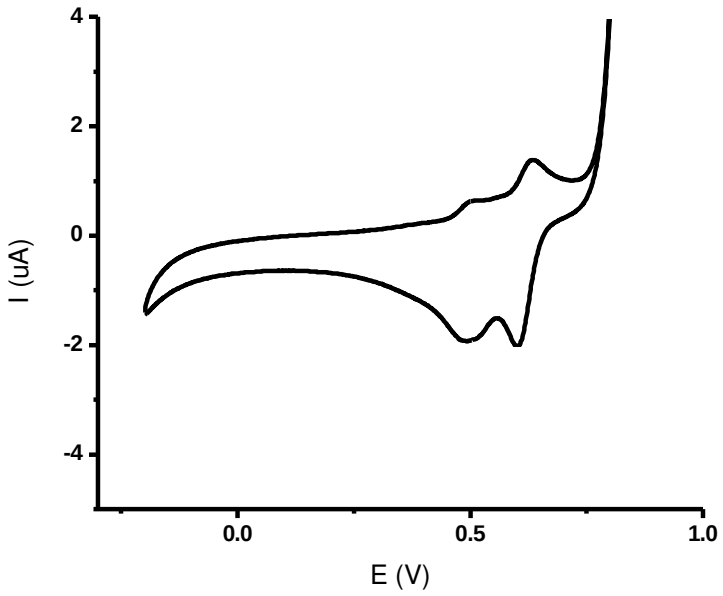


Figura 3. **Voltametría cíclica PSA de electropolimerizado sobre un electrodo de carbono vítreo en ácido sulfúrico 1.8 M a 10 mV s^{-1}.**

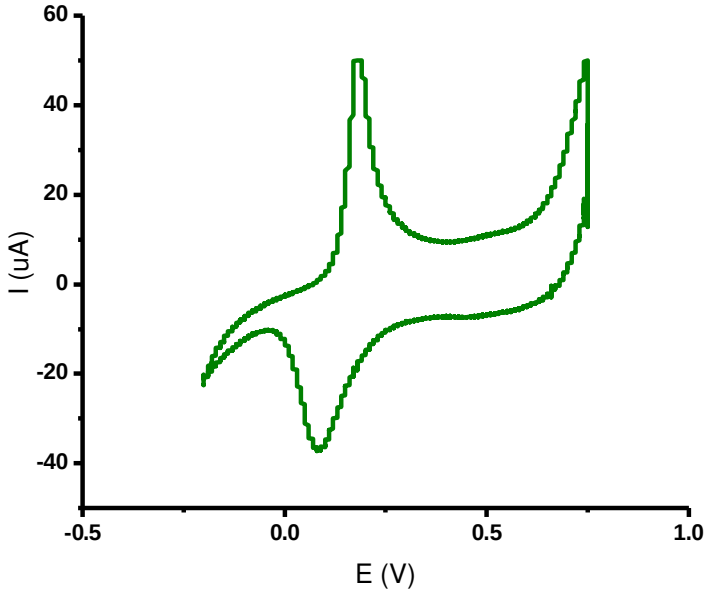


Figura 4. **Voltametría cíclica de PANI electropolímerizado sobre un electrodo de carbono vítreo en ácido sulfúrico 1.8 M a 10 mV s^{-1}.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

En la Figura 3 se puede ver claramente que el PSA presenta máximos de corriente en potenciales de 0.52 V, 0.7 V y 0.85 V, a diferencia de la PANI (Figura 4) que presenta máximos de corriente en potenciales de 0.22 V y 0.85 V.

Cuando se realizó la electrosíntesis del PSA utilizando la técnica de voltametría cíclica se observó que la señal iba aumentando a medida que se incrementaba el número de ciclos de la misma; esta tendencia se observó hasta el octavo ciclo a partir del cual se notó una disminución en la señal y la solución pasó de ser incolora a verde.Esto se debe a que el polímero depositado sobre la superficie del electrodo pasa de ser insoluble a soluble debido la incorporación de grupos sulfonatos presentes en el monómero. Este resultado indica que el polímero obtenido a partir del PSA no es útil para este trabajo, por lo que se procedió a realizar un estudio llevando a cabo una copolimerización con distintas proporciones de PSA:anilina (75:25, 50:50 , 25:75 y 10:90) .

Se pudo comprobar que cuando se trabajó con relaciones de concentraciones altas de PSA:Anilina (75:25, 50:50 y 25:75) se obtuvo un polímero con similares características al de poli-PSA puro. El crecimiento del polímero depende de la relación de PSA:anilina; para la solución que tiene una mayor concentración de PSA el crecimiento del polímero ocurre de manera más rápida. Esto indica que la activación y polimerización entre moléculas de PSA es mucho más rápida para la anilina pura, ya que la cadena alquilica (propilsulfonato) del PSA aporta densidad electrónica al nitrógeno y hace que esta molécula sea más reactiva.

Sin embargo, cuando se realiza esta copolimerización con la solución de concentración 10:90, se observó en la primera voltametría cíclica la aparición de los máximos de corriente de 0.52 V y 0.7 V, posteriormente se observa un rápido crecimiento del máximo de corriente

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

de 0.25 V, lo que nos indica que el PSA se incorpora a la cadena polimérica de la PANI, obteniendo así un polímero con características similares a la PANI a pH ácido (Figura 5).

A pH 7, el nuevo copolímero presenta un comportamiento más estable y reversible (Figura 6), respecto al observado para PANI, en similares condiciones (Figura 7).

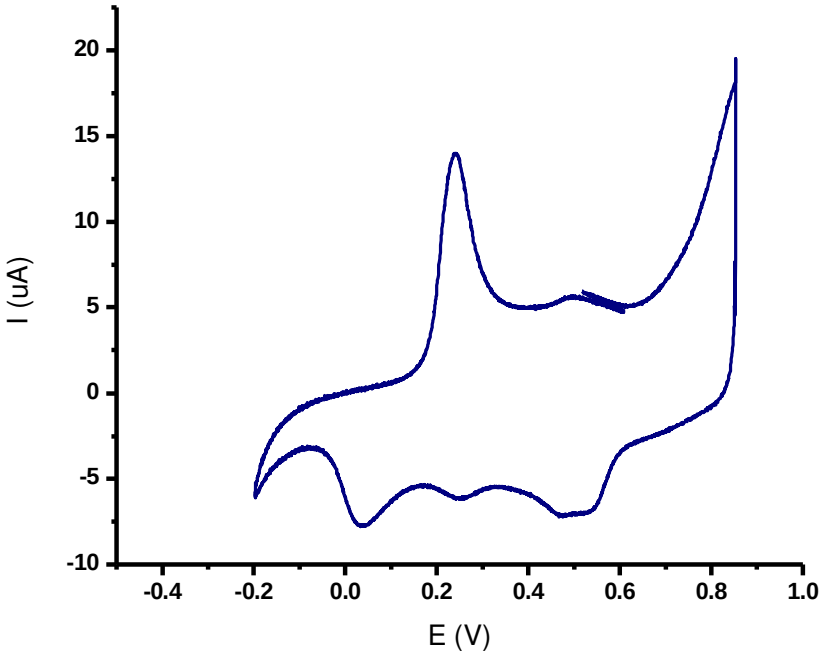


Figura 5. **Voltametría cíclica de PSA:Anilna (10:90) en ácido sulfúrico 1.8 M a 10 mV s^{-1} luego de ser electropolímerizado sobre un electrodo de carbono vítreo.**

La electroactividad de este copolímero a pH neutro se debe a que cuando se incorpora el monómero de PSA a la cadena polimérica este actúa como dopante generando cargas positivas cuando se encuentra oxidado en la superficie del electrodo. Así, se logra mantener la movilidad

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

de cargas a lo largo de la cadena polimérica permitiendo de esta manera el paso de electrones a través de ella. Esto no ocurre en el caso de la PANI, ya que cuando está en estado oxidado a pH neutro, se deprotona y pierde su capacidad conductora[15].

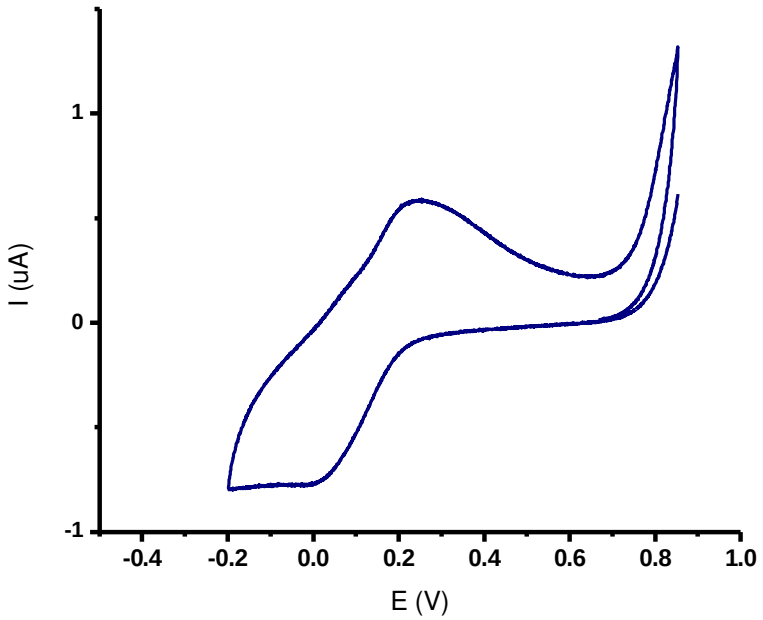


Figura 6. **Voltametría cíclica de PSA:Anilna (10:90) en buffer fosfato pH 7 100mM a 10 mV s^{-1} luego de ser electropolímerizado sobre un electrodo de carbono vítreo.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

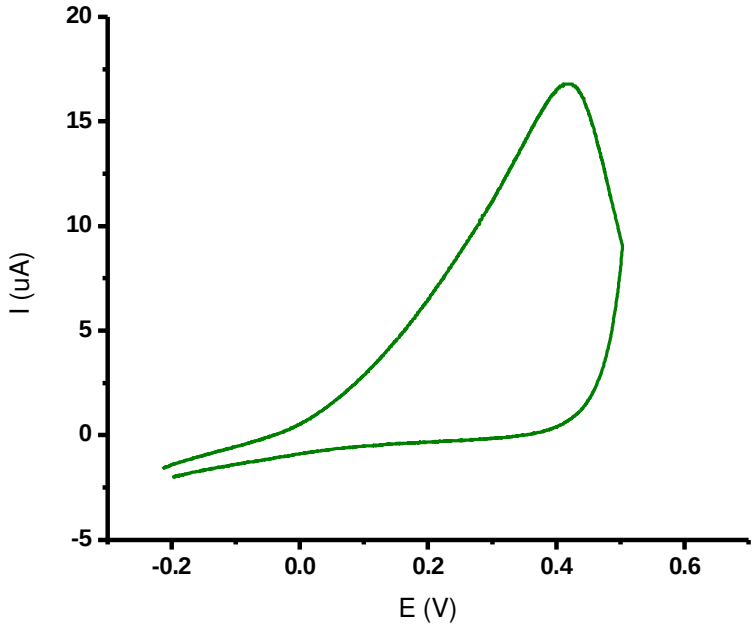


Figura 7. **Voltametría cíclica de PANI en buffer fosfato pH 7 100mM a 10 mV s^{-1} luego de ser electropolímerizado sobre un electrodo de carbono vítreo.**

Con el fin de tener un mejor control sobre el crecimiento del polímero, se estudió también la polimerización secuencial, electropolimerizando primero la anilina y luego PSA en distintas grados de cubrimiento.

En la Figura 8, se muestra que las respuestas electroquímicas de estas nuevas superficies es similar a la de la PANI a pH ácido (voltametrías hechas luego de la electropolimerización en ácido sulfúrico 2M), la única diferencia entre la superficie de PANI y la superficies obtenidas secuencialmente es que se observa un máximo de corriente muy suave entre 0.4-0.6V el cual va incrementando a medida que se aumenta la cantidad de PSA incorporado a la superficie. También se puede destacar que a medida que se incorpora el PSA a la superficie el máximo de corriente que se encuentra aproximadamente en 0.2V aumenta hasta la cuarta voltametría cíclica, luego de allí se observa

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

una pequeña disminución de esta señal y se va obteniendo un voltamograma con respuesta capacitiva originada por la gran cantidad de material con carga incorporado en la superficie del electrodo.

Cuando se estudiaron las respuestas de estas nuevas superficies a pH neutro (Figura 9) se logró observar que presentan mejoras en la respuesta amperométrica en comparación al comportamiento de la PANI (Figura 7), mostrando una respuesta electroquímica cuasi-reversible y estable en el tiempo. La estabilidad de estas superficies fue probada realizando voltametrías cíclicas entre -0.2 y 0.6V durante 40 minutos a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1}, donde solo se mostró una disminución asintótica en la corriente menor al 30% de la corriente original.

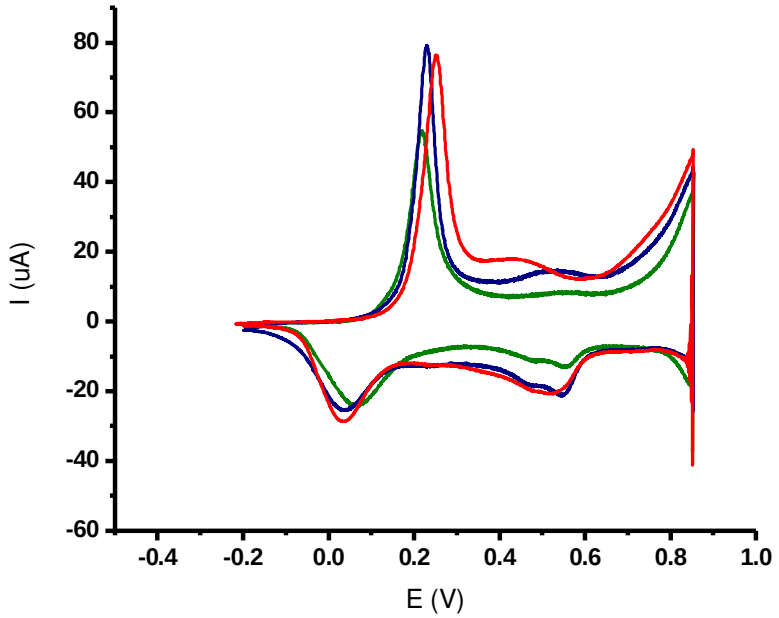


Figura 8.**Voltametría cíclica de las distintas superficies en ácido sulfúrico 1.8 M a 10 mV s^{-1} luego de ser electropolímerizadas sobre un electrodo de carbono vítreo. Verde PANI; Azul PANI/PSA 4; Rojo PANI/PSA 7.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

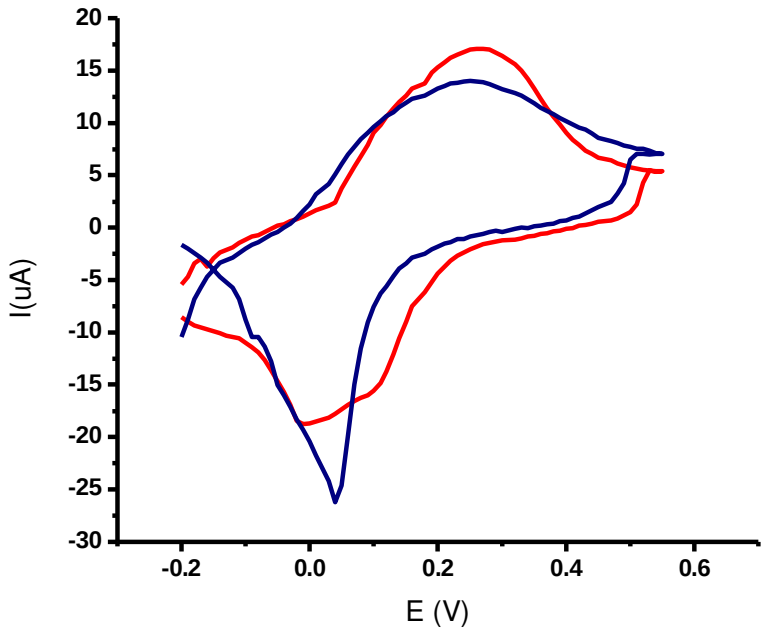


Figura 9. **Voltametría cíclica de las distintas superficies en buffer fosfato pH7100 mM a 10 mV s^{-1} luego de ser electropolimerizadas sobre un electrodo de carbono vítreo. Azul PANI/PSA 4; Rojo PANI/PSA 7**

III.3.2. Determinación de Ácido Ascórbico.

Ya cumplido el objetivo de obtener una superficie con características similares a la PANI y que presente una respuesta electroquímica cuasi-reversible a pH neutro, se decidió evaluar a este pH el desempeño de estas superficies en la detección y cuantificación de ácido ascórbico (vitamina C).

Se evaluaron las superficies diseñadas [copolímero: anilina:PSA (90:10); polimerización secuencial: PANI/PSA 4; PANI/PSA 7 y PANI/PSA 15] para la detección de ácido ascórbico. Se observó que estas superficies logran catalizar de igual manera la oxidación de esta molécula a un potencial de 0.025 V, el cual es el menor potencial reportado hasta el momento.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

En la Figura 10 se muestra la respuesta de la superficie PANI/PSA 7, donde se puede observar claramente un máximo de corriente alrededor de 0.025 V, el cual corresponde a la oxidación catalítica por vía electroquímica de la cupla ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico. Cabe destacar que las respuestas de las otras superficies fueron similares y que solo se presenta una variación en la intensidad de la corriente dependiendo de la superficie que se utilice.

Utilizando la técnica de voltametría cíclica se evaluó la respuesta de diferentes configuraciones de los electrodos ante la presencia de ácido ascórbico. Cabe destacar que la velocidad de barrido a la que se realizó el estudio es baja, otorgando el tiempo necesario para que se de la difusión del ácido ascórbico en la superficie del electrodo y reaccione para ser oxidado.

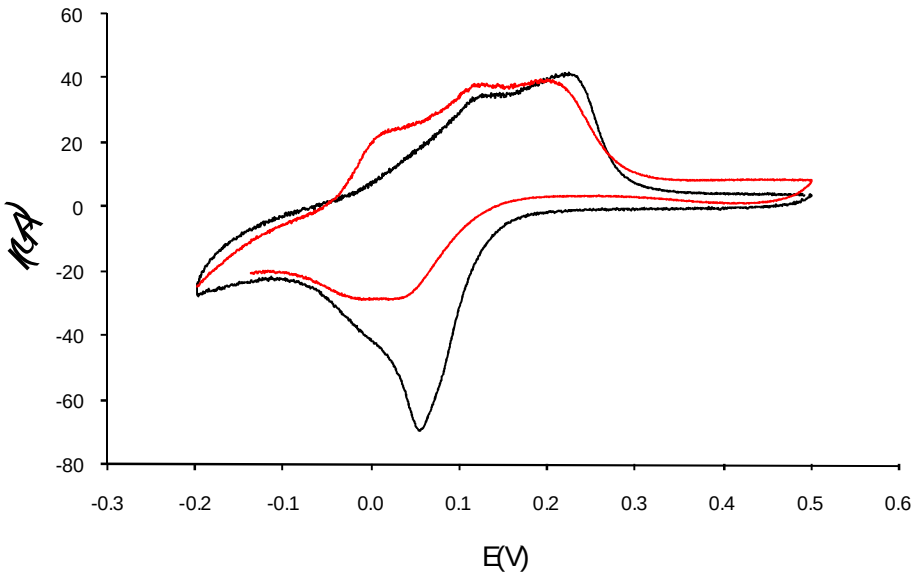


Figura 10. **Voltametría cíclica para un electrodo modificado secuencialmente PANI/PSA 7. Negro: en buffer fosfato pH 7 100 mM; Rojo: 125μM de ácido ascórbico en una solución de buffer fosfato pH 7. Velocidad de barrido 2 mV s^{-1}.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

La mejor respuesta a la concentración de ácido ascórbico fue para los electrodos crecidos secuencialmente PANI/PSA 7 y PANI/PSA 15, que muestran la mejor sensibilidad y el mejor rango lineal (Figura 11), mientras que el electrodo modificado por copolimerización muestra una pobre sensibilidad y el peor rango lineal.

Como se puede ver en la Figura 11, los electrodos PANI/PSA 7 y PANI/PSA 15 presentan prácticamente la misma respuesta. De acuerdo con los resultados obtenidos, se escogió el electrodo PANI/PSA 7 para la evaluación de la respuesta a ácido ascórbico en presencia de posibles interferentes (ácido úrico y dopamina).

La presencia de ácido úrico no afectó la respuesta del electrodo modificado en un rango de potencial de trabajo de – 0.2 V a 0.5 V, a pesar de que el ácido úrico presenta un pico de oxidación a un potencial de 0.4 V en electrodo de carbono. Se obtuvo un resultado similar por O'Connell[16] usando solamente polianilina. Estos autores sugirieron que la capa de PANI está actuando como una membrana permeoselectiva evitando la oxidación de ácido úrico sobre la superficie del electrodo.

En la Figura 12 se compara la voltametría cíclica de ácido ascórbico con la respuesta de ácido ascórbico en presencia de dopamina, ambos a la misma concentración y a pH 7. Como se puede observar, la dopamina presenta un potencial de oxidación de aproximadamente 0.2 V, que coincide con el reportado para la dopamina a este pH[17]. Ya que la señal de la dopamina no afecta la señal generada por el ácido ascórbico, se podría realizar la determinación simultánea de ambas especies.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

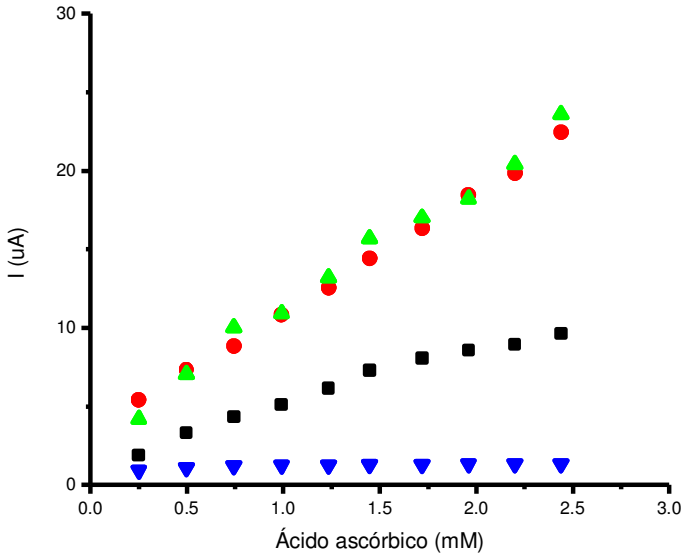


Figura 11.**Respuesta de los diferentes electrodos en presencia de distintas concentraciones de ácido ascórbico. Triángulos invertidos Azules: Anilina:PSA; Cuadros Negros: PANI/PSA 4; Círculos Rojos: PANI/PSA 7; Triángulo Verdes: PANI/PSA 15 Velocidad de barrido 2 mV s^{-1}.**

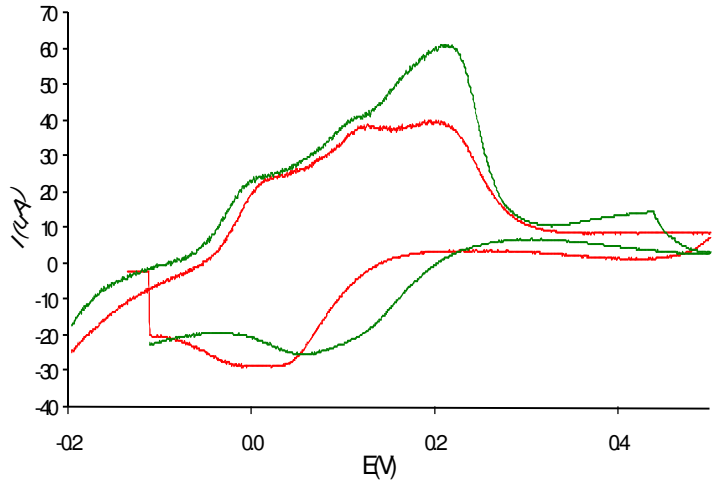


Figura 12.**Respuesta del electrodo PANI/PSA 7 a pH neutro en presencia de 125uM ácido ascórbico (línea roja) y 125 µM ácido ascórbico + 125 µM dopamina (línea verde).Velocidad de barrido 2 mV s^{-1}.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

III.3.2.1. Sensor Amperométrico para Ácido Ascórbico.

Para diseñar un sensor de ácido ascórbico más eficiente, que posea un menor tiempo de respuesta y un menor limite de detección, se utilizó una celda electroquímica de inyección de flujo, la cual trabaja a un potencial constante de 0.0 V midiendo la corriente que circula por el electrodo de trabajo.

El electrodo de trabajo utilizado en esta celda debe tener similares características a los electrodos descritos anteriormente (ser conductor a pH neutro y mantener las características electroquímicas similares a la PANI). De acuerdo con estas premisas, se diseñó un electrodo de forma secuencial haciendo 3 voltametrías cíclicas en una solución de anilina y posteriormente cuatro voltametrías cíclicas en una solución de PSA. De este modo se obtuvo un electrodo PANI 3/PSA 4 con un menor tiempo de respuesta ya que se minimiza el efecto difusivo generado por el espesor de la superficie del electrodo.

En la Figura 13 se muestra el funcionamiento del dispositivo amperométrico al inyectar distintas concentraciones de ácido ascórbico a pH neutro. Cuando se utilizó este dispositivo, se logró obtener respuestas que dependen en forma lineal (Figura 14) con la concentración inyectada de ácido ascórbico en buffer pH neutro.

Como se puede ver en la Tabla 1, con este sensor amperométrico se logra obtener un límite de detección de 2.2 µM y un intervalo de respuesta lineal entre 5 y 50µM.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

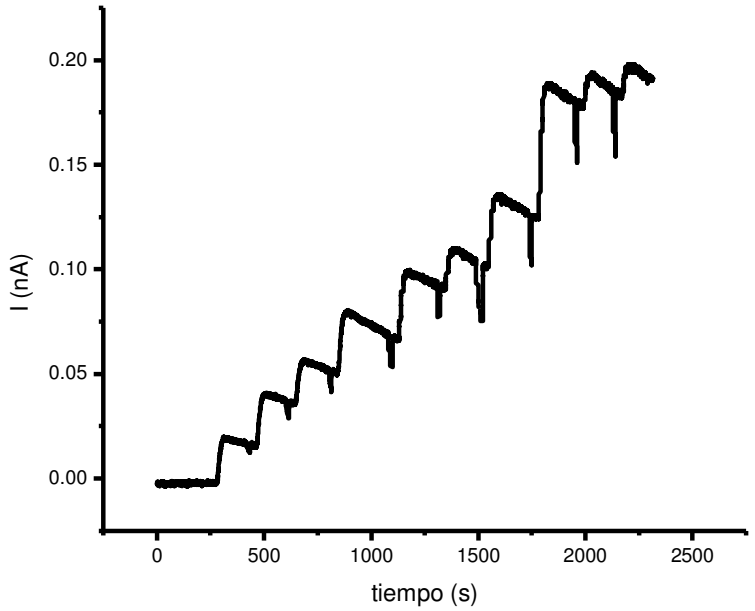


Figura 13. **Funcionamiento del dispositivo amperométrico al inyectar distintas concentraciones (5-100 µM) de ácido ascórbico a pH neutro. Potencial de trabajo 0.0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de flujo 1.5 mL min^{-1}.**

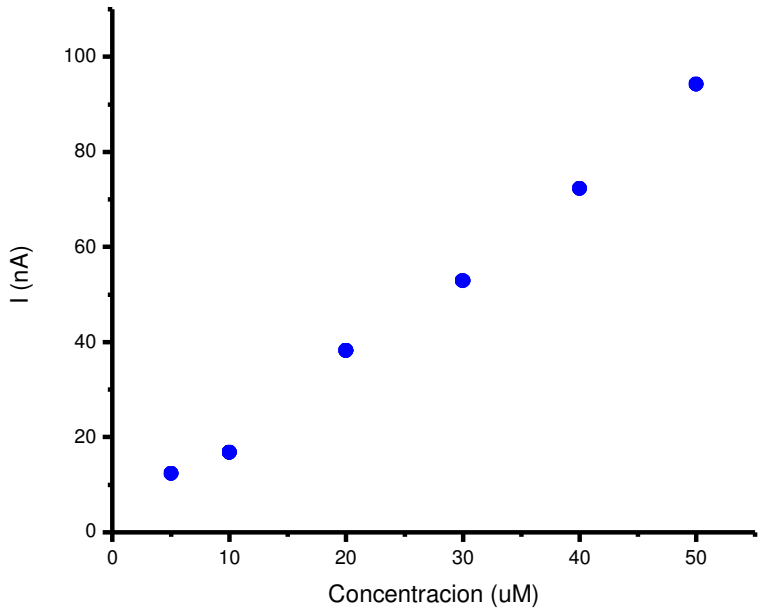


Figura 13. **Respuesta del sistema de inyección de flujo en presencia de la concentración de ácido ascórbico. Potencial de trabajo 0.0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de flujo 1.5 mL min^{-1}.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Parámetros	Valores
Pendiente (nA/µM)	**1.90 ± 0.03**
Ordenada al Origen (nA)	**1.8 ± 0.9**
Coeficiente de Correlación	**0.9961**
Límite de Detección (µM)	**2.2**
Intervalo Lineal (µM)	**5-50**

Tabla 1. **Parámetros para la curva de calibración de la Figura 13.**

III.3.3. Discusión y conclusiones.

La polimerización secuencial de PANI y PSA produce un polímero con electroactivo a pH 7.0. Estas propiedades lo hacen adecuado para determinar ácido ascórbico en condiciones fisiológicas, el cual reacciona con el polímero a menores potenciales en comparación con carbono vítreo, platino u otros electrodos modificados presentes en literatura[4]. Las características permeoselectivas de este copolímero y el bajo valor de potencial para la oxidación de ácido ascórbicopermite su determinación en presencia de ácido úrico y dopamina.

En contraste con el trabajo previo donde la PANI fue químicamente modificada con propanosultona[14], estos electrodos modificados pueden ser construidos completamente por medios electroquímicos. Por lo tanto, su tamaño puede ser reducido y pueden ser parte de un arreglo de diferentes electrodos modificados.

Por último, los resultados obtenidos fueron publicados[18]; los cuales hasta el momento de su publicación eran los resultados con menor límite de detección reportado en literatura, posteriormente otros grupos de investigación[19-21] han tomado como referencia nuestro trabajo.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Solo uno de estos grupos logró mejorar el límite de detección de la técnica a 0.22 uM[21]. Sin embargo, en este trabajo el procedimiento es de mayor complejidad y costo, ya que realizan la determinación de ácido ascórbico por vía indirecta oxidando el ácido ascórbico con permanganato y cuantificando la cantidad de permanganato restante en solución con un electrodo de membrana de ión selectivo.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

III.3.4. Referencias.

(1) R. Berkow and A.J. Fletcher, Editors, *El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica* (9th ed.), Mosby/Doyma Libros, Barcelona, Spain (1996), p. 1091 (in Spanish).

(2) P.L. Conklin, E.H. Willlams and E.L. Last, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996), pp. 9970–9974

(3) I. Koshiishi and T. Imanari, *Anal. Chem.* 69 (1997), pp. 216–220

(4) R.M.C. Dawson, D.C. Elliot, W.H. Elliot and K.M Jones, *Data for Biochemical Research*, Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford,pp.1986-1902.

(5) L.A. Pachlaand P.T Kissinger, *Anal. Chem.* 48 (1976), pp. 364-370

(6) A. Malinauskas, R. Garjonyte, R. Mazeikiene and I. Jureviciute, *Talanta* 64 (2004), pp. 121–129.

(7) I. Jureviciute, K. BBrazdziuviene, L.Bernotaite, B. Salkus and A. Malinauskas, *Sens. Actuator B* 107 (2005), pp. 716-721.

(8) D. M. Zhou, J.J. Xu, H. Y. Chen and H.Q. Fang, *Electroanal.*9 (2005), pp. 1185-1188.

(9) L. Zhang, *Electrochim. Acta* 52 (2007), pp.6969-6975.

(10) L. Zhang and J. Lian, *Electroanal. Chem.* 611 (2007), pp.51-59.

(11) S.L. Mu and J.Q. Kan, *Synth. Meth.* 132 (2002), pp. 29–33.

(12) P.N. Bartlett and E.N.K. Wallace, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3 (2001), pp. 1491–1496.

(13) P.A. Kilmartin, A. Martinez and P.N. Bartlett, *Curren. Aplic.Phys.* 8 (2008), pp. 320-323.

(14) D. Raffa, K.T. Leung and F. Battaglini, *Anal. Chem.* 75 (2003), pp. 4983–4987.

(15) W.S. Huang, B.D. Humphrey and A.G. MacDiarmid, *J. Chem. Soc.* 82 (1986), pp. 2385-2400.

(16) P.J. O'Connell, C. Gormally, M. Pravda and G.G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001), pp. 239–247.

(17) M.B. Gelbert' and D. J. Curran, *Anal. Chem* 58(1986), pp. 1028-1032.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(18) J. Yánez, A. Forte and F. Battaglini, *Talanta* 71 (2007), pp. 1648–1689.

(19) A. Ambrosi, A. Morrin, M. Smyth and A.J. Killard, *Anal. Chem. Acta* 609 (2008), pp. 37-43.

(20) M. Barsan, E. Pinto, M. Florescu and C. Brett, *Anal. Chem. Acta* 609 (2008), pp. 37-43.

(21) H. Guo, T. Yin, Q. Su and W. Qin, *Talanta* 75 (2008), pp. 851–855.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Capítulo IV

Introducción

Materiales y métodos experimentales

Resultados

Caracterización de la polimerización secuencial de PSA

Polimerización secuencial de otros derivados de anilina

Transporte de masa

Transporte de en medio ácido

Transporte de masa en medio neutro

Discusión y conclusiones

Referencias

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

IV.1. Introducción

Los interesantes resultados presentados en el capítulo III generan una serie de preguntas sobre las propiedades fisicoquímicas de las nuevas superficies sintetizadas: la cantidad de material que se incorpora en la superficie del electrodo por vía electroquímica, su actividad redox y las propiedades de transporte de iones que presentan estas superficies en medio ácido y en medio neutro.

Resulta interesante entender los fenómenos de transporte de electrones e iones durante el ciclo redox de los polímeros conductores, ya que estos fenómenos determinaran la aplicación de estos materiales en diversas áreas[1-6].

La oxidación o reducción electroquímica de películas de polímeros conductores depositadas sobre superficies de electrodos ocurre por la transferencia de electrones entre el polímero y el electrodo, esta transferencia electrónica está acompañada por el movimiento de iones entre la película del polímero y la solución de electrolito que está en contacto con el mismo. Este movimiento de iones es necesario para poder mantener la electroneutralidad en la película y depende de la reacción de transferencia electrónica sobre el electrodo. A su vez, este movimiento de iones y cambio de estado redox del polímero puede estar acompañado por el movimiento de solvente dentro o fuera de la película originado por un cambio en la configuración de la cadena del polímero[7]. Como resultado de estos cambios, las características físicas de la película del polímero conductor pueden ser modificadas significativamente por la reacción electroquímica[8-10].

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Pese al gran interés por los polímeros conductores, todavía queda mucho por entender sobre estos materiales. Técnicas no-electroquímicas para la caracterización in situ de la interfase electrodo modificado/electrólito pueden proporcionar información importante sobre los procesos redox y de crecimiento de la película. Para el estudio del transporte de iones en polímeros conductores muchas técnicas analíticas combinadas con métodos electroquímicos han sido utilizadas tales como: resonancia electrónica de spin (Electron Spin Resonance, ESR)[11], Probe Beam Deflection (PBD)[12,13], elipsometría[14] , técnicas espectroquímicas [15,16] y la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo[17,18], siendo esta última técnica la más utilizada.

La microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo puede ser utilizada de forma simultánea para monitorear el transporte de carga (electrodo/película de polímero) y el transporte de iones (película de polímero/solución de electrolito), el correspondiente cambio en la impedancia electroacústica del cristal de cuarzo es causado por cambios en las propiedades de la película depositada sobre el mismo (espesor, densidad de carga y almacenamiento y/o pérdida de iones)[10,16,19]. El uso de la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo junto con la PBD[19] permite seguir a detalle el proceso de transporte de iones entre la película de polímero y la solución de electrolito. El conocimiento detallado de los procesos redox y movilidad iónica tiene consecuencias importantes para el diseño de nuevas aplicaciones de los polímeros conductores[20-21].

A su vez, resulta interesante saber si otros derivados de anilina, que presentan grupos funcionales distintos al utilizado en el capítulo anterior, pueden generar un polímero con propiedades electroquímicas y conductoras similares.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Se escogieron como nuevos monómeros para diseñar los sistemas secuenciales 2-aminobencilamina (2ABA) y ácido 3-aminofenilacetico (3AFA) (Figura 1). Estos monómeros presentan disponibles los sitios involucrados en la polimerización. En ambos casos, los grupos funcionales (amino y carboxilato) se unen al anillo aromático a través de un metileno, evitando así un severo cambio en la densidad electrónica del anillo aromático, comparado con anilina[22]. Otra interesante característica de estos derivados es que los grupos funcionales amino (2ABA) y carboxilato (3AFA) pueden ser activados y modificados a través de métodos suaves, permitiendo el anclaje de moléculas de origen biológico comúnmente utilizadas en bioensayos.

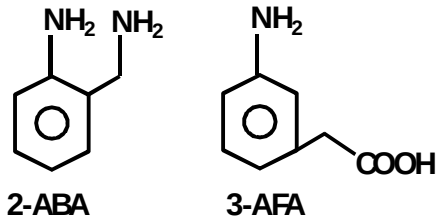


Figura 1. **Estructuras de los monómeros a estudiar.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

IV.2. Materiales y métodos experimentales.

IV.2.1. Materiales

Anilina, 3-AFA, 2-ABA fueron provistos por Sigma–Aldrich Argentina. Todos estos reactivos son de calidad analítica salvo la anilina, que fue destilada al vacio para obtenerla con mayor grado de pureza. Buffer Tris de calidad analítica fueron suministrados Sigma –Aldrich.

IV.2.2. Métodos

IV.2.2.1. Crecimiento de polímeros.

IV.2.2.1.1. Crecimiento de Polianilina (PANI).

Se utilizo un equipo µAUTOLAB type III para electropolimerizar PANI a partir de una solución 0.09M de anilina en ácido perclórico 2M, realizando 3 voltametrías cíclicas entre -0.20V y 0.85V vs. Ag/AgCl a 10 mV/s, seguidamente 3 voltametrías cíclicas entre -0.20 y 0.75 V vs. Ag/AgCl a 10 mV/s sobre un cristal de cuarzo de 5MHz el cual esta recubierto por una superficie circular de oro de 1.53cm^2. El crecimiento de la PANI se realizó en dos pasos, el primero es para iniciar la polimerización de PANI y el segundo paso es evitar reacciones secundarias.

IV.2.2.1.2. Crecimiento de derivados de anilina (dANI)

Se utilizo un equipo µAUTOLAB type III para electropolimerizar los distintos polímeros a partir de soluciones 0,01M de: N-(3-propilsulfonato)anilina (PSA), 2-aminobencilamina (2ABA) y ácido 3-

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

aminofenilacetico (3AFA). Esta polimerización se realizo haciendo voltametrías cíclicas entre -0.2 y 0.85 V vs. Ag/AgCl a 10 mV/s.

Fueron realizadas 7 y 15 voltametrías para el monómero de PSA sobre dos cristales de cuarzo modificados previamente con PANI, obteniendo dos superficies distintas: PANI/PSA7 y PANI/PSA15.

De acuerdo con los resultados observados para las superficies de PSA, se realizaron 7 voltametrías cíclicas para los otros monómeros obteniendo las superficies: PANI/2ABA7 y PANI/3AFA7.

I.V.2.2.2. Estudios por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

Para realizar las medidas de XPS, cada superficie fue electropolímerizada sobre láminas de oro de, una vez obtenidas las superficies: PANI/PSA4, PANI/PSA7 y PANI/PSA15, estas fueron reducidas por 20 minutos a un potencial de -0.2 V en el mismo medio en que fueron sintetizadas (medio ácido), pasado el tiempo fueron retiradas de la solución y lavadas con abundante agua milli Q, secadas con gas nitrógeno y puestas en un desecador.

Las medidas de XPS fueron llevadas a cabo usando un equipo comercial (Specs SAGE 150) equipado una fuente de rayos X de doble ánodo Mg/Al y un analizador de energía de electrón hemisférico. Las energías de enlace reportadas se basan en la calibración de la energía del analizador utilizando muestras de referencia (Ag $3d_{5/2}$ and Au $4f_{7/2}$). No fue necesaria la compensación de carga y no se observaron características de carga diferencial (colas a bajas energías de unión) dado que se midieron películas suficientemente delgadas sobre sustratos conductores. Las relaciones atómicas fueron calculadas a partir de las

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

intensidades integradas de los niveles de núcleo luego de las correcciones de "*cross-section*" instrumental y de fotoionización[23].

El cálculo del espesor se realizó considerando la siguiente ecuación[24]:

$$\frac{I}{Io} = e^{-d/LAu} \quad \text{(IV.1)}$$

donde *I* es la intensidad de la señal del oro modificado, *Io* es la intensidad de la señal oro limpio, *d* es el espesor del film y *LAu* es la longitud de atenuación efectiva que para un polímero tipo PANI, que tiene un valor de 30 [25].

IV.2.2.3. Estudios gravimétricos

Se utilizó una microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (SRS, modeloQCM25) para cuantificar la masa incorporada a la superficie del electrodo y a su vez, realizar los estudios de transferencia de masa a pH ácido y neutro.

La masa incorporada en la superficie del cristal de cuarzo fue calculada en función de la variación de la frecuencia de oscilación del cristal al realizar la eletropolimerización de los monómeros y de acuerdo con la ecuación de la balanza.

$$\text{ÄF} = -C_f\,\text{Äm}; \quad C_f = 56.6\,\text{Hz}\,\mu g^{-1}cm^2 \quad \text{(IV.2)}$$

Los cálculos de masa incorporada de PANI y los demás derivados de anilina, se pueden realizar debido a que los cambios en la resistencia del cristal son muy pequeños con respecto a los cambios de frecuencia generados por la incorporación de material[26].

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

IV.2.2.4. Transporte de masa en procesos redox a pH ácido y neutro.

Una vez realizados los cálculos de la cantidad de material depositado sobre la superficie del electrodo, cada superficie fue lavada con agua Milli Q y estabilizada en una solución al pH de trabajo para poder realizar el estudio de transporte de masa en estos medios.

Utilizando la microbalanza de cristal de cuarzo se siguió el proceso redox y la cantidad de masa intercambiada entre la película del polímero y las soluciones de estudio.

Para los estudios de transporte de masa se realizaron varias voltametrías entre -0.2 y 0.6 V vs. Ag/AgCl a 10 mV/s en ácido perclórico 2M y para los estudios en medio neutro se realizaron varias voltametrías entre -0.2 y 0.55 V vs. Ag/AgCl a 10 mV/s en un buffer tris pH=7 de concentración 100mM.

IV.2.2.5. Deflectometría por gradientes de concentración (Probe Beam Deflection, PBD)

Para realizar los estudios por PBD, se utilizo como electrodo de trabajo un electrodo preparado por evaporación de oro sobre obleas de silicio: las obleas de silicio fueron cortadas de acuerdo al tamaño de electrodo requerido (1 cm x 1,5 cm). Los silicios cortados fueron cuidadosamente desengrasados con acetona usando un equipo Soxhlet durante 8 horas. Una vez terminado este proceso los electrodos fueron enjuagados en una solución 10 % HF para extraer posibles trazas de SiO_2 formadas sobre la superficie, finalmente fueron enjuagados con isopropanol y colocados en la máquina evaporadora (Edwards AUTO 306). Para mejorar la adherencia del oro sobre el sustrato de silicio se

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

evaporó primero 10 nm de Ti, luego 20 nm Pd y finalmente 200 nm de Au.

Los estudios de PBD fueron realizados en las mismas condiciones del estudio de transporte de masa en medio ácido y medio neutro (descritos anteriormente) salvo la velocidad de barrido que fue de 50 mV/s en vez de 10 mV/s.

Los componentes básicos de un sistema de PBD son un láser He-Ne de 5 mW (Melles Griot) y un detector de posición (UDT model PIN-LSC/5D). Todos estos dispositivos mas sus accesorios están montados sobre un banco óptico (Melles Griot).

El haz del láser es focalizado, por medio de una lente de 50 mm diámetro, frente al electrodo plano (electrodo de trabajo). Este ultimo esta sujeto sobre una cara interna de la celda electroquímica, la que también incluye el electrodo de referencia y contra-electrodo. La celda electroquímica (cubeta de cuarzo de 2 cm de lado) está montada sobre una base de traslación que permite el movimiento en los tres ejes del espacio. La posición es controlada por medio de tornillos micrométricos, con una resolución máxima de 1 μm. El detector de posición está colocado a 25 cm aproximadamente detrás de la celda electroquímica y tiene una sensibilidad de 1μrad/mV. La señal que parte del detector de posición es procesada por un monitor Graserby Optronics 301-Div. Para registrar la señal de deflexión del haz y la respuesta electroquímica durante los experimentos de voltamperometría cíclica se utilizó un potenciostato Amel y una PC con placa y software Lab-View.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

IV.3. Resultados

IV.3.1. Caracterización de la polimerización secuencial de PANI/PSA.

Según los resultados obtenidos en el capitulo anterior, donde se observó que los electrodos secuenciales PANI/PSA7 y PANI/PSA15 presentan igual sensibilidad a la concentración de ácido ascórbico, resulta interesante cuantificar la masa de monómero PSA que se incorpora a la superficie del electrodo modificado con PANI. Esto se realizó mediante el uso de la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo y espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)

En la Figura 2, el gráfico principal muestra el cambio de frecuencia a medida que se electropolimeriza la anilina sobre la superficie del electrodo, mientras que el pequeño gráfico en la parte superior derecha muestra el cambio en la respuesta amperométrica a medida que crece el polímero. Volviendo al gráfico principal se pueden observar ciclos donde las pendientes negativas corresponden a la incorporación de anilina y electrolito (barrido anódico), mientras que las positivas a la expulsión de electrolito durante el proceso de reducción. La tendencia neta del cambio de frecuencia es hacia valores menores, lo que corresponde a una incorporación de masa. A partir de estos cambios se puede estimar la cantidad de masa incorporada sobre la superficie del electrodo. Este valor se informa en la Tabla 1 (página 95)

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

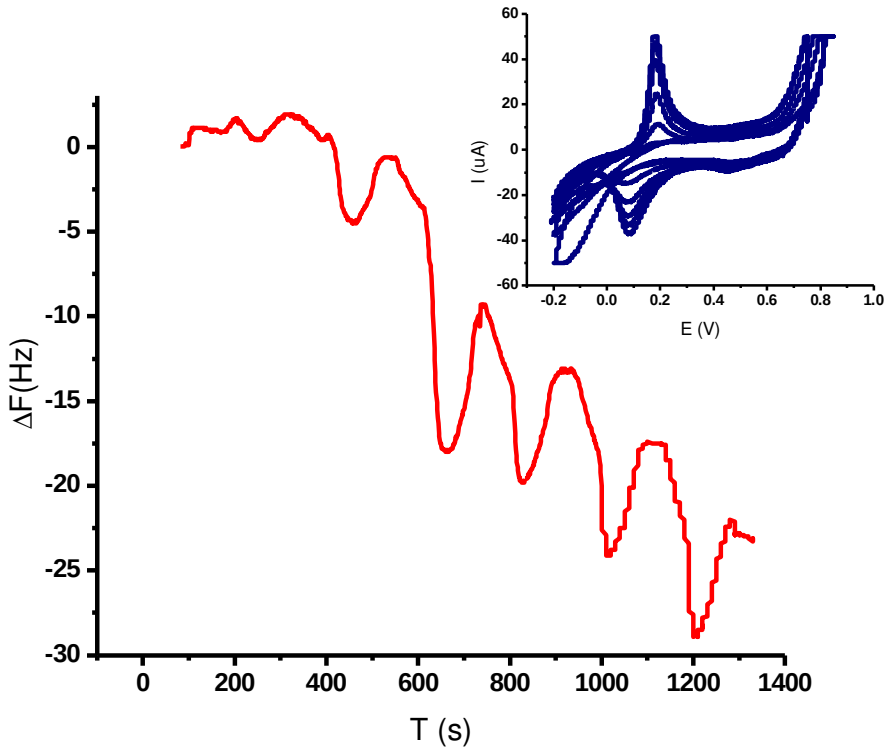


Figura 2. **Variación de la frecuencia en función del tiempo para la elctropolimerización de PANI. En el cuadro superior derecho se muestra el voltamograma para la electropolimerización de PANI 6.**

Una vez polimerizada la anilina en la superficie del electrodo, se procedió a electropolimerizar PSA; se realizaron quince voltametrías cíclicas entre -0.20 V y 0.85 V a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1}, en la Figura 3 se presenta un gráfico principal correspondiente al seguimiento de la incorporación de PSA a través de la balanza de cuarzo, mientras que el gráfico que se encuentra dentro de esta figura en la parte superior derecha corresponde a la respuesta amperométrica a medida que PSA se incorpora al electrodo previamente modificado con PANI.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

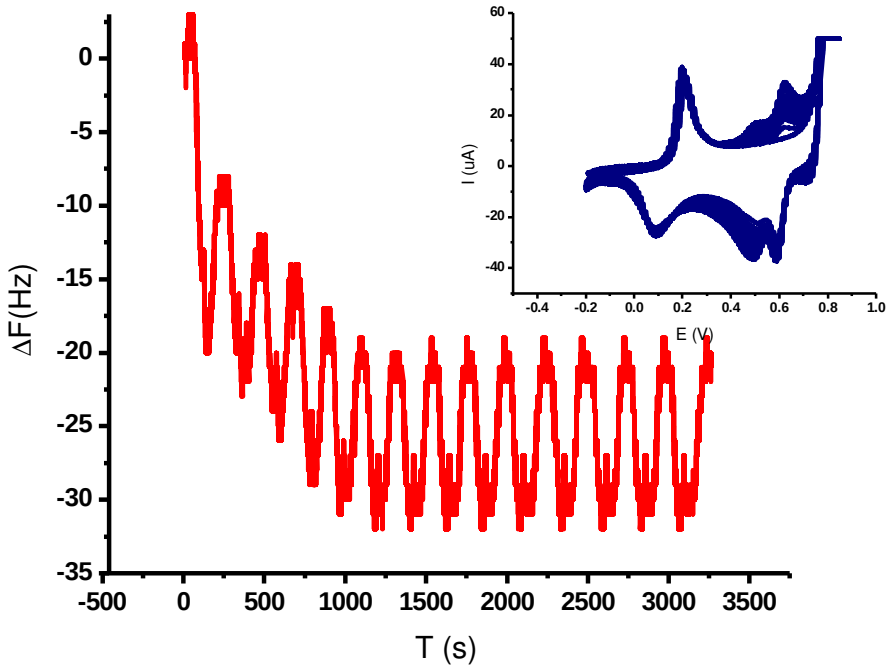


Figura 3. **Variación de la frecuencia en función del tiempo para la electropolimerización de PSA. En el cuadro superior derecho se muestra el voltamograma para la electropolimerización de PSA 15.**

Desde un punto de vista de la incorporación de masa se observa una tendencia similar a anilina hasta el séptimo ciclo, a partir del cual el cambio neto de frecuencia es prácticamente nulo, indicando que no se incorpora a la superficie una cantidad importante de PSA (ver Tabla 1). Además, se observa un importante cambio en la respuesta cuando el monómero es incorporado en la superficie modificada con PANI, mostrando la aparición de dos nuevos picos de oxidación entre 0.4-0.7 V debido a la oxidación del derivado sulfonado. Por otra parte es importante destacar que estos picos corresponden a la parte soluble del polímero PSA, ya que desaparecen cuando la superficie es lavada con abundante agua milli Q y posteriormente es evaluada su respuesta electroquímica en medio ácido.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

También se calculó la carga de los electrodos PANI/PSA7 y PANI/PSA15 a partir del primer pico de oxidación del polímero (aprox. 0.2 V) para los voltamogramas realizados entre –0.2 y 0.6 V de estas superficies en medio ácido (Tabla 1), notando que los valores de carga para estas superficies son similares a los de PANI. Esto indica que si bien hay una incorporación neta de PSA, este derivado no afecta en mayor medida la oxidación de leucoemeraldina a emeraldina en PANI. La similitud entre los datos obtenidos para PANI/PSA7 y PANI/PSA15 explica los resultados obtenidos en el capítulo anterior, donde se obtuvieron iguales sensibilidades en la oxidación de ácido ascórbico.

Electrodo	Q (μC cm^{-2})	Masa PSA (μg cm^{-2})	Masa Total (μg cm^{-2})
PANI	**451.4**	**-**	**0.433**
PANI/PSA4	**434.6**	**0.392**	**0.825**
PANI/PSA7	**451.3**	**0.524**	**0.957**
PANI/PSA15	**427.9**	**0.526**	**0.959**

Tabla 1.**Carga y masa incorporada según la modificación.**

Para verificar la incorporación permanente de PSA, se analizaron los distintos electrodos modificados por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). A través de esta técnica es posible monitorear la incorporación de PSA a la superficie del electrodo siguiendo la señal de azufre y oxígeno (Tabla 2). La relación O/S prácticamente constante y cercana 3 es consecuente con la incorporación de un grupo sulfonato, mientras que la relación N/S permite establecer la estequiometria entre anilina y PSA, que para PSA4 es aprox. 5:1, mientras que para PSA7 y 15 es aprox. 3:1. Por otro lado, con la misma técnica se calculó el espesor del film por la atenuación en la señal del orbital 4f del oro[25]. Con estas dos medidas se verifica que luego del séptimo ciclo no se incorpora más

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

PSA, ya que los espesores para PANI/PSA7 y PANI/PSA15 son iguales (Tabla 3).

Relación Molar	PANI/PSA 4	PANI/PSA 7	PANI/PSA 15
N/S	**6.35**	**3.71**	**3.83**
O/S	**2.76**	**2.46**	**2.73**

Tabla 2.**Relaciones molares de átomos según la modificación.**

Electrodo	Espesor (nm)
PANI	**6.7**
PANI/PSA 4	**8.1**
PANI/PSA 7	**8.4**
PANI/PSA 15	**8.4**

Tabla 3. **Espesor del electrodo modificado.**

Ya que los resultados muestran que las superficies PANI/PSA7 y PANI/PSA15 poseen el mismo comportamiento, se escogió la configuración PANI/PSA7 como modelo para los estudios de transporte de masa a pH ácido y neutro.

IV.3.2. Polimerización secuencial de otros derivados de anilina

Siguiendo la metodología de polimerización secuencial se realizó el estudio gravimétrico de otros derivados de anilina (2ABA, 3AFA). Estos derivados tienen diversas características que los hacen interesantes, introducen cargas positivas o negativas extras dependientes del pH, y pueden ser fácilmente derivatizados para posteriores aplicaciones en dispositivos de reconocimiento molecular.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

En las Figuras 4 y 5 se observa la electropolimerización de estos nuevos monómeros (2ABA y 3AFA) sobre una superficie de oro modificada previamente con PANI.

En el caso de PANI/2ABA (Figura 4), se observa la aparición de un nuevo pico de oxidación a alrededor de 0.3 V (Figura 4 parte superior derecha), además cabe destacar que la incorporación de material es en forma asintótica y que el intercambio de masa debido al cambio de estado de oxidación se hace cada vez menor, a diferencia de lo que sucede en los otros casos, esto se debe posiblemente a que la incorporación de 2ABA a la cadena polimérica puede dificultar la transferencia de carga ya que se observa una disminución de corriente importante en el proceso redox correspondiente a la oxidación de leucoesmeraldina.

En el caso de la Figura 5, la incorporación de 3AFA es la más parecida al crecimiento de PANI, observándose la aparición de un nuevo pico de oxidación alrededor de 0.45 V (Figura 5 parte superior derecha), además se puede notar que la cantidad de material incorporado es mucho menor que para los otros derivados y que la actividad electroquímica de esta superficie es menor a la de PANI/2ABA.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

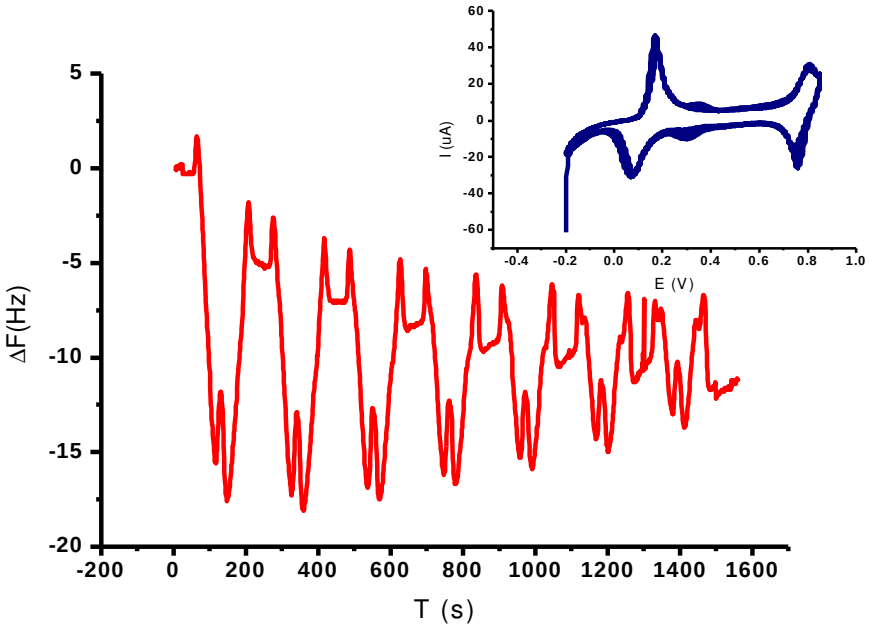


Figura 4. **Variación de la frecuencia en función del tiempo para la electropolimerización de 2ABA. En el cuadro superior derecho se muestra el voltamograma para la electropolimerización de 2ABA7.**

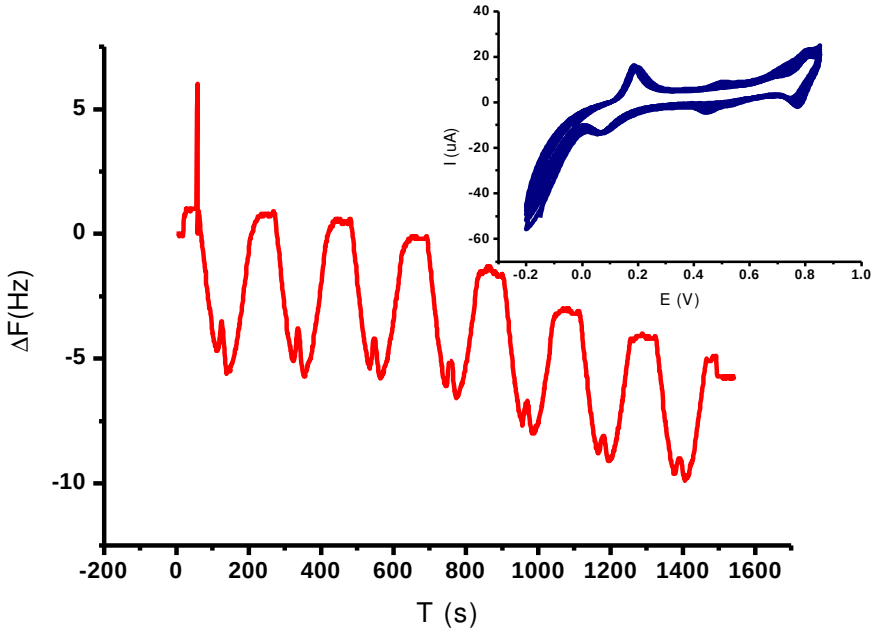


Figura 5. **Variación de la frecuencia en función del tiempo para la electropolimerización de 3AFA. En el cuadro superior derecho se muestra el voltamograma para la electropolimerización de 3AFA 7.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

En la Tabla 4, se puede observar que la mayor incorporación en masa a la superficie del electrodo, modificado previamente con PANI, es la del PSA. Esto podría deberse a que en el caso de PSA este afecta en menor medida la densidad electrónica del anillo aromático y a que posee una masa molar mayor, junto a esto hay que tener en cuenta que para los otros derivados la presencia de grupos funcionales sobre el anillo afecta la electropolimerización. Es conocido que las sustituciones en posiciones meta y en orto tienen efectos diferentes, el hecho que una posición orto esté bloqueada, diminuye el acoplamiento a través de dicha posición, beneficiando de esta manera polimerización cola-cabeza y por lo tanto mejorando el rendimiento. Esto explicaría la tendencia observada en la Tabla 4, una mayor incorporación es PSA seguido de 2ABA y por ultimo 3AFA[27].

Electrodo	Masa derivado (μg cm^{-2})	Masa Total (μg cm^{-2})
PANI	**-**	**0.433**
PANI/PSA 7	**0.524**	**0.957**
PANI/2ABA7	**0.196**	**0.629**
PANI/3AFA7	**0.100**	**0.533**

Tabla 4**. Masa incorporada según el monómero.**

IV.3.3. Transporte de masa (intercambio iónico).

Una vez hechas las electropolimerizaciones de estas superficies, se tomó cada uno de los cristales modificados (Au/PANI/dANI7, dANI= PSA, 2ABA ó 3AFA), se lavaron con abundante agua milli Q y posteriormente se estabilizaron realizando al menos 20 voltametrías cíclicas en el pH en que se desee realizar el estudio de transferencia de masa.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

IV.3.3.1. Transporte de Masa en Medio Ácido.

Se evaluó el intercambio iónico de estas superficies en ácido perclórico de concentración 2 M, realizando varias voltametrías cíclicas entre -0.2 y 0.6 V. A través de la EQCM se siguió el intercambio de masa, mientras que por PBD se siguió el ingreso y egreso de iones al polímero.

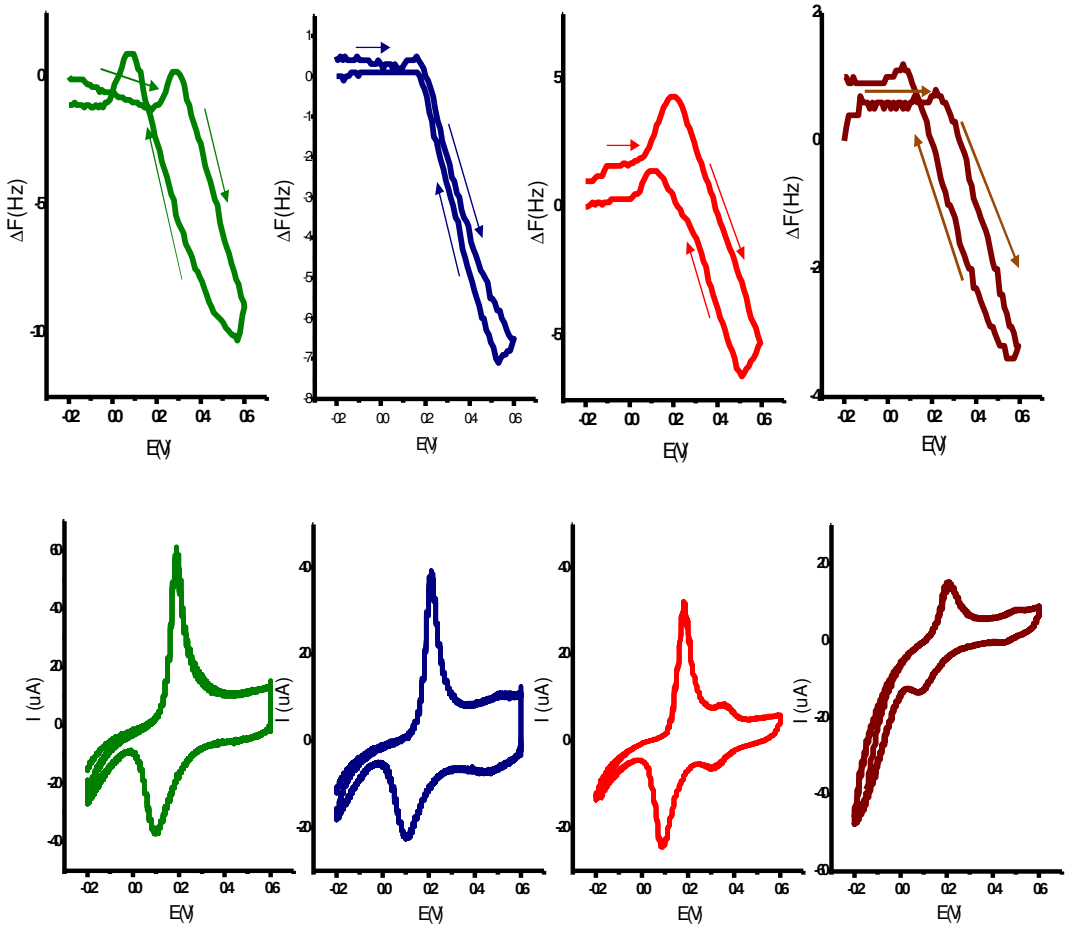


Figura 6. **Cambios de frecuencia (línea superior) y respuesta amperométrica (línea inferior) en función del potencial en medio ácido. Verde: PANI; Azul: PANI/PSA7; Rojo: PANI/2ABA7; Marrón: PANI/3AFA7.**

En la Figura 6, se puede observar el intercambio de masa según la oxidación o reducción de los distintos electrodos. Para PANI, a medida que se oxida el polímero y a un valor aproximado de 0.35 V, se observa

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

un aumento en la frecuencia, lo que indica la expulsión de protones, resultados similares fueron obtenidos usando PBD[13]. Esto se debe a que el film se está oxidando, lo que origina la expulsión de cualquier ión con carga positiva que se encuentre dentro de él. Posteriormente se puede observar que, a medida que se sigue oxidando el polímero, se presenta una brusca disminución en la frecuencia. Esto se debe a que la polianilina cuando es oxidada cambia su estructura de una forma compacta a una estructura más expandida, lo que permite la incorporación de solvente, en este caso agua acompañada de los distintos iones disueltos en ella[28,29]. Un comportamiento similar se observa las en superficies PANI/2ABA7, mientras que para PANI/3AFA7, el egreso de protones es menos evidente ya que todo el proceso de intercambio de masa es mucho menor.

El film PANI/PSA7 presenta un comportamiento distinto a PANI, ya que no se observa una nítida la expulsión de protones, pero si se observa la incorporación de electrolito a medida que el polímero se oxida. Por otra parte, si se calcula los gramos de masa intercambiada por mol de electrones (Tabla 5), en este caso es menor que el observado para los otros polímeros. Este efecto también fue informado por Mello et al. para PANI modificada con grupos sulfónicos sobre el anillo, observando que el proceso de contracción y expansión es mucho menor que en el caso de PANI, reduciéndose de esta manera el intercambio de materia[30].

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Electrodo	Q ($\mu C\ cm^{-2}$)	Masa intercambiada ($\mu g\ cm^{-2}$)	g. inter./mol e^-
PANI	**451.4**	**170**	**55.2**
PANI/PSA7	**451.4**	**118**	**38.3**
PANI/2ABA7	**160**	**99**	**90.7**
PANI/3AFA7	**124**	**72**	**85.1**

Tabla 5. **Masa intercambiada por mol de electrón medio ácido.**

Los resultados obtenidos a partir de PBD, permiten ver como es el flujo de iones (Figura 7). Si se observan con detalle los deflectogramas de PANI/PSA7 y PANI/2ABA7, los sistemas pueden ser explicado teniendo en cuenta los típicos modos de flujo iónico reportados para PANI[13].

Para PANI/PSA7, cuando se parte del polímero completamente reducido a partir de un potencial de -0.2 V se obtiene una señal que corresponde a la expulsión de protones (tramo de pendiente negativa en el deflectograma). Esto puede deberse a la relajación de la cadena polimérica cuando empieza a oxidarse. Luego de esta expulsión se observa una incorporación de aniones (tramo de pendiente positiva en el deflectograma), que alcanza un plateau a potenciales entre 0.2 y 0.3 V, cuando la superficie se está oxidando. Está pendiente con un valor cercano a cero indica que hay un proceso que contrarresta la incorporación de aniones, que puede ser atribuido a una importante expulsión de protones. Luego la superficie continúa incorporando aniones una vez pasado el pico de oxidación, y cuando empieza a reducirse el polímero se puede ver que no intercambia iones con el medio hasta un potencial cercano a 0.3 V, esto puede atribuirse a un retraso en la respuesta del polímero originada por el cambio de sentido de la voltametría, pasado el potencial de 0.3 V se puede notar una expulsión

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

de aniones que va hasta un potencial de alrededor de -0.05 V, luego de este potencial la pendiente muestra un plateau y luego un cambio neto (a pendiente negativa) entre los potenciales de -0.05 y -0.2V, indicando la incorporación de protones.

De la misma manera puede ser explicado lo que ocurre con la superficie PANI/2ABA7, con la salvedad de que los cambios en la pendiente por expulsión (entre 0.1 y 0.3 V aproximadamente) e incorporación (entre 0.15 y -0.05 V aproximadamente) de protones se ve de una manera más marcada en el deflectograma que para el caso anterior.

Para el caso de la superficie PANI/3AFA7, es complicado explicar lo que se observa en el deflectograma, ya que en el voltamograma se puede ver que la superficie cuando está reducida a un potencial de -0.2 V se ven valores muy negativos de la corriente, lo que hace sospechar que esta superficie este catalizando la reducción del hidrógeno haciendo que la interpretación del deflectograma a potenciales menores que 0.1 V sea muy difícil. Mientras que a potenciales mayores se observa una pendiente positiva la cual nos indica el movimiento de incorporación (barrido anódico) o expulsión de aniones (barrido catódico).

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

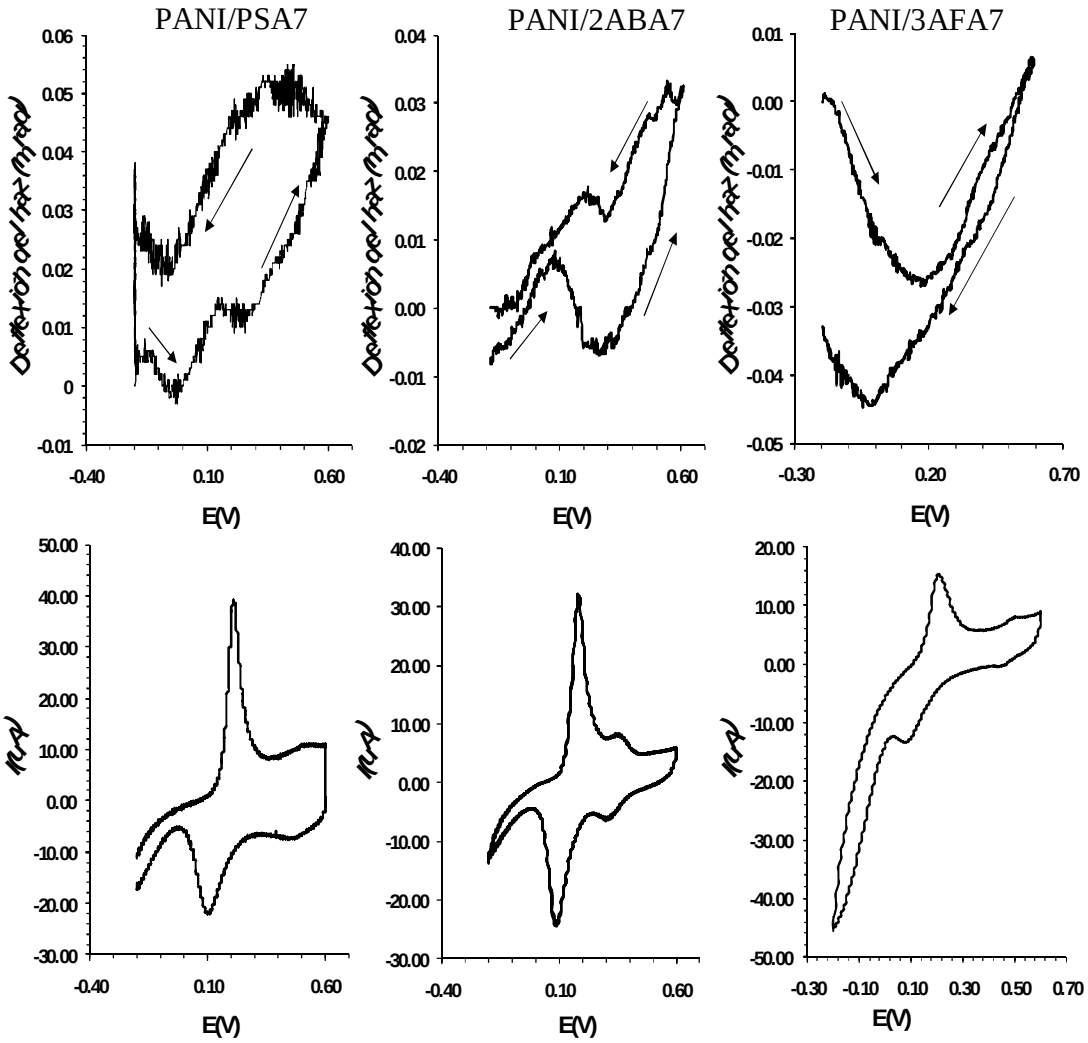


Figura 7. **Deflectogramas de PBD para las distintas superficies obtenidos al realizar una voltametría cíclica entre -0.2 y 0.6 V a una velocidad de barrido de 50 mV/s en ácido perclórico 2 M.**

IV.3.3.2. Transporte de Masa en Medio Neutro.

Se evaluó el intercambio de masa de estas superficies en buffer tris de concentración 100 mM pH 7.0, realizando varias voltametrías cíclicas entre -0.2 y 0.55 V a una velocidad de barrido de 10 mV s^{-1} y registrando con la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo la variación de la frecuencia en función del potencial. De manera similar se realizaron deflectogramas (PBD) a una velocidad de barrido de 50 mV s^{-1}.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Es importante destacar que es la primera vez que se realiza este tipo de estudios a pH neutro, ya que en bibliografía hasta este momento no existe estudio alguno de intercambio iónico de polímeros conductores basados en PANI a este pH.

Al igual que en medio ácido, para los experimentos de EQCM la variación de la frecuencia indica cómo es la entrada o salida de masa al film (PANI/dANI7) a medida que éste se oxida o se reduce. Es importante observar que las nuevas superficies presentan transferencia electrónica cuasi-reverisble a este pH (los voltamogramas se muestran en la parte inferior de la Figura 8) a diferencia de electrodos modificados con PANI[35], además a este pH se observan picos de oxidación más anchos para todas las superficies esto se debe al efecto del pH sobre la segunda cupla redox de PANI, por lo cual ambos procesos redox se superponen[31], además de los posibles procesos redox de los derivados utilizados.

En la parte superior de la Figura 8 se puede observar los cambios de masa para las superficies de PANI/PSA7, PANI/2ABA7 y PANI/3AFA7. Vale la pena destacar que a este pH el proceso de incorporación de electrolito al film acompaña al proceso de oxidación de éste y el intercambio de masa por mol de electrones es ligeramente superior para 2ABA respecto a PSA y 3AFA (Tabla 6). Teniendo en cuenta las masas molares de las especies presentes, agua, cloruro y tris, debemos considerar que el intercambio es mayoritariamente de solvente, siendo el proceso de auto-dopado un factor muy importante para mantener la electroactividad del polímero a pH neutro.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Electrodo	Q (uC cm^{-2})	Masa intercambiada (ug cm^{-2})	g. inter./mol e^-
PANI	**---**	**---**	**---**
PANI/PSA7	**205.1**	**61**	**43.6**
PANI/2ABA7	**140.2**	**87**	**91.0**
PANI/3AFA7	**224.1**	**56**	**36.7**

Tabla 6. **Masa intercambiada por mol de electrón medio neutro.**

Al igual que en medio ácido, se evaluó el intercambio iónico de estas superficies por PBD, notando que en todos los casos el proceso más importante es la incorporación de aniones cuando la superficie es oxidada y la expulsión de los mismos cuando esta se sufre un proceso de reducción (Figura 9). Cuando son estudiados los deflectogramas en detalle se puede observar que para las superficies PANI/2ABA7 y PANI/3AFA7 se logran observar claramente la presencia de dos procesos que pueden atribuirse a los procesos de oxidación leucoesmeraldina-esmeraldina y esmeraldina-pernigranilina que a pH neutro convergen[31], ya que una vez que estas superficies empiezan a oxidarse o a reducirse se ve como en el deflectograma hay cambios en la pendiente para incorporar o expulsar aniones dependiendo del estado de redox de la superficie. Para el caso de la superficie PANI/PSA7 no se evidencian cambios en las pendientes, observándose como si existiese un solo proceso redox involucrado.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

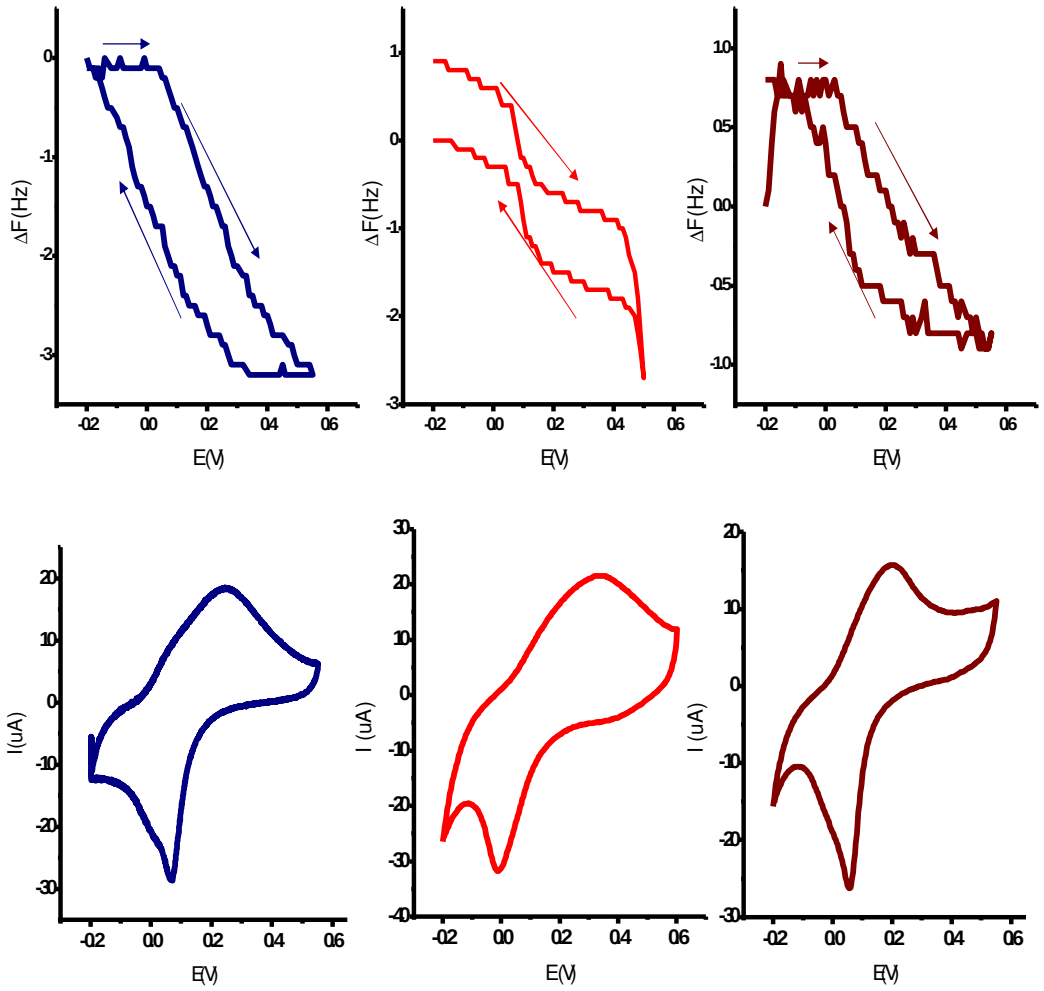


Figura 8. **Cambios de frecuencia (línea superior) y de corriente en función del potencial aplicado en medio neutro. Azul PANI/PSA7, Rojo: PANI/2-ABA7, Marrón: PANI/3-AFA 7.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

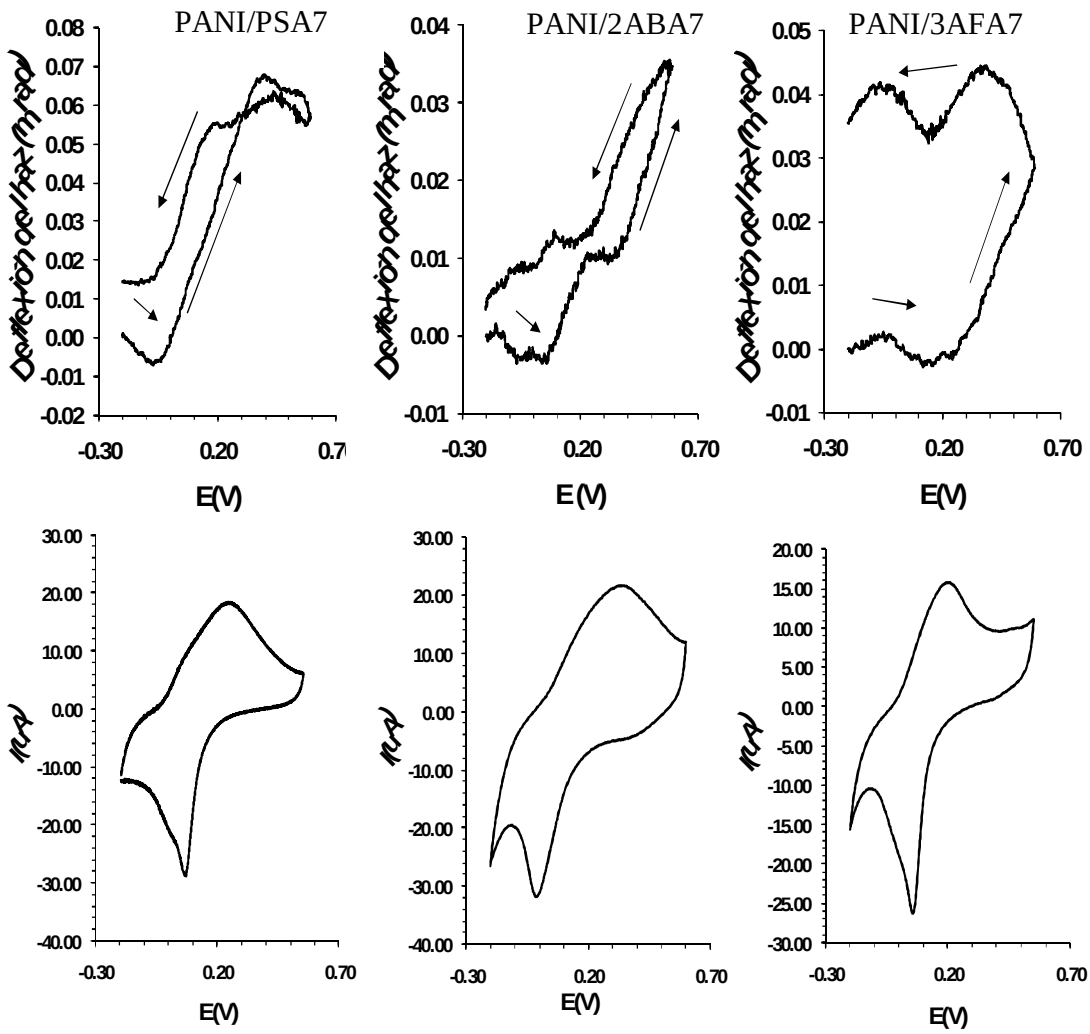


Figura 9. **Deflectogramas de PBD (línea superior) para las distintas superficies obtenidos al realizar una voltametría cíclica entre -0.2 y 0.6 V a una velocidad de barrido de 50 mV/s en tris 100mM pH 7 (línea inferior).**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

IV.4. Discusión y conclusiones.

El estudio gravimétrico muestra que el monómero PSA se incorpora con mayor facilidad a la superficie de oro modificada previamente con PANI respecto a los otros derivados de anilina presentados en este capítulo. Esto ocurre debido a que el monómero PSA tiene una cadena alquílica que sustituye a un hidrogeno en el grupo amino, esta cadena aporta densidad electrónica al nitrógeno haciendo así a este monómero una molécula mas reactiva para la polimerización[22,27].

Se logro comprobar que la incorporación de PSA sobre la superficie de oro modificada previamente con PANI es asintótica a partir del séptimo ciclo. Este hecho explica lo visto en el capítulo III donde se puede observar que las superficies PANI/PSA7 y PANI/PSA15 presentan similares respuestas ante la presencia de ácido ascórbico.

La incorporación de estos derivados de anilina genera una disrupción en el proceso de transferencia electrónica de PANI. Esto se observa claramente cuando se comparan las voltametrías en medio ácido para los distintos electrodos modificados (Figura 6). En el caso de PSA el efecto es pequeño, pero se hace más importante en los casos de 2ABA Y 3AFA, disminuyendo sensiblemente la señal y presentando otros procesos de oxidación, esto podría atribuirse al grado de disrupción que produce la presencia de los grupos funcionales en la estructura del polímero, siendo más pronunciada cuando la modificación se realiza en el anillo.

Cuando fueron realizados experimentos con la técnica EQCM en medio ácido se observó para todos los casos que existe una masiva incorporación de solución, una vez que el polímero ya ha sido oxidado a

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

esmeraldina. En estas condiciones la principal diferencia se observa en 2ABA, el cual muestra un egreso neto de materia (Figura 6) durante la oxidación a esmeraldina como sucede en PANI; mientras que este proceso se produce en menor medida en 3AFA, probablemente debido a que las corrientes son menores. Para PSA, el egreso de protones es prácticamente despreciable.

Estudiando los mismos procesos por PBD, el egreso de materia observado durante la oxidación está asociado con la expulsión de protones. Para los derivados de anilina, solo en el caso de 2ABA se observa una nítida pendiente negativa correspondiente a este tipo de procesos. En el caso de PSA, los experimentos de PBD muestran que entre 0.1 y 0.3 V la pendiente es ligeramente negativa, con lo cual puede postularse que el egreso de protones es prácticamente igual al ingreso de aniones; sí se observa la señal obtenida por EQCM, el intercambio de materia es muy pequeño en esa región. Para el caso de 3AFA es más difícil de explicar, ya que la presencia de señales espurias a bajos potenciales afecta el análisis del proceso de oxidación del polímero.

El proceso más interesante que se observa en estos electrodos modificados es la respuesta electroquímica a pH 7. Como ya planteará Nyholm[32], "a priori no hay conexión entre la pérdida de conductividad y la pérdida de electroactividad para PANI a pH mayor que 4, siempre que la solución presente una fuerza iónica adecuada para suplir contraiones ante la generación y destrucción de cargas". Las voltametrías cíclicas realizadas para los tres derivados (Figura 8) muestran las respuestas obtenidas para electrodos que fueron ciclados al menos 20 veces a pH neutro. Las corrientes obtenidas y la cuasi-reversibilidad del sistema para los tres casos contrastan con las señales habitualmente obtenidas para PANI aun a altas fuerzas ionicas[32]. Los experimentos de EQCM muestran que los intercambios de masa corresponden al ingreso de

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

solución cuando el polímero es oxidado y las masas intercambiadas por mol de electrones son bastante similares para los tres casos (Tabla 6), a diferencia de los que sucede en medio ácido donde hay importantes diferencias entre PSA y los otros derivados (Tabla 5), siendo para estos últimos mucho mayor. Este efecto puede explicarse principalmente al tipo y número de cargas presentes en cada caso.

Para PSA, tanto a pH ácido como neutro, presentará un número importante de cargas negativas que interaccionan fuertemente con las cargas positivas de la PANI, mientras que en el caso de 3AFA, en medio ácido no se encuentra disociado, y en medio neutro presenta cargas negativas al igual que el sulfonato. Por último, 2ABA, en medio neutro está positivamente cargado, aumentando aun más la repulsión entre las cadenas, mientras que en medio neutro el número de cargas positivas disminuye.

Los deflectogramas obtenidos para estos derivados muestran claramente que el intercambio iónico producido a pH neutro se debe a la incorporación y expulsión de aniones para cualquiera de ellos. Los gráficos también muestran claramente para 2ABA y 3AFA, la presencia de dos procesos redox.

Pese a la información recolectada por estas técnicas no es sencillo explicar la persistencia de la respuesta electroquímica. Una hipótesis podría ser la presencia en el polímero de un número de cargas fijas (no dependientes del estado de oxidación) que generan dentro del mismo un retardo en el egreso de protones o impide la salida de los mismos, estableciéndose en las capas del polímero más cercanas al electrodo la existencia de un pH ácido local. La otra hipótesis en concordancia con los resultados de Nyholm, es que al barrer el potencial hasta 0.6 V, la PANI no sufre el segundo proceso redox, ya que la reducción de la forma

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

totalmente oxidada de PANI es un proceso muy lento a pH neutro. En el caso de 2ABA y 3AFA, el segundo proceso que se observa correspondería al de la oxidación del derivado que como se vio en medio ácido presenta un proceso suplementario a potenciales ligeramente mayores, este tipo de procesos para derivados de anilina fueron previamente observados por Dao y colaboradores[27].

Estas nuevas plataformas pueden ser usadas en ensayos ambientales o bioensayos. Como ya se vio en el capítulo III, el electrodo que contiene PSA es un excelente mediador para la determinación ascórbico en bajas concentraciones y sin necesidad de aplicar sobrepotenciales. En los próximos capítulos se discutirá la aplicabilidad de estos polímeros en medidas de impedancia utilizando la cupla leucoemeraldina-emeraldina como sonda para la detección de analitos debido a cambios producidos en la respuesta faradaica y capacitiva en este tipo de electrodos.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

IV.5. Referencias.

(1) M. Gerard, A. Chaubey and B.D. Malhorta, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002), pp. 345-359.

(2) P.N. Bartlett and P.R. Birkin, *Synth. Met.* 61 (1993), pp. 15-21.

(3) S.P. Sitaram, J.O. Stoffer and T.J. O'Keefe, *J. Coatings Tech.* 69 (1997), pp. 65-69.

(4) R.H. Baughman, *Synth. Met.* 78 (1996), pp. 339-353.

(5) S.B. Adeloju and G.G. Wallace, *Analyst* 121 (1996), pp. 699-703.

(6) C. Weidlich, K.M. Mangold and K. Juttner, *Synth. Met.* 119 (2001), p. 263-264.

(7) A.R. Hillman and S. Bruckenstein, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 89 (1993), pp. 339-344.

(8) D.A. Buttry and M.D. Ward, *Chem. Rev.* 92 (1992), pp. 1355-1379.

(9) E.J. Calvo, R. Etchenique, P.N. Bartlett, K. Singhal and C. Santamaria, *Faraday Discuss.* 107 (1997), pp. 141-157.

(10) A.R. Hillman, A. Jackson and S.J. Martin, *Anal. Chem.* 73 (2001), pp. 540-549.

(11) E.M. Genies and M. Lapkowski, *J. Electroanal. Chem.* 236 (1987), pp. 199-208.

(12) M. Vilas-Boas, M.J. Henderson, C. Freire, A.R. Hillman and E. Vieil, *Chem. Eur. J.* 6 (2000), pp. 1160-1167.

(13) C. Barbero, M.C. Miras, O. Haas and R. Koetz, *J. Electroanal. Chem.* 138 (1991), pp. 669-672.

(14) R. Greef, M. Kalaji and L.M. Peter, *Faraday Discuss.* 88 (1989), pp. 277-289.

(15) T. Kobayashi, H. Yoneyama and H. Tamura, *J. Electroanal. Chem.* 177 (1984), pp. 281-291.

(16) A.L. Briseno, A.J. Baca, Q. Zhou, R. Lai and F. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 441 (2001), pp. 123-134.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(17) D. Orata and D.A. Buttry, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987), pp. 3574-3581.

(18) L. Niu, C. Kvarnstrom, S. Dong and A. Ivaska, *Synth. Met.* 121 (2001), pp. 1389-1390.

(19) C. Barbero, E.J. Calvo, R. Etchenique, G.M. Morales and M. Otero, *Electrochim. Acta* 45 (2000), pp. 3895-3906.

(20) C. Eickes, J. Rosenmud, S. Wasle, K. Doblhofer, K. Wang and K.G. Weil, *Electrochim. Acta* 45 (2000), pp. 3623-3628

(21) H. Varela, S.L.D.A. Maranhao, R.M.Q. Mello, E.A. Ticianelli and R.M. Torresi, *Synth. Met.* 122 (2001), pp. 321-327.

(22) L.G Wade Jr., *Organic Chemistry* (2nd. ed.), Pearson Education, Naucalpan de Juárez, México, (1993).

(23) J. H. Scofield, *J. Electron Spectrosc Relat. Phenom.* 1976, 8, 129.

(24) D. Petrovykh, H. Kimura-Suda, M.J Tarlov and L.J Whitman, *Langmuir* 20 (2004), pp. 429–440.

(25) M.Tagliazucchi, F.J. Williams and E.J. Calvo, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007), pp. 8105-8113

(26) D.E. Grumelli, E.S. Forzani, G.M. Morales, M.C. Miras, C.A. Barbero and E. Calvo, *Langmuir* 20 (2) (2004), pp. 2349–2355.

(27) M. Leclerc, J. Guay and L. H. Dao, *Macromolecules* 22 (1989), pp.649-653.

(28) L. Lizarraga, E.M. Andrade, M.I. Florit and F. Molina, *J. Phys. Chem.* 109 (2005), pp. 18815-18821.

(29) A.R. Hillman and S. Brukenstein, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 89 (1993), pp. 339-345.

(30) R. M. Q. Mello, R. M. Torresi S. I. Córdoba de Torresi and E. A. Ticianelli, *Langmuir* 16 (2000), pp. 7835-7841.

(31) W.S. Huang, B.D. Humphrey and A.G. MacDiarmid, *J. Chem. Soc. Faraday Trans 1.* 82 (1986), pp. 2385-2400.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(32) L. Nyholm and L.M. Peter, *J. Chem. Soc. Faraday Trans* 90(1) (1994), pp. 149-154.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Capítulo V

Introducción

Materiales y métodos experimentales

Resultados

Determinación de iones metálicos en agua milli Q

Determinación de iones metálicos en otro tipo de muestras

Discusión y conclusiones

Referencias

Apéndice

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

V.1. Introducción.

La detección de iones de metales pesados es una práctica importante ya que estos son tóxicos para los seres humanos y además causan efectos adversos al medio ambiente.

La preocupación por la toxicidad de ciertos metales incluye también al aluminio, ya que aunque aún no se haya demostrado definitivamente una relación directa entre su rol en la enfermedad de Alzheimer, la evidencia epidemiológica sugiere que niveles elevados de éste, y otros metales (Fe, Cu), en el cerebro podrían estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad[1,2]. Es por esto que se guarda cierto cuidado con las cantidades de este metal consideradas aptas para el consumo humano.

Si bien el aluminio es el metal más abundante en la corteza terrestre y el tercer elemento más importante allí, actualmente la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA) no regula este metal en su programa de agua potable, pero tiene un estándar secundario de concentraciones entre 50-200µg/L[3].

La determinación de estas especies en pequeñas cantidades para productos basados en soluciones acuosas (agua potable, bebidas, productos farmacéuticos) puede realizarse mediante el uso de técnicas espectroscópicas. Sin embargo, el tiempo que se emplea para la determinación y el costo de la misma resultan muy elevados, ya que la mayoría de las veces se desea cuantificar o determinar la presencia de estas especies por debajo de los niveles máximos permitidos, por lo que es necesario realizar un pretratamiento de la muestra. Por lo tanto, sería conveniente desarrollar un sensor capaz de alertar cuando alguno de

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

estos iones metálicos se encuentra por encima del umbral establecido sin condicionamiento previo de la muestra.

Una manera de desarrollar un dispositivo capaz de determinar estas especies es aprovechando que la mayoría de los iones metálicos son capaces de formar complejos muy estables con ligandos quelantes polidentados: éstos son capaces de capturar iones en concentraciones del orden de ppb, debido a sus altas constantes de afinidad[4-6]. A pesar de esta importante propiedad, los ligandos presentan problemas de selectividad ya que la misma es generalmente pobre, por lo que impiden la diferenciación y determinación del ión según la señal obtenida.

La forma más popular para la detección de iones utilizando ligandos quelantes polidentados es a través de técnicas colorimétricas, aunque a veces el cambio de absorbancia no es lo suficientemente sensible. Una solución parcial a este problema es el uso de un agente quelante con propiedades fluorescentes, aunque el mismo no posee aplicación universal.

En cuanto a los problemas de selectividad y sensibilidad, una ingeniosa solución fue presentada por Anzenbacher quien logró desarrollar un dispositivo para la identificación y cuantificación de diferentes iones metálicos[7] usando una combinación de fluoróforos quelantes y analizando la señal obtenida por análisis de componentes principales. La desventaja que presenta este sistema es que el costo del equipamiento usado para realizar las determinaciones es elevado y no puede trasladarse fácilmente al lugar de muestreo.

La espectroscopía de impedancia es una técnica electroquímica capaz de producir una enorme cantidad de información debido a su

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

capacidad para estudiar al sistema de interés de una forma rápida y en diferentes condiciones.

Una característica común de estas especies con carga positiva (iones metálicos) es el hecho de que todas ellas pueden generar cambios eléctricos en el sistema. Sin embargo, en concentraciones bajas, estos cambios no son lo suficientemente importantes para producir una señal sensible. Una forma sencilla de mejorar su detección es capturarlos en la superficie del electrodo y observar los cambios producidos en la capacidad o en el proceso de transferencia electrónica de una sonda.

Estos cambios en capacidad y en transferencia electrónica pueden ser registrados y posteriormente analizados estadísticamente con métodos de análisis multivariado, los cuales permiten clasificar y discriminar el analito según la interacción que éste presente con la superficie.

En los últimos años varios grupos han utilizado la respuesta impedimétrica de superficies como el método de transducción para la detección de especies, en concentraciones bajas, ya sea por el reconocimiento específico o mediante métodos de reconocimiento de analitos de acuerdo a su naturaleza (por ejemplo sales, proteínas y azúcares)[8].

Para el reconocimiento específico se han usado aptámeros o anticuerpos, los cuales otorgan selectividad al sistema[9-11]. Dadas las altas constantes de asociación de estas especies, es posible detectar analitos en concentraciones muy bajas. En el segundo caso, los sistemas menos selectivos se utilizan para identificar grupos de compuestos en lugar de cada especie en particular[8,12].

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

En muchos de estos estudios puede utilizarse una cupla redox, como por ejemplo la cupla ferri/ferrocianuro, como sonda para seguir el cambio producido en la superficie del electrodo. Una de las ventajas de este método es que facilita el análisis de la señal, ya que la cupla utilizada es un sistema bien conocido. Por ejemplo, la concentración del analito puede ser determinada por los cambios del proceso de transferencia de electrones en la superficie del electrodo[6]. Por otra parte, cuando las sondas no están presentes, el análisis se limita principalmente a los cambios en la capacitancia y resistencia en el sistema[11,12].

Otro enfoque puede ser el uso de una sonda que forme parte de la superficie del electrodo. Cualquier cambio que se dé en el entorno de la superficie puede afectar el potencial redox formal de la sonda, originando pequeños cambios en el orden de mV que pueden resultar significativos y verse reflejados en la transferencia electrónica a un potencial dado. Esta información, sumada a otros cambios eléctricos debido a la adsorción de especies cargadas en la superficie del electrodo, puede producir un conjunto de datos útiles para distinguir la naturaleza de las diferentes especies adsorbidas.

De acuerdo con lo explicado anteriormente resulta interesante trabajar con superficies que posean una cupla redox como parte de ella y que a su vez sean capaces de interaccionar con iones metálicos. Por ello se estudiaron dos superficies (PANI/3AFA-d-NTA y violeta de piroquetacol (VP)), que pueden presentar comportamientos distintos ante la presencia de iones metálicos[4-6]. El uso de estas dos superficies permite formar un arreglo de electrodos que puede facilitar la discriminación entre los distintos iones de acuerdo con la naturaleza de los mismos, Generando así un sistema de detección económico y portátil.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Estas superficies fueron elegidas por presentar las siguientes características:

- PANI/3AFA: **al poseer PANI en su estructura puede usarse como sonda la cupla leucoesmeraldina-esmeraldina; por otro lado, puede ser modificada uniendo covalentemente el derivado de NTA (d-NTA) a los grupo carboxílicos del poli-3AFA[13-16]. Este derivado permitirá capturar los iones metálicos de la solución en estudio;**

- Violeta de Piroquetacol (VP): **debido a que es un ligando quelante polidentado que se absorbe de manera muy fácil sobre el grafito, presenta una alta constante de afinidad para Al^{3+}[4] y además posee una cupla reversible que puede actuar como sonda[17].**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

V.2. Materiales y métodos experimentales.

V.2.1. Materiales.

Anilina, 3-AFA, N,N-bis(carboxymethil)-L-Lisina, N-(3-dimetilaminopropil)-N'-ethilcarbodiimida (EDC) , N-hidroxisuccinimida (NHS) fueron provistos por Sigma –Aldrich Argentina. Todos estos reactivos son de calidad analítica salvo la anilina, que fue destilada al vacio para obtenerla con mayor grado de pureza. Violeta de piroquetacol (VP) fue suministrado por Merck.

Las soluciones de iones metálicos fueron preparadas a partir de sales de nitrato con calidad analítica. El agua Milli Q (resistencia 18 MÙ·cm) fue obtenida con un sistema de purificación de agua Millipore Milli Q. El agua mineral embotellada utilizada fue de marca comercial Villa del Sur (lote LB4133-Argentina) pH 7.8 y que contiene 19 ppm de Ca^{2+}, 12 ppm de Mg^{2+}, 164 ppm de Na^{+}, 10 ppm de K^{+}, 450 ppm de HCO_3^{-} y 0.7 ppm de F^{-}. La solución salina concentrada de NaCl (27% NaCl) fue suministrada por Fresenius Medical Care Argentina, esta solución es de calidad farmacopea y es la utilizada para la preparación de baños de hemodiálisis. El resto de reactivos utilizados son de calidad analítica.

V.2.2. Métodos

V.2.2.1. Construcción de sensores.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

V.2.2.1.1. Sensor PANI/3-AFA-d-NTA.

Una matriz desechable de 8 electrodos de grafito fue construida por serigrafiía (*"screen printing")* de una manera similar a la que se informó anteriormente[18] (pero sin la presencia de la pista de plata). Sobre los ocho electrodos se electropolimerizó PANI a partir de una solución de anilina 90 mM de anilina en H_2SO_4 1.8M realizando 6 voltametrías cíclicas entre -0.2 y 0.85 V vs. Ag/AgCl a 10 mV/s, posteriormente se lavó la matriz de 8 electrodos con abundante agua milli Q y se procedió con la electropolimerización con el ácido 3-amifenilacético (3AFA) a partir de una solución 10 mM en H_2SO_4 realizando 4 voltametrías cíclicas entre -0.2 y 0.85 V vs. Ag/AgCl a 10 mV/s.

Los grupos carboxílicos presentes en la superficie del electrodo fueron activados sumergiendo la matriz de ocho electrodos en una solución que contiene: 50 mM de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-ethilcarbodiimida (EDC) y 12 mM de N-hidroxisuccinimida (NHS) en buffer MES 100 mM pH 5.5 por 30 minutos. Finalizado este tiempo los electrodos fueron lavados con buffer MES 100 mM pH 5.5 y sumergidos por una hora en una solución 50 mM de buffer PIPES pH 7.5 que contiene N,N-bis(carboxymethil)-L-Lisina (d-NTA) 5 mM luego los electrodos fueron lavados con abundante agua milli Q. Las electropolimerizaciones y modificaciones de los electrodos fueron llevadas a cabo en la celda una celda diseñada para esto. (apéndice A.V.1, foto extraída de la tesis doctoral del Dr. Diego Pallarola)

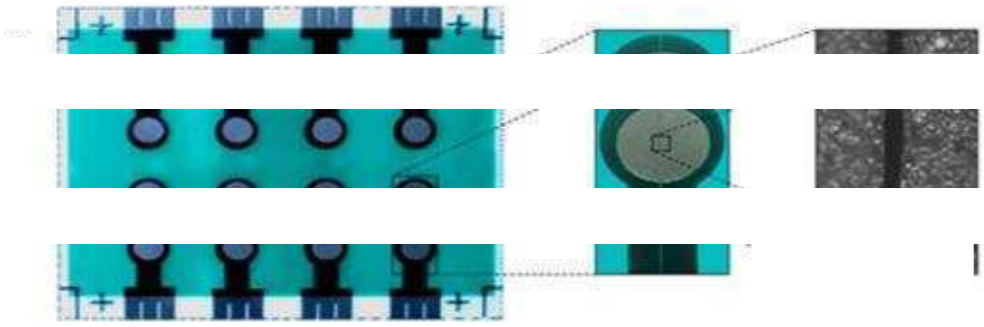
Posteriormente los ocho electrodos fueron cortados con un bisturí para dividir cada electrodo en dos separados por una distancia no mayor a 40 um. Una de estas mitades será utilizada como electrodo de trabajo y la otra como electrodo auxiliar. Finalmente los 8 sensores son separados para analizar cada muestra de forma individual. (Esquema 1)

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

V.2.2.1.2. Sensor VP.

Una matriz desechable de 8 electrodos de grafito sumergida en una solución 5mM de VP por 90 minutos y pasado este tiempo los electrodos fueron lavados con abundante agua milli Q.

Posteriormente los ocho electrodos fueron cortados con un bisturí para dividir cada electrodo en dos separados por una distancia no mayor a 40 um. Una de estas mitades fue utilizada como electrodo de trabajo y la otra como electrodo auxiliar. Finalmente los 8 sensores son separados para analizar cada muestra de forma individual. (Esquema 1)



Esquema 1. **Arreglo de electrodos y corte de los mismos.**

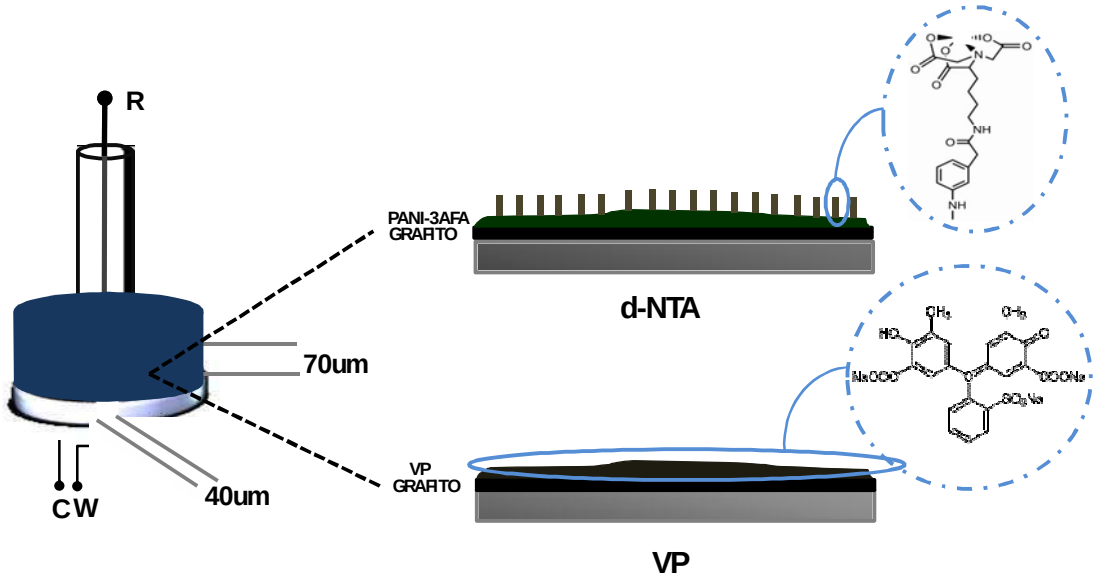
V.2.2.2. Medidas de espectroscopia electroquímica de impedancia (EEI).

Las medidas de EEI fueron realizadas con un equipo µAUTOLAB type III analizador de impedancia. La celda de medida fue hecha en acrílico, la cual permite que el electrodo de referencia se pueda colocar sobre el trabajo y electrodo auxiliar a una distancia fija de 70 um (Esquema 2). Los espectros de impedancia se registraron dentro de un rango de frecuencia de 0,1 Hz - 10 kHz. El potencial se ha fijado en

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

0,25 V para el sensor PANI/3AFA-dNTA, y 0,2 V para el sensor VP. La amplitud de la tensión alterna se 10mV. Un total de 51 frecuencias fueron estudiadas con una distribución logarítmica en cada década. Cada ión metálico se ha estudiado en un electrodo modificado nuevo, donde primero fue analizada el agua milli Q y luego se adiciono el ion metálico de estudio en una concentración final que van desde 1 hasta 250 µM. Los resultados se analizan en términos de resistencia (Z') y la reactancia capacitiva (Z'').

Cabe destacar que la preparación de las soluciones de iones fueron realizadas en material volumétrico lavado con extremo cuidado: primero se sumergió en un detergente alcalino por 30 minutos, después se sumergió en acido nítrico 1 N por 90 minutos y luego es lavado con abundante agua milli Q. Una vez preparadas las soluciones estas fueron transvasadas a un envase plástico nuevo y limpio.



Esquema 2. **Celda para medidas de impedancia. Donde: *R* electrodo de referencia, *C* electrodo auxiliar y *W* electrodo de trabajo**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

V.2.2.3. Análisis multivariado de datos.

Cada medición se realizó usando un arreglo de dos sensores, determinando Z' y Z" para un número de 51 frecuencias para cada sensor. Por lo tanto, cada medición, fue considerada como un vector de un espacio N-dimensional con vector de N igual a 204 (2 x 2-sensores de variables x 51-frecuencias). Además, teniendo en cuenta que cuatro concentraciones fueron estudiadas y cada medida se realizo por triplicado para cada concentración y para cada ion de metal, entonces se obtuvieron doce medidas para cada ion. Esto hace que a una matriz de datos MxN compuesto por M–filas y la N-columnas, en donde M = 12 x número de iones que se van a ser discriminados discriminadas (ocho iones y la mátriz de estudio). Por lo tanto, una matriz de M = 108 y N = 204 fue inicialmente utilizado como entrada de para el análisis multivariado. Sin embargo, el tamaño de la matriz de datos de entrada se redujo significativamente después por una selección apropiada de los más los datos de entrada representativa, basada en la inspección del factor de "*loading*" por el ACP, que conduce a los valores de N entre 18 y 30 dependiendo del caso particular.

V.2.2.3.1. Métodos multivariados no supervisados.

Dos métodos no supervisados fueron utilizados, análisis de componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados (AC), los cuales son los métodos más comúnmente utilizados para el análisis de datos de arreglos de sensores[19,20].

En ACP, las proyecciones de cada vector de medición en la base ortonormal de la N-dimensionales asociados a las direcciones de la varianza de los datos máximos fueron obtenidos por diagonalización de la matriz de correlación. Estas proyecciones se refieren a los llamados

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

componentes principales. Con frecuencia, las proyecciones en las primeras dos o tres direcciones de la nueva base del espacio vectorial contiene más del 90% de la varianza total de datos, con lo que la investigación de estos conjunto reducido de componentes mejora la capacidad de agrupación de datos para los propósitos de discriminación, favoreciendo así una importante reducción dimensional. Por lo tanto, los resultados del ACP son gráficos en 2D o 3D, comúnmente conocida como mapas de ACP o *"score plots"*, representan los más relevantes componentes principales para cada medición realizada con el arreglo de sensores. Las muestras se agrupan por similitudes en mapas de ACP y los grupos observados por inspección visual.

Análisis de conglomerados (AC) es también un método no supervisado[19]. La principal diferencia respecto a ACP es la habilidad para probar el rendimiento cuantitativo del arreglo de sensores para el agrupamiento correcto de los datos, indicando el poder de agrupar la información contenida en cada muestra en un número deseado de grupos. El número de grupos, es llamado agrupamiento o *"cluster"* y es elegido por el operador según sus necesidades o conocimientos previos sobre el tipo de muestras. En nuestro caso, el número de grupos elegido es igual al número de iones más la solución de estudio para ser objeto de discriminación (por ejemplo, 9 será el numero de agrupamiento en el caso de las soluciones en agua milli Q).

AC puede ser implementada utilizando diferentes algoritmos. En este caso trabajaremos con el algoritmo Partition Around Medoids (PAM) algoritmo utilizado, que se basa en la búsqueda de objetos representativos k entre el conjunto de datos (k = número de grupos deseados), llamado Medoids. El Medoids se calcula de modo de que la distancia total entre todos los elementos y sus más cercanos Medoid sea la mínima. El número de grupos de clasificación deseado será fijado

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

previamente, y estos serán asignados después de ejecutar PAM. Cada elemento se asigna a la agrupación correspondiente al centro o semilla más cercana. Por lo tanto, PAM indica como están compuestos los grupos según los datos de entrada, lo que permite verificar si el número de muestras están correctamente agrupadas.

Además de AC proporciona también la silueta de cada grupo. Para cada elemento i (cada uno de los datos de entrada), el valor de la silueta *sv(i)* está dado por : $sv(i) = \frac{a(i) - b(i)}{\max\{a(i), b(i)\}}$**, donde *a(i)*, es la distancia media entre el elemento *i* todos los demás elementos de la agrupación, mientras que *b(i)* es la distancia media de *i* a todos los elementos del grupo mas cercano. Si *sv(i)* es cercano a un valor de 1 implica que el elemento *i* ha sido bien agrupado , mientras que si el *sv(i)* es cercano a un valor de -1 implica que el elemento *i* no ha sido bien agrupado. En la práctica, el agrupamiento óptimo está dada por los mismos valores de *sv(i)* para las diferentes muestras en el mismo grupo, y para valores cercanos 1 de sus promedios, esto se denomina como el ancho de silueta promedio, ASW. Los valores de ASW entre 0,7 y 1 son considerados para indicar un buen agrupamiento[21].**

V.2.2.3.2. Análisis Discriminante Multivariado (ADM).

El ADM es un método supervisado, el cual es utilizado para el la discriminación entre muestras[22,23]. El ADM utiliza datos para el entrenamiento del sistema con el fin de obtener las funciones discriminantes que definen los límites entre las clases, es decir, encuentra los límites óptimos para separar las clases. Se han utilizado expresiones lineales o cuadráticas las cuales definen la función de la superficie de la frontera entre clases, los métodos utilizados son el análisis discriminante lineal (ADL) y el análisis discriminante cuadrático

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(ADC), respectivamente. Los parámetros que definen las funciones se obtienen en un proceso de optimización, utilizando datos para el entrenamiento. Por ejemplo el ADL encuentra una función discriminante lineal que es una combinación lineal de las variables originales de forma de maximizar la relación entre los elementos de una clase y de maximizar la dispersión entre distintas clases, asumiendo que las matrices de covarianza son iguales para todos los grupos.

La cantidad de datos de entrenamiento fue siempre el 80% del total de datos disponibles y el mismo porcentaje que utilizó para seleccionar el número de entrada de datos asociada a cada clase. Estos datos fueron seleccionados al azar en las anteriores restricciones. Este procedimiento se repitió tres veces, con lo que se realizaron tres ensayos en cada una de las situaciones analizadas.

V.3. Resultados

V.3.1. Determinación de iones metálicos en agua milli Q.

En primer lugar se estabilizaron las superficies modificadas (ya sea PANI/3AFA-dNTA o VP) en agua milli Q y se registró la respuesta electroquímica de la misma (Figura 2). Además, se observó el potencial de la cupla redox en esta solución para determinar el potencial de trabajo a utilizar en la detección de los iones metálicos de interés.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

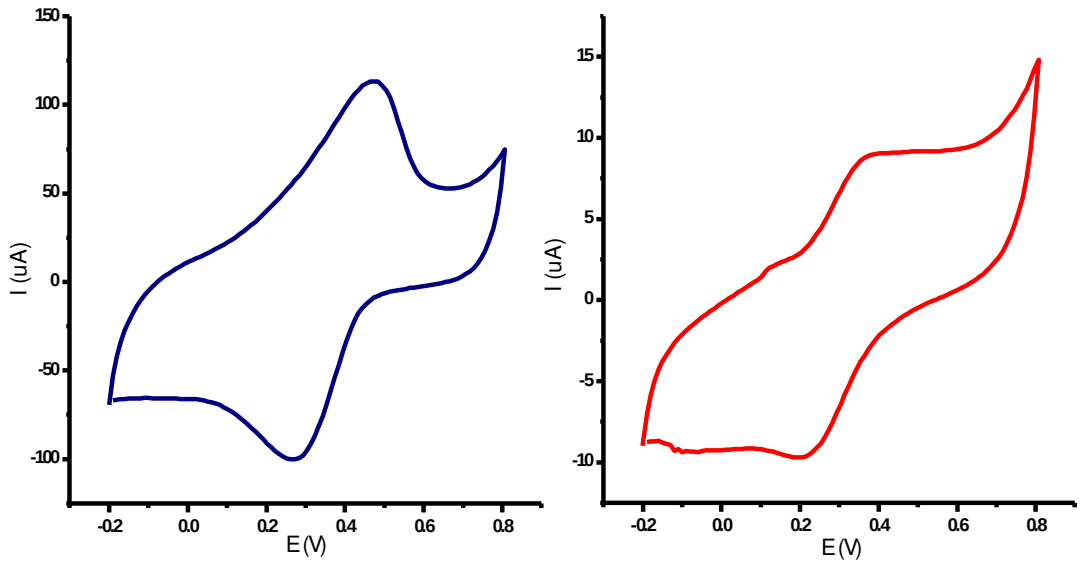


Figura 2. **Voltametría de PANI/3AFA-dNTA (Azul) y VP (Rojo) en agua milli Q.**

Una vez observado el comportamiento de estas superficies en agua milli Q, se fijó el potencial de trabajo en 0.25 V vs Ag/AgCl para PANI/3AFA-dNTA y en 0.20 V vs Ag/AgCl para VP durante 200 s para estabilizar las superficies. Posteriormente se realizó el estudio de impedancia de la superficie en estas condiciones (potenciales descritos anteriormente) observando la respuesta en agua milli Q y posteriormente en el sistema agua milli Q + ión metálico de interés (Al^{3+}, Fe^{3+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Ca^{2+}, Hg^{2+}, Pb^{2+} o Ag^{+} en un intervalo de concentraciones entre 1 y 250 µM) utilizando un electrodo para la determinación de cada ión metálico.

En la Figura 3 (diagrama de Nysquit), se puede observar la respuesta del sensor PANI/3AFA-dNTA en presencia de agua milli Q y para concentraciones crecientes desde 1 hasta 250 µM de iones metálicos en agua milli Q (Al^{3+}, Cd^{2+}, Ca^{2+} y Cu^{2+}). Cada ion fue estudiado sobre un electrodo diferente; como puede verse, las señales correspondientes a los blancos con agua milli Q son similares y tienen

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

prácticamente los mismos valores en resistencia (Z´) y resistencia capacitiva (Z´´= 1/*w*C) para los cuatro electrodos. El comportamiento observado en la matriz muestra la alta reproducibilidad entre los electrodos. Además se puede observar en los diagramas de Nysquit que la superficie presenta distinta respuesta según el tipo de interacción que presenta el ión con la superficie.

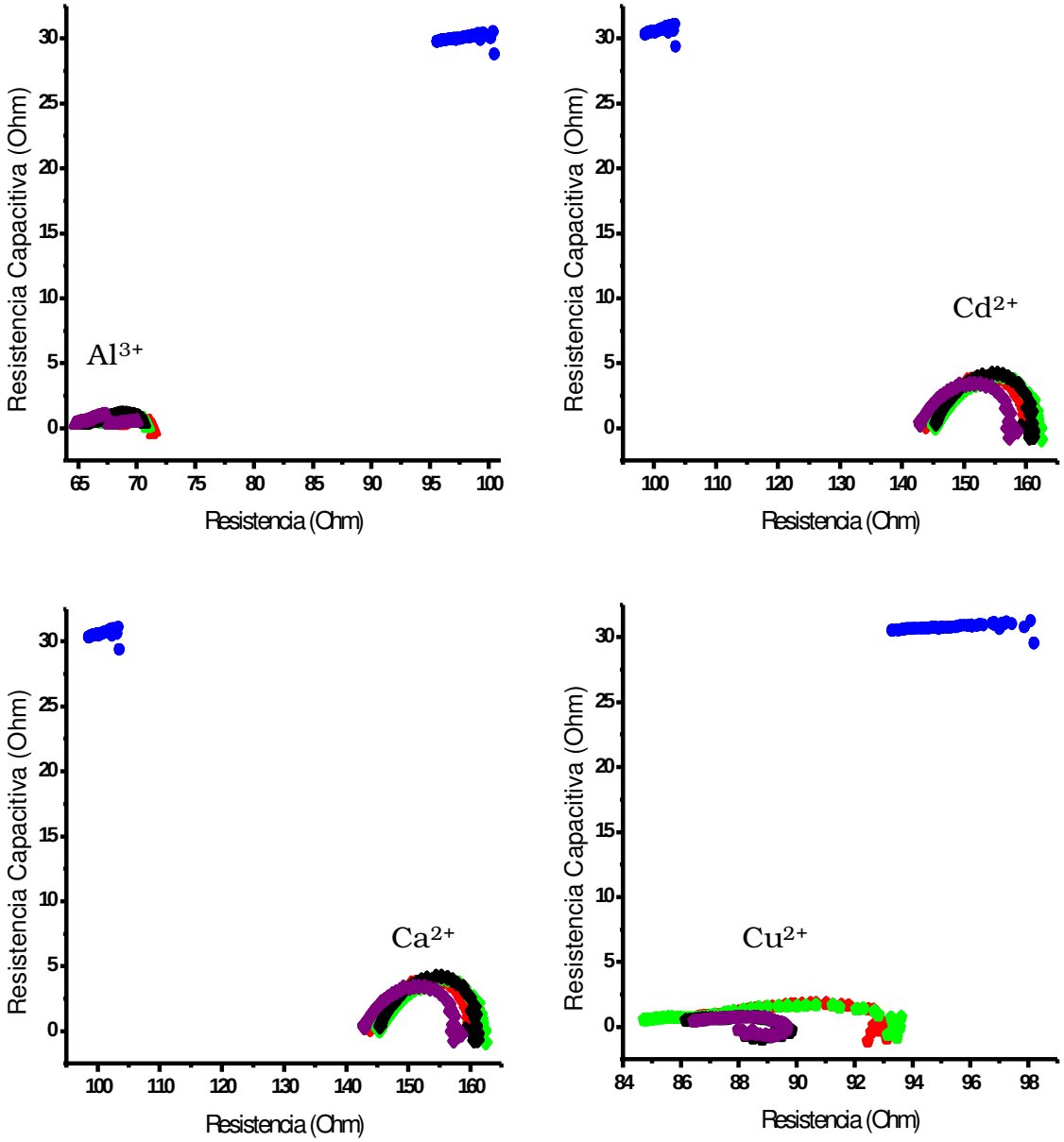


Figura 3. **Respuesta de la superficie PANI/3AFA-dNTA para: agua milli Q (Azul) y distintos iones a distintas concentraciones (Rojo: 1 µM; Verde: 12 µM; Negro: 125 µM; Violeta: 250µM).**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

El mismo tipo de resultado fue observado para el sensor VP (Figura 4): la respuesta obtenida para agua milli Q es la misma para los cuatro electrodos modificados con este ligando, y además se pueden observar claramente las distintas respuestas obtenidas según el ión metálico (Al^{3+}, Fe^{3+}, Ca^{2+} o Cu^{2+}) que interactúe con la superficie.

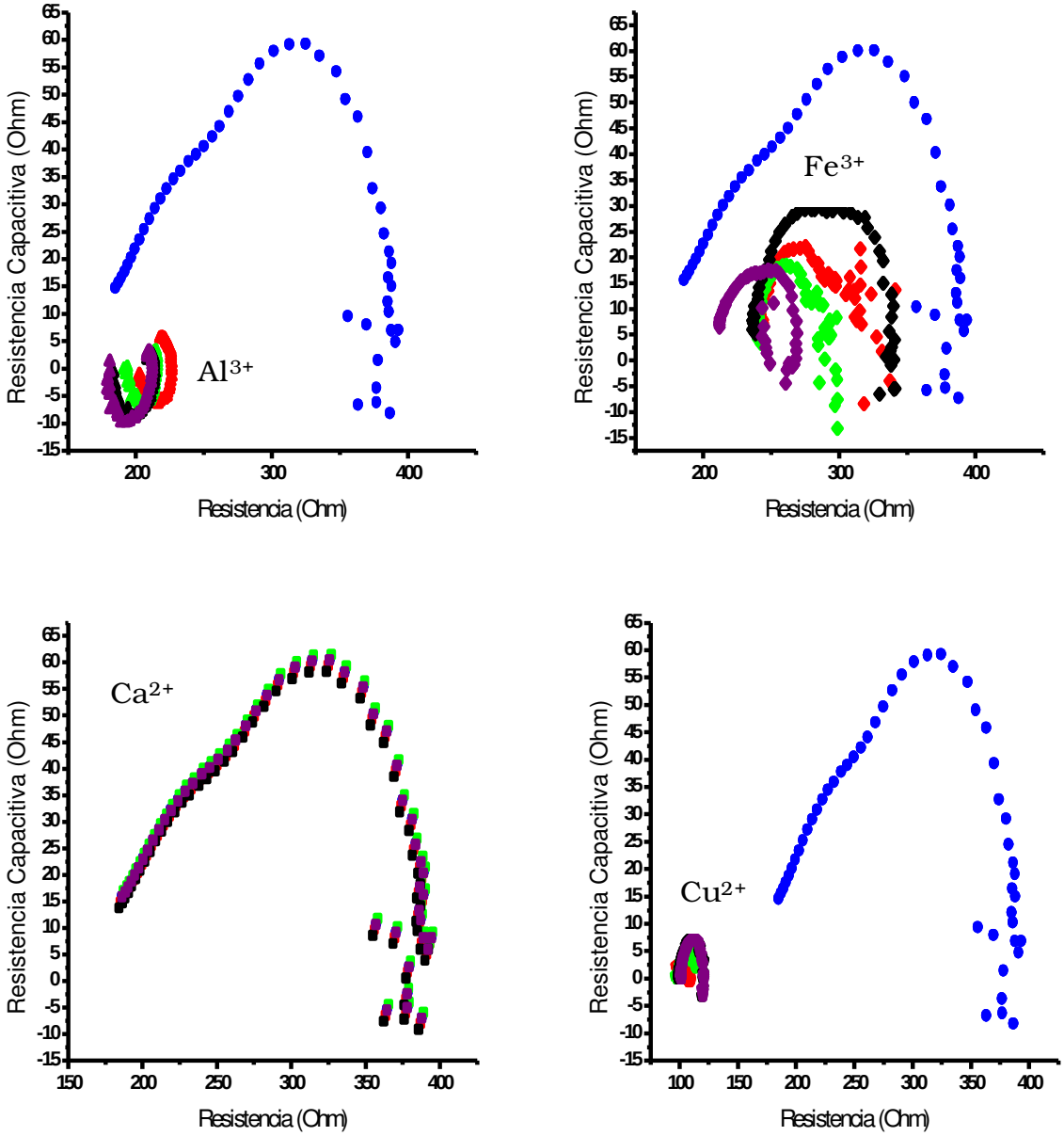


Figura 4. **Respuesta de la superficie VP para: agua milli Q (Azul) y distintos iones a distintas concentraciones (Rojo: 1 µM; Verde: 12 µM; Negro: 125 µM; Violeta: 250µM).**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Para evaluar la reproducibilidad del método utilizado se evaluó la respuesta de 8 electrodos diferentes modificados con VP (Figura 5). En la misma se puede ver la desviación estándar obtenida para los 8 electrodos; por ejemplo, el promedio de valores para la resistencia y resistencia capacitiva a 10 Hz son 364 ± 2 y 46 ± 1 ohms (n=8) respectivamente. Un comportamiento similar fue obtenido para la superficie PANI/3AFA-dNTA.

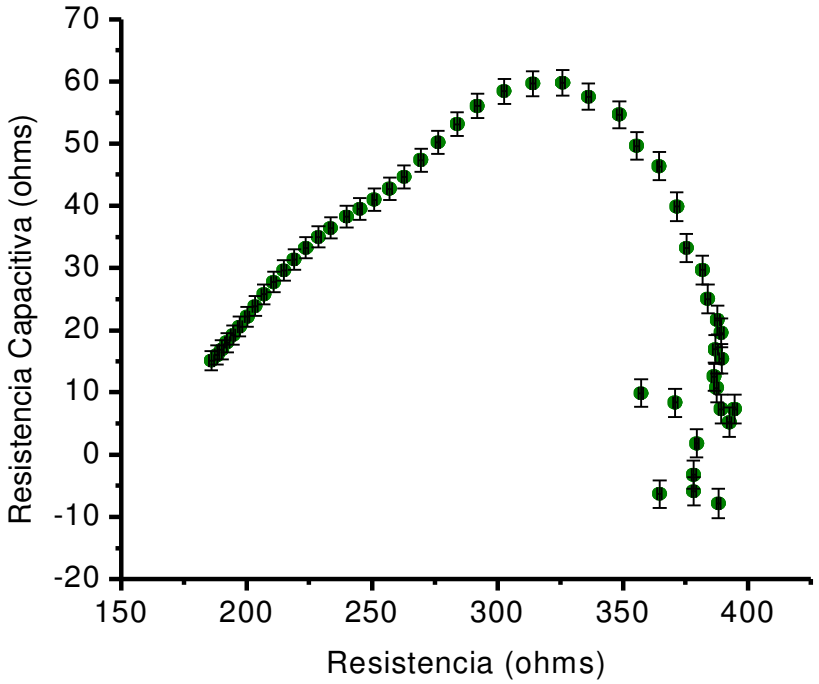


Figura 5. **Respuesta de la superficie VP en agua milli Q para ocho electrodos diferentes.**

La reproducibilidad de los electrodos se logra debido a que son modificados en forma simultánea y en las mismas condiciones, lo que permite que sea válido correlacionar las respuestas obtenidas para la determinación de los diversos iones sin la necesidad de relacionar las respuestas de distintos electrodos con una referencia común.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Otra característica importante del sistema es que, debido a la rápida velocidad de reacción de los iones metálicos con el quelante, la medición puede llevarse a cabo inmediatamente después de la colocación de la muestra en contacto con el electrodo, sin ninguna manipulación adicional, como los pasos de enjuague o adiciones de la sonda.

Cuando se realizó el análisis de impedancia el sistema fue estudiado a 51 frecuencias distintas entre 0.1 y 10000 Hz, dando respuestas de corriente y de desplazamiento de fase para cada una de las frecuencias. Esta información es representada en resistencia (Z´) y en resistencia capacitiva (Z´´), por lo que se tiene un total de 102 respuestas por cada sensor. Los datos obtenidos de algunas frecuencias seleccionadas se presentan el la Figura 6.

En la parte superior de la Figura 6, se presentan las resistencias (izquierda) y las reactancias capacitivas (derecha) para el sensor de VP. Los valores de resistencia para cada ión metálico no muestran cambios importantes a través de la frecuencia; sin embargo, entre las muestras, algunos elementos pueden ser fácilmente distinguidos de acuerdo con sus características químicas. Pueden establecerse tres grupos principales:

- **Un primer grupo (Cu^{2+} y Hg^{2+}), con una baja resistencia: esto se debe a que estos iones pasan por un proceso redox al potencial de trabajo;**

- **un segundo grupo (Fe^{3+} y Al^{3+}), con una resistencia intermedia, debido a que estos iones presentan altas constantes de afinidad por el quelante;**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

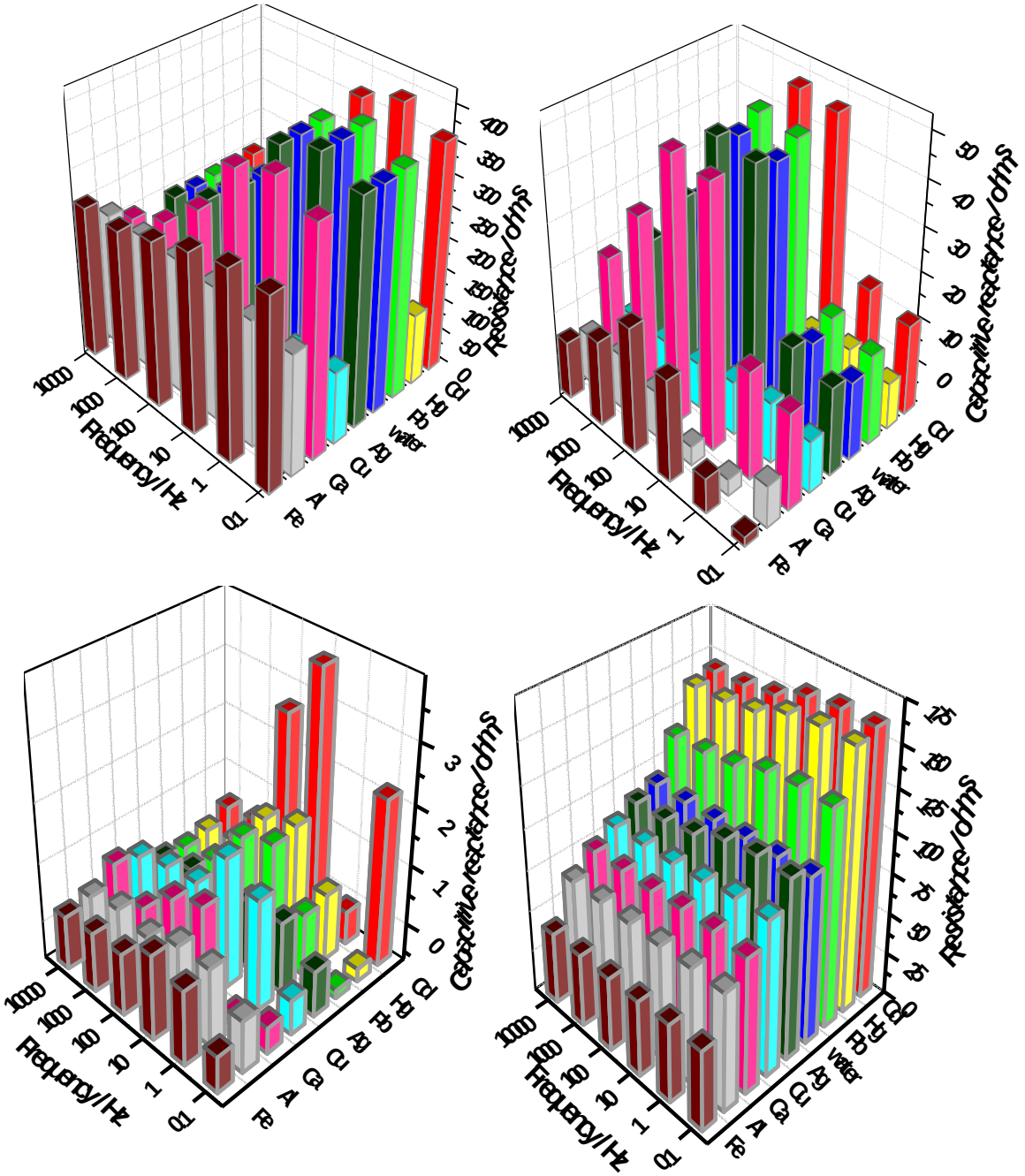


Figura 6. **Respuesta de los sensores para agua milli Q y para una concentración 12 µM de ión metálico en agua milli Q. Gráficos superiores para VP e inferior para PANI/3AFA-dNTA. Resistencia Capacitiva: gráficos a la izquierda y Resistencia gráficos a la derecha.**

PDF

- **un tercer grupo, que corresponde a los iones que no forman complejos o presentan una baja afinidad con el VP[4]. A la derecha en el gráfico de la resistencia capacitiva para el VP se muestra un patrón más diverso en toda las frecuencias, permitiendo también la clasificación de los iones metálicos, principalmente en los mismos tres grupos.**

Para el sensor PANI/3AFA-dNTA (parte inferior Figura 6), se puede observar que los cambios en la resistencia a lo largo del rango de frecuencias son pequeños. Sin embargo, se observan cambios importantes en las capacitancias. En este caso los valores de la reactancia capacitiva de agua milli Ω no están representados, debido a que van desde 28 a 31 ohmios, mientras que las muestras con iones metálicos tienen un valor máximo de 3 ohmios. Es importante tener en cuenta que estos valores representan el inverso de la capacidad: considerando que este sensor está formado por un recubrimiento que contiene ácidos y bases débiles, cuando un ión metálico se incorpora produce un cambio importante en la carga del recubrimiento, impactando en la capacitancia.

A pesar de que es posible hacer una interpretación cualitativa de los resultados señalados anteriormente, un análisis detallado no se puede realizar, ya que los experimentos se llevan a cabo en condiciones en las que el comportamiento de los diferentes cationes no puede ser descrito por medio de un modelo sencillo. Es por esto, que resulta interesante centrarse en el uso de la riqueza de la información para la búsqueda de las diferencias que permitan detectar los diferentes iones metálicos por debajo de lo niveles permitidos[12,8,24]. Por lo tanto, se realizó el análisis multivariado de los datos (Análisis de Componentes Principales (ACP), Análisis de Conglomerados (AC) y Análisis Discriminante Multivariado (ADM) con el fin de explorar la capacidad de

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

la actual metodología para discriminar las soluciones de los diferentes iones, es decir, sobre la base de su identidad química.

El primer paso fue realizar un ACP para las respuestas obtenidas del estudio de la interacción de los cationes metálicos con el sensor PANI/3AFA-dNTA y con sensor VP. Este método permitirá distinguir la formación de los grupos de acuerdo a la similitud entre las muestras analizadas, haciendo posible diferenciar de una manera visual (en el mapa de ACP o gráfico de "*score*") cada uno de los grupos formados.

Cuando se realiza el gráfico de "*score*" con los datos obtenidos del ACP para el sensor PANI/3AFA-dNTA (Figura 7), se puede apreciar que las respuestas de agua pura son diferentes a las respuestas del sensor frente a agua contaminada con los iones de estudio. Esto se debe a la interacción que presentan los iones con la superficie. Además se puede observar claramente la formación de ocho diferentes grupos: uno que corresponde a agua pura, seis que corresponden a las respuestas para los iones Al^{3+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ca^{2+}, Pb^{2+} y Ag^{+} y un grupo corresponde a las respuestas para Hg^{2+} y Cd^{2+}. Si bien es claro que este sensor es capaz de diferenciar agua pura de agua con iones metálicos, el mismo no es capaz de diferenciar las respuestas obtenidas para Hg^{2+} y Cd^{2+}.

También se realizó un gráfico de score para las respuestas obtenidas del ACP para el sensor de VP (Figura 8), donde se puede ver claramente la formación de cuatro grupos: un grupo que corresponde a las respuestas para agua pura y para los iones que no presentan interacción con la superficie Ag^{+}, Ca^{2+}, Pb^{2+} y Cd^{2+}, dos grupos que corresponden a los iones Al^{3+} y Fe^{3+} y un cuarto grupo que corresponde a las respuestas para los iones Hg^{2+} y Cu^{2+}. Es claro que este sensor es capaz de diferenciar agua pura de los iones que presentan alguna interacción con la superficie (Al^{3+}, Fe^{3+}, Hg^{2+} y Cu^{2+}).

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

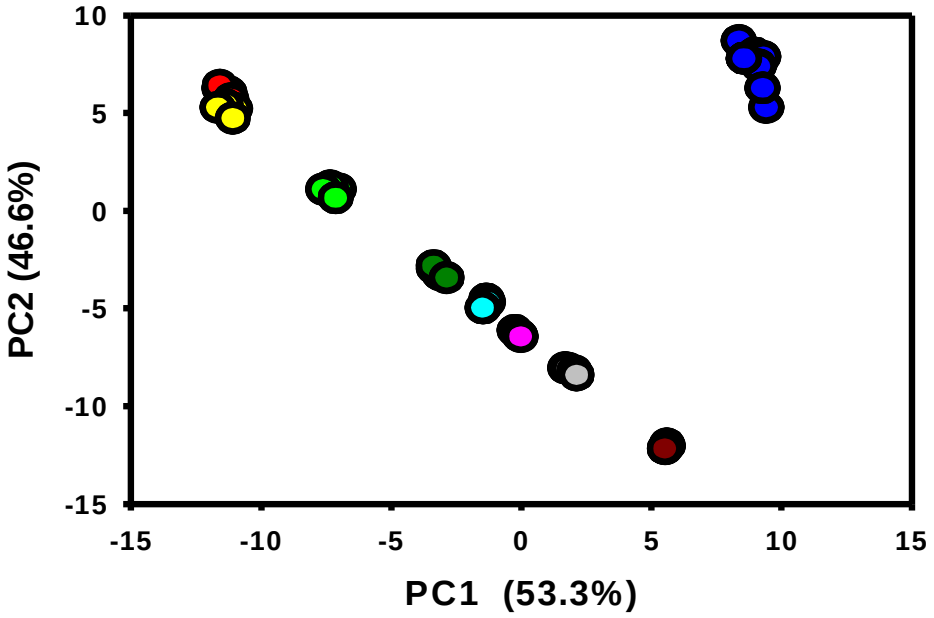


Figura 7. **ACP para el sensor PANI/3AFA-dNTA.**

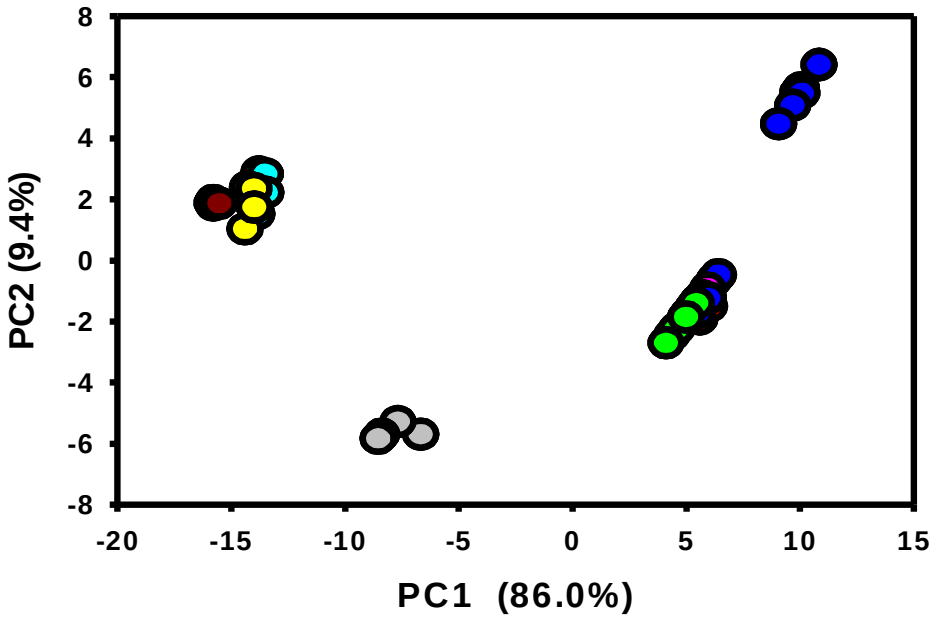


Figura 8. **ACP para el sensor VP.**

Agua Ag Al Ca Cd Cu Fe Hg Pb

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

A partir de los resultados obtenidos para cada sensor, se decidió realizar un arreglo de estos combinando las respuestas obtenidas del estudio de impedancia para cada uno de ellos. Esta nueva matriz de datos fue utilizada para realizar estudios de análisis multivariado, con el fin de poder discriminar entre las distintas muestras de estudio.

Al realizar el ACP de esta matriz, se puede apreciar que las primeras tres componentes principales representan el 94% de la varianza total. El gráfico de "*score*" (Figura 9 superior), muestra que se puede distinguir cada una de las respuestas para los iones de estudio (cada grupo está compuesto por un solo tipo de muestra, es decir, agua milli Q y cada uno de los cationes de soluciones acuosas). Esto se puede explicar basándose en las respuestas obtenidas para cada sensor por separado, ya que el sensor PANI/3AFA-dNTA es capaz de diferenciar las respuestas de agua y todos los iones de estudio menos las de Hg^{2+} y Cd^{2+} (Figura 7), mientras que el sensor VP logra diferenciar agua y soluciones acuosas de los iones Hg^{2+},Cd^{2+}, Al^{3+} y Fe^{3+}(Figura 8), por lo que la combinación en las respuestas de los estudios de impedancia para ambas superficies hace posible la separación de todos los iones de estudio según la interacción que presenten estos con las superficies.

Cuando se toman sólo las dos primeras componentes principales se puede observar una clara agrupación de las muestras con una buena discriminación entre los distintos contaminantes (Figura 9, inferior). Cabe destacar la importante diferencia entre el agua milli Q y las demás muestras, mientras que la distribución de los iones en el gráfico mantiene una relación con la información descrita para la Figura 6. Por ejemplo, Hg^{2+} y Cu^{2+} presentan una posición respecto notablemente diferente a los demás, mientras que el Fe^{3+} y Al^{3+} están cerca.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

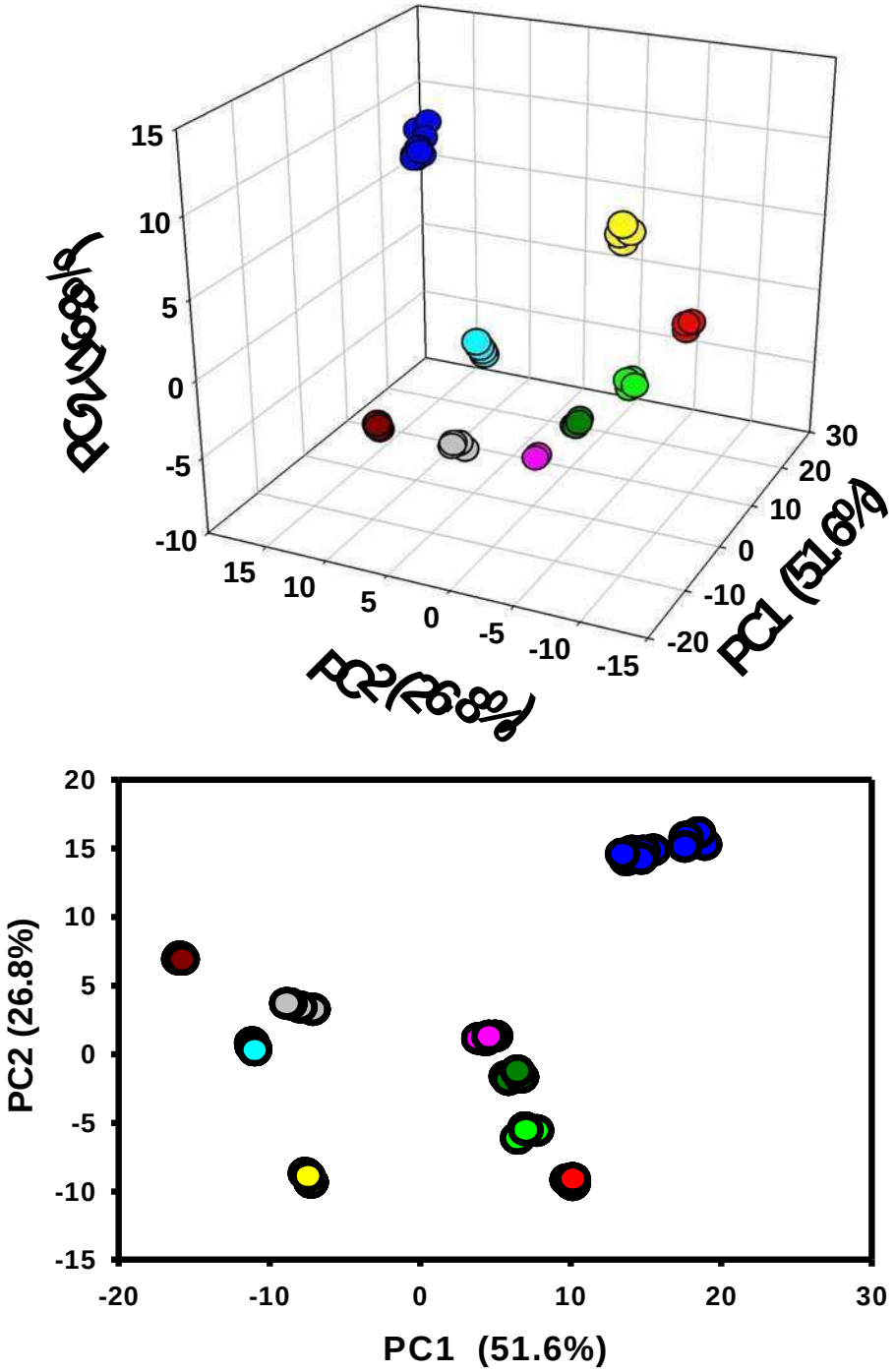


Figura 8. **ACP para arreglo de electrodos PANI/3AFA-dNTA+VP en agua milli Q; gráfico superior 2D; gráfico inferior 3D.**

Agua Ag Al Ca Cd Cu Fe Hg Pb

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Se llevó a cabo un AC con el fin de confirmar cuantitativamente la agrupación obtenida por la inspección visual del ACP. Cuando se realizó el AC se obtuvo como resultado un excelente agrupamiento para las muestras analizadas, es decir, que todas las muestras de igual composición fueron asignadas al mismo grupo sin cometer errores. La medida de la silueta promedio, ASW, fue de 0.86, este valor confirma la bondad del agrupamiento ("*clusterización*").

Por último, se realizó un método supervisado, ADM. Considerando que el método es pensado como una alarma de contaminación con iones metálicos en la producción de productos farmacéuticos o bebidas en situaciones donde es conocida la posible presencia de ciertas impurezas, se exploró la capacidad del sistema de sensores para clasificar muestras de los cationes considerados. Esto se lleva a cabo utilizando análisis multivariado supervisado de datos, como el Análisis Discriminante Multivariado (ADM). En otras palabras, los métodos multivariados supervisados pueden ser utilizados para entrenar el sistema de sensores para reconocer contaminantes relevantes. Se utilizó ADM para la clasificación de las muestras. Se eligieron al azar 86 muestras para entrenar el sistema y 21 como muestras para la evaluación del método. Este proceso se repitió en forma azarosa tres veces y en todos los casos se obtuvo 100 % de clasificación correcta de las muestras de evaluación.

Dado que el sistema muestra un excelente desempeño, se puede plantear la interrogante de si un menor número de entrada de datos se puede utilizar para obtener el mismo resultado y ahorrar tiempo en el procedimiento analítico.

Se tomaron dos criterios: uno estadístico basado en el análisis de las frecuencias más importantes para el ACP (factor de "*loading*") y el otro mediante inspección visual de los valores Z' y Z" obtenidos para

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

diferentes frecuencias (Figura 6). El criterio estadístico, basado en el análisis del llamado factor de "*loading*" obtenido en ACP, muestra que ambos sensores son necesarios; en cada uno de ellos, tanto Z' como Z'' se utilizan en el análisis. Finalmente, el análisis estadístico muestra que las frecuencias bajas (entre 0,1 y 32 Hz) contribuyen a producir una buena discriminación de los distintos tipos de muestras. Usando 18 de las variables se puede apreciar que las tres primeras componentes principales describen el 97% de la varianza total (Figura 9 superior). Para el análisis de conglomerados, si las muestras son dividas en 9 grupos, el sistema confunde a algunas de las muestras de agua con soluciones de iones de plata. Esto puede ser corregido utilizando el método de supervisión (ADM), donde se obtiene un éxito en clasificación del 100%.

Cuando se realizó la inspección visual de los valores de Z' y Z'' (Figura 6), se puede observar que el sistema a bajas frecuencias muestra diferencias importantes entre las soluciones de iones. Por lo tanto, se analizaron siete frecuencias entre 0,1 y 40 Hz usando los dos sensores. Esto significa que fueron analizadas en total de 28 variables, ya que son tomadas siete frecuencias para Z' y siete frecuencias para Z'' en cada sensor, teniendo un total de 14 frecuencias por sensor. El ACP muestra tan buenos resultados como los obtenidos anteriormente (Figura 9). El análisis de conglomerados es mejorado con un 100% de éxito, significando que con el uso de solo 28 de las 204 variables es posible obtener el mismo resultado. ADM también presenta un 100% de clasificación correcta de las muestras de evaluación.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

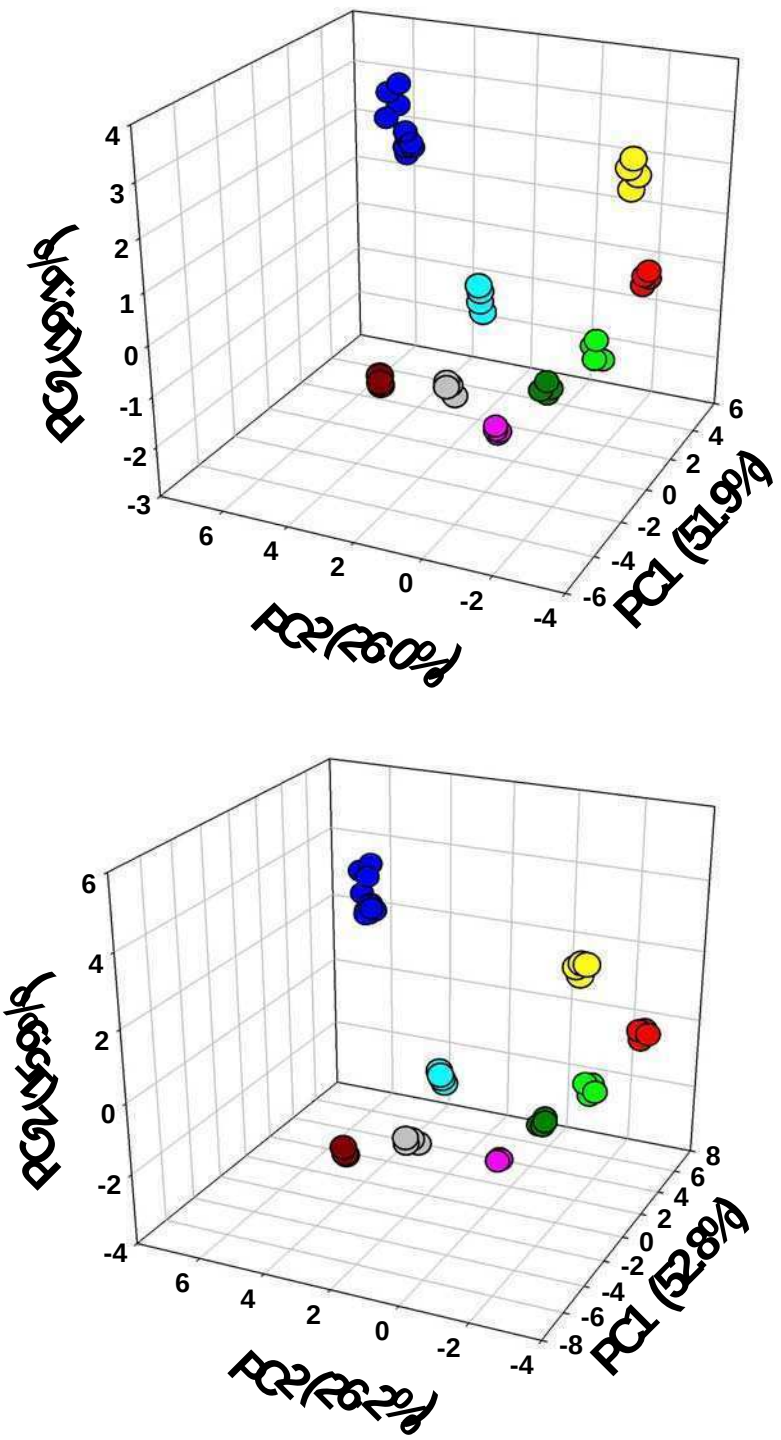


Figura 9. **ACP para arreglo de electrodos PANI/3AFA-dNTA+VP en agua milli Q. Gráfico superior 18 variables; grafico inferior 28 variables.**

●Agua ●Ag ●Al ●Ca ●Cd ●Cu ●Fe ●Hg ●Pb

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

V.3.2. Determinación de iones metálicos en otros tipos de muestras.

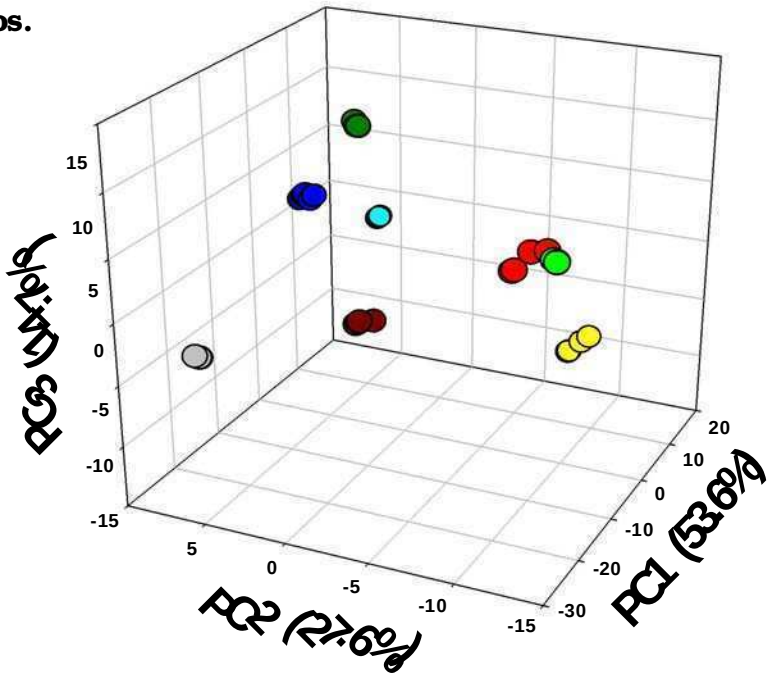
La presencia de contaminantes de metales en soluciones acuosas es una importante preocupación en bebidas y productos farmacéuticos. Como ejemplos de la aplicabilidad de este método a la detección de eventuales contaminantes, se analizaron muestras de agua mineral embotellada y de solución concentrada de cloruro de sodio calidad farmacopea.

En las soluciones concentradas de cloruro de sodio, los cambios más importantes respecto a la muestra de agua milli Q son la alta concentración de iones, lo cual cambiará las características eléctricas del sistema, la capacidad de los iones cloruros de formar complejos con los iones metálicos y la presencia de sodio. Esta solución presenta diferencias importantes respecto al agua milli Q; sin embargo es posible observar diferencias entre los distintos iones metálicos debido a la elevada capacidad secuestrante de los quelantes.

La Figura 10, muestra el ACP de la combinación de las respuestas para ambos sensores en solución de cloruro de sodio pura y contaminada con distintos iones metálicos (el ACP para cada sensor apéndice A.V.2); puede observarse que las tres primeras componentes principales representan un 96% de la varianza total del sistema (Figura 10 superior), mientras la Figura 10 inferior representa el 81% de la varianza. En ambos gráficos se obtienen regiones bien definidas; comparado con el agua milli Q, la distribución de los diferentes conglomerados alrededor de la muestra pura es diferente, y el sistema tiende a solapar las muestras de los iones metálicos Cd^{2+} (rojo) y Pb^{2+} (verde claro). Al aplicar el AC para agrupar las muestras, el análisis obtenido integra las respuestas de Cd^{2+} y Pb^{2+} en el mismo grupo,

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

mientras que divide a Hg^{2+} (amarillo) en dos grupos. Finalmente, ADM evidencia que con un entrenamiento apropiado, similar al utilizado para agua milli Q, el sistema puede diferenciar todas las muestras con un 100% de éxitos.



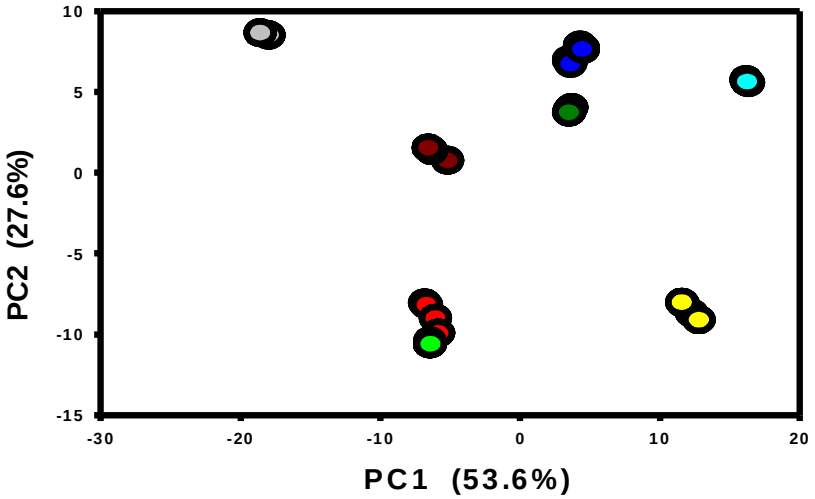


Figura 10. **ACP para arreglo de electrodos PANI/3AFA-dNTA+VP para cloruro de sodio; parte superior gráfico 2D; parte inferior gráfico 3D.**

NaCl Ag Al Cd Cu Fe Hg Pb

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Cuando se evaluó el factor de "*loading*" obtenido en ACP, se observo que un total de dieciocho variables (seis para cada componente que describe el ACP) son las que influyen de forma más importantes en el análisis siendo estas frecuencias comprendidas entre 400 y 10 KHz. Utilizando solo esta cantidad de variables se logra explicar el 97% de la varianza total. En la Figura 11 se puede observar una mejor discriminación que la observada en la Figura 10. Además cuando se realizo un AC se mostró que el uso de solo dieciocho variables permite realizar un excelente agrupamiento logrando agrupar cada elemento según su naturaleza con un ASW 0.84. Esto muestra que algunas veces el uso de una gran cantidad de información puede ser redundante y ocasionar la perdida de la discriminación del sistema.

La tercera muestra estudiada fue el agua mineral embotellada, donde las concentraciones de de iones calcio y magnesio son de alrededor de 500 µM las capacidades quelantes de los agentes usados para estos iones pueden tener un impacto importante, por lo tanto se realizo el ACP para cada sensor independiente.

Para el sensor de VP se puede observar la formación de 4 grupos: uno que contiene a las muestras de agua mineral pura junto con los iones que no presentan interacción con la superficie y otros tres grupos que contienen Al^{3+}, Fe^{3+}, Hg^{2+} y Cu^{2+}. Vale la pena destacar que las respuestas para los iones Al^{3+} y Fe^{3+} se encuentran muy cercanas al igual que los grupos Hg^{2+} y Cu^{2+} esto se debe posiblemente a que el magnesio en altas concentraciones forma un complejo con el [4,25], por lo que la señal producida por esta complejación puede influir enmascarando las señales, afectando análisis de las mismas (Figura 12).

Para el caso del sensor PANI/3AFA-dNTA (Figura 13), se puede ver que el sensor es capaz de discriminar parcialmente casi todos los

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

componentes de la muestra, mostrando una similitud en la respuesta para plomo y cadmio, cabe destacar que para este caso la constante de complejación es al menos tres órdenes de magnitud menor a la constante de los otros iones metálicos[5,6].

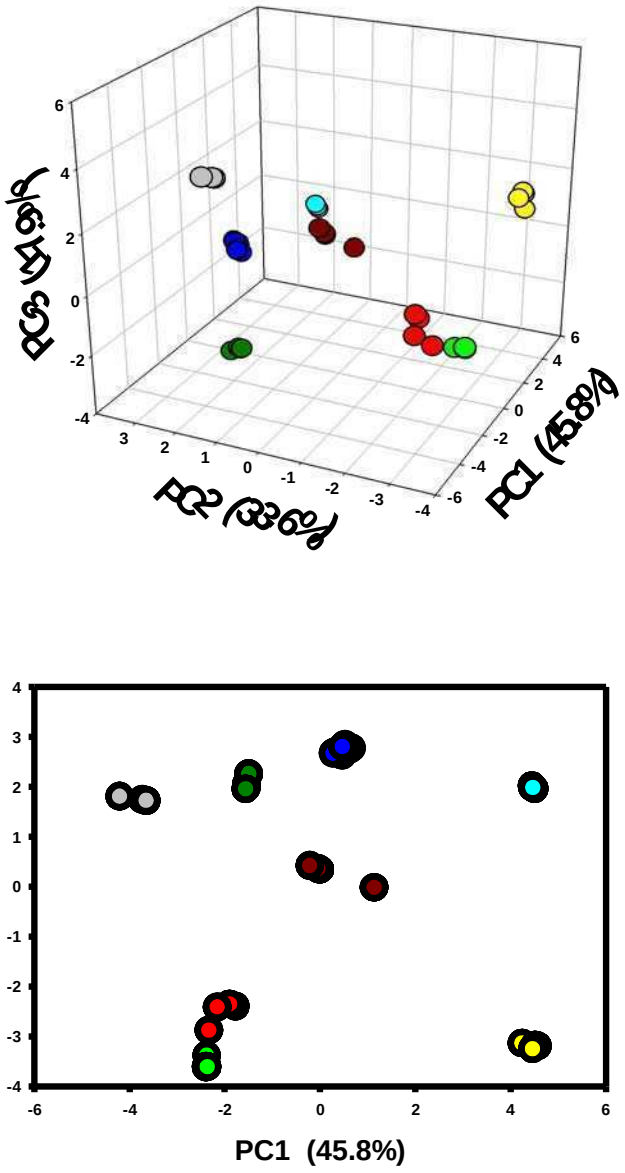


Figura 11. **ACP para arreglo de electrodos PANI/3AFA-dNTA+VP para cloruro de sodio reducción 18 variables; parte superior gráfico 3D; parte inferior gráfico 2D.**

NaCl Ag Al Cd Cu Fe Hg Pb

PDF

Cuando se realizó en CA, se observó que el plomo y el cadmio pertenecen a un mismo grupo. En este caso el uso de ADM es de gran importancia, ya que el sistema puede discriminar con un 100% de éxitos todas las muestras, logrando separar las respuestas para cadmio y plomo.

Al reducir la cantidad de variables utilizando solo dieciocho variables de acuerdo con lo visto del análisis del factor de "*loading*" obtenido del ACP, se pudó ver que las frecuencias importantes corresponden a las altas frecuencias. El ACP y AC no aporto mayor información de la obtenida en el caso anterior (204 variables). Sin embargo, el ADM permite clasificar las muestras correctamente con un 100% de éxitos.

Es importante tener en cuenta que para el caso donde son estudiadas las respuestas para el agua mineral y los distintos iones metálicos con el sistema de arreglo de sensores, los análisis obtenidos no muestran una buena discriminación, esto se debe a que el sensor VP no aporta información importante que contribuya con la discriminación entre las muestras, lo que hace que cuando se combinen las respuestas de los dos sensores, el sistema solo muestre la formación de 5 grupos que corresponden a: agua mineral, Ag^{+} Pb^{2+} y Cd^{2+}, Al^{3+} y Fe^{3+}, Hg^{2+}, Cu^{2+} (Figura apéndice A.V.3) Por esta razón se decidió utilizar solo el sensor PANI/3AFA-dNTA para el estudio de agua mineral.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

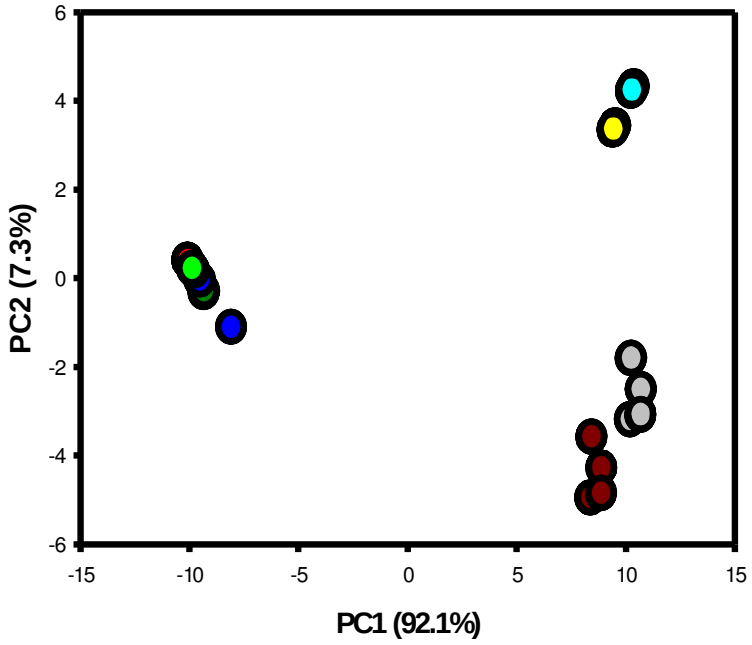


Figura 12. **ACP para VP en agua mineral**

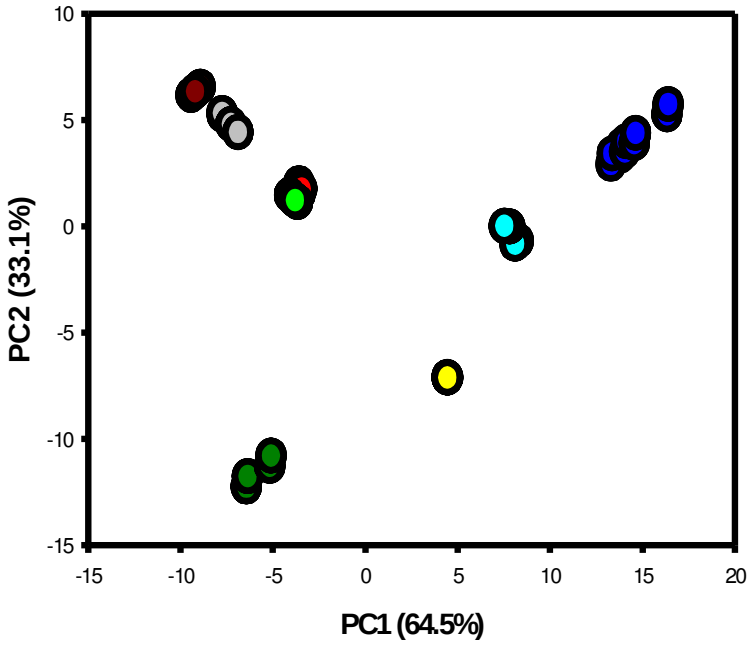


Figura 13. **ACP para PANI/3AFA-dNTA en agua mineral.**

Agua Ag Al Cd Cu Fe Hg Pb

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

V.4. Discusión y conclusiones.

Se logró mostrar que la detección y discriminación de diferentes iones metálicos se puede realizar por el análisis de la respuestas obtenidas por impedancia de los electrodos modificados con agentes quelantes; la combinación de fuertes agentes secuestrantes con una técnica sensible a la adsorción de cargas sobre una superficie conductora hace posible la detección de iones metálicos con un límite de concentración de 1 µM en las tres diferentes muestras de estudio.

El método permite la detección de iones metálicos en muestras acuosas. Se puede realizar sin la necesidad de hacer tratamientos previos de la muestra, pasos de lavados o adición de sondas. El sistema es fácil de construir y económico. El hecho de que los electrodos hayan sido modificados en conjunto (*"batches"*) garantiza la reproducibilidad de la prueba, sin tener que hacer el uso de referencias para el análisis de los datos.

Debido a la distancia entre los electrodos, permite que el sistema de sensores pueda ser miniaturizado y junto a esto puede ser utilizado en ambientes de diferentes conductividades, una de conductividad muy baja (Agua milli Q) y la otra de alta conductividad (alta concentración de NaCl), y en ambos casos se logran distinguir los diferentes tipos de contaminantes. En el caso del aluminio, una concentración de 27 ppb puede ser detectada, esta concentración se encuentra por debajo del límite establecido por la EPA para el agua potable. El rendimiento del sistema puede ser mejorado con un análisis apropiado de las señales de las diferentes frecuencias; algunas veces es posible seleccionar las frecuencias correctas en una primera vista de la respuesta del sistema, mientras que, si los datos muestran señales complicadas, el uso de algoritmos estadísticos permite elegir la información más importante.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

El tercer tipo de muestra analizada fue el agua mineral. En este caso, la muestra contiene iones calcio y magnesio que pueden formar complejos con los agentes quelantes. La concentración de calcio y de magnesio fue alrededor de 500 µM, mientras que el rango de concentración de los contaminantes es de 1 a 250 µM. En este caso, el análisis no fue sencillo y el sensor VP no permite distinguir los diferentes contaminantes, mientras que el uso del sensor PANI/3AFA-dNTA permite la discriminación de todas las muestras analizadas.

Los resultados mostrados en este capítulo muestran la utilidad del método de polimerización sequencial, ya que el electrodo PANI/3AFA no solo ha sido útil para anclar dNTA a la superficie, sino que la persistencia de electroactividad a pH cercano a la neutralidad ha permitido usarlo como sonda en este tipo de análisis.

Desde un punto de vista más amplio, la existencia de una gran cantidad de agentes quelantes permite el desarrollo del sensor más conveniente para cada aplicación, teniendo en cuenta las características químicas básicas de los componentes de la muestra y los contaminantes que se esperan. El método abre la oportunidad de desarrollar sistemas simples para garantizar la calidad del agua en las zonas más diversas.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

V.5. Referencias.

(1) I. Shcherbatykh and D.O. Carpenter., *J. Alzheimer's Dis.* 11 (2007) pp.191–20577 **(2005), pp. 4976-4984.**

(2) T.P. Flaten, *Brain Res. Bull.* 55 (2001) pp.187-196.

(3) Secondary Drinking Water Regulations: Guidance for Nuisance Chemicals EPA 810 / K-92001 ; July 1992 www.epa.gov/safewater/consumer/2ndstandards.html.

(4) K. Ueno, T. Imamura and K.L. Cheng (Eds), *Handbook of Organic Analytical Reagents* (2nd. ed.), CRC, Boca Raton, Florida, (1992).

(5) S. Chaberek and A.E. Martell, *Organic Sequestering Agents*, Wiley, New York, 1959.

(6) I.M. Kolthoff, E.B. Sandell, E.J. Meehan and S. Bukenstein, *Quantitative Chemical Analysis* (4th. Ed.), The Macmillan Company, Toronto, Canada, 1969.

(7)M. A. Palacios, Z. Wang, V. A. Montes, G. V. Zyryanov, and P. Anzenbacher, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) pp.10307–10314.

(8)M. Ferreira, A. Riul Jr., K. Wohnrath, F.J. Fonseca, O.N. Oliveira Jr. and L.H.C. Mattoso, *Anal. Chem.* 75 (2003) pp.953-955.

(9)M.C. Rodriguez, A.-N. Kawde and J. Wang, *Chem. Commun.* (2005) pp. 4267–4269.

(10) E. Katz and I. Willner, *Electroanal.* 15 (2003) pp.913-947.

(11) M. C. Yang, J.E. Diaz; T.M. McIntire, G.A. Weiss, R.M. Penner, *Anal. Chem.* 80 (2008) pp.5695–5705.

(12) G. Pioggia, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro, R. Leardi and A. Ahluwalia *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) pp.2618–2623.

(13) G. Priano and F. Battaglini., *Anal. Chem.* 77 (2005), pp. 4976-4984.

(14) D. Pallarola, L. Domenianni, G. Priano and F. Battaglini, *Electroanalysis* 19 (2007), pp. 690-697.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(15) G. Priano, D. Pallarola and F. Battaglini. *Anal. Biochem.* 362 (2007), pp. 108–116.

(16) D. Pallarola and F. Battaglini., *Anal. Chem.* 81 (2009), pp. 3824-3829.

(17) C.Cai, L. Yin and K Xue, *J. Mol. Catal. A- Chem.* 152 (2000), pp.179–186.

(18) G. Priano, G. Gonzalez, M. Günther, and F. Battaglini, *Electroanalysis* 20 (2008), pp. 91-97.

(19) R.A. Johnson and D.W Wichern, *Applied Multivariate Statistical Analysis*, Prentice Hall, New Jersey, 2002.

(20) A.Struyf, M. Hubert and P.J. Rousseeuw, *Comput. Statist. Data Anal.* 26 (1997), pp. 17-37.

(21) L. Kaufman and P.J Rousseeuw, *Statistical Data Analysis Based on the L1 Norm. In: Cl ustering by means of medoids.*, Y. Dodge (Ed.); North-Holland, Amsterdam, 1987.

(22) S. M. Scott, D. James and Z. Ali, *Microchim. Acta* 156 (2007), pp. 183–207.

(23) L.A Berrueta, R.M. Alonso-Salces and K. J. Héberger, *Chromatogr. A*, 1158 (2007), pp. 196-214.

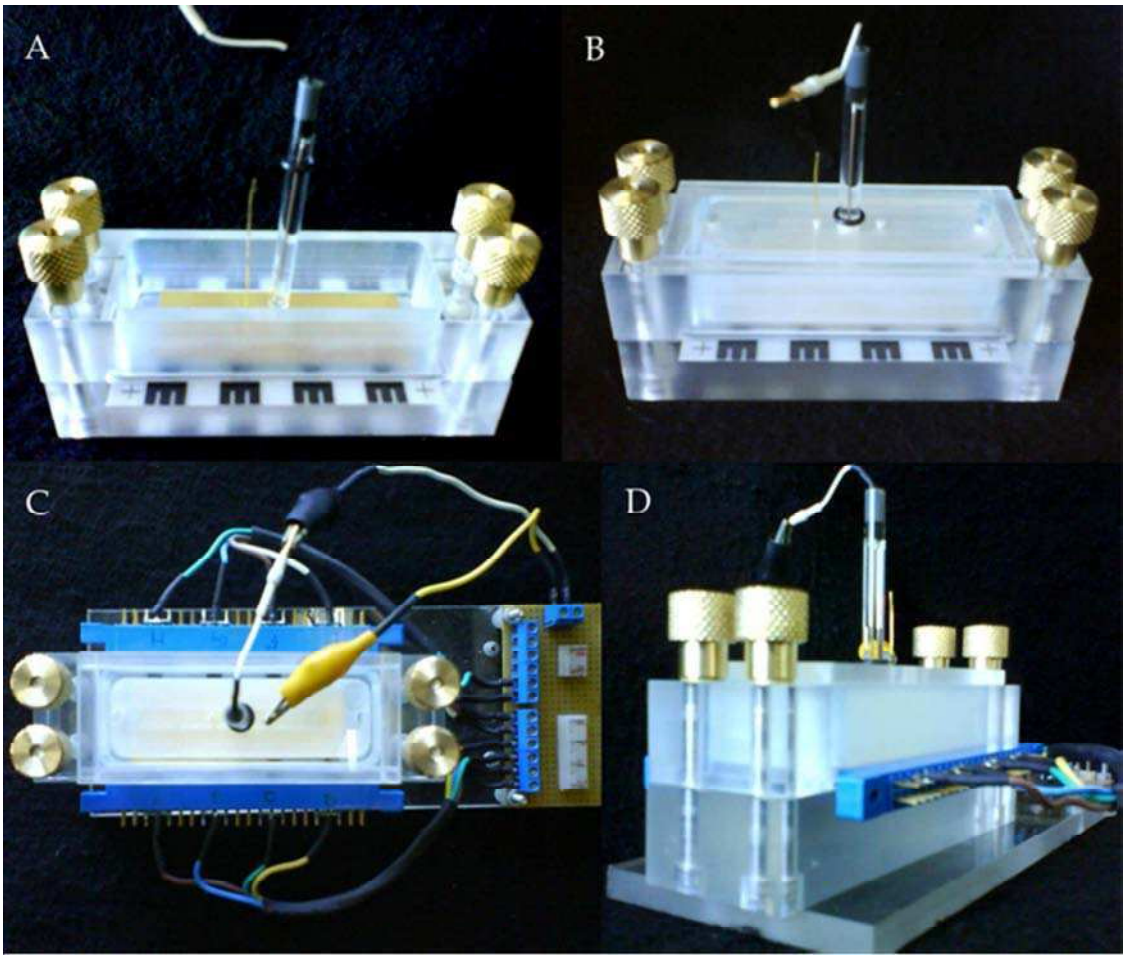
(24) A. Riul Jr., D.S dos Santos Jr., K. Wohnrath, R. Di Tommazo, A.C.P.L.F. Carvalho, F.J. Fonseca Jr., O.N. Oliveira, D.M. Taylor and L.H.C. Mattoso, *Langmuir*. 18 (2002), pp.239-245.

(25) Kocjan, R. and Garbacka, M.; *Talanta* 41 (1994), pp. 131-133.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

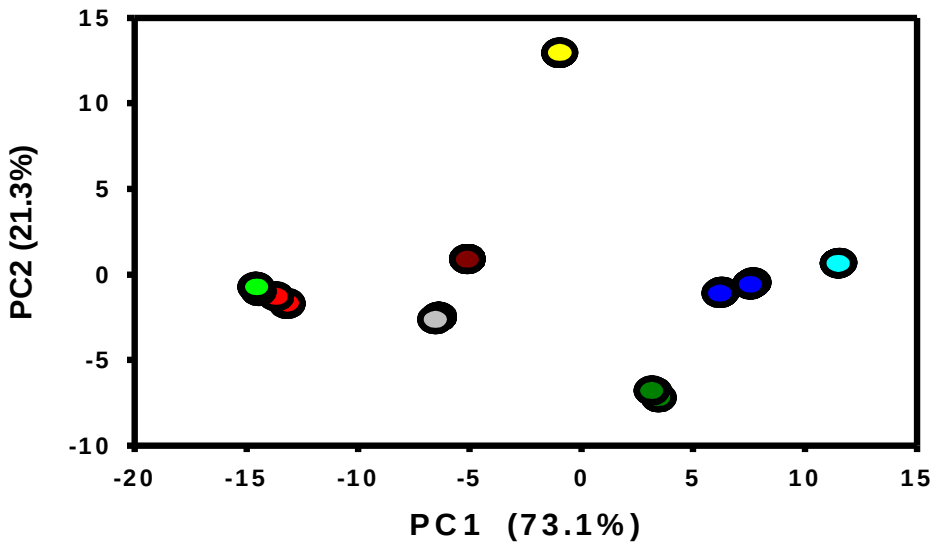
V.6. Apéndice.

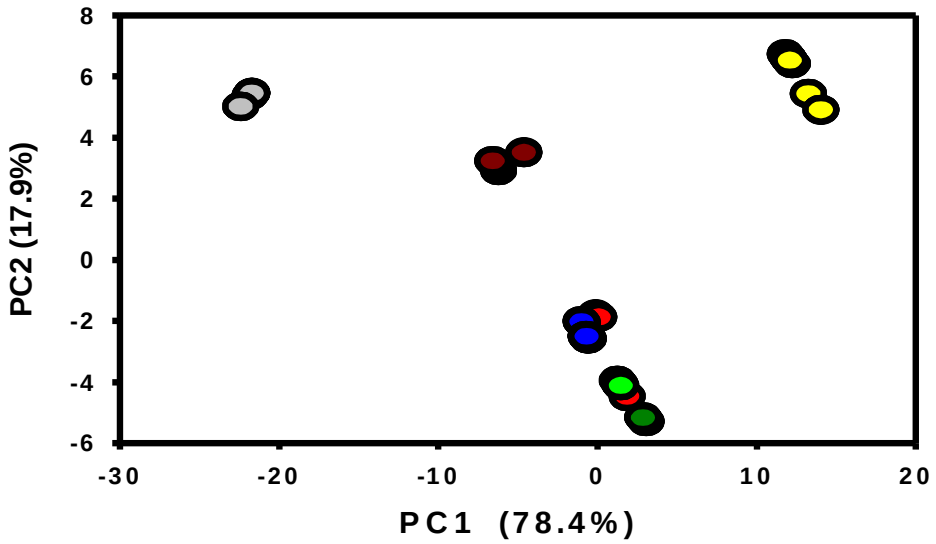
A.V.1. **Celda empleada para la electropolimerización y modificación de las superficies de los electros. (A) y (B) Ubicación del electrodo de referencia y contraelectrodo sin y con la tapa, respectivamente. (C) y (D) Vista superior y perspectiva de la celda montada sobre la base de conectores, respectivamente.**



PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

A.V.2. **ACP para sensores PANI/3AFA-dNTA(superior) y VP(inferiror) para cloruro de sodio.**

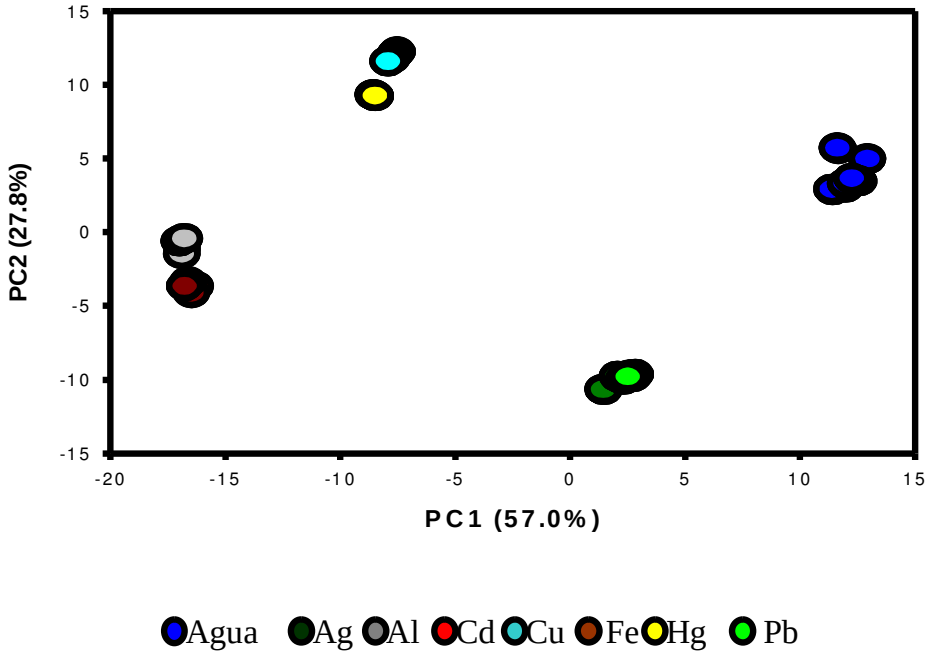




NaCl Ag Al Cd Cu Fe Hg Pb

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

A.V.3. **ACP para sensores PANI/3AFA-dNTA+VP para Agua mineral.**



PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Capítulo VI

Introducción

Materiales y métodos experimentales

Resultados

Detección de LPS e interferentes puros

Detección de LPS puro y muestras contaminadas

Discusión y conclusiones

Referencias

Apéndice

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

VI.1. Introducción

La calidad microbiológica del agua es extremadamente importante en los tratamientos médicos donde soluciones acuosas están en contacto con el torrente sanguíneo; por ejemplo, el uso de solución salina fisiológica en infusión intravenosa. Otro ejemplo es como componente de la hemoterapia, donde el agua se utiliza en la preparación de líquido de diálisis, en este caso es extremadamente importante tener un control microbiológico del agua, ya que los pacientes con insuficiencia renal no sólo son expuestos a mayores volúmenes de agua que la población general, sino que la barrera entre la sangre y el líquido de diálisis es una membrana semipermeable no selectiva, ofreciendo una ruta directa para cualquier contaminante en el torrente sanguíneo[1].

Los dos ensayos utilizados principalmente para evaluar la contaminación microbiológica en los fluidos, son: El lisado de amebocitos de Limulus (LAL-Test) y el contando de unidades formadoras de colonias (UFC). El ensayo LAL está destinada a detectar la presencia de pirógenos, químicamente lipopolisacáridos (LPS) provenientes de la lisis de bacterias gran negativa. Sin embargo, solo LPS intactos son los únicos que puede ser detectado por este ensayo. El ensayo de UFC tiene el inconveniente que muchos microorganismos en agua de hemodiálisis están en un estado viable pero no cultivable, y su detección requiere de condiciones de cultivo muy específicas. Estos ensayos se utilizan habitualmente, no porque sean los mejores, sino por conveniencia, dado que no pueden detectar todos los productos bacteriales relevantes que causan efectos nocivos en los pacientes[2]. Ambos ensayos son laboriosos, consumen mucho tiempo y requieren gran experiencia por la persona que las lleva a cabo, sin embargo siguen siendo los métodos más eficaces para determinar la contaminación microbiológica. Por lo tanto, diseñar un

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

método sencillo que funcione como una alarma ante la presencia de pirógenos y otros contaminantes de origen microbiológico podría ser muy conveniente.

Las bacterias Gram-negativas se hallan protegidas de su entorno por una membrana externa asimétrica que encapsula su peptidoglicano. La sección externa de esta membrana se compone principalmente de lipopolisacáridos , un glicolípido que constituye el mayor componente superficial de las bacterias Gram-negativas, mientras que la sección interna se compone por fosfolípidos[3]. El LPS (Figura 1), también denominado endotoxina (pirógeno) está organizado en tres dominios estructurales, antígeno O, núcleo sacárido (denominado en inglés *"core"*) y lípido A[4].

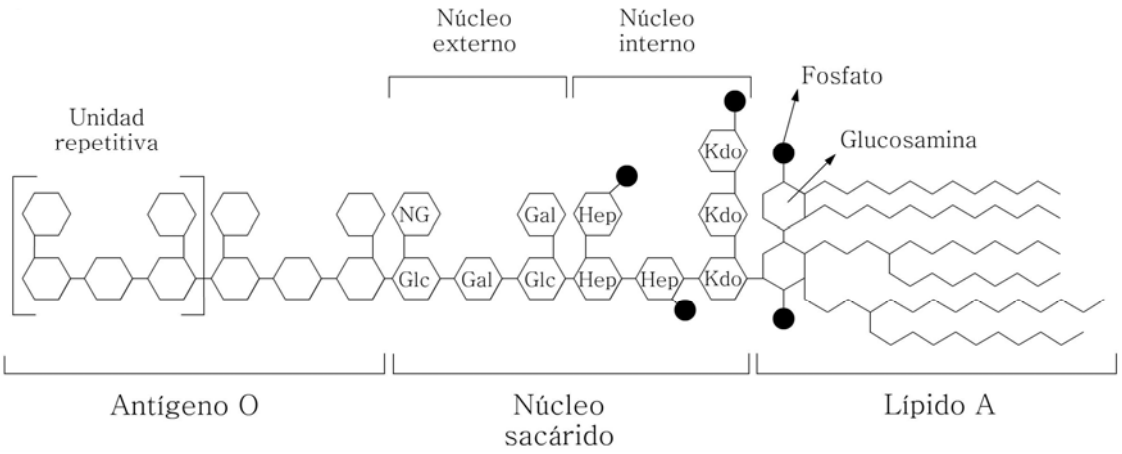


Figura 1. **Estructura de LPS**

El lípido A es la parte de la molécula que más se conserva entre distintas bacterias Gram-negativas, es decir, que es la porción que presenta menor variabilidad según su origen y actúa como un anclaje hidrofóbico para el LPS y es el componente bioactivo de la molécula. asociada con el shock séptico generado por bacterias Gram-negativas [2,5-7].

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Aunque LPS en sí es químicamente inerte, su presencia en la sangre (endotoxemia) desencadena una respuesta excesiva del sistema inmune generando una cascada de respuestas que afectan a la estructura y función de órganos y células, generando cambios de las funciones metabólicas, modificación de la hemodinámica y un aumento de la temperatura corporal. Esta respuesta desmedida es denominada shock séptico[8].

Esta molécula puede tener diferentes interacciones con una superficie modificada. Por ejemplo: las interacciones electrostáticas y hidrofóbicas, coordinación a través de los grupos fosfato o, más selectivamente, utilizando una de las proteínas de reconocimiento descritas anteriormente. En los últimos 20 años, se ha hecho un gran avance en el estudio de las interacciones químicas entre los lipopolisacáridos y proteínas antibacterianas. Algunos de los sistemas que se han estudiado son los siguientes: Factor Limulus anti-LPS (ENP), producida por el cangrejo herradura[9], proteínas antimicrobianas catiónicas de los seres humanos[10], los péptidos derivados de secuencias de las proteínas antes mencionadas[11]; y polimixina producida por Bacillus polymyxina[12]. Estos resultados permiten el desarrollo de ensayos equivalente basados en el tipo de interacción antígeno anticuerpo, algunos ejemplos se pueden encontrar en los últimos años[13-17]. La gran desventaja es que en todos los casos, la marcación de la endotoxina[13-15] o del agente de reconocimiento[16,17] es estrictamente necesario.

Como se vio en el capitulo anterior, la espectroscopía de impedancia electroquímica es una técnica capaz de producir una enorme cantidad de información debido a su capacidad para interrogar a un sistema de una manera rápida, y en muchas condiciones diferentes. Dependiendo de la frecuencia utilizada, la respuesta del sistema contiene

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

información sobre las interacciones de los componentes de la muestra con la superficie del electrodo, que afecta a la capacidad y los eventuales procesos de transferencia electrónica. La generación de una película electroactiva y su interacción con la muestra también genera información queo, puede proporcionar información útil. En general, todos estos fenómenos no pueden ser descritos por un modelo simple, sin embargo, la variedad de la información obtenida puede ser útil para distinguir diferentes tipos de muestras[18-21].

Siendo las bacterias Gram-negativas la fuente de LPS, debe considerarse que podrían estar presentes otros tipos de moléculas en la muestra, interferiendo en el ensayo. Una bacteria Gram-negativas está compuesta principalmente por agua (70%), proteínas (15%), ácidos nucleicos (7%) y, en menor medida, lípidos y polisacáridos[23].

Siguiendo la premisa de realizar diseñar un método sencillo que funcione como una alarma ante la presencia de pirógenos y otros contaminantes de origen microbiológico, se desarrolló y evaluó un método basado en la espectroscopía de impedancia combinado con métodos de análisis multivariado que permita diferenciar los diferentes tipos de contaminantes microbiológicos (endotoxinas, proteínas, ácidos nucleicos y fosfolìpidos). El sistema se basa en el uso de diferentes tipos de interacciones entre las superficies del electrodo modificado y las muestras acuosas. Utilizando tres superficies con distinta interacción con el LPS:

- d-NTA-Ni: **Esta superficie se encuentra cubierta con Ni^{2+} el cual es capaz de interactuar con los grupos fosfatos del LPS[24].**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

- CAP18F: **Esta superficie modificada con un fragmento de 37 aminoácidos de una proteína de 18 KDa antimicrobianas catiónica (CAP18) que presenta actividad de unión LPS[25], es capaz de interactuar con grupos de fosfato y con la fracción anfifílicas de las endotoxinas (lípido A).**

- ENP: **Esta superficie modificada con una proteína muy selectiva para la neutralización de endotoxinas (ENP), también conocida como anti-LALF[9].**

Este nuevo método propuesto basado en ensayo del tipo antígeno-anticuerpo presenta ventajas sobre los métodos comúnmente utilizados, ya que las respuestas se obtienen de manera sencilla y rápida. Además presenta la gran ventaja de no tener que marcar la endotoxina o el agente de reconocimiento y no se necesita el agregado de sondas para el seguimiento electroquímico del sistema.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

VI.2. Materiales y métodos experimentales.

VI.2.1. Materiales.

LPS liso de *Salmonella Minnesota* fue provisto por Sigma–Aldrich Argentina, este LPS fue purificado según el método descrito por Pallarola y colaboradores[15] (Nota: LPS puede causar fiebre. Puede ser nocivo por inhalación, ingestión o en contacto con la piel. Deben ser empleadas buenas técnicas de laboratorio: se debe utilizar guardapolvo, guantes y anteojos de seguridad para su manipulación, trabajar en áreas ventiladas y evitar todo contacto con heridas expuestas).

Anilina , 3-AFA, albumina de suero bovino (BSA), ácido nucleico de esperma de salmon (ADN), 1,2-dipalmitiol-sn-glicero-3-fosfato (DPGP), N,N-bis(carboxymethil)-L-Lisina (dNTA), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-ethilcarbodiimida (EDC) , N-hidroxisuccinimida (NHS) fueron provistos por Sigma –Aldrich Argentina. Todos estos reactivos son de calidad analítica salvo la anilina, que fue destilada al vacio para obtenerla con mayor grado de pureza.

ENP (versión recombinante de LALF) proveniente de Saccharomyces Cerevisiae fue provista y caracterizada por Seikagaku America de Associates of Cape Cod, Inc. (pI 8.5, Mr = 12.2 kDa, 105 residuos aminoácidos y 90% de pureza, lote: 9-054). El CAP18F fue sintetizado y caracterizado por Global Peptide Services con la siguiente secuencia: NH_2GLR KRL RKF RNK IKE KLK KIG QKI QGL LPK LAP RTD YHH HHH HCOOH.

El ensayo cromogénico LAL fue realizado por Biowhitaker. El agua apirógena fue provista por Lonza (<0.005 EU mL^{-1}). La solución

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

fisiológica fue suministrada por Parafarm Argentina. El resto de reactivos utilizados son de calidad analítica.

VI.2.2. Métodos.

VI.2.2.1. Construcción de sensores.

VI.2.2.1.1. Sensor d-NTA-Ni.

Una matriz desechable de 8 electrodos de grafito fue construida por serigrafía "*screen printing*" de una manera similar a la que se informó anteriormente[26] (pero sin la presencia de la pista de plata). Sobre los ocho electrodos se electropolimerizó PANI utilizando un equipo µAUTOLAB type III y a partir de una solución de anilina 90 mM de anilina en H_2SO_4 1.8M realizando 6 voltametrías cíclicas entre -0.2 y 0.85 V vs. Ag/AgCl a 10 mV/s, posteriormente se lavó la matriz de 8 electrodos con abundante agua milli Q y se procedió con la electropolimerización con el ácido 3-amifenilacético (3-AFA) a partir de una solución de (3-AFA) 10 mM de anilina en H_2SO_4 realizando 4 voltametrías cíclicas entre -0.2 y 0.85 V vs. Ag/AgCl a 10 mV/s. Las electropolimerizaciones y modificaciones de los electrodos fueron llevadas a cabo en la celda una celda diseñada para esto. (apéndice A.V.1 capítulo anterior)

Los grupos carboxílicos presentes en la superficie del electrodo fueron activados sumergiendo la matriz de ocho electrodos en una solución que contiene: 50 mM de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-ethilcarbodiimida (EDC) y 12 mM de N-hidroxisuccinimida (NHS) en buffer MES 100 mM pH 5.5 por 30 minutos. Finalizado este tiempo los electrodos fueron lavados con buffer MES

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

100 mM pH 5.5 y sumergidos por una hora en una solución 50 mM de buffer PIPES pH 7.5 que contiene N,N-bis(carboxymethil)-L-Lisina (d-NTA) 5 mM; luego los electrodos fueron lavados con abundante agua milli Q y sumergidos en una solución 1 mM de hidróxido de sodio por 10 minutos para desprotonar los grupos carboxílicos del dNTA y favorecer complejación del Ni^{2+}, posteriormente los electrodos fueron sumergidos en una solución 50 mM de $NiCl_2$ por una hora. Finalmente los electrodos fueron lavados con abundante agua milli Q.

Posteriormente en los ocho electrodos el depósito de grafito fue cortado con un bisturí para dividir cada electrodo en dos, separados por una distancia no mayor a 40 um. Una de estas mitades será utilizada como electrodo de trabajo y la otra como electrodo auxiliar. Finalmente los 8 sensores son separados para analizar cada muestra de forma individual. (Esquema 1A)

VI.2.2.1.2. Sensor CAP18F.

La construcción fue similar a la hecha anteriormente. Una vez realizada la construcción del sensor d-NTA-Ni, el sistema se sumergio en una solución 1 µM de CAP18F en buffer Tris pH 7.4 20 mM que conteniene NaCl 20 mM durante 1 hora. Luego, los electrodos se enjuagaron con agua milli Q.

VI.2.2.1.3. Sensor ENP.

Los monómeros de anilina y 3AFA fueron electropolimerizados secuencialmente y los grupos carboxílicos fueron activados de la misma manera que para el sensor dNTANi. Posteriormente, se sumergieron los electrodos en una solución 1 µM de ENP buffer PIPES 50 mM pH 8.0, durante 1 hora. Entonces, los electrodos, se enjuagaron con agua milli

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Q, se procedió a dividir los electrodos al igual que los casos anteriores. Dividiendo cada electrodo en dos con un bisturí para obtener una separación de 40 µm.

Para todos los sensores, la respuesta amperométrica del electrodo se estabilizó ciclando cada electrodo a 10 mV/s entre -0.2 y 0.55 V diez veces en la matriz de estudio, y luego se mantuvo a un potencial de 0.2 V vs Ag/AgCl durante 200 segundos.

VI.2.2.2. Medidas de espectroscopia electroquímica de impedancia (EEI).

Las medidas de EEI fueron realizadas con el mismo equipo y en las condiciones descritas en el capítulo anterior.

La concentración de las muestras analizadas fueron: LPS en un intervalo de 0,01 a 10 ng/mL, ácido nucleico de esperma de salmon (ADN) en un intervalo de 0,01 a 1 ng/mL, fosfolípido: 1,2-dipalmitiol-sn-glicero-3-fosfato (DPGP) en un intervalo de 0,7 a 70 mg/ml (0,1 a 10 µM) y albumina de suero bovino (BSA) en un intervalo de 5 a 500 mg/mL. Las mezclas de componentes se realizaron utilizando una concentración fija de 0,1 ng/mL de LPS más uno de los contaminantes en una relación de concentración de contaminantes: LPS igual a 100, 10, 1. Cada muestra fue analizada en un nuevo electrodo modificado, donde se analizó la respuesta primero en agua apirógena o solución fisiológica, y luego la muestra correspondiente. Todas las muestras fueron incubadas por 15 minutos y los resultados se analizan en términos de resistencia (Z') y la reactancia capacitiva (Z'').

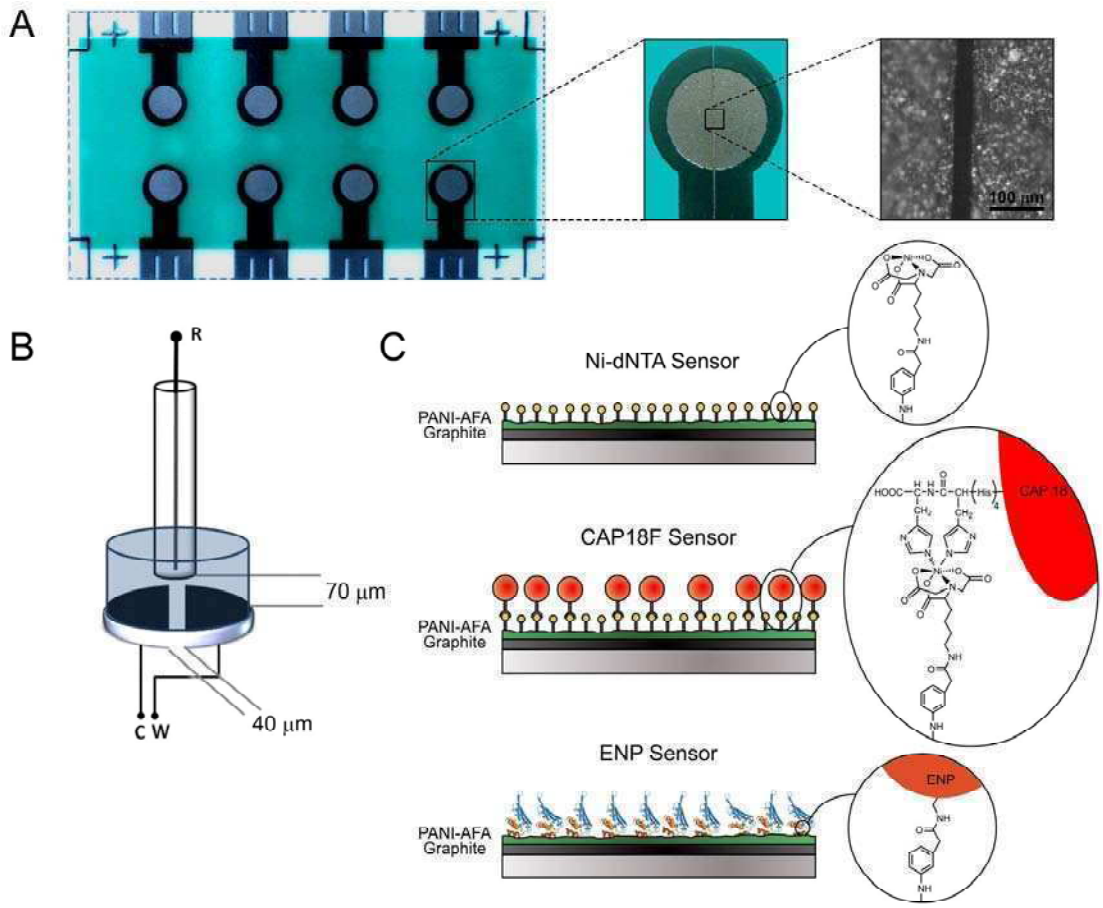
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

VI.2.2.3. Análisis multivariado de datos.

Al igual que en el capitulo anterior, se evaluó estadísticamente el patrón de respuesta multidimensional para los diferentes sensores construidos (dNTANi, CAP18F y ENP) en presencia de contaminantes microbiológicos (LPS, ADN, BSA, DPGP, LPS + ADN, LPS + BSA, LPS + DPGP) mediante análisis de componentes principales (ACP), análisis de conglomerados (AC) y análisis discriminante multivariado (ADM). Para el caso de un sensor se analizaron 102 dimensiones (N según lo visto en el capitulo anterior), mientras que en el caso de arreglo de dos sensores de 204 dimensiones, mientras que M= numero de filas en la matriz de datos viene dada por la cantidad de muestras evaluadas (es importante conocer que cada muestra fue medida por triplicado, al igual que en el capitulo anterior).

Las explicaciones y consideraciones de los métodos multivariados no supervisados (PCA, CA) y supervisados (ADM) utilizados para evaluar el patrón de respuestas obtenidas por análisis de impedancia, ya fueron vistos en el capitulo anterior.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com



Esquema 1. **Representación esquemática de la construcción de los sensores. (A) Plataforma de ocho electrodos de carbono. Distancia de separación entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, medida por microscopía óptica. (B) Celda para medidas de impedancia. Donde: *R* electrodo de referencia, *C* electrodo auxiliar y *W* electrodo de trabajo. (C) Dibujo representativo de los sensores construido.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

VI.3. Resultados.

En el capitulo anterior se presentó un sistema que permite realizar medidas en soluciones acuosas con baja conductividad, este sistema consta de dos bandas de carbono separadas por una distancia de 40 µm, una de esas bandas es utilizada como electrodo de trabajo y la otra como contraelectrodo, mientras que el electrodo de referencia está ubicado 70 µm por encima de estas bandas. Este tipo de arreglo permite tener un sistema compacto, en el cual la caída óhmica originada por las soluciones acuosas de baja conductividad pueda ser manejada por un potenciostato y que solo represente una pequeña parte de la información contenida en la señal impedimétrica. Los electrodos de carbón fueron modificados primero depositando una delgada capa de PANI y posteriormente electropolimerizando 3-AFA sobre la PANI. De este modo, no solo se tienen grupos carboxílicos anclados a la superficie para ser modificados, sino que además la PANI permanece electroactiva a pH neutro, generando una sonda redox la cual puede proveer de información adicional (Figura apéndice A.VI.1).

Dos tipos de matrices fueron estudiadas, agua apirógena y solución. Dado que los componentes principales de las bacterias Gram-negativas, después del agua, son las proteínas y ácidos nucleicos, una proteína globular, la albúmina sérica bovina (BSA) y ADN fueron utilizados como sistemas modelo para estudiar el efecto de posibles interferencias. Además fue probado como posible interferente un fosfolípido (DPGP), debido a sus similitudes químicas estructurales con LPS

Se trabajó con un rango de concentraciones de LPS entre 0.01 a 10 ng/mL, donde la actividad endotoxica para la muestra más diluida

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

determinada por método LAL fue de 0.03 EU/ml. Otra característica de las muestras que vale la pena mencionar es el hecho de que tres de las cuatro sustancias estudiadas contienen grupos fosfato, el cual puede interactuar con el complejo Ni, mientras que la BSA puede experimentar un tipo diferente de interacción con la superficie.

La EEI se llevó a un potencial de trabajo de 0.20 V vs Ag/AgCl aplicando una perturbación de ±10 mV con respecto al potencial de trabajo, ya que a este potencial de trabajo la cupla es electroactiva; fueron probadas 51 frecuencias entre 10^{-1} a 10^{4} Hz, dando una corriente y una respuesta de cambio de fase para cada uno de ellos. Esta información puede ser representada como la resistencia (Z') y la reactancia capacitiva (Z''), por lo tanto cada muestra produce 102 respuestas en cada sensor. Al igual que el capítulo anterior se comprobó la reproducibilidad del sistema frente a agua apirógena utilizando ocho electrodos (Figura apéndice A.VI.2) y se evaluó el patrón de respuestas para todas las especies (Figura apéndice A.VI.3).

VI.3.1. Detección de LPS e interferentes puros.

VI.3.1.1. Sensor d-NTA-Ni

El primer sensor estudiado fue el electrodo derivatizado con el complejo d-NTA-Ni, este complejo es similar al utilizado en la cromatografía de afinidad de ión metálico inmovilizado (IMAC). Este tipo de separación cromatográfica está basada en la interacción con los residuos de histidinas presentes en las proteínas con el complejo Ni. En cambio en este caso, la elección de esta superficie se llevó a cabo debido a los iones Ni pueden interactuar con los grupos fosfatos[27], por lo cual resulta interesante evaluar el comportamiento del LPS, ya que el lípido A presenta estos grupos en su estructura.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

La detección de LPS se llevo a cabo analizando las respuestas obtenidas del análisis de EEI por análisis de componentes parciales (ACP). El primer componente principal contiene el máximo valor de la varianza, mientras que los otros componentes seguirán en orden decreciente de varianza, de esta manera el patrón generado por el sensor es reducido en componentes y se representa en un espacio con dos o tres componentes principales. La representación gráfica en este espacio ("*score plot*") se muestra en la Figura 1, donde se puede ver que con el uso de solo dos componentes principales se describe el 90% de la varianza total tanto en agua apirógena como en solución fisiológica. Para el caso de agua apirógena, el sensor permite discriminar las muestras que contienen BSA, la matriz pura y muestras que contienen grupos fosfato los cuales se encuentran dispersos (grafico superior Figura 1). Mientras que para la solución fisiológica, el ACP muestra una buena discriminación entre la solución fisiológica pura y la solución contaminada con proteínas y las sustancias que contienen grupos fosfatos (grafico inferior Figura 1).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede ver que el uso del sensor d-NTA-Ni tiene una aplicabilidad limitada para la discriminación de endotoxinas. Además es importante resaltar que al igual que el capitulo anterior se observa reproducibilidad entre los patrones de respuestas de las matrices, por lo que se pueden comparar muestras sin necesidad de tomar referencias.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

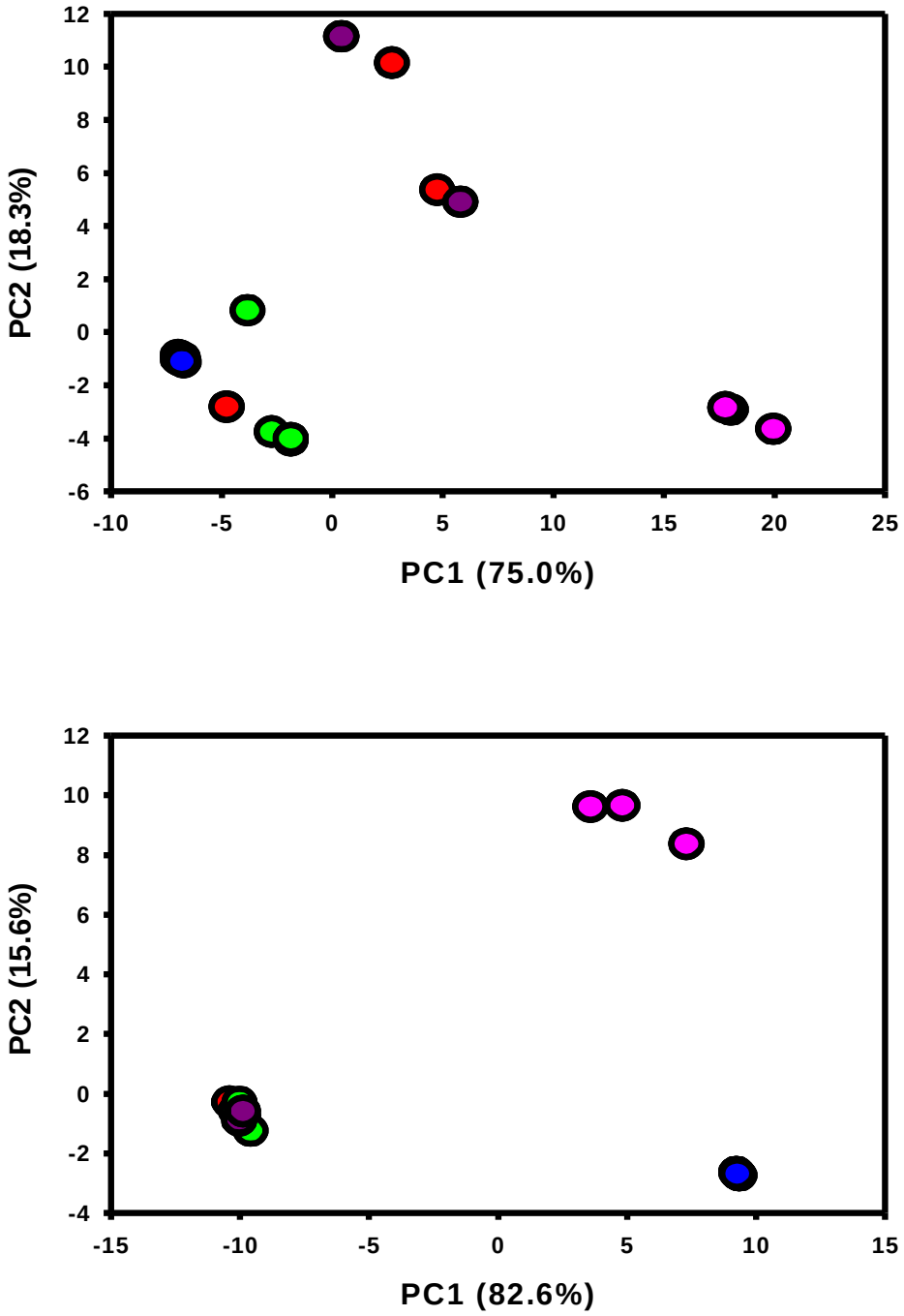


Figura 1. **Sensor dNTANi. Superior: Agua apirógena; Inferior: Solución fisiológica.**

Matriz **LPS** **ADN** **DPGP** **BSA**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

VI.3.1.2. Sensor CAP18F.

Para mejorar la discriminación de LPS frente a otros compuestos que contienen fosfatos, se utilizo un péptido capaz de reconocer de una forma más específica al LPS, este péptido fue unido al complejo d-NTA-Ni a través de una reacción His-tag. El péptido elegido es un dominio de unión a LPS correspondiente a 18KDa de una proteína catiónica antimicrobiana (CAP18F)[25], este péptido fue sintetizado con seis residuos de histidinas las cuales pueden unirse al complejo d-NTA-Ni.. En la Figura 2 se muestra el ACP obtenido para agua apirógena (gráfico superior) y para solución fisiológica (gráfico inferior). Para ambos sistemas de estudio se observa la marcada discriminación de la proteína con respecto a las otras muestras, mientras que las muestras que contienen grupos fosfatos muestran un patrón característico.

En función de corroborar cuantitativamente los resultados obtenidos por inspección del ACP, fue realizado un AC. Cuando se realiza un AC para agua apirógena y se escoge como opción la formación de cinco grupos, se puede notar, que el análisis agrupa correctamente los grupos de BSA, ADN y DPGP, pero comete el error de agrupar las muestras de LPS y agua apirógena, lo que nos indica que este sistema puede dar como resultados falsos negativos ante la presencia de LPS. Mientras que para el caso de solución fisiológica, el AC muestra un correcto agrupamiento entre muestras.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

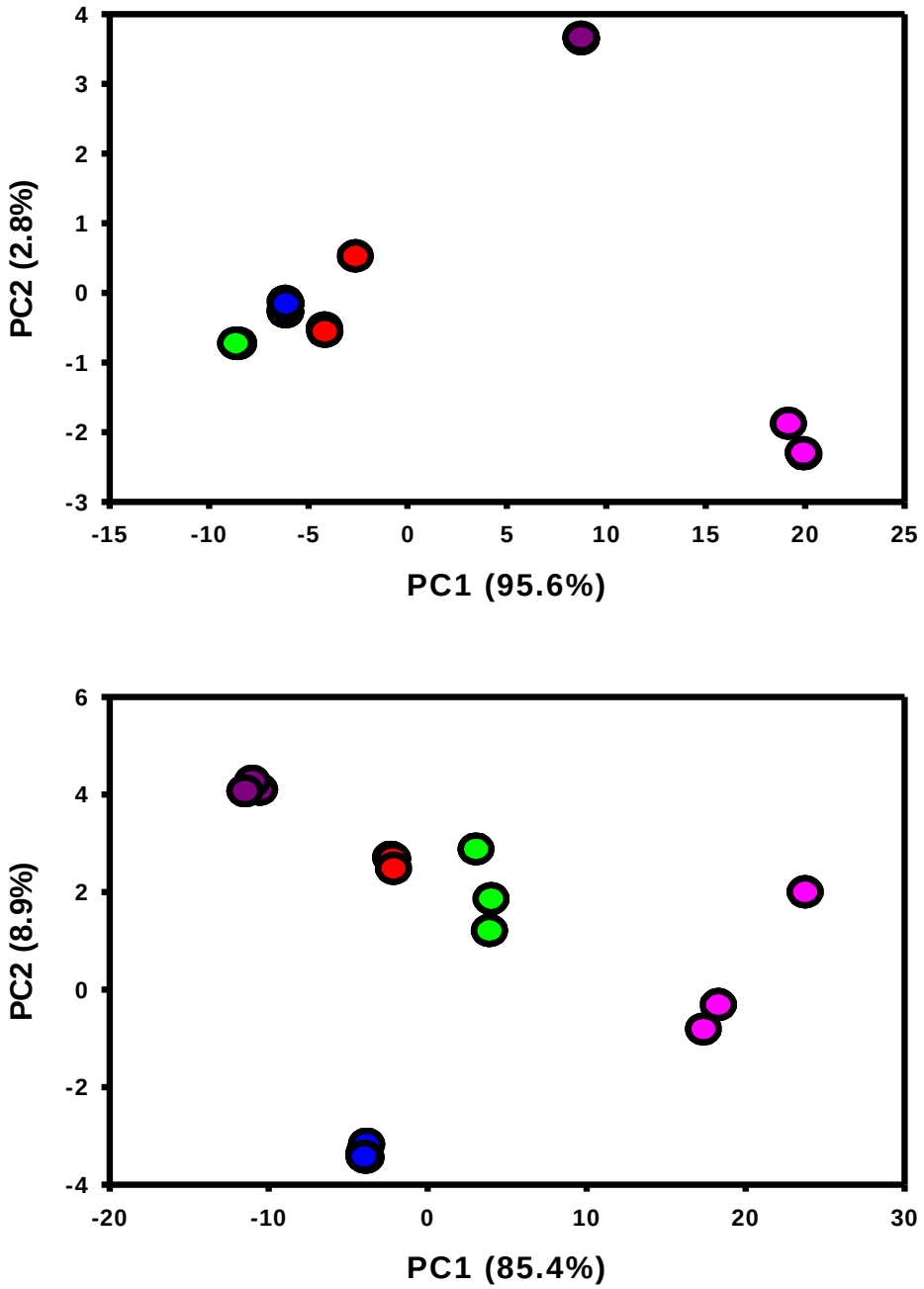


Figura 2. **Sensor CAP18F. Superior: Agua apirógena; Inferior: Solución fisiológica.**

Matriz **LPS** **ADN** **DPGP** **BSA**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

A pesar de que la discriminación de los diferentes contaminantes de origen microbiológico puede ser de interés, las agencias reguladoras limitan específicamente la presencia de endotoxinas por debajo de una determinada concentración, por lo general por debajo de 2 EU/ml o menos[28]. Por esta razón, se diseño un tercer sensor el cual fue hecho mediante la modificación de la superficie con una proteína reconocimiento a LPS, la proteína de neutralización de endotoxina (ENP).

VI.3.1.3. Sensor ENP.

El electrodo se modifica de manera similar que los anteriores, con la diferencia de que una vez activado los grupos carboxílicos del 3-AFA presentes en la superficie, la superficie se pone en contacto directamente con la proteína. La unión entre la proteína y la superficie se lleva a cabo por la reacción de los grupos amino de la proteína con los grupos carboxílicos activados en la superficie.

La Figura 3 muestra el comportamiento visto en las dos matrices de estudio. En ambos casos se puede observar claramente la diferencia entre las muestras que contienen LPS con respecto a las demás. Para el caso de solución fisiológica se puede observar una buena discriminación para todas las muestras, mientras que en el caso de agua apirógena se observa la formación de tres grupos: agua pura, muestra que contienen LPS y muestras contaminadas con otros compuestos. Es evidente que la selectividad de este sensor a LPS se debe a la presencia de ENP.

La estructura cristalográfica de la ENP[9] muestra que es una proteína con forma piramidal), formada por tres hélices alfa y tres hojas beta unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas 31 y 52. El dominio de la ENP se caracteriza por una serie alternada de cargas positivas y residuos hidrófobos que, en virtud de la conformación beta,

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

apuntan en direcciones opuestas y forman un bucle anfipático cargado positivamente (Figura 4). Teniendo en cuenta los estudios realizados por Suriola y colaboradores sobre las interacciones del lípido A con diferentes péptidos[12], puede proponerse que inicialmente la carga negativa del lípido A se siente atraída por el bucle y posteriormente el complejo se estabiliza por interacciones hidrofóbicas. Además, este resultado confirma que la presencia de centros de Ni en el sensor anterior permite la discriminación entre los compuestos que contienen grupos fosfato de los que no los poseen, aportando así información complementaria.

Por otra parte es importante resaltar que de ahora en adelante se tomará como único sistema de estudio la matriz de agua apirógena, ya que ésta es la solución utilizada para la fabricación de las soluciones de diálisis y soluciones inyectables.

De acuerdo con los análisis hechos y la información obtenida con los sensores CAP18F y ENP, se realizó un arreglo de sensores, es decir, se combinaron las respuestas obtenidas con cada uno de ellos.Esta combinación de respuestas permite obtener un sistema con una excelente discriminación de los distintos tipos de contaminantes microbiológicos para el agua apirógena (Figura 5). También se realizó para las 82 muestras un AC (Tabla 1), donde se pudo corroborar cuantitativamente el excelente agrupamiento visto en el ACP, teniendo como resultado un ASW de 0.98, dato que confirma el buen agrupamiento entre muestras.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

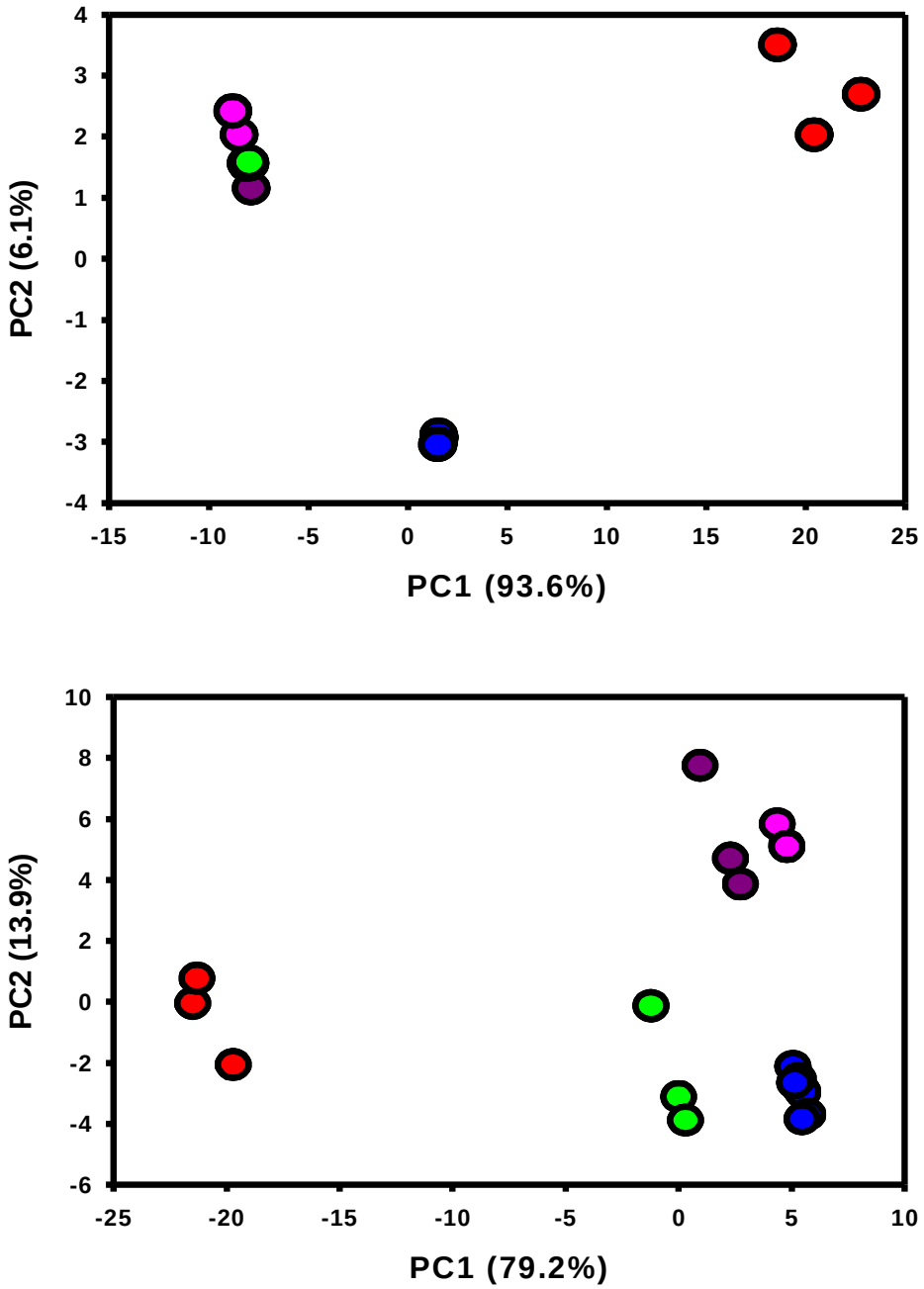


Figura 3. **Sensor ENP. Superior: Agua apirógena; Inferior: Solución fisiológica.**

Matriz **LPS** **ADN** **DPGP** **BSA**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

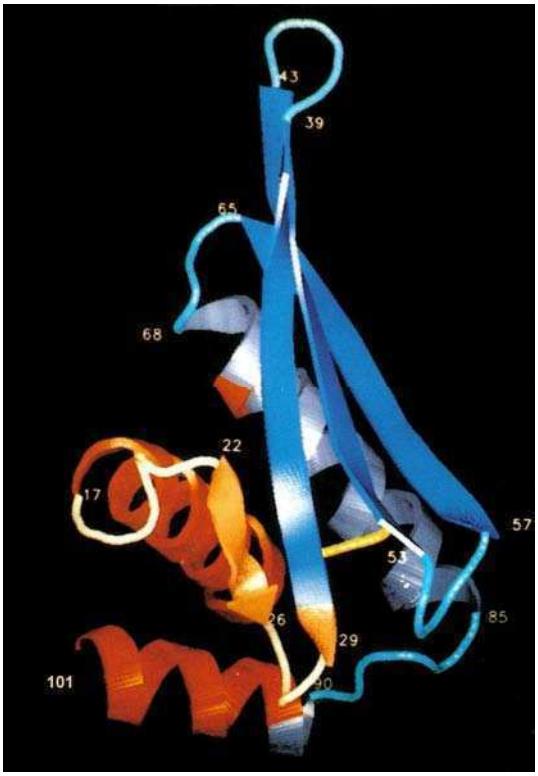


Figura 4. **Representación esquemática de ENP con los extremos de estructura secundaria numerados. Las hélices se muestran como bucles, las hebras como flechas y los enlaces disulfuros como cuerdas amarillas. Los distintos tonos en rojo (aminoácidos 2-30, 92-101 y 72) indican la superficie negativamente cargada de la estructura del ENP. Los distintos tonos en azul (aminoácidos 31-91) indican la superficie positivamente cargada. El lazo anfifílico incluye a los aminoácidos 32-50**[9]

Electrodo	# Grupo	Grupo	ASW	ASW total
CAP18F-ENP	1	LPS	0.972	0.98
	2	Fosfolípido	0.996	
	3	BSA	0.947	
	4	Agua Apirógena	0.985	
	5	ADN	0.995	

Tabla 1. **Resultado del análisis de conglomerados para el arreglo de sensores CAP18F-ENP.**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

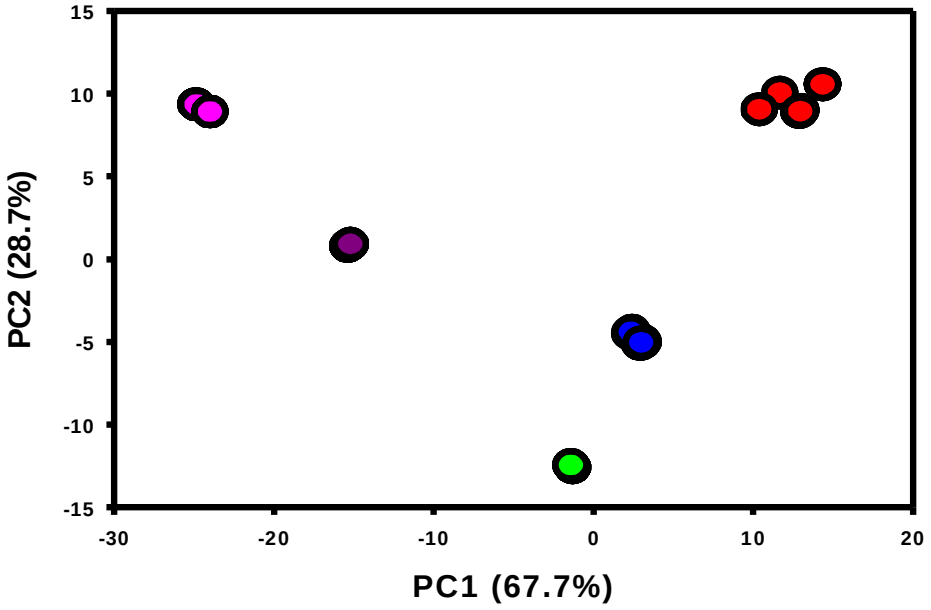


Figura 5. **Arreglo de sensores CAP18F-ENP muestras en agua apirógena.**

Matriz **LPS** **ADN** **DPGP** **BSA**

VI.3.2. Detección de LPS puro y muestras de LPS contaminadas.

Cuando una bacteria se encuentra en un medio, ésta libera los componentes que la conforman, estos componentes pueden causar problemas afectando la señal y logrando una detección imprecisa endotoxinas. De acuerdo con esto, los sensores CAP18F y ENP fueron probados con muestras que contienen LPS mezclado con diferentes cantidades de BSA, de ADN y un fosfolípido (DPGP), los cuales pueden actuar como posibles interferencias, utilizando relaciones de concentraciones (Contaminantes : LPS) entre 1-100. Entonces las muestras que fueron utilizadas para los estudios fueron: LPS, BSA, ADN, DPGP, LPS+BSA, LPS+ADN y LPS+DPGP.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

La Figura 6 muestra los resultados obtenidos para los sensores CAP18F (Figura superior) y ENP (Figura inferior) por ACP. Cuando se analizan los resultados obtenidos con el sensor CAP18F, se puede observar que las muestras que contienen proteínas presentan diferencias muy importantes respecto a los otras; sin embargo, es muy fácil distinguir la que contiene una mezcla de BSA y LPS de la muestra contaminada sólo con la proteína. El análisis de conglomerados muestra que el sistema es capaz de discriminar con éxito seis grupos: el agua apirógena pura, LPS, DPGP, BSA, LPS + BSA y un grupo que contiene LPS + ADN, LSP + DPGP y el ADN con un ASW de 0.86 (Tabla 2).

Por otro lado, el ACP para el sensor ENP discrimina las muestras en cuatro grupos bien definidos: LPS, agua apirógena pura, un grupo que contiene a BSA, ADN y DPGP, y un cuarto grupo para las muestras de LPS mezclado otras impurezas. Los 4 grupos pueden ser perfectamente discriminados por análisis de conglomerados presentando un ASW de 0.97 (Tabla 2), por lo que este sensor representa una poderosa herramienta para la detección de LPS a bajas concentraciones, incluso en presencia de otros contaminantes en concentraciones 100 veces mayores.

Al igual que lo visto anteriormente, se procedió a realizar un arreglo de sensores combinando las respuestas de los sensores CAP18F y ENP, el ACP (Figura 7), muestra una buena separación entre los grupos, es importante notar que la separación entre el grupos de LPS+ADN y LPS+DPGP es muy pequeña, debido a esto cuando se realizó un AC se puede ver un buen agrupamiento para siete grupos donde seis de estos grupos corresponden a muestras independiente y el otro grupo corresponde al grupo formado por LPS+ADN y LPS+DPGP, con un ASW de 0.96 (Tabla 2).

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

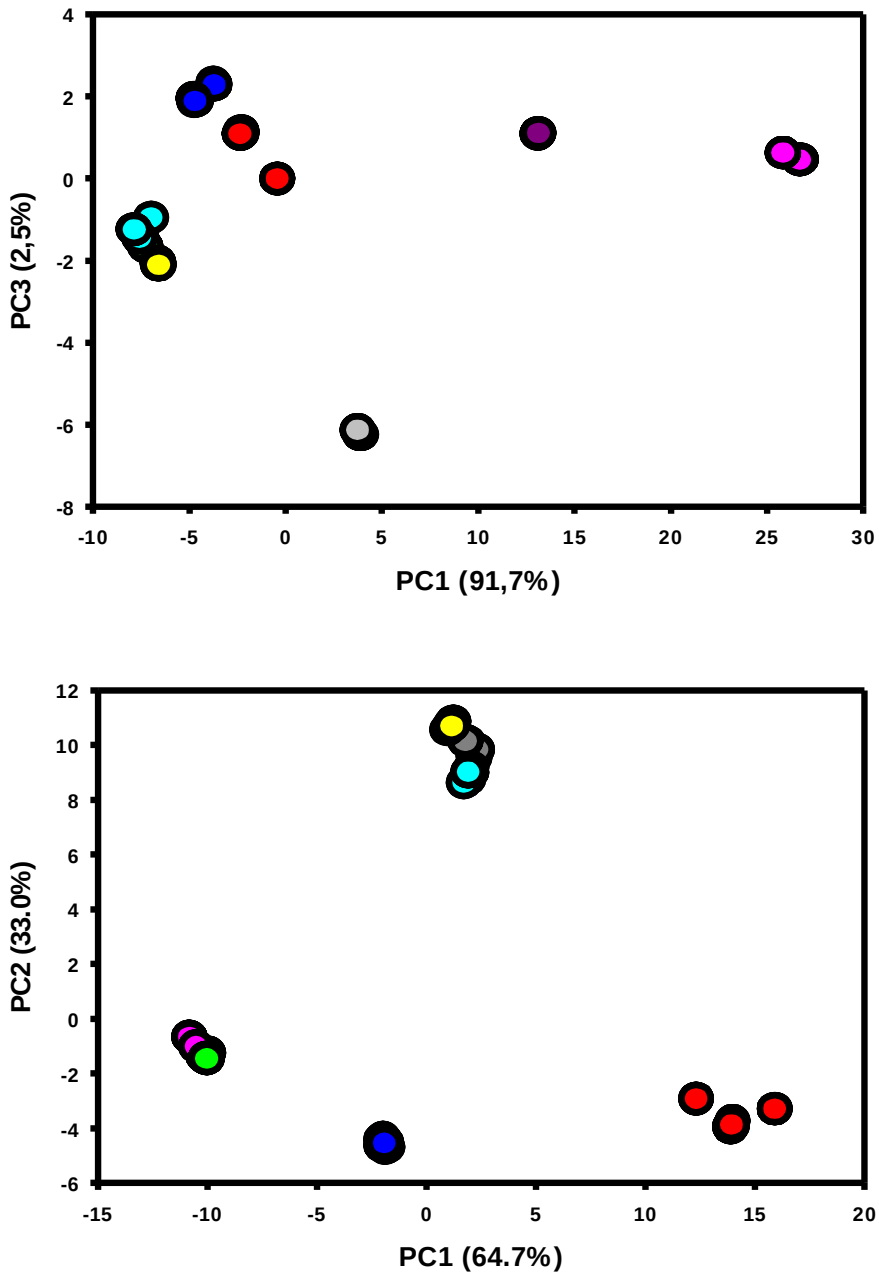


Figura 6. **Respuestas para CAP18F (superior) y ENP (inferior) para muestras de LPS puro, interferentes puros y LPS+ interferentes.**

Matriz **LPS** **ADN** **DPGP** **BSA** **LPS+BSA** **LPS+DPGP** **LPS+ADN**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

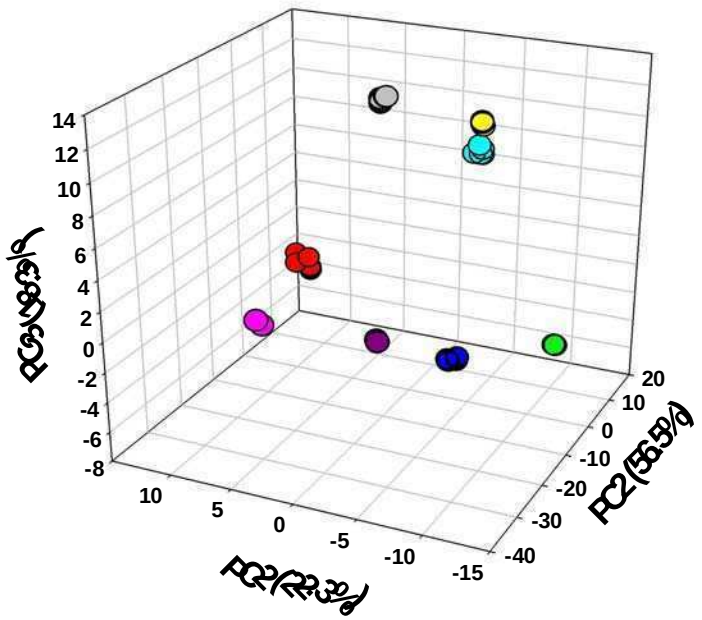


Figura 7. **Respuestas del arreglo de sensores CAP18F-ENP para muestras de LPS puro, interferentes puros y LPS+ interferentes.**

Matriz **LPS** **ADN** **DPGP** **BSA** **LPS+BSA** **LPS+DPGP** **LPS+ADN**

Sensor	# Grupos	Grupos	ASW Grupo	ASW Total
CAP 18	6	Agua Apirógena	0.91	0.85
		LPS	0.50	
		DPGP	0.99	
		ADN-LPS+ADN-LPS+ DPGP	0.94	
		BSA	0.94	
		LPS+BSA	0.99	
ENP	4	Agua Apirógena	0.99	0.97
		LPS	0.92	
		DPGP - ADN-BSA	0.98	
		LPS+ DPGP - LPS+ADN-LPS+BSA	0.99	
CAP18 - ENP	7	Agua Apirógena	0.98	0.96
		LPS	0.92	
		DPGP	0.99	
		ADN	0.99	
		BSA	0.94	
		LPS+BSA	0.98	
		LPS+ DPGP - LPS+ADN	0.92	

Tabla 2. **Resultado del análisis de conglomerados para cada sensor por separado y para el arreglo de sensores CAP18F-ENP.**

PDF

Con los resultados obtenidos y considerando que el método diseñado está pensado como una alarma ante la presencia de endotoxina o de algún otro contaminante microbiológico, fue explorada la capacidad de discriminación del sistema cuando es sometido a un entrenamiento previo. Esto se realizó usando un método supervisado como el análisis discriminante multivariado (ADM). En otras palabras este método es utilizado para entrenar a la matriz de sensores para reconocer los contaminantes estudiados y así poder clasificar las muestras. Cuando se aplico este método, fueron escogidos 83 muestras al azar para entrenar al sistema y 23 muestras de prueba. Este proceso se repitió tres veces al azar y en todos los casos se obtuvo un 100% de clasificación correcta de las muestras de prueba.

Dado que el sistema muestra un excelente desempeño, se puede plantear la interrogante de si un menor número de entrada de datos se puede utilizar para obtener el mismo resultado y ahorrar tiempo en el procedimiento analítico.

Se tomo como criterio para la eliminación de datos, un criterio estadístico basado en el análisis de las frecuencias más importantes para el ACP (factor de "*loading*"), el cual muestra que ambos sensores son necesarios; y en cada uno de ellos, tanto Z' como Z'' se utilizan en el análisis. Finalmente, el análisis estadístico muestra que las frecuencias bajas (entre 0.1 y 1Hz y entre 500 y 1200 Hz) contribuyen a producir una buena discriminación de los distintos tipos de muestras. Usando 18 de las variables se puede apreciar que las tres primeras componentes principales describen el 97.2% de la varianza total (Figura 8). Para el análisis de conglomerados, si las muestras son dividas en 7 grupos, al igual que lo visto anteriormente, pero esto puede ser corregido utilizando el método de supervisión (ADM), donde se obtiene un éxito en clasificación del 100%.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

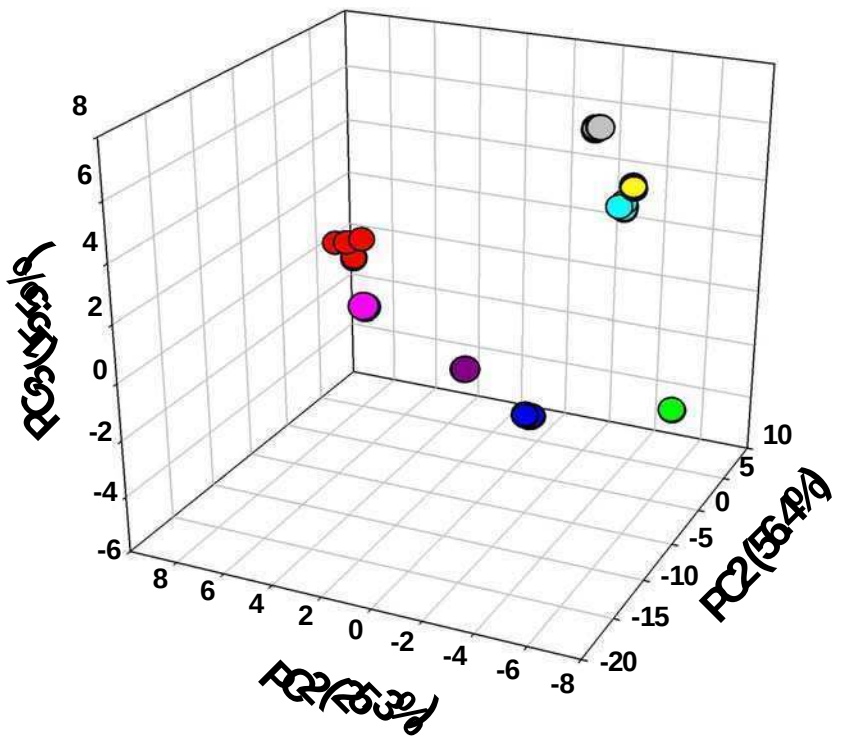


Figura 8. **Reducción de variables para el arreglo de sensores CAP18F y ENP.**

Matriz **LPS** **ADN** **DPGP** **BSA** **LPS+BSA** **LPS+DPGP** **LPS+ADN**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

VI.4. Discusión y conclusiones.

Se logro mostrar que la detección y discriminación de endotoxinas y otros contaminantes microbiológicos se puede realizar por el análisis de la respuestas obtenidas por impedancia de los electrodos modificados, capaces de interactuar con los compuestos estudiados de dos maneras: hidrofóbicas y por interacciones electrostáticas para el sensor CAP18F, y por reconocimiento especifico para el sensor ENP. Esta combinación permite la discriminación de los LPS de otros componentes de las bacterias Gram-negativas: los ácidos nucleicos y las proteínas, en mucha mayor proporción que LPS; y de los fosfolípidos que presentan importantes similitudes a LPS en cuanto a su estructura.

El método permite la detección de los diferentes contaminantes en muestras acuosas sin necesidad de acondicionamiento de la muestra, enjuagues previos a las medidas o la adición de las sondas, además es importante resaltar que el tiempo de incubación es de tan solo 15 minutos. Por otra parte, el hecho de que los sensores pueden ser construidos y modificados en lotes garantiza la reproducibilidad de la prueba, sin tener que utilizar referencias para el análisis de datos.

Debido a la distancia entre los electrodos, el sistema de sensores se puede trabajar en ambientes de muy baja conductividad (agua apirógena), junto a esto, la modificación de la superficie de los electrodos por electropolimerización y las reacciones necesarias para el anclaje del elemento de reconocimiento de modificación podrían ser fácilmente adaptado a un sistema de nanoescala.

El sistema ha demostrado ser muy sensible a la detección de LPS, siendo capaz de discriminar las soluciones que contienen 10 pg/ml,

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

equivalente a 0,03 UE/ml medidos por el ensayo LAL, proporcionando así una alarma útil para detectar las concentraciones endotoxina que sobrepasan el estricto nivel de umbral establecidos por la mayoría de las agencias reguladoras[28,29].

Por último, cabe señalar que los ensayos estándar de contaminación microbiana puede pasar por alto un porcentaje sustancial de muestras pro-inflamatorias, como ácidos nucleicos, el cual en los últimos años ha sido considerado como un nuevo candidato pirógenico[30]. El método presentado es capaz de detectar otros contaminantes microbiológicos como: proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos, este trabajo plantea el inicio de una nueva ruta para ampliar la detección de otras potenciales moléculas pro-inflamatorias[2].

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

V.I.5. Referencias

(1) N. A. Hoenich and R. Levin, *Semin. Dial.* 16 (2003) pp. 492–497.

(2) R.Schindler, *Blood Purification* (supplement1), 27 (2009) pp. 20–22.

(3) Y.Kamio and H. Nikaido, *Biochemistry* 15(1976) pp. 2561-2570.

(4) C. R. H Raetz and Whitfield, *Annu. Rev. Biochem.* 71(2002) pp.635-700.

(5) S. Kotani, H. Takada, M. Tsujimoto, T. Ogawa, I. Takahashi, T. Ikeda, K. Otsuka, H. Shimauchi, N. Kasai, J. Mashimo, S. Nagao, A. Tanaka, S. Tanaka, K. Harada, K. Nagaki, H. Kitamura, T. Shiba, S. Kusumoto, M. Imoto, and H. Yoshimura, *Infect. Immun.* 49(1985) pp. 225-237.

(6) C. Galanos, O. Luderitz, E. T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura, S. Kusum oto and T. Shiba, *Eur. J. Biochem.* 148 (1985) pp. 1-5.

(7) I. Takahashi, S. Kotani H. Takada Takahashi, M. Tsujimoto, T. Ogawa, T. Shiba, , S. Kusumoto, M. Yamomoto, A. Hasegawa, M. Kiso, M. Nishijima, F. Amano, Y. Akamatsu, K. Harada, S. Tanaka, H. Okamura and T. Tamura, *Infect. Immun.* 55 (1987) pp. 57-68.

(8) E. S. Van Amersfoort, T. J. C. Van Berkel and J. Kuiper, *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2003)pp. 379-414.

(9) A. Hoess, S. Watson, G.R. Siber and R. Liddington, *EMBO J.* 12 (1993) pp. 3351-3356.

(10) J.W. Larrick, M. Hirata, R.F. Balist, J. Lee, J. Zhong, D. and S.C. Wright, *Infect. Immun.* 63 (1995) pp. 1291-1297.

(11) C. Ried, C. Wahl, T. Miethke, G. Wellnhofer, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, A. Hoess, , *J. Biol. Chem* 271 (1996) pp. 28120-28127.

(12) C.J Thomas, B.P Gangadhar, N. Surolia and A. Surolia, *J.Am.Chem.Soc.* 120(1998) pp. 12428-12434.

(13) G. Priano and F. Battaglini, *Anal. Chem.*, 77 (2005) pp. 4976-4984.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(14) G. Priano, D. Pallarola and F. Battaglini, *Anal. Biochem.*, 362 (2007) pp. 108-116.

(15) D. Pallarola and F.Battaglini, *Anal. Chem* 81 (2009) pp. 3824-2829.

(16) S.Voss, R. Fischer, G. Jung, K.-H.Wiesmuller, and R. Brock, *J.Am.Chem.Soc.* 129 (2007) pp. 554-561.

(17) G. Jones II and H. Jiang, *Bioconjug. Chem.*, 16 (2005) pp. 621-625.

(18) G. Pioggi, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro and A. Ahluwalia, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007)pp. 2618–2623.

(19) G. Pioggi, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro, R. Leardi and A. Ahluwalia, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007)pp. 2624–2628.

(20) M. Ferreira, A. Riul Jr., K. Wohnrath, F.J. Fonseca, O.N. Oliveira Jr. and L.H.C. Mattoso, *Anal. Chem.* 75 (2003) pp. 953-955.

(21) A. Riul Jr., R.R Malmegrim, F.J. Fonseca., and L.H.C. Mattoso, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003)pp. 1365-1369.

(22) E.T. Rietschel, T. Kirikae, U.F. Schade, A.J. Ulmer, O. Holst, H. Brade, G. Schmidt, U. Mamat, H-D. Gimmecke, S. Kusumoto and U. Zahringer, *Immunbiology* 187 (1993)pp. 169-190.

(23) D.L. Nelson and M.M. Cox, *Lehninger´s Principles of Biochemistry* (3rd ed.), 2000, Worth Publishers. New York, USA.

(24) K. V. Gobi and T. Ohsaka, *J.Electroanal.Chem.* 485 (2000)pp. 61-70.

(25) J.W. Larrick, M. Hirata, H. Zheng, J. Zhong, D. Bolin, J.M. Cavaillon, H. Shaw Warren and S.C. Wright, *J. Immun.*, 152 (1994) pp. 231-240.

(26) G. Priano, G. Gonzalez, M. Günther, and F. Battaglini, *Electroanalysis* 20 (2008), pp. 91-97.

(27) K. V. Gobi and T. Ohsaka, *J.Electroanal.Chem.* 485 (2000) pp. 61-70.

(28) R. Nystrand, *J. Chin. Med. Assoc.* 71 (2008) pp. 223-229.

(29) United States Pharmacopoeia 30 (2007).

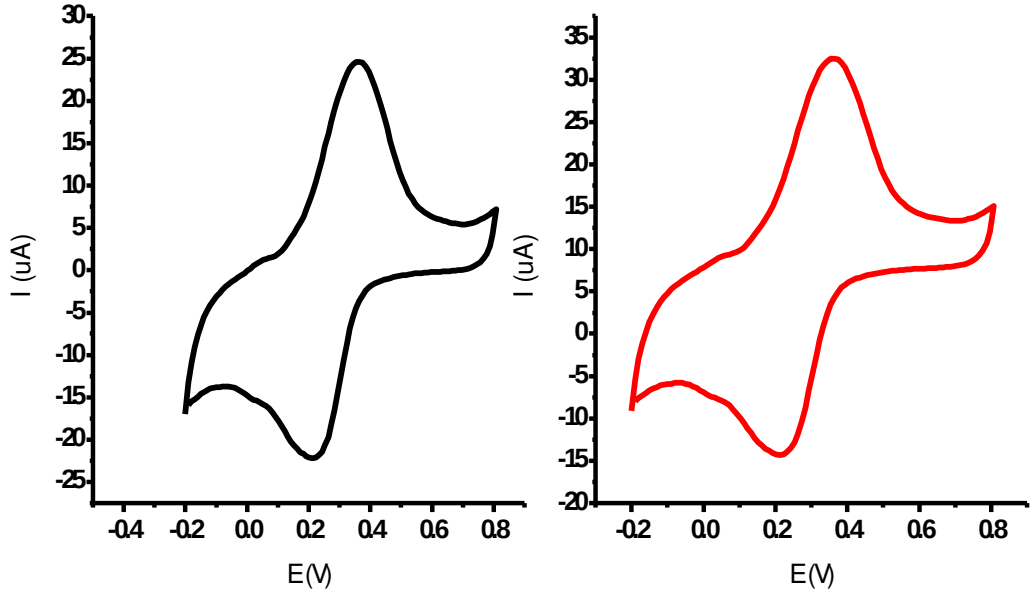
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(30) R. Schindler, W. Beck, R. Deppisch, M. Aussieker, A. Wilde, H. Gohl and U. Frei, *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2004) pp. 3207–3214.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

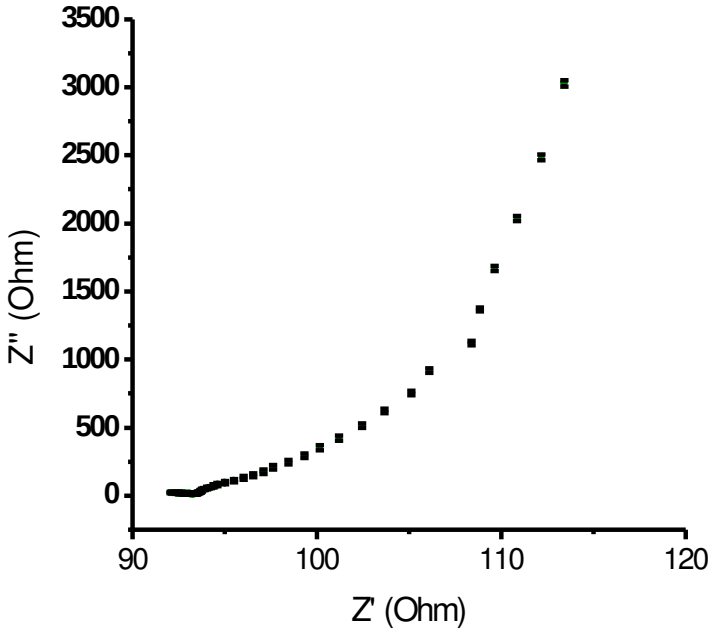
V.I.5. Apéndice

A.VI.1. **Voltametría del sensor CAP18F en agua apirógena (negro) y en solución fisiológica (rojo).**



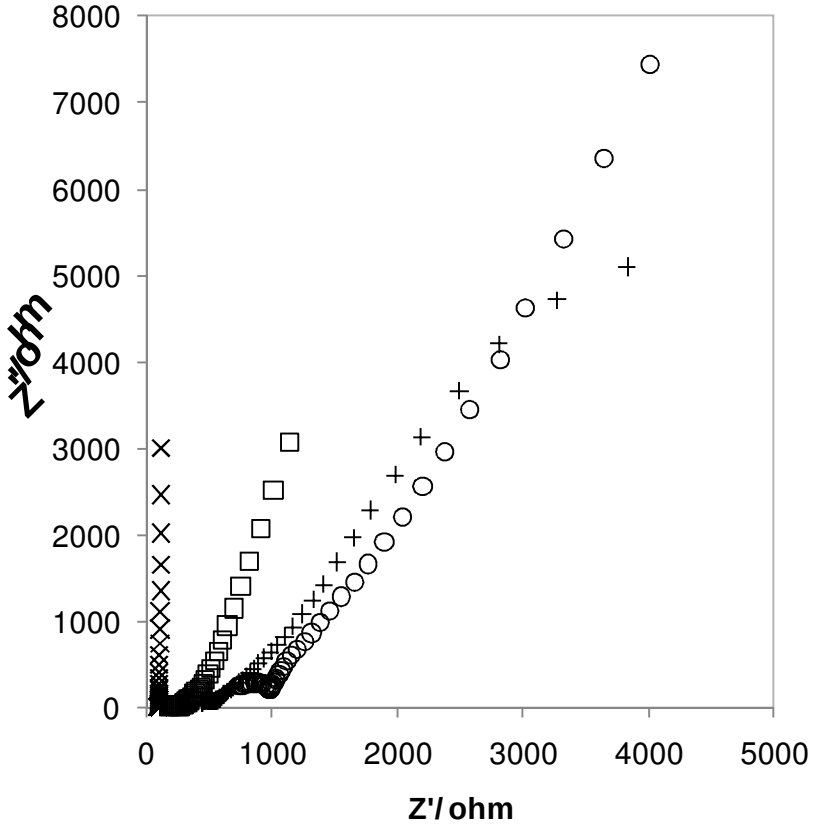
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

A.VI.2. **Respuesta de la superficie CAP18F en agua milli Q para ocho electrodos diferentes [Ejemplo: promedio de valores para la resistencia y resistencia capacitiva a 10 Hz son Z'= 94 ± 2 y Z''=82 ± 11 ohms (n=8)]**



PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

A.VI.3. **Respuesta de la superficie CAP18F para agua milli Q(X), LPS( ), DPGP(+)BSA ( ) y ADN (no se representa en el grafico debido a que posee valores de Z" muy pequeños).**



PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Capítulo VII

Conclusiones generales

Referencias

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

VII.1. Conclusiones Generales.

Como es conocido, PANI es un material muy interesante por varias razones: el monómero es económico, la reacción de polimerización es directa y se produce con un alto rendimiento, tiene una excelente estabilidad en presencia de ciertos oxidantes y ácidos fuertes; además posee propiedades redox bien definidas asociadas con los átomos de nitrógeno de las cadenas poliméricas[1]. Es por esto que ha sido ampliamente utilizado para el desarrollo de herramientas analíticas (sensores)[2]. Sin embargo, poco es lo que se ha logrado con este material para trabajar en forma eficiente a pH fisiológico, ya que PANI a pH mayores de 5 se desprotona convirtiéndose en un aislante y electroquímicamente inactivo. Para resolver este problema, muchos grupos han realizado estudios de modificación de PANI[3-7]. En base a estos trabajos nuestro grupo de investigación comenzó a trabajar en el desarrollo de sensores de PANI y su uso a pH neutro para cuantificar o determinar analitos de interés biológico.

La experiencia del grupo de trabajo en esta área comenzó la tesis doctoral del Dr. Raffa. En su trabajo de tesis, se comenzó a explorar la posibilidad de desarrollar copolímeros de anilina que posean actividad electroquímica a pH fisiológico y que a su vez sirvan para la unión de moléculas de reconocimiento que permitan determinar analitos específicos. Basándose en esto se logró sintetizar un copolímero entre anilina y 2-aminobencilamina, el cual permite la incorporación de otras moléculas (como por ejemplo: ferroceno-carboxialdehido) por métodos suaves a través de la reacción con el amino primario libre, presente en el copolímero[8].

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Por otra parte, se realizó una síntesis por vía química de un copolímero capaz de trabajar a pH neutro a través de la modificación de PANI con alquilsultonas, reemplazando un hidrógeno del átomo de nitrógeno de la PANI por un grupo alquílico, el cual está unido covalentemente este polímero. Este polímero modificado mostró importantes mejoras, reduciendo su resistencia eléctrica en 3 órdenes de magnitud con respecto a la PANI a pH fisiológicos, presentando una mayor estabilidad que otros materiales reportados previamente en literatura[5]. Además, este sistema combinado con peroxidasa permitió la construcción de sensores capaces de detectar concentraciones menores a 1ppm de peróxido de hidrogeno trabajando en rango fisiológico de pH[9].

Este trabajo de tesis surge como una continuación enfocándose en el desarrollo de sistemas que sean de fácil construcción, con alta reproducibilidad y que presenten mejoras en las propiedades electroquímicas para su uso como sensores.

Se exploró exitosamente la síntesis de un monómero derivado de anilina en el cual un hidrogeno del nitrógeno fue sustituido por un grupo propilsulfonato y posteriormente se evaluó la polimerización electroquímica del mismo, obteniéndose un polímero el cual se desprende del electrodo ya que presenta una gran solubilidad en medio acuoso por la presencia de los grupos sulfonato, como consecuencia de esto se probó la copolimerización de anilina junto a este monómero teniendo un mejor resultado para una relación anilina:PSA igual a 90:10. Este nuevo copolímero presenta una actividad electroquímica similar a la de anilina pero con importantes mejoras en la electroactividad a pH fisiológico. Con el fin de tener un mayor control en el diseño del electrodo se realizó un sistema por medio polimerización secuencial PANI/PSA, obteniendo dispositivos que presentan una actividad electroquímica

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

similar a la de anilina e importantes mejoras en la electroactividad a pH fisiológico, similares al anterior.

Por otra parte, fueron evaluadas las respuestas de ambos sistemas generados, en forma secuencial y por copolimerización, para la catálisis de ácido ascórbico. Por voltametría cíclica se obtuvo una respuesta amperométrica prácticamente al potencial termodinámico de la cupla, lo que permite ganar selectividad frente a otros analitos comúnmente presentes en las muestras que contienen ascórbico. También se pudo observar que el sistema generado por polimerización secuencial presentó una mayor sensibilidad a la presencia del analito, que llevó al desarrollo del sensor a ácido ascórbico fuese diseñado por polimerización secuencial, obteniendo respuestas similares ante la presencia del analito para los sensores PANI/PSA7 y PANI/PSA15, obteniéndose un límite de detección de 2,2 μM.

Los resultados obtenidos con estos electrodos mostraron una excelente estabilidad a pH neutro lo cual llevó al estudio fisicoquímico de las superficies diseñadas para poder comprender cuál es el mecanismo involucrado en la actividad redox de estos electrodos, lo que involucra entender las propiedades de transporte iónico que poseen estos copolímeros en medio ácido y en medio neutro. A su vez, resultó interesante realizar el mismo tipo de estudio para otros sistemas generados en forma similar pero utilizando otros monómeros en lugar del PSA (2ABA ó 3AFA) permitiendo así incorporar diferentes grupos funcionales en la superficie del electrodo, los cuales pueden ser modificados fácilmente para incorporar distintas moléculas de reconocimiento. Los estudios realizados mostraron importantes resultados como:

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

- **A través de experimentos realizados con balanza de microcristal de cuarzo se pudo establecer que la incorporación de PSA a la superficie del electrodo modificado con anilina es de forma asintótica; observándose que a partir de la séptima voltametría cíclica la incorporación de nuevo material es despreciable. Esto lleva a entender la similitud en las respuestas amperométricas para las superficies PANI/PSA7 y PANI/PSA15 ante la presencia de ácido ascórbico, esto hace a que se tome como modelo de estudio el sistema PANI/monómero7. Además resulta interesante destacar que el monómero PSA tiene una mayor incorporación a la superficie del electrodo con respecto a los otros monómeros, ya que este posee una cadena alquílica que sustituye al hidrógeno del grupo amino la cual aporta densidad electrónica haciendo a este monómero una molécula mas reactiva a la polimerización [10.11].**

- **La incorporación de estos monómeros generan una disrupción en el proceso de transferencia electrónica de la PANI en medio ácido, pero a su vez otorgan una buena actividad electroquímica en medio neutro permitiendo así el uso de la polianilina en el desarrollo de sistemas capaces de cuantificar analitos a pH mayores que 5.**

- **Cuando se evaluó el intercambio de iones en medio ácido se observó que para todas las superficies existe una masiva incorporación de solución, una vez que el polímero ha sido oxidado a esmeraldina. Este egreso de materia está asociado con la expulsión de protones, la cual puede verse claramente a partir de los resultados de PBD. El proceso más interesante que se da en estos electrodos modificados es la buena actividad**

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

electroquímica a pH 7, observándose por PBD que el intercambio iónico producido a pH neutro se debe a la incorporación y expulsión de aniones para cualquiera de ellos.

- **Estos nuevos electrodos modificados fueron utilizados en ensayos ambientales o biológicos utilizando espectroscopía de impedancia electroquímica sin la necesidad de utilizar sondas para la generación de una señal, a diferencia da la gran mayoría de los trabajos presentados en el área [12,13].**

Teniendo en cuenta el último punto antes enumerado y en base a la experiencia de nuestro grupo (Tesis doctoral del Dr. Pallarola), se decidió trabajar con la superficie PANI/3AFA, ya que los grupos carboxílicos presentes en la superficie del electrodo pueden ser activados por un método sencillo utilizando EDC y NHS para luego hacerlos reaccionar con agentes de reconocimiento que en su estructura posean grupos aminos, logrando así una unión de tipo covalente entre estos y la superficie del electrodo. Aprovechando esta estrategia se diseño una superficie anclando un agente quelante similar al NTA, la cual fue usada en conjunto con otra superficie (VP) para la detección y discriminación de iones metálicos de interés ambiental. La gran cantidad de información obtenida por la técnica de impedancia electroquímica se estudio utilizando métodos de análisis multivariados, logrando diseñar un arreglo de electrodos (Lengua electrónica) capaz de detectar la presencia metales de interés medio ambiental (e.g. aluminio, cadmio) en soluciones acuosas.

Utilizando el tipo de metodología descrita anteriormente y haciendo uso de los conocimientos de nuestro grupo en la detección de LPS (Tesis de la Dra. Priano y del Dr. Pallarola), se desarrollaron superficies

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

modificadas con moléculas capaces de interaccionar de diversas formas con el LPS. Estas superficies fueron utilizadas el desarrollo de una lengua electrónica.

Este dispositivo de fácil y económica fabricación permitió detectar y discriminar moléculas similares al LPS como fosfolípidos y productos mayoritarios de la lisis de las bacterias Gram-negativas (LPS, ADN y proteína), abriendo una nueva ruta para ampliar la detección de otras potenciales moléculas pro-inflamatorias[14]. Además el sistema ha demostrado ser muy sensible a la detección de LPS, proporcionando así una alarma útil para detectar las concentraciones endotoxina que sobrepasan el estricto nivel de umbral establecidos por la mayoría de las agencias reguladoras[15,16]. Por otra parte resulta interesante resaltar las grandes ventajas que ofrece este dispositivo, como ser: el ahorro de tiempo en los análisis, sin la necesidad de un operador con amplia experiencia, sin el requerimiento de pasos de lavado y sin necesidad de marcación de LPS o del agente de reconocimiento que ha sido la solución alternativa al ensayo LAL en los últimos años[17-21].

Ambas lenguas electrónicas pueden ser fácilmente adaptadas a nanoescala. Además se pueden realizar estos estudios sin la necesidad de hacer tratamientos previos de la muestra, pasos de lavados o adición de sondas. Ambos sistemas son fáciles de construir, económicos y el hecho de que los electrodos hayan sido modificados en conjunto (*"batches"*) garantiza la reproducibilidad del ensayo, sin tener que hacer el uso de referencias para el análisis de los datos.

Los copolímeros sintetizados en este trabajo son el punto de partido para dispositivos de reconocimiento basados en técnicas amperométricas o de espectroscopía de impedancia. En este último caso, el desarrollo presentado aquí permite el uso de una especie electroactiva unida a la

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

superficie del electrodo, evitando así el agregado de sondas; este tipo de sistema ha sido poco estudiado por el momento y solamente dos trabajos publicados en 2009 y 2010 son de nuestro conocimiento[22,23]. Como trabajo a futuro podría ser interesante desarrollar métodos que permitan cuantificar los analitos estudiados en esta tesis. Además este tipo de trabajo abre camino a una posible solución de problemas analíticos específicos, diseñando electrodos que interactúen en forma selectiva, ya sea incorporando aptámeros u otro tipo de moléculas de reconocimiento a la superficie.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

VII.2. Referencias.

(1) E. T. Kang, K. G. Neoh and K. L. Tan, *Prog. Polym. Sci.* 23 (1998) pp. 211-324.

(2) U. Langea, N. V. Roznyatovskaya and V. M. Mirsky, *Anal. Chim. Acta* 614 (2008), pp. I-26.

(3) P.N. Bartlett, P.R. Birkin, J.H. Wang, F. Palmisano and G. De Bendetto, *Anal. Chem.* 70 (1998), pp 3685-3694.

(4) P.N. Bartlett, J.H. Wang and E.N.K. Wallace, *Chem. Com.* (1996), pp 359-360.

(5)P.N. Bartlett and J.H. Wang, *Faraday Trans.* 92 (1996), pp 4137-4143.

(6)J. Y. Bergeron, J. W. Chevalier and L. H. Dao, *Chem. Comm.* (1990) pp. 180-182.

(7) S. A. Chen and G. W. Hwang, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) pp. 10055-10062.

(8) D. Raffa and F. Battaglini, *J. Electroanal. Chem.* 504 (2001) pp. 120-124.

(9)D. Raffa, K.T. Leung and F. Battaglini, *Anal. Chem.* 5 (2003) pp. 4983-87.

(10) L.G Wade Jr., *Organic Chemistry* (2nd. ed.), Pearson Education, Naucalpan de Juárez, México, (1993).

(11) M. Leclerc, J. Guay and L. H. Dao, *Macromolecules* 22 (1989), pp.649-653.

(12) E. Katz and I. Willner, *Electroanal.* 15 (2003) pp.913-947.

(13) M. C. Yang, J.E. Diaz; T.M. McIntire, G.A. Weiss, R.M. Penner, *Anal. Chem.* 80 (2008) pp.5695–5705.

(14) R.Schindler, *Blood Purification* (supplement1), 27 (2009) pp. 20–22.

(15) R. Nystrand, *J. Chin. Med. Assoc.* 71 (2008) pp. 223-229.

(16) United States Pharmacopoeia 30 (2007).

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(17) G. Priano and F. Battaglini, *Anal. Chem.*, 77 (2005) pp. 4976-4984.

(18) G. Priano, D. Pallarola and F. Battaglini, *Anal. Biochem.*, 362 (2007) pp. 108-116.

(19) D. Pallarola and F.Battaglini, *Anal. Chem* 81 (2009) pp. 3824-2829.

(20) S.Voss, R. Fischer, G. Jung, K.-H.Wiesmuller, and R. Brock, *J.Am.Chem.Soc.* 129 (2007) pp. 554-561.

(21) G. Jones II and H. Jiang, *Bioconjug. Chem.,* 16 (2005) pp. 621-625.

(22) F.Giroud, K. Gorgy, C. Gondran, S. Cosnier, D.G. Pinacho, M.P. Marco and F.J. Sánchez-Baeza, *Anal. Chem.* 81 (2009), pp. 8405–8409.

(23) I.Hafaida, S. Chebilc, H. Korri-Youssoufic, F. Bessueillea, A. Errachida, Z. Sassi, Z. Ali, A. Abdelghanie, and N. Jaffrezic-Renault, *Sens. Actuators, B* 144 (2010), pp. 323-331.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com